

Oncofertilidad: criopreservación de tejido ovárico

Alberto Valcarcel

IFER, Instituto de Fertilidad. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Reproducción 2018;33(4):17-31

Resumen

A medida que aumenta el número de mujeres jóvenes y niñas prepuberales sobrevivientes de cáncer, la calidad de vida después del tratamiento es una consideración cada vez más importante. Tanto en las mujeres jóvenes como en las niñas prepuberales, la quimioterapia y la radioterapia pueden conducir a gonadotoxicidad, daño ovárico, disminución de la cantidad de oocitos y pérdida de potencial reproductivo. A las mujeres jóvenes se les pueden ofrecer distintas alternativas de preservación de la fertilidad: criopreservación de embriones, de oocitos y criopreservación y autotrasplante de tejido ovárico. Para niñas prepuberales, la congelación de tejido ovárico y el autotrasplante futuro son las alternativas más aceptables. Existen dos metodologías disponibles para la criopreservación de tejido ovárico: el congelamiento lento y la vitrificación. A nivel mundial, se han reportado a la fecha 87 nacimientos en 69 mujeres, de un total de 318 mujeres que realizaron trasplante

de tejido ovárico criopreservado. La experiencia del IFER en preservación de tejido ovárico comprende 42 pacientes jóvenes con diagnóstico de cáncer, que criopreservaron tejido ovárico antes de iniciar su tratamiento oncológico. Dos pacientes realizaron descongelamiento y autotrasplante del material. Ambas recuperaron su actividad hormonal. Una de ellas no buscó embarazo, mientras que la otra logró dos nacimientos vivos.

Palabras claves. Niña prepuberal, cáncer, preservación, autotrasplante, tejido ovárico.

Oncofertility: cryopreservation of ovarian tissue

Summary

As the number of young women and prepubertal girls surviving cancer increases, life quality after treatment is becoming an increasingly important consideration. Both in young women and in prepubertal girls, chemotherapy and radiotherapy can lead to gonadotoxicity, ovarian damage, decreased number of oocytes and loss of reproductive potential. For young women, different fertility preservation alternatives can be offered: cryopreservation of embryos and oocytes and cryopreservation and future transplantation of ovarian tissue. In prepubertal girls, freezing of ovarian tissue and future transplantation are the most acceptable alternatives. There are two available methodologies

Correspondencia: Alberto Valcarcel
Marcelo T. de Alvear 2259, IFER (Instituto de Fertilidad),
Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina
Correo electrónico: avalcarcel@hotmail.com

for cryopreservation of ovarian tissue: slow freezing and vitrification. As a global level, a total of 87 births have been reported to date in 69 women, out of a total of 318 women who underwent cryopreserved ovarian tissue transplantation. The IFER experience in ovarian tissue preservation includes 42 young patients diagnosed with cancer, who cryopreserved ovarian tissue before initiating their oncological treatment. Two patients performed thawing and tissue auto-transplant. Both recovered their hormonal activity. One of them did not seek pregnancy, while the other achieved two live births.

Key words. *Prepubertal girl, cancer, fertility preservation, auto-transplant, ovarian tissue.*

Introducción

El último Reporte Mundial de Cáncer, realizado por la OMS en 2014, señala que en el 2012 se diagnosticaron 14 millones de nuevos casos y 8 millones de muertes relacionadas con cáncer, y estima que para el 2025 habrá anualmente más de 22 millones de nuevos casos y más de 13 millones de muertes.¹

Un trabajo reciente publicado en *Lancet*² indica que en los últimos 15 años se han diagnosticado 37.513.025 pacientes con cáncer en 71 países que reportan su información al CONCORD Working Group, que es un grupo de investigadores de cáncer nucleados en el London School of Hygiene & Tropical Medicine y que registra los 18 tipos de cáncer más frecuentes en humanos, los que representan el 75% del total de los cánceres. Esto indica aproximadamente unos 2,5 millones de diagnosticados por año en estos países. Estas cifras son concordantes con el informe de la Sociedad Americana de Cáncer,³ que indica que 810.170 mujeres fueron diagnosticadas con cáncer durante 2015 en los Estados Unidos. Entre las mujeres sobrevivientes de cáncer, una de cada 250 está en edad reproductiva (aproximadamente 3240 por año). Según Salama y col.,⁴ el número de niñas prepuberales diagnosticadas en 2014 con cáncer en los Estados Unidos rondó los cinco mil casos, con una tasa de supervivencia a cinco años del 82% debido a los avances en el diagnóstico y el tratamiento

temprano. El informe de la Sociedad Americana de Cáncer indica también que la cifra estimada a nivel mundial de niñas prepuberales diagnosticadas con cáncer anualmente rondaría los 82.000 casos.³ Concordantemente, el Registro Alemán de Cáncer Infantil estimó en 2014 que el número de niñas prepuberales diagnosticadas anualmente con cáncer en Alemania es de aproximadamente 1000, con una tasa de supervivencia a 5 años del 81%.⁵

La pubertad en las niñas se refiere al proceso fisiológico de cambios secuenciales endocrinos, físicos y psicológicos que conducen al desarrollo de las funciones sexuales y reproductivas. Con cierta variabilidad observada según factores genéticos, ambientales y nutricionales, la pubertad en las niñas comienza usualmente a la edad de 9-11 años y se completa a la edad de 15-17 años.⁶⁻⁸ Por definición, las niñas prepuberales son las niñas que no han comenzado o completado la pubertad (de 0 a 15 años).⁹ Desde el punto de vista biológico, las niñas prepuberales tienen un gran potencial reproductivo debido a la gran cantidad de oocitos en sus ovarios. El número máximo de oocitos es de aproximadamente 7 millones durante la vida intrauterina media,^{10, 11} luego desciende a aproximadamente 2 millones al nacer y a casi medio millón en la pubertad.^{11, 12} Sin embargo, cuando una niña prepuberal es expuesta para el tratamiento del cáncer a quimioterapia y radioterapia agresivas, la gonadotoxicidad ocurre como un efecto secundario que puede provocar daño ovárico grave, agotamiento completo de los oocitos y pérdida permanente del potencial reproductivo.¹³⁻¹⁸

Los cánceres más comunes en las niñas prepuberales en los Estados Unidos son la leucemia (31%), las neoplasias del sistema nervioso central (21%) y el linfoma (10%).¹⁹ Del mismo modo, los reportes en Alemania indican que son la leucemia (30,9%), las neoplasias del sistema nervioso central (23,7%) y el linfoma (14,1%).⁵

A medida que aumenta el número de mujeres jóvenes y niñas prepuberales sobrevivientes de cáncer, la calidad de vida después del tratamiento del cáncer se está convirtiendo en una consideración cada vez más importante, en particular en países como los Estados Unidos, Canadá, Australia, Nueva Zelanda, Finlandia, Islandia, Noruega y Suecia, donde los porcentajes de supervivencia son los más altos del mundo.^{2, 20}

El objeto de esta revisión es presentar una actualización de las opciones disponibles para preservar el potencial reproductivo de mujeres jóvenes y niñas prepuberales diagnosticadas con cáncer, así como presentar la experiencia del IFER en congelamiento de tejido ovárico y su trasplante.

Tratamiento del cáncer y gonadotoxicidad

Tanto en las mujeres jóvenes como en las niñas prepuberales, la quimioterapia y la radioterapia pueden conducir a gonadotoxicidad, daño ovárico, disminución de la cantidad de oocitos y posterior riesgo de pérdida de potencial reproductivo.²¹ Estas consecuencias se relacionan principalmente con dos elementos: **1)** tipo, esquema de fraccionamiento, dosis y campo de irradiación utilizado,^{18, 22-24} y **2)** la edad de la paciente al comienzo del tratamiento.²²⁻²⁴ La quimioterapia es la primera línea de tratamiento para la mayoría de los cánceres infantiles. Agentes alquilantes como ciclofosfámda, ifosfámda y procarbazina son los regímenes más gonadotóxicos para el ovario. La radioterapia puede usarse sola o en combinación con quimioterapia para el tratamiento de algunos cánceres infantiles y cánceres en mujeres jóvenes.²¹

Los oocitos son de las células más sensibles a la radiación.²⁵ La radioterapia pélvica, abdominal y total son las más gonadotóxicas para el ovario, con dosis efectivas de esterilización total de 20,3 Gy al nacer, 18,4 Gy a los 10 años y 16,5 Gy a los 20 años.²⁶⁻²⁸ El 50% de los oocitos humanos inmaduros pueden destruirse por exposición a 2 Gy de radiación.^{13, 25}

En las niñas prepuberales con cáncer, se estima que el riesgo de pérdida del potencial reproductivo es:

1) Alto (mayor de 80%) en la irradiación corporal total, la radioterapia pélvica localizada, el acondicionamiento de la quimioterapia para el trasplante de médula ósea, en la enfermedad de Hodgkin tratada con agentes alquilantes, el sarcoma de tejidos blandos (estadio IV) y el sarcoma de Ewing metastásico.

