



Trabajo Fin de Grado

Preservación de la fertilidad en pacientes
oncológicos pediátricos

Fertility preservation in oncopediatric patients

Autor

Raquel Antolín Villaverde

Dirigido por

Ignacio Ochoa Garrido
Clara Malo Ladrero



Facultad de Medicina
Universidad de Zaragoza

Curso 2024-2025

ÍNDICE

1 ABREVIATURAS	- 1 -
2 RESUMEN	- 2 -
3 OBJETIVOS	- 3 -
4 MATERIAL Y MÉTODOS	- 4 -
4.1 DISEÑO DEL ESTUDIO	- 4 -
4.2 FUENTES DE DATOS Y ESTRATEGIA DE BÚSQUEDA	- 4 -
4.3 SELECCIÓN DE ESTUDIOS	- 6 -
5 INTRODUCCIÓN	- 7 -
5.1 HISTOLOGÍA DEL OVARIO	- 7 -
5.2 RESERVA OVÁRICA	- 8 -
5.2.1 Vías moleculares de activación folicular	- 9 -
5.3 CÁNCER Y FERTILIDAD	- 10 -
5.3.1 Cáncer infantil.....	- 11 -
6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	- 14 -
6.1 CRIOPRESERVACIÓN DE OVOCITOS O EMBRIONES	- 14 -
6.2 CRIOPRESERVACIÓN DE TEJIDO OVÁRICO	- 15 -
6.2.1 Indicaciones.....	- 16 -
6.2.2 Contraindicaciones	- 17 -
6.2.3 Preparación del tejido	- 17 -
6.2.4 Trasplante del tejido.....	- 25 -
6.2.5 Seguimiento posterior y recuperación de la función ovárica	- 26 -
6.2.6 Resultados de OTC	- 27 -
6.2.7 Factores predictivos de regreso de la función ovárica	- 28 -
6.3 OTRAS TÉCNICAS	- 29 -
6.3.1 Transposición ovárica	- 29 -
6.3.2 Supresión ovárica con análogos de la GnRH	- 30 -
6.4 INVESTIGACIÓN EN EL MOMENTO ACTUAL	- 30 -
6.4.1 Agentes antiapoptóticos	- 30 -
6.4.2 Maduración in vitro de ovocitos inmaduros	- 31 -
6.4.3 Trasplante de ovario completo.....	- 32 -
6.4.4 Ovario artificial	- 32 -
6.4.5 Células madre	- 32 -
7 CONCLUSIONES	- 33 -
8 BIBLIOGRAFÍA	- 34 -

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Listado de abreviaturas empleadas	Página 1
Tabla 2	Criterios de inclusión y exclusión	Página 6
Tabla 3	Riesgo de FOP según el tratamiento oncológico	Página 13
Tabla 4	Resultado de la criopreservación de embriones vs ovocitos	Página 15
Tabla 5	Congelación lenta vs vitrificación	Página 22

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Primera búsqueda realizada	Página 4
Figura 2	Segunda búsqueda realizada	Página 5
Figura 3	Tercera búsqueda realizada	Página 5
Figura 4	Vías moleculares de activación folicular	Página 10
Figura 5	Criopreservación de embriones vs ovocitos	Página 15
Figura 6	Criopreservación y trasplante de tejido ovárico	Página 16
Figura 7	Procedimiento de extracción de tejido ovárico	Página 19
Figura 8	Problemas asociados a diferentes velocidades de congelación	Página 21

1 ABREVIATURAS

Tabla 1. Listado de abreviaturas empleadas

Abreviatura	Significado
FSH	Hormona foliculoestimulante
LH	Hormona luteinizante
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
AMH	Hormona Antimülleriana
CEF	Ciclofosfamida, Epirubicina, 5-Fluoruracilo
CAF	Ciclofosfamida, Doxorrubicina, 5-Fluoruracilo
AC	Doxorrubicina (Adriamicina), Ciclofosfamida
AVBD	Doxorrubicina (Adriamicina), Vinblastina, Bleomicina, Dacarbazina
CHOP	Ciclofosfamida, Doxorrubicina, Vincristina (Oncovin) y Prednisona
CMF	Ciclofosfamida, Metrotexato, 5-Fluoruracilo
ALL	Leucemia linfoblástica aguda
AML	Leucemia mieloide aguda
OTC	Criopreservación de tejido ovárico
OTT	Trasplante de tejido ovárico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EG	Etilenglicol
DMSO	Dimetil-sulfóxido
FOP	Fallo ovárico prematuro
TC	Tomografía computarizada
PI3K	Fosfoinositol 3-cinasa
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
ESMO	Sociedad Europea de Oncología Médica
ESHRE	Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología
ASRM	Sociedad Americana de Medicina Reproductiva
mU	Miliunidades
IU	Unidades Internacionales
RN	Recién nacido