2) Moderado (entre 20 y 80%) en la leucemia mieloblástica aguda, el hepatoblastoma, el osteosarcoma, el sarcoma de Ewing (estadio II o III), el neuroblastoma, el linfoma no Hodgkin, la En-

fermedad de Hodgkin (tratamiento alternante), la radioterapia craneoespinal e irradiación craneal en dosis mayores a 24 Gy.

3) Bajo (menor a 20%) en la leucemia linfoblástica aguda, el tumor de Wilms, el sarcoma de tejidos blandos (estadio I), los tumores de células germinales (con preservación gonadal y sin radioterapia), el retinoblastoma y la irradiación craneal en dosis menores a 24 Gy.^{13, 15, 16} Además del riesgo de pérdida de potencial reproductivo, las mujeres adultas sobrevivientes de cánceres infantiles, particularmente aquellas tratadas con radioterapia abdominal o cerebral, muestran bajos resultados reproductivos, que incluyen abortos espontáneos, parto prematuro y bajo peso al nacer.²⁹⁻³³

Alternativas de preservación de la fertilidad

Para las mujeres jóvenes con cáncer se pueden ofrecer distintas alternativas de preservación de la fertilidad:

a) Opciones establecidas como clínicas, que incluyen la criopreservación de embriones y la criopreservación de oocitos;

b) opciones consideradas aún como experimentales, como la criopreservación y el autotrasplante de tejido ovárico.

Adicionalmente, existen una serie de opciones no clínicas de preservación de la fertilidad que se encuentran en distintas fases de investigación y desarrollo, como el cultivo *in vitro* a partir de folículos primordiales, el xenotrasplante, el autotrasplante de ovario artificial, la congelación de ovario completo y las técnicas de protección ovárica.³⁴⁻³⁶

Criopreservación de embriones y de oocitos

Para las niñas prepuberales diagnosticadas con cáncer, las primeras de estas opciones antes mencionadas no son viables, ya que requieren estimulación ovárica previa y recuperación posterior de oocitos maduros, situación no factible antes de la pubertad debido a que el eje hipotálamo-hipófisis-ovario se encuentra inactivo.

En el caso de mujeres jóvenes diagnosticadas con cáncer, la primera opción, de ser posible, es la criopreservación de embriones.³⁷ Esta es una técnica ampliamente utilizada y estandarizada, con

excelentes resultados a la fecha.³⁸⁻⁴³ Sin embargo, el procedimiento clásico de crioconservación de embriones requiere aproximadamente dos semanas, por lo que no es una opción para mujeres que tienen cánceres agresivos y deben comenzar el tratamiento oncológico de inmediato. Debido a que deben someterse a una estimulación ovárica con hormonas para producir óvulos maduros, esta opción tampoco se recomienda para las mujeres que tienen cánceres sensibles a las hormonas.

La segunda opción disponible para pacientes oncológicas jóvenes es la criopreservación de oocitos.⁴⁴ Desde el año 2013, los procedimientos para la criopreservación de oocitos ya no se consideran experimentales.⁴⁵ Este procedimiento está ampliamente validado en mujeres que realizan procedimientos de reproducción asistida y no desean criopreservar embriones,⁴⁶ y en mujeres que postergan su maternidad por diversas razones.⁴⁷ ⁴⁸ Así, la criopreservación de oocitos proporciona una alternativa a la crioconservación de embriones para aquellas pacientes oncológicas que no tienen pareja o no quieren usar espermia donado. Sin embargo, al igual que la criopreservación embrionaria, la crioconservación de oocitos implica la utilización de hormonas y estimulación del ovario, por lo que este método no es sugerido para mujeres con cánceres que requieren tratamiento inmediato, cánceres sensibles a hormonas, o para niñas prepuberales.

Los oocitos recolectados luego de una estimulación ovárica se pueden criopreservar como oocitos maduros (estadio MII) o como oocitos inmaduros (estadio MI o vesícula germinal). Si bien en un principio se pensaba que la criopreservación de oocitos inmaduros podía ser equivalente a la de oocitos maduros, una serie de estudios han mostrado que los oocitos maduros criopreservados lograron mejores resultados en comparación con oocitos inmaduros criopreservados y madurados *in vitro* luego de su descongelación.^{49, 50} Por esta razón, actualmente se sugiere que los oocitos inmaduros captados sean madurados *in vitro* hasta el estadio de MII y luego criopreservados como oocitos maduros.⁵⁰⁻⁵²

Debido a las contraindicaciones mencionadas para la estimulación ovárica clásica, recientemente se han desarrollado dos tipos nuevos de estimulación ovárica, uno de ellos para pacientes jóvenes con cáncer que deban comenzar el trata-

miento oncológico de inmediato (conocido con el nombre de “estimulación de inicio aleatorio”), y el otro para mujeres con cánceres sensibles a hormonas (“estimulación por uso de inhibidores de aromatasas o de tamoxifeno”).⁵³⁻⁵⁵

En la estimulación de inicio aleatorio, la estimulación ovárica se inicia independientemente de la fase del ciclo.^{56, 57} Este protocolo se basa en el concepto reciente de que hay múltiples oleadas de reclutamiento de folículos dentro de un único período interovulatorio.⁵⁸ Además, este enfoque es posible porque el propósito del protocolo es recuperar oocitos maduros del ovario y no requiere la preparación completa del útero. Este protocolo minimiza las demoras en el inicio del tratamiento oncológico. Los resultados indicarían que el número de oocitos totales y maduros recuperados y las tasas de fecundación no diferirían de los obtenidos con ciclos convencionales de estimulación ovárica.^{54, 59-61}

La posibilidad de iniciar aleatoriamente el ciclo de estimulación permite, si hay tiempo suficiente, maximizar el resultado del ciclo realizando dos estimulaciones consecutivas de inicio aleatorio.⁶²

En la estimulación por el uso de inhibidores de aromatasas para pacientes con tumores sensibles a estrógenos, como el cáncer de mama, se ha utilizado la administración diaria de letrozol durante la estimulación ovárica para prevenir el aumento de niveles de estradiol circulante. De esta manera se alcanzan valores fisiológicos de estradiol y no se afecta la cantidad de oocitos recuperados, aunque se informó una menor tasa de maduración de los oocitos en los ciclos de letrozol en algunos estudios.^{54, 63} Este protocolo se usa solamente para obtener oocitos para la criopreservación, después de lo cual los pacientes pueden proceder a su tratamiento oncológico planificado. Con una intención semejante se utilizan esquemas de estimulación con tamoxifeno (modulador de receptores estrogénicos), que en presencia de valores suprafisiológicos de estradiol bloquea los receptores estrogénicos presentes en los tumores. Estas estimulaciones tienen menor recuperación de oocitos que las realizadas con letrozol.⁶⁴

En ambas estimulaciones, la descarga realizada con agonistas de GnRH en lugar de HCG colabora con la disminución del riesgo en tumores hormonosensibles.⁶⁵

Hasta el momento, los datos prospectivos so-

bre el riesgo de la recurrencia del cáncer de mama en pacientes sometidos a estimulación ovárica con el protocolo de letrozol son tranquilizadores, cuando se lo compara con el riesgo de recurrencia en mujeres con cáncer de mama que no se sometieron a estimulación ovárica.^{66,67}

Criopreservación y autotrasplante de tejido ovárico

Dentro de las opciones experimentales, la criopreservación de tejido ovárico, a diferencia de la criopreservación de oocitos o embriones, no requiere de estimulación ovárica hormonal o un retraso en el inicio de la terapia contra el cáncer, y no hay necesidad de un compañero o donante de esperma.

La criopreservación de tejido ovárico puede ser la mejor opción para preservar la fertilidad para mujeres jóvenes que no desean usar esperma donado y para niñas prepúberes. Sin embargo, este procedimiento es invasivo y requiere anestesia general y extirpación quirúrgica del tejido del ovario. La cantidad de oocitos inmaduros contenidos en los folículos dentro del ovario es dependiente de la edad, y se ha sugerido que esta técnica no debe ser ofrecida a mujeres mayores de 39 años.^{68,69}

La congelación de tejido ovárico implica la extracción del tejido en forma quirúrgica, su congelación, su posterior descongelación y el trasplante del material al mismo paciente (autotrasplante). Según las pautas más recientes de preservación de la fertilidad femenina, la congelación de tejido ovárico y el autotrasplante aún se consideran experimentales.^{35,36,69-71} En las niñas prepúberes, se recomienda extraer la mitad o un ovario mediante laparoscopia o minilaparotomía antes de iniciar la quimioterapia o la radioterapia. Si el riesgo de pérdida de potencial reproductivo es mínimo o moderado, la extracción de menos de la mitad de un ovario (20-30%) puede ser suficiente.⁷² Después de la extracción quirúrgica, la corteza ovárica que contiene la gran mayoría de los oocitos se separa de la médula y se corta en trozos o tiras ultra finas (~ 10 × 5 × 1 mm cada uno), como paso previo a la congelación. Al congelar el tejido ovárico cortical, la mayoría de los oocitos se conservan, así como el potencial reproductivo. El método estándar para la congelación de tejido ovárico cortical es la congelación lenta.⁷³⁻⁷⁹

Los rápidos avances en los métodos de vitrificación han llevado a la criopreservación exitosa de embriones y oocitos maduros. Sin embargo, a diferencia de la criopreservación de embriones y oocitos, los primeros estudios que compararon la congelación lenta y la vitrificación del tejido ovárico presentaron resultados contradictorios.^{76,80,81} La mayoría de los nacimientos vivos humanos reportados se lograron después del trasplante de tejido ovárico que se había congelado lentamente,^{82,83} y solo hay unos pocos informes de nacimientos vivos a partir del trasplante de tejido ovárico humano vitrificado.^{84,85} Esto probablemente se deba a la reciente incorporación de la vitrificación como metodología de criopreservación de tejido ovárico. Los resultados de estudios recientes muestran que tanto la vitrificación como la congelación lenta son capaces de preservar la morfología folicular y estromal,⁸⁶ y un metaanálisis realizado por Shi y col. sugiere que la vitrificación sería más efectiva que la congelación lenta en el mantenimiento de las células primordiales y estromales.⁸⁷

Después de la congelación o vitrificación, el tejido ovárico cortical se almacena en nitrógeno líquido a -196°C. Una vez que la paciente oncológica es dada de alta de su enfermedad, su tejido ovárico almacenado se puede descongelar y volver a trasplantar a ella (autotrasplante). En el caso particular de niñas prepúberes, el trasplante se debe realizar después de la pubertad. El autotrasplante de tejido ovárico congelado/descongelado puede ser ortotópico (en sitios pélvicos) o heterotópico (en sitios extrapélvicos).^{68,71,88-92}

El autotrasplante ortotópico. Implica el trasplante del tejido ovárico congelado-descongelado en sitios pélvicos como el ovario restante, el ligamento ancho del útero o el peritoneo de la fosa ovárica. La técnica puede realizarse por laparoscopia o minilaparotomía.⁹³

Según los estudios publicados hasta la fecha, se necesitan aproximadamente entre 4 y 6 meses después del trasplante de tejido de la corteza ovárica para la reanudación del desarrollo folicular, con un aumento en los niveles de estradiol.⁹⁴ Esto es consistente con el hecho de que se requiere de un período de 4 a 6 meses para que un folículo primordial progresa a la etapa de folículo an-

tral grande con un oocito maduro. Otros autores indican entre 2 y 9 meses como el lapso para la reanudación del desarrollo folicular, permitiendo el embarazo espontáneo.⁹⁵⁻¹⁰⁰ Solo un 5% de los casos autotrasplantados no recuperaron la función endócrina.¹⁰¹

Desde que en 2004 Donnez y col. informaron el primer embarazo y nacimiento exitoso de trasplante de tiras de corteza ovárica criopreservadas,¹⁰² se han reportado a la fecha un total de 87 nacimientos en 69 mujeres, de un total de 318 mujeres que realizaron 360 procedimientos de trasplante de tejido ovárico criopreservado a nivel mundial. De los 131 embarazos registrados en 95 pacientes, el 51% correspondieron a concepción espontánea, 33 % a procedimientos de reproducción asistida de alta complejidad, 1% a inseminación y del resto no se dispone de la información.¹⁰¹⁻¹⁰⁵ Casi todos los embarazos y nacimientos se debieron al autotrasplante ortotópico del tejido ovárico congelado después de la pubertad.¹⁰⁶ Se ha establecido que la posibilidad de un nacimiento vivo después del injerto del tejido ovárico es de aproximadamente entre un 20 y 30%.^{82, 107}

Recientemente se ha publicado la recriopreservación exitosa de tejido ovárico que había sido congelado y trasplantado, y luego nuevamente extirpado, criopreservado y descongelado.¹⁰⁸

Demeestere y col. reportaron el primer caso de un embarazo espontáneo y nacimiento después del autotrasplante combinado en sitios ortotópico y heterotópico de tejido ovárico congelado durante la infancia.¹⁰⁹ Este resultado positivo confirma la viabilidad de esta técnica para preservar la salud reproductiva potencial de niñas prepuberales con cáncer.^{36, 110}

El autotrasplante heterotópico. Implica el retrasplante del tejido ovárico congelado/descongelado a la misma paciente en sitios extrapélvicos como el espacio subcutáneo del antebrazo o la pared abdominal. Esta técnica es quirúrgicamente más fácil y generalmente está indicada cuando el autotrasplante ortotópico no es posible debido a adherencias pélvicas inducidas por la radioterapia severa. De dos a nueve meses después del autotrasplante heterotópico exitoso, las funciones ováricas pueden reanudarse, pero el embarazo solo es po-

sible después de la realización de una técnica reproductiva de alta complejidad.^{95, 96, 98-100} En todo el mundo, esta técnica ha resultado en tres bebés sanos y se debieron al autotrasplante heterotópico de tejido ovárico congelado después de la pubertad.^{108, 111} Hasta la fecha, no se ha informado el nacimiento vivo después del autotrasplante heterotópico de tejido ovárico congelado durante la infancia. Sin embargo, esta técnica puede ofrecer a las niñas prepuberales con cáncer una nueva esperanza, ya que puede ser una buena alternativa al autotrasplante ortotópico en caso de adherencias pélvicas.

Después del trasplante, la función ovárica continúa por aproximadamente cinco años en promedio.^{82, 112} Las causas de la baja tasa de supervivencia folicular después del trasplante del tejido ovárico son la lesión crioinducida al criopreservar/descongelar y el daño isquémico. Una correcta angiogénesis es esencial para la preservación de los folículos y el aumento de la vida útil del tejido trasplantado.¹¹³

Las principales críticas al procedimiento de congelación/descongelación de tejido ovárico y su autotrasplante radican en el riesgo de reintroducir células malignas,^{114, 115} y la relativamente corta duración de los trasplantes de tejido ovárico.¹¹⁶⁻¹¹⁸ Con respecto a la primera de las críticas, Gellert y col. realizaron una exhaustiva revisión bibliográfica en la que muestran que, del total de pacientes oncológicas que tuvieron recurrencia de la enfermedad, en ninguno de los casos esta recurrencia pudo ser asociada al trasplante del tejido ovárico.¹⁰¹

De todos modos, para minimizar el riesgo de reintroducir células malignas, se han postulado una serie de recomendaciones y medidas antes del autotrasplante que incluyen: examen histológico, inmunohistoquímico, reacción en cadena de la polimerasa y, a largo plazo, el xenoinjerto de una pequeña porción de tejido ovárico para excluir malignidad. Otra recomendación es la contraindicación absoluta de autotrasplante en caso de cánceres de ovario o en tumores malignos que pueden hacer metástasis en ovarios, como leucemia y otras enfermedades malignas hematológicas (alto riesgo), mientras que la contraindicación es relativa en el caso de cánceres gastrointestinales (riesgo moderado), cánceres de hueso y de tejido conectivo (bajo riesgo).¹¹⁹⁻¹²⁴

Opciones no clínicas de preservación de fertilidad que se encuentran en distintas fases de investigación y desarrollo

Finalmente mencionaré algunas de las opciones en distintas fases de investigación y desarrollo. A la fecha, algunos grupos han estudiado la maduración *in vitro* de folículos antrales de tejido ovárico,^{34, 125, 126} el cultivo *in vitro* de folículos primordiales,^{119, 127} el xenotrasplante de tejido ovárico humano¹²⁸⁻¹³² y el autotrasplante de ovario artificial hecho de matriz de matrigel de alginato en tres dimensiones y cargado con folículos extraídos de los ovarios de la misma paciente.^{130, 131, 133-136}

Las primeras dos opciones tienen desafíos pendientes que se centran en el desconocimiento de las condiciones óptimas de cultivo durante los largos períodos de cultivo requeridos.^{119, 130, 132} El ovario artificial, aunque se encuentra en su etapa inicial de desarrollo, ha mostrado resultados prometedores en modelos animales.^{113, 137-139}

Otras aproximaciones al tema centran su atención en la protección ovárica contra la quimioterapia y la radioterapia. Varios grupos han estudiado el autotrasplante de ovario entero con su pedículo vascular, que previamente había sido congelado/descongelado. Estos estudios fueron realizados en modelos animales o en humanos. Esta técnica requiere la extirpación quirúrgica de uno de los ovarios con una gran parte de su pedículo vascular, luego crioperfusión y finalmente el congelamiento lento o la vitrificación. Después de descongelar, se realiza el autotrasplante y la anastomosis microvascular de los vasos ováricos en la misma paciente a través de una minilaparotomía o laparotomía. Desafortunadamente, esta técnica tiene mayores riesgos para producir daños en el material por el proceso de congelación en sí mismo, la reintroducción de células malignas, así como mayores complicaciones vasculares posoperatorias. Hasta la fecha, el trasplante de ovario completo congelado/descongelado no ha producido nacimientos vivos en mujeres adultas.¹⁴⁰⁻¹⁴⁴