2 RESUMEN

Los avances en el campo de la oncología han permitido aumentar la supervivencia de los pacientes diagnosticados de cáncer, especialmente durante la niñez y la adolescencia. Sin embargo, determinadas terapias oncológicas son gonadotóxicas y su uso puede afectar a la fertilidad de estos niños, suponiendo un gran impacto psicosocial para los pacientes y sus familiares. La medicina ha desarrollado y optimizado técnicas de reproducción asistida que deben ser ofrecidas tras el diagnóstico y de forma previa al tratamiento. Las más empleadas a nivel internacional son la preservación de embriones y de ovocitos, sin embargo, no pueden emplearse en el caso de pacientes que no hayan alcanzado la madurez sexual o en aquellas que necesiten tratamiento quimioterápico inmediato. En la actualidad, la única alternativa en estos casos es la criopreservación de tejido ovárico y su posterior trasplante una vez alcanzada la remisión completa de la enfermedad, con el objetivo potencial de restaurar la función ovárica, tanto hormonal como reproductiva. Finalmente, tras años de investigación, ha demostrado buenos resultados dejando de considerarse experimental, aunque todavía son necesarios más avances que permitan optimizar al máximo el proceso y aumentar la tasa de éxito.

Palabras clave: cáncer, prepuberal, fertilidad, ovario, criopreservación, trasplante

Advances in the field of oncology have increased survival rates among patients diagnosed with cancer, especially during childhood and adolescence. However, certain oncological therapies are gonadotoxic, and their use can affect the fertility of these children, having a significant psychosocial impact on both patients and their families. Medicine has developed and optimized assisted reproduction techniques that should be offered after diagnosis and before the start of treatment. The most commonly used methods internationally are embryo and oocyte preservation; however, these cannot be used in patients who have not yet reached sexual maturity or in those requiring immediate chemotherapy. Currently, the only alternative in such cases is the cryopreservation of ovarian tissue and its subsequent transplantation once complete remission of the disease has been achieved, with the potential aim of restoring both hormonal and reproductive ovarian function. After years of research, this approach has shown good results and is no longer considered experimental, although further advancements are still needed to optimize the process and increase the success rate.

Key words: cancer, prepubertal, fertility, ovary, cryopreservation, transplantation

3 OBJETIVOS

- **Objetivo general:**

Revisar la bibliografía médica disponible sobre la criopreservación de tejido ovárico y su posterior trasplante en pacientes diagnosticadas de fallo ovárico prematuro, principalmente secundario a tratamiento oncológico.

- **Objetivos específicos**

Establecer las indicaciones y contraindicaciones principales, así como las ventajas e inconvenientes respecto a otras técnicas de reproducción asistida más extendidas a nivel mundial.

4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Este estudio consiste en una revisión bibliográfica sobre la criopreservación de tejido ovárico y su posterior trasplante en pacientes oncológicos pediátricos.

4.2 FUENTES DE DATOS Y ESTRATEGIA DE BÚSQUEDA

Se realizaron búsquedas en la base de datos de bibliografía médica PubMed, complementando los hallazgos con información recopilada en distintos atlas de histología, material que fue facilitado en la Universidad.

Para realizar la búsqueda bibliográfica se emplearon los **términos MeSH** *child, neoplasms, fertility preservation, cryopreservation, ovary, tissue* y *transplantation*. Se encadenaron de varias formas mediante los operadores *AND* y *OR* obteniendo la siguiente **estrategia de búsqueda**:

Ovary AND Tissue AND (Fertility preservation OR Cryopreservation)