Dentro de las técnicas de protección ovárica contra la quimioterapia gonadotóxica y la radioterapia, y que se encuentran en fase de investigación y desarrollo, debemos mencionar las técnicas quirúrgicas y no quirúrgicas. Las técnicas quirúrgicas incluyen la transposición de los ovarios (ooforopexia), mien-

tras que las técnicas no quirúrgicas incluyen el uso de análogos de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y el fraccionamiento de dosis de quimioterapia y radioterapia.¹⁴⁵⁻¹⁵⁵ El fraccionamiento de dosis de quimioterapia y radioterapia puede reducir la gonadotoxicidad.^{34-36, 156, 157}

A la fecha, la utilización de la ooforopexia se considera discutible y no es factible cuando se usa quimioterapia.^{34-36, 69, 156, 157} Por su lado, el efecto del uso de análogos de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) es muy debatido y no es factible cuando se usa radioterapia.¹⁵⁸⁻¹⁶¹ Sin embargo, el fraccionamiento de dosis de quimioterapia y radioterapia parecería que podría reducir la gonadotoxicidad.^{34, 36, 156}

La experiencia de IFER

Nuestra experiencia en el tema comprende desde enero de 2002 y hasta la fecha un total de 42 pacientes jóvenes no puberales con diagnóstico de cáncer, que procedieron a criopreservar tejido ovárico antes de iniciar su tratamiento oncológico. Del total de pacientes que criopreservaron, 19 fueron diagnosticadas con cáncer de mama, 6 con cáncer de cuello de útero, 10 con enfermedad de Hodgkin, 6 con leucemia mieloide crónica y 1 con tumor de Askin.

De las 42 pacientes que criopreservaron, 2 fallecieron (4,8%), 38 no han requerido la utilización del material a la fecha (90,4%) y 2 procedieron al descongelamiento y autotrasplante del material (4,8%).

En la mayoría de los casos (40), el tejido ovárico fue procesado, criopreservado y descongelado de acuerdo con la metodología descrita por Newton e Illingworth,⁷³ con algunas modificaciones. El método de criopreservación utilizado en estos casos fue el método lento.

Recientemente se incorporó la vitrificación de tejido ovárico como metodología de preservación en el IFER, contando con dos casos almacenados a la fecha. En estos casos se siguió la metodología descrita por Kagawa y col.¹⁶² Ninguno de estos casos fue descongelado a la fecha.

Técnica de congelamiento lento de tejido ovárico

Obtención de la pieza de tejido ovárico. Las piezas de tejido ovárico extraídas en quirófano se

colocaron en un tubo de 50ml (Falcon, Corning Science México, México) que contenía medio Leibovitz (Leibovitz's L-15 (1x), GIBCO, Life Technology, Grand Island, USA) suplementado con 10% (v/v) de sustituto sintético de suero (SSS, Serum Substitute Supplement, Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA) a 37°C. Así fueron llevadas hasta el laboratorio en donde se colocaron en una placa de Petri mediana estéril con medio Leibovitz suplementado limpio, y se procedió a la bisección y separación de la porción medular con un bisturí. Así, la corteza medular obtenida fue cortada en tiras ultrafinas de $\sim 10 \times 5 \times 1$ mm cada una de ellas.

Criopreservación por congelamiento lento.

Se preparó una solución crioprotectora consistente en etilenglicol (Ethylene glicol anhydrous 99,8%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA) a una concentración de 1,5 mol/l en medio Leibovitz suplementado con 10% de SSS. La solución crioprotectora se alicuotó en crioviales de 1,8 ml (Nalgene, Nue-

va York, NY, EEUU) y se mantuvo a 4 °C hasta su uso. Las piezas de tejido ovárico se transfirieron a crioviales (dos tiras por tubo) y se hicieron rodar suavemente sobre un mezclador Coulter (Coulter Electronics Ltd., Herts, Reino Unido) durante 25 minutos a 4 °C para permitir el equilibrio del agente crioprotector. Los viales se enfriaron en una congeladora de etanol programable (SISTEL Modelo CM-02, Industria Argentina) de la siguiente manera: (I) se enfrió a -2 °C/min desde 4 °C hasta -9 °C; (II) luego se mantuvo durante 6 minutos a -9 °C; (III) se indujo la formación de cristales (seeding, en inglés) a -9 °C manualmente; (IV) se mantuvo durante 4 minutos más a -9 °C; (V) se enfrió a -0,3 °C/min desde -9 °C hasta -40 °C. A esta temperatura los viales se sumergieron en nitrógeno líquido a -198 °C.

Descongelación del tejido ovárico y trasplante. Para la descongelación del material, se tomó un criovial individual (que contenía dos ti-

Figura 1. Preparación y reinscripción del tejido ovárico descongelado (Lorenzo, exposición oral, ASRM 2017).



ras de tejido ovárico) y se descongeló sumergiendo el criovial en baño térmico a 20 °C durante 1-2 minutos (~100°C/min). El tejido luego se lavó repetidas veces con medio Leibovitz fresco hasta ser preparado por el cirujano para ser injertado, como lo muestra la Figura 1 (fotografías tomadas de Lorenzo, exposición oral, ASRM 2017).

Ambas pacientes autotrasplantadas recuperaron su actividad hormonal. Una de ellas no buscó embarazo, mientras que la otra logró dos nacimientos vivos (correspondiente a la paciente con tumor de Askin). El primero de los embarazos fue en forma espontánea con el nacimiento de un varón de 2,9 kg de peso mientras que el segundo embarazo fue por inseminación, con el nacimiento de una niña de 3,3 kg de peso.¹⁰³⁻¹⁰⁵

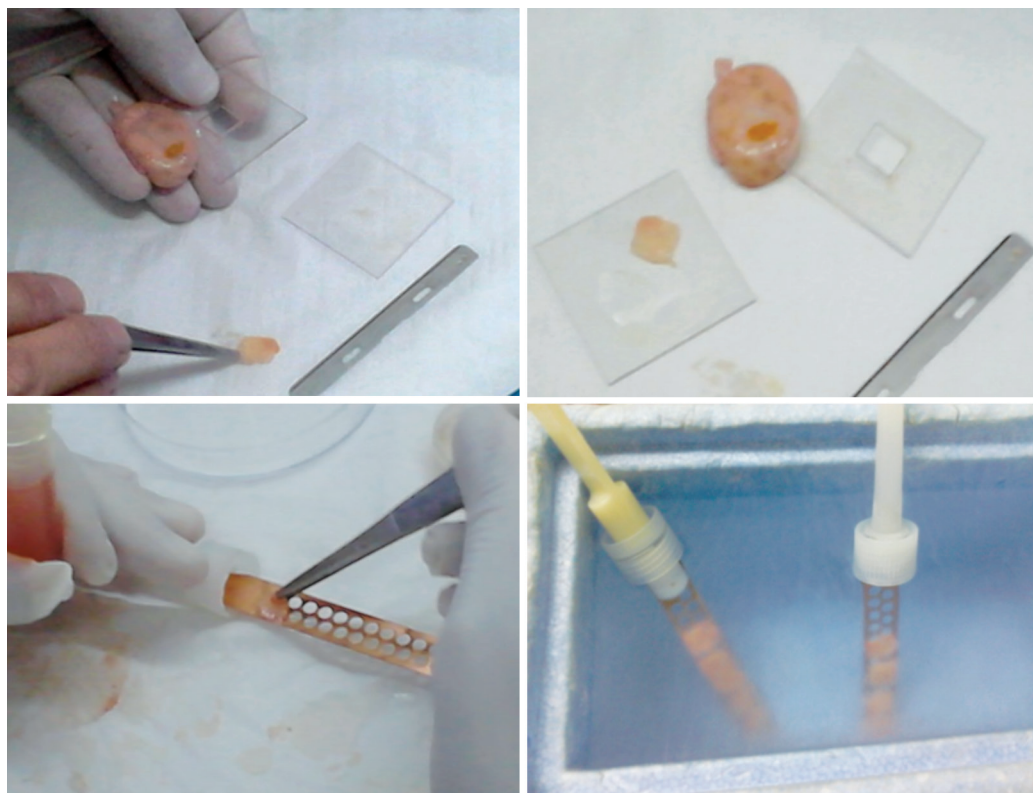
Técnica de vitrificación de tejido ovárico

Obtención de la pieza de tejido ovárico. El tejido ovárico extraído en quirófano se colocó en

un tubo de 50 ml (Falcon, Corning Science México, México) que contenía solución salina Dulbecco tamponada (PBS 1X, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline Solution, Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA) a temperatura ambiente. En el laboratorio el tejido ovárico fue cortado en fragmentos de ~ 1 × 10 × 10 mm. Para lograr fragmentos de este tamaño y un grosor exacto de 1 mm se utilizó una placa de corte de tejido que tiene un espacio de 10 mm cúbicos en donde colocar el tejido ovárico y que es provisto con el equipo de vitrificación de tejido ovárico (Cryotech, Buenos Aires, Argentina). La obtención de trozos de corteza ovárica de 1 mm de grosor es fundamental no solo para el éxito de la vitrificación, sino también para que una vez descongelado el material e injertado, la revascularización del tejido sea correcta.

Procedimiento de vitrificación. Los fragmentos de corteza ovárica obtenidos fueron inicialmente equilibrados en un medio de manejo

Figura 2. Preparación y vitrificación del tejido ovárico (cortesía de la Dra. Mariana Hernández).



(HM, solución TCM-99 tamponado con Hapes y suplementado con 20% SSS) conteniendo 7,5% etilenglicol y 7,5% dimetil sulfóxido, durante 25 minutos. Luego el material se colocó en HM con 20% etilenglicol y 20% dimetil sulfóxido durante 15 minutos. El tejido ovárico, con un volumen mínimo de esta última solución, fue entonces colocado sobre una tira metálica fina con perforaciones (provista en el equipo de vitrificación), y sumergida directamente en el nitrógeno líquido, luego de lo cual la tira metálica fenestrada con el tejido ovárico fue insertada en el interior del contenedor definitivo del material y colocado en el interior del tanque de nitrógeno líquido hasta su utilización.

Descongelamiento del tejido ovárico y trasplante. Si bien no lo hemos realizado a la fecha porque el material vitrificado permanece almacenado, el procedimiento de descongelamiento indica que deberemos quitar del contenedor definitivo la tira metálica fenestrada que contiene el material vitrificado (siempre en nitrógeno líquido) para luego sumergir rápidamente la tira metálica con el tejido ovárico vitrificado en 40 ml de la solución HM suplementada con sacarosa 1,0 mol/l y a 37°C durante 1 minuto. Luego, ya separado de la tira metálica fina, el fragmento de tejido ovárico deberá transferirse a 15 ml de una solución HM suplementada con sacarosa 0,5 mol/l y a temperatura ambiente por 5 minutos. Finalmente, los fragmentos de tejido ovárico descongelados deberán ser lavados dos veces en solución HM durante 10 minutos. En ese momento, el material se encuentra en condiciones para que el cirujano pueda injertarlo, siguiendo la metodología ya descripta anteriormente.

Conclusión

El número de mujeres jóvenes y niñas prepuberales diagnosticadas con cáncer aumenta progresivamente. Los tratamientos oncológicos pueden conducir a gonadotoxicidad, daño ovárico, disminución de la cantidad de oocitos y posterior riesgo de pérdida de potencial reproductivo. La preservación de la fertilidad en mujeres jóvenes con cáncer incluye la criopreservación de embriones, de oocitos y la criopreservación y el autotrasplante de

tejido ovárico. En el caso de niñas prepuberales, la congelación de tejido ovárico y el autotrasplante futuro es la alternativa más aceptable. Sin embargo, esta técnica es una técnica quirúrgica altamente invasiva y tiene dos desventajas importantes: el riesgo de reintroducir células malignas y la relativamente corta duración de los trasplantes de tejido ovárico. Se debe ser cuidadoso antes de ofrecer estas técnicas de preservación de la fertilidad, en particular a niñas prepuberales. El asesoramiento temprano y la correcta evaluación de los riesgos de gonadotoxicidad son los elementos más importantes en la toma de decisiones del proceso para preservar el potencial reproductivo en pacientes oncológicas.

Referencias

1. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. Cancer, World Cancer Report. Stewart BW and Wild CP Editors 2014.
2. Allemani C, Matsuda T, Di Carlo V et al. CONCORD Working Group. Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. *Lancet* 2018; 391 (10125): 1023-1075.
3. American Cancer Society. Global Cancer Facts & Figs 2015, 3rd ed. American Cancer Society, Atlanta.
4. Salama M, Isachenko V, Isachenko E et al. Updates in preserving reproductive potential of prepubertal girls with cancer: Systematic review. *Crit Rev Oncol Hematol* 2016; 103: 10-21.
5. German Childhood Cancer Registry (GCCR). Annual Report 2013/14. GCCR, Mainz 2014.
6. Fritz MA, Speroff L. Normal and abnormal growth and pubertal development. In: Fritz MA, Speroff L. (Eds.); *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (PA) 2011; 8: 391-434.
7. Biro FM, Greenspan LC, Gálvez MP. Puberty in girls of the 21st century. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 2012; 25 (5): 289-294.
8. Colvin CW, Abdullatif H. Anatomy of female puberty: the clinical relevance of developmental changes in the reproductive system. *Clin Anat* 2013; 26 (1): 115-129.
9. Resetkova N, Hayashi M, Kolp LA, Christianson MS. Fertility preservation for prepubertal girls: update and current challenges. *Curr Obstet Gynecol Rep* 2013; 2 (4): 218-225.
10. Baker TG. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1963; 158: 417-433.

11. Mamsen LS, Lutterodt MC, Andersen EW et al. Germ cell numbers in human embryonic and fetal gonads during the first two trimesters of pregnancy: analysis of six published studies. *Hum Reprod* 2011; 26: 2140-2145.
12. Fritz MA, Speroff L. The ovary, embryology and development. In: Fritz MA, Speroff L. (Eds.), *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*; Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (PA) 2011; 8: 105-120.
13. Wallace WH, Anderson RA, Irvine DS. Fertility preservation for young patients with cancer: who is at risk and what can be offered? *Lancet Oncol* 2005; 6 (4): 209-218.
14. Sauvat F, Binart N, Poirot C, Sarnacki S. Preserving fertility in prepubertal children. *Horm Res* 2009; 71 (Suppl. 1): 82-86.
15. Jadoul P, Dolmans MM, Donnez J. Fertility preservation in girls during childhood: is it feasible, efficient and safe and to whom should it be proposed? *Hum Reprod Update* 2010; 16 (6): 617-630.
16. Wallace WH. Oncofertility and preservation of reproductive capacity in children and young adults. *Cancer* 2011; 117 (Suppl. 10): 2301-2310.
17. Dillon KE, Gracia CR. Pediatric and young adult patients and oncofertility. *Curr Treat Options Oncol* 2012; 13 (2): 161-173.
18. Morgan S, Anderson RA, Gourley C et al. How do chemotherapeutic agents damage the ovary? *Hum Reprod Update* 2012; 18: 525-535.
19. Ward E, De Santis C, Robbins A et al. Childhood and adolescent cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2014; 64: 83-103.
20. Burns KC, Hoefgen H, Strine A, Dasgupta R. Fertility preservation options in pediatric and adolescent patients with cancer. *Cancer* 2018; 124 (9): 1867-1876.
21. Jensen AK, Rechnitzer C, Macklon KT et al. Cryopreservation of ovarian tissue for fertility preservation in a large cohort of young girls: focus on pubertal development. *Hum Reprod* 2017; 32 (1): 154-164.
22. Meirou D, Biederman H, Anderson RA et al. Toxicity of chemotherapy and radiation on female reproduction. *Clin Obstet Gynecol* 2010; 53: 727-739.
23. Wallace WH, Thomson AB, Saran F, Kelsey TW. Predicting age of ovarian failure after radiation to a field that includes the ovaries. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; 62: 738-744.
24. De Vos M, Smits J, Woodruff TK. Fertility preservation in women with cancer. *Lancet* 2014; 384: 1302-1310.
25. Dursun P, Do an NU, Ayhan A. Oncofertility for gynecologic and non-gynecologic cancers: fertility sparing in young women of reproductive age. *Crit Rev Oncol Hematol* 2014; 92: 258-267.
26. Wallace WHB, Thomson AB, Kelsey TW. The radio sensitivity of the human oocyte. *Hum Reprod* 2003; 18: 117-121.
27. Green DM, Sklar CA, Boice Jr JD et al. Ovarian failure and reproductive outcomes after childhood cancer treatment: results from the Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Oncol* 2009; 27 (14): 2374-2381.
28. Anderson RA, Mitchell RT, Kelsey TW et al. Cancer treatment and gonadal function: experimental and established strategies for fertility preservation in children and young adults. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2015; 3 (7): 556-567.
29. Nagarajam R, Robison LL. Pregnancy outcomes in survivors of childhood cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2005; 34: 72-76.
30. Mueller BA, Chow EJ, Kamineni A et al. Pregnancy outcomes in female childhood and adolescent cancer survivors: a linked cancer-birth registry analysis. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2009; 163 (10): 879-886.
31. Reulen RC, Zeegers MP, Wallace WH et al. British Childhood Cancer Survivor Study. Pregnancy outcomes among adult survivors of childhood cancer in the British Childhood Cancer Survivor Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18 (8): 2239-2247.
32. Wallace WH, Shalet SM, Crowne EC et al. Ovarian failure following abdominal irradiation in childhood: natural history and prognosis. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 1989; 1: 75-79.
33. Wo JY, Viswanathan AN. Impact of radiotherapy on fertility, pregnancy, and neonatal outcomes in female cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009; 73: 1304-1312.
34. Loren AW, Mangu PB, Beck LN et al. American Society of Clinical Oncology. Fertility preservation for patients with cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* 2013; 31 (19): 2500-2510.
35. Peccatori FA, Azim Jr HA, Orecchia R et al. ESMO Guidelines Working Group. Cancer, pregnancy and fertility: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2013; 24 (Suppl 6): vi160-vi170.
36. Fernbach A, Lockart B, Armus CL et al. Evidence-based recommendations for fertility preservation options for inclusion in treatment protocols for pediatric and adolescent patients diagnosed with cancer. *J Pediatr Oncol Nurs* 2014; 31 (4): 211-222.
37. Martínez F. Update on fertility preservation from the Barcelona International Society for Fertility Preservation-ESHRE-ASRM 2015 expert meeting: indications, results and future perspectives. *Hum Reprod* 2017; 32 (9): 1802-1811.
38. Valcarcel A, Tiveron M, Guidobono M, Castro A, Kenny A, Auge LM, Young E. Resultados de la aplicación de distintas técnicas en los laboratorios de reproducción asistida de alta complejidad. Su evolución a lo largo del tiempo. La visión desde el laboratorio del IFER. *Reproducción* 2013; 28: 105-115.
39. Ruhlmann C, Molina L, Tessari G, Ruhlmann F, Tessari L, Gnocchi D, Cattaneo A, Irigoyen M, Martínez AG. Optimizing the number of embryos to transfer on day 5: two should be the limit. *J BRA Assist Reprod* 2017; 21 (1): 7-10.
40. Senn A, Vozzi C, Chanson A et al. Prospective randomized study of two cryopreservation policies avoiding embryo selection: the pronucleate stage leads to a higher cumulative delivery rate than the early cleavage stage. *Fertil Steril* 2000; 74: 946-952.
41. Jaffar A, Naif H, Nafisa A. Historical Background on Gamete and Embryo Cryopreservation. Chapter 1. In: *Cryopreservation of Mammalian Gametes and Embryos. Methods and Protocols*. Nagy ZP, Varghese AC, Agarwal A (eds). Springer Protocols 2017: 3-20.
42. Liebermann J. Human Embryo Vitrification. Chapter 11. In: *Cryopreservation of Mammalian Gametes and Embryos. Methods and Protocols*. Nagy ZP, Varghese AC, Agarwal A (eds). Springer Protocols 2017: 141-159.

43. Maheshwari A, Pandey S, Amalraj Raja E et al. Is frozen embryo transfer better for mothers and babies? Can cumulative meta-analysis provide a definitive answer? *Hum Reprod Update* 2018; 24 (1): 35-58.
44. Massarotti C, Scaruffi P, Lambertini M et al. State of the art on oocyte cryopreservation in female cancer patients: a critical review of the literature. *Cancer Treat Rev* 2017; 57: 50-57.
45. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine, 2013a. Society for assisted reproductive technology. Mature oocyte cryopreservation: a guideline. *Fertil Steril* 2013; 99: 37-43.
46. Augé LM, Zappacosta Villarreal MP, Buzzi PJ, Valcárcel A, Guidobono ML, Caballero T, Quintana R. Criopreservación de oocitos, una alternativa al congelamiento de embriones en pacientes infértiles. *Reproducción* 2016; 31 (4): 96-108.
47. Cobo A, García-Velasco JA, Coello A et al. Oocyte vitrification as an efficient option for elective fertility preservation. *Fertil Steril* 2016; 105 (3): 755-764.
48. Rienzi L, Cobo A, Ubaldi FM. Human Oocyte Vitrification. Chapter 10. In: *Cryopreservation of mammalian gametes and embryos. Methods and Protocols* 2017. Nagy ZP, Varghese AC, Agarwal A (eds). Springer Protocols: 131-139.
49. Cao Y, Xing Q, Zhang ZG et al. Cryopreservation of immature and in-vitro matured human oocytes by vitrification. *Reprod Biomed Online* 2009; 19 (3): 369-373.
50. Oktay K, Buyuk E, Rodriguez-Wallberg KA, Sahin G. In vitro maturation improves oocyte or embryo cryopreservation outcome in breast cancer patients undergoing ovarian stimulation for fertility preservation. *Reprod Biomed Online* 2010; 20: 634-638.
51. Son WY, Park SE, Lee KA et al. Effects of 1,2-propanediol and freezing-thawing on the in vitro developmental capacity of human immature oocytes. *Fertil Steril* 1996; 66 (6): 995-999.
52. Khalili MA, Shahedi A, Ashourzadeh S et al. Vitrification of human immature oocytes before and after in vitro maturation: a review. *J Assist Reprod Genet* 2017; 34 (11): 1413-1426.
53. Bedoschi GM, de Albuquerque FO, Ferriani RA, Navarro PA. Ovarian stimulation during the luteal phase for fertility preservation of cancer patients: case reports and review of the literature. *J Assist Reprod Genet* 2010; 27: 491-494.
54. Kim JH, Kim SK, Lee HJ et al. Efficacy of random-start controlled ovarian stimulation in cancer patients. *J Korean Med Sci* 2015; 30: 290-295.
55. Danis RB, Pereira N, Elias RT. Random start ovarian stimulation for oocyte or embryo cryopreservation in women desiring fertility preservation prior to gonadotoxic cancer therapy. *Curr Pharm Biotechnol* 2017; 18 (8): 609-613.
56. Nayak SR, Wakim AN. Random-start gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonist-treated cycles with GnRH agonist trigger for fertility preservation. *Fertil Steril* 2011; 96: e51-e54.
57. Sönmez M, Türkçüo lu I, Co kun U, Oktay K. Random-start controlled ovarian hyper stimulation for emergency fertility preservation in letrozole cycles. *Fertil Steril* 2011; 95: 2125.e9-e11.
58. de Mello Bianchi PH, Serafini P, Monteiro da Rocha A et al. Review: follicular waves in the human ovary: a new physiological paradigm for novel ovarian stimulation protocols. *Reprod Sci* 2010; 17: 1067-1076.
59. Cakmak H, Katz A, Cedars MI, Rosen MP. Effective method for emergency fertility preservation: random start controlled ovarian stimulation. *Fertil Steril* 2013; 100: 1673-1680.
60. von Wolff M, Capp E, Jauckus J et al; FertiPROTEKT study group. Timing of ovarian stimulation in patients prior to gonadotoxic therapy: an analysis of 684 stimulations. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2016; 199: 146-149.
61. Boots CE, Meister M, Cooper AR et al. Ovarian stimulation in the luteal phase: systematic review and meta-analysis. *J Assist Reprod Genet* 2016; 33 (8): 971-980.
62. Turan V, Bedoschi G, Moy F, Oktay K. Safety and feasibility of performing two consecutive ovarian stimulation cycles with the use of letrozole-gonadotropin protocol for fertility preservation in breast cancer patients. *Fertil Steril* 2013; 100 (6): 1681-1685.
63. Oktay K, Hourvitz A, Sahin G et al. Letrozole reduces estrogen and gonadotropin exposure in women with breast cancer undergoing ovarian stimulation before chemotherapy. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 3885-3890.
64. Oktay K, Buyuk E, Libertella N et al. Fertility preservation in breast cancer patients: a prospective controlled comparison of ovarian stimulation with tamoxifen and letrozole for embryo cryopreservation. *J Clin Oncol* 2005; 23 (19): 4347-4353.
65. Pereira N, Kelly AG, Stone LD et al. Gonadotropin-releasing hormone agonist trigger increases the number of oocytes and embryos available for cryopreservation in cancer patients undergoing ovarian stimulation for fertility preservation. *Fertil Steril* 2017; 108 (3): 532-538.
66. Azim AA, Costantini-Ferrando M, Oktay K. Safety of fertility preservation by ovarian stimulation with letrozole and gonadotropins in patients with breast cancer: a prospective controlled study. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2630-2635.
67. Kim J, Turan V, Oktay K. Long-term safety of letrozole and gonadotropin stimulation for fertility preservation in women with breast cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2016; 101 (4): 1364-1371.
68. Donnez J, Dolmans MM. Fertility preservation in women. *Nat Rev Endocrinol* 2013; 9: 735-749.
69. Waimey KE, Duncan FE, Su HI et al. Future directions in oncofertility and fertility preservation: a report from the 2011 oncofertility consortium conference. *J Adolesc Young Adult Oncol* 2013; 2 (1): 25-30.
70. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Fertility preservation in patients undergoing gonadotoxic therapy or gonadectomy: a committee opinion. *Fertil Steril* 2013; 100 (5): 1214-1223.
71. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Ovarian tissue cryopreservation: a committee opinion. *Fertil Steril* 2014; 101 (5): 1237-1243.
72. Sarnacki S. Ovarian tissue cryopreservation in children with cancer. *Lancet Oncol* 2014; 15 (10): 1049-1050.
73. Newton H, Illingworth P. In-vitro growth of murine pre-antral follicles after isolation from cryopreserved ovarian tissue. *Hum Reprod* 2001; 16 (3): 423-429.

74. Hovatta O. Methods for cryopreservation of human ovarian tissue. *Reprod Biomed Online* 2005; 10 (6): 729-734.
75. Isachenko V, Isachenko E, Weiss JM. Human ovarian tissue: vitrification versus conventional freezing. *Hum Reprod* 2009; 24 (7): 1768-1769.
76. Isachenko V, Lapidus I, Isachenko E et al. Human ovarian tissue vitrification versus conventional freezing: morphological, endocrinological, and molecular biological evaluation. *Reproduction* 2009; 138 (2): 319-327.
77. Keros V, Xella S, Hultenby K et al. Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. *Hum Reprod* 2009; 24 (7): 1670-1683.
78. Amorim CA, Curaba M, Van Langendonck A et al. Vitrification as an alternative means of cryopreserving ovarian tissue. *Reprod Biomed Online* 2011; 23 (2): 160-186.
79. Klocke S, Bündgen N, Köster F et al. Slow-freezing versus vitrification for human ovarian tissue cryopreservation. *Arch Gynecol Obstet* 2015; 291 (2): 419-426.
80. Isachenko V, Isachenko E, Kreienberg R et al. Human ovarian tissue cryopreservation: quality of follicles as a criterion of effectiveness. *Reprod Biomed Online* 2010; 20: 441-442.
81. Sheikhi M, Hultenby K, Niklasson B et al. Clinical grade vitrification of human ovarian tissue: an ultrastructural analysis of follicles and stroma in vitrified tissue. *Hum Reprod* 2011; 26: 594-603.
82. Donnez J, Dolmans MM, Pellicer A, Díaz-García C et al. Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation. *Fertil Steril* 2013; 99 (6): 1503-1513.
83. Díaz-García C, Domingo J, García-Velasco JA et al. Oocyte vitrification versus ovarian cortex transplantation in fertility preservation for adult women undergoing gonadotoxic treatments: a prospective cohort study. *Fertil Steril* 2018; 109 (3): 478-485.
84. Kawamura K, Cheng Y, Suzuki N et al. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110 (43): 17474-17479.
85. Suzuki N, Yoshioka N, Takae S et al. Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency. *Hum Reprod* 2015; 30: 608-615.
86. Tian T, Zhao G, Han D et al. Effects of vitrification cryopreservation on follicular morphology and stress relaxation behaviors of human ovarian tissues: sucrose versus trehalose as the non-permeable protective agent. *Hum Reprod* 2015; 30 (4): 877-883.
87. Shi Q, Xie Y, Wang Y, Li S. Vitrification versus slow freezing for human ovarian tissue cryopreservation: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 2017; 7 (1): 8538.
88. Grynberg M, Poulain M, Sebagn-Peyrelevalde S et al. Ovarian tissue and follicle transplantation as an option for fertility preservation. *Fertil Steril* 2012; 97 (6): 1260-1268.
89. Jeruss JS, Woodruff TK. Preservation of fertility in patients with cancer. *N Engl J Med* 2009; 360 (9): 902-911.
90. Donnez J, Dolmans MM. Cryopreservation and transplantation of ovarian tissue. *Clin Obstet Gynecol* 2010; 53 (4): 787-796.
91. Imbert R, Moffa F, Tsepelidis S et al. Safety and usefulness of cryopreservation of ovarian tissue to preserve fertility: a 12-year retrospective analysis. *Hum Reprod* 2014; 29 (9): 1931-1940.
92. Donfack NJ, Alves KA, Araújo VR et al. Expectations and limitations of ovarian tissue transplantation. *Zygote* 2017; 25 (4): 391-403.
93. Van der Ven H, Liebhentron J, Beckmann M et al; Ferti-PROTEKT network. Ninety-five orthotopic transplantations in 74 women of ovarian tissue after cytotoxic treatment in a fertility preservation network: tissue activity, pregnancy and delivery rates. *Hum Reprod* 2016; 31 (9): 2031-2041.
94. Donnez J, Jadoul P, Squifflet J et al. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation in cancer patients. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2010; 24: 87-100.
95. Demeestere I, Simon P, Emiliani S et al. Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation. *Hum Reprod Update* 2009; 15 (6): 649-665.
96. Sönmez M, Oktay K. Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2010; 24 (1): 113-126.
97. Donnez J, Silber S, Andersen CY et al. Children born after autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue. a review of 13 live births. *Ann Med* 2011; 43: 437-450.
98. Gamzatova Z, Komlichenko E, Kostareva A et al. Autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue-effective method of fertility preservation in cancer patients. *Gynecol Endocrinol* 2014; 1 (Suppl 30): 43-47.
99. Donnez J, Dolmans MM. Transplantation of ovarian tissue. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2014; 28 (8): 1188-1197.
100. Silber S, Pineda J, Lenahan K et al. Fresh and cryopreserved ovary transplantation and resting follicle recruitment. *Reprod Biomed Online* 2015; 30 (6): 643-650.
101. Gellert SE, Pors SE, Kristensen SG et al. Transplantation of frozen-thawed ovarian tissue: an update on worldwide activity published in peer-reviewed papers and on the Danish cohort. *J Assist Reprod Genet* Mar 2018; 35 (4): 561-570.
102. Donnez J, Dolmans MM, Demylle D et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004; 364: 1405-1410.
103. Lorenzo F, Tiveron M, Valcarcel A, Quintans C, Marconi G, Quintana R, Villamayor Figueroa M, Young E. Primer nacimiento en Argentina posterior a autotransplante de tejido ovárico criopreservado en una paciente joven, previamente tratada por enfermedad de Askin. *Reproducción* 2014; 29 (2): 40-46.
104. Lorenzo FVM, Buzzi PJ, Marconi G, Tiveron M, Young ET. Livebirth with intrauterine insemination (IUI) after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a young patient previously treated with chemotherapy for a skin's disease. *ASRM Abstracts. Fertil Steril* 2014; 102 (Suppl 3): e64.
105. Lorenzo FVM, Viola J, Tiveron M, Young E. Second children born after autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue in a young patient previously treated with chemotherapy for Askin's disease. The successful of fertility preservation program. *Fertil Steril* 2016; 106 (Suppl 3): e29.

106. Salama M, Woodruff TK. New advances in ovarian auto-transplantation to restore fertility in cancer patients. *Cancer Metastasis Rev* 2015; 34 (4): 807-822.
107. Jadoul P, Guilmain A, Squifflet J et al. Efficacy of ovarian tissue cryopreservation for fertility preservation: lessons learned from 545 cases. *Hum Reprod* 2017; 32 (5): 1046-1054.
108. Kristensen SG, Giorgione V, Humaidan P et al. Fertility preservation and refreezing of transplanted ovarian tissue—a potential new way of managing patients with low risk of malignant cell recurrence. *Fertil Steril* 2017; 107 (5): 1206-1213.
109. Demeestere I, Simon P, Dedeken L et al. Live birth after autograft of ovarian tissue cryopreserved during childhood. *Hum Reprod* 2015; 30 (9): 2107-2109.
110. Fallat ME, Hutter J, American Academy of Pediatrics Committee on Bioethics, American Academy of Pediatrics Section on Hematology/Oncology, American Academy of Pediatrics Section on Surgery. Preservation of fertility in pediatric and adolescent patients with cancer. *Pediatrics* 2008; 121 (5): e1461-e1469.
111. Stern CJ, Gook D, Hale LG et al. Delivery of twins following heterotopic grafting of frozen-thawed ovarian tissue. *Hum Reprod* 2014; 29 (8): 1828.
112. Donnez J, Dolmans MM. Ovarian cortex transplantation: 60 reported live births brings the success and worldwide expansion of the technique towards routine clinical practice. *J Assist Reprod Genet* 2015; 32: 1167-1170.
113. Ting AY, Yeoman RR, Lawson MS, Zelinski MB. In vitro development of secondary follicles from cryopreserved rhesus macaque ovarian tissue after slow-rate freeze or vitrification. *Hum Reprod* 2011; 26: 2461-2472.
114. Rosendahl M, Greve T, Andersen CY. The safety of transplanting cryopreserved ovarian tissue in cancer patients: a review of the literature. *J Assist Reprod Genet* 2013; 30 (1): 11-24.
115. Bastings L, Beerendonk CC, Westphal JR et al. Autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue in cancer survivors and the risk of reintroducing malignancy: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2013; 19 (5): 483-506.
116. Bedaiwy MA, Falcone T. Harvesting and autotransplantation of vascularized ovarian grafts: approaches and techniques. *Reprod Biomed Online* 2007; 14 (3): 360-371.
117. Bedaiwy MA, Shahin AY, Falcone T. Reproductive organ transplantation: advances and controversies. *Fertil Steril* 2008; 90 (6): 2031-2055.
118. Silber SJ. Fresh ovarian tissue and whole ovary transplantation. *Semin Reprod Med* 2009; 27 (6): 479-485.
119. Fabbri R, Pasquinelli G, Keane D et al. Culture of cryopreserved ovarian tissue: state of the art in 2008. *Fertil Steril* 2009; 91 (5): 1619-1629.
120. Meirow D, Hardan I, Dor J et al. Searching for evidence of disease and malignant cell contamination in ovarian tissue stored from hematologic cancer patients. *Hum Reprod* 2008; 23 (5): 1007-1013.
121. Rosendahl M, Andersen MT, Ralfkiær E et al. Evidence of residual disease in cryopreserved ovarian cortex from female patients with leukemia. *Fertil Steril* 2010; 94 (6): 2186-2190.
122. Rosendahl M, Timmermans Wielenga V, Nedergaard L et al. Cryopreservation of ovarian tissue for fertility preservation: no evidence of malignant cell contamination in ovarian tissue from patients with breast cancer. *Fertil Steril* 2011; 95 (6): 2158-2161.
123. Bastings L, Liebenthron J, Westphal JR et al. Efficacy of ovarian tissue cryopreservation in a major European center. *J Assist Reprod Genet* 2014; 31 (8): 1003-1012.
124. Dittrich R, Lotz L, Fehm T et al. Xenotransplantation of cryopreserved human ovarian tissue—a systematic review of MII oocyte maturation and discussion of it as a realistic option for restoring fertility after cancer treatment. *Fertil Steril* 2015; 103 (6): 1557-1565.
125. Chian RC, Uzelac PS, Nargund G. In vitro maturation of human immature oocytes for fertility preservation. *Fertil Steril* 2013; 99 (5): 1173-1181.
126. Prasath EB, Chan ML, Wong WH et al. First pregnancy and live birth resulting from cryopreserved embryos obtained from in vitro matured oocytes after oophorectomy in an ovarian cancer patient. *Hum Reprod* 2014; 29 (2): 276-278.
127. Smits J, Dolmans MM, Donnez J et al. Current achievements and future research directions in ovarian tissue culture, in vitro follicle development and transplantation: implications for fertility preservation. *Hum Reprod Update* 2010; 16 (4): 395-414.
128. Dolmans MM, Martínez-Madrid B, Gadsis E et al. Short-term transplantation of isolated human ovarian follicles and cortical tissue into nude mice. *Reproduction* 2007; 134 (2): 253-262.
129. Dolmans MM, Yuan WY, Camboni A et al. Development of antral follicles after xenografting of isolated small human preantral follicles. *Reprod Biomed Online* 2008; 16 (5): 705-711.
130. Luyckx V, Scalercio S, Jadoul P et al. Evaluation of cryopreserved ovarian tissue from prepubertal patients after long-term xenografting and exogenous stimulation. *Fertil Steril* 2013; 100 (5): 1350-1357.
131. Luyckx V, Dolmans MM, Vanacker J et al. First step in developing a 3D biodegradable fibrin scaffold for an artificial ovary. *J Ovarian Res* 2013; 6 (1): 83-93.
132. Paulini F, Vilela JM, Chiti MC et al. Survival and growth of human preantral follicles after cryopreservation of ovarian tissue, follicle isolation and short-term xenografting. *Reprod Biomed Online* 2016; 33 (3): 425-432.
133. Shikanov A, Smith RM, Xu M et al. Hydrogel network design using multifunctional macromers to coordinate tissue maturation in ovarian follicle culture. *Biomaterials* 2011; 32 (10): 2524-2531.
134. Vanacker J, Luyckx V, Dolmans MM et al. Transplantation of an alginate-matrigel matrix containing isolated ovarian cells: first step in developing a biodegradable scaffold to transplant isolated preantral follicles and ovarian cells. *Biomaterials* 2012; 3 (26): 6079-6085.
135. Shea LD, Woodruff TK, Shikanov A. Bioengineering the ovarian follicle microenvironment. *Ann Rev Biomed Eng* 2014; 16: 29-52.
136. Soares M, Sahrari K, Chiti MC et al. The best source of isolated stromal cells for the artificial ovary: medulla or cortex, cryopreserved or fresh? *Hum Reprod* 2015; 30 (7): 1589-1598.

137. Ting AY, Yeoman RR, Campos JR et al. Morphological and functional preservation of pre-antral follicles after vitrification of macaque ovarian tissue in a closed system. *Hum Reprod* 2013; 28(5): 1267-1279.
138. Xu J, Lawson MS, Yeoman RR et al. Secondary follicle growth and oocyte maturation during encapsulated three-dimensional culture in rhesus monkeys: effects of gonadotrophins, oxygen and fetuin. *Hum Reprod* 2011; 26 (5): 1061-1072.
139. Xu M, Fazleabas AT, Shikanov A et al. In vitro oocyte maturation and preantral follicle culture from the luteal-phase baboon ovary produce mature oocytes. *Biol Reprod* 2011; 84 (4): 689-697.
140. Bedaiwy MA, Hussein MR, Biscotti C, Falcone T. Cryopreservation of intact human ovary with its vascular pedicle. *Hum Reprod* 2006; 21 (12): 3258-3269.
141. Martínez-Madrid B, Camboni A, Dolmans MM et al. Apoptosis and ultrastructural assessment after cryopreservation of whole human ovaries with their vascular pedicle. *Fertil Steril* 2007; 87 (5): 1153-1165.
142. Jadoul P, Donnez J, Dolmans MM et al. Laparoscopic ovariectomy for whole human ovary cryopreservation: technical aspects. *Fertil Steril* 2007; 87 (4): 971-975.
143. Bromer JG, Patrizio P. Fertility preservation: the rationale for cryopreservation of the whole ovary. *Semin Reprod Med* 2009; 27 (6): 465-471.
144. Westphal JR, Gerritse R, Braat DDM et al. Complete protection against cryodamage of cryopreserved whole bovine and human ovaries using DMSO as a cryoprotectant. *J Assist Reprod Genet* 2017; 34 (9): 1217-1229.
145. Morris SN, Ryley D. Fertility preservation: nonsurgical and surgical options. *Semin Reprod Med* 2011; 29 (2): 147-154.
146. Irtan S, Orbach D, Helfre S, Sarnacki S. Ovarian transposition in prepubescent and adolescent girls with cancer. *Lancet Oncol* 2013; 14 (13): e601-e608.
147. Terenziani M, Piva L, Meazza C et al. Oophoropexy: a relevant role in preservation of ovarian function after pelvic irradiation. *Fertil Steril* 2009; 91 (3): e15-e16.
148. Han SS, Kim YH, Lee SH et al. Underuse of ovarian transposition in reproductive-aged cancer patients treated by primary or adjuvant pelvic irradiation. *J Obstet Gynaecol Res* 2011; 37 (7): 825-829.
149. Ferrari S, Persico P, Di Puccio F et al. Laparoscopic lateral ovarian transposition: a fertility sparing procedure. *Minerva Ginecol* 20019; 61 (5): 465-468.
150. Bisharah M, Tulandi T. Laparoscopic preservation of ovarian function: an underused procedure. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188 (2): 367-370.
151. Blumenfeld Z, von Wolff M. GnRH-analogues and oral contraceptives for fertility preservation in women during chemotherapy. *Hum Reprod Update* 2008; 14 (6): 543-552.
152. Clowse ME, Behera MA, Anders CK et al. Ovarian preservation by GnRH agonists during chemotherapy: a meta-analysis. *J Women's Health* 2009; 18 (3): 311-319.
153. Del Mastro L, Boni L, Michelotti A et al. Effect of the gonadotropin-releasing hormone analogue triptorelin on the occurrence of chemotherapy-induced early menopause in premenopausal women with breast cancer: a randomized trial. *JAMA* 2011; 306 (3): 269-276.
154. Del Mastro L, Ceppi M, Poggio F et al. Gonadotropin-releasing hormone analogues for the prevention of chemotherapy-induced premature ovarian failure in cancer women: systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Cancer Treat Rev* 2014; 40 (5): 675-683.
155. Wang C, Chen M, Fu F, Huang M. Gonadotropin-releasing hormone analog co treatment for the preservation of ovarian function during gonadotoxic chemotherapy for breast cancer: a meta-analysis. *PLoS One* 2013; 8 (6): e66360.
156. Lee SJ, Schover LR, Partridge AH et al. American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. *J Clin Oncol* 2006; 24 (18): 2917-2931.
157. Pentheroudakis G, Orecchia R, Hoekstra HJ, Pavlidis N, ESMO Guidelines Working Group. Cancer, fertility and pregnancy: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2010; 21 (Suppl. 5): v266-v273.
158. Meistrich ML, Shetty G. Hormonal suppression for fertility preservation in males and females. *Reproduction* 2008; 136 (6): 691-701.
159. Oktay K, Sonmezer M, Oktem O et al. Absence of conclusive evidence for the safety and efficacy of gonadotropin-releasing hormone analogue treatment in protecting against chemotherapy-induced gonadal injury. *Oncologist* 2007; 12 (9): 1055-1066.
160. Nitzschke M, Raddatz J, Bohlmann MK et al. GnRH analogs do not protect ovaries from chemotherapy-induced ultrastructural injury in Hodgkin's lymphoma patients. *Arch Gynecol Obstet* 2010; 282 (1): 83-88.
161. Blumenfeld Z. Fertility preservation and GnRH for chemotherapy: debate. *Cancer Manag Res* 2014; 6: 313-315.
162. Kagawa N, Silber S, Kuwayama M. Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue. *Reprod Biomed Online* 2009; 4: 568-577.