Child AND Neoplasms AND Fertility preservation

Ovary AND Tissue AND Transplantation

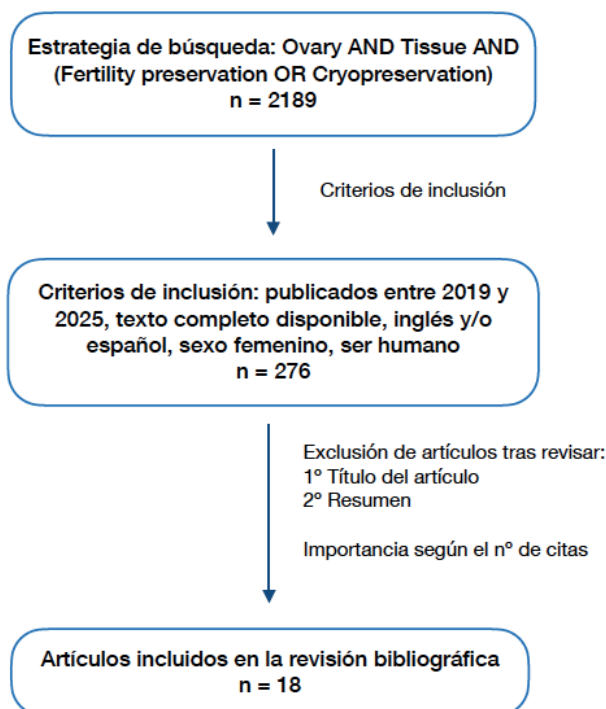


Figura 1. Primera búsqueda realizada

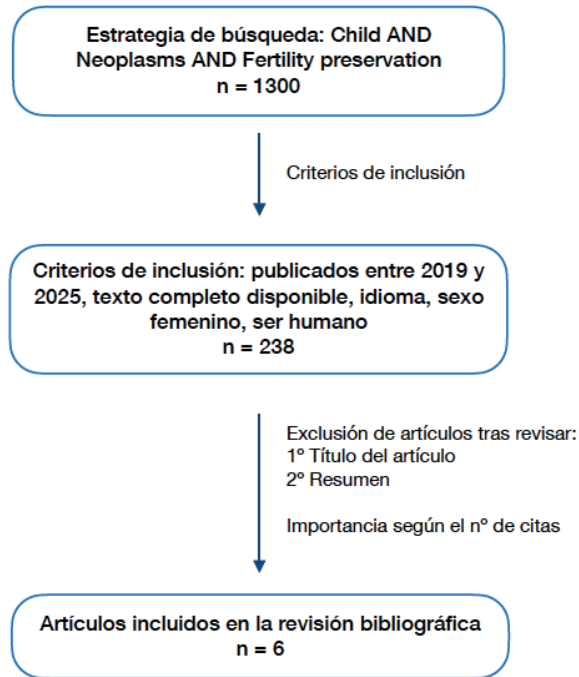


Figura 2. Segunda búsqueda realizada

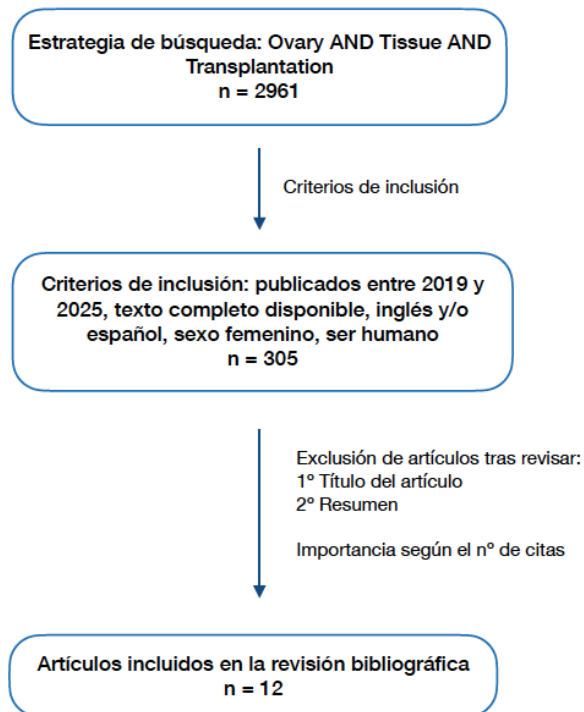


Figura 3. Tercera búsqueda realizada

4.3 SELECCIÓN DE ESTUDIOS

La **Tabla 2** refleja los criterios de inclusión y exclusión de artículos elegidos para la realización del trabajo. Dichos criterios se establecieron antes de realizar las búsquedas en la base de datos. El resultado final del proceso de selección de estudios fue un total de 36 artículos y 2 atlas revisados para la elaboración del proyecto.

Tabla 2. Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
Texto completo	Texto completo no disponible
Idioma: inglés y/o español	Idioma diferente al inglés o español
Temporal: 2019-actualidad	Artículos previos a 2019
Sexo: mujer	Sexo: hombre
Especie: ser humano	Especie: animal

5 INTRODUCCIÓN

Se conoce como fertilidad a la capacidad biológica de un ser vivo para reproducirse y tener descendencia, siendo necesaria la normalidad anatómica y funcional del aparato genital femenino y masculino. La concepción es una de las principales preocupaciones del ser humano. Cuando aparecen problemas de fertilidad y existe dificultad para lograr un embarazo, se afecta considerablemente el bienestar emocional de una persona.

La capacidad reproductiva de una pareja puede verse alterada por diferentes motivos, tanto de la mujer como del hombre, fisiológicos o patológicos. En cuanto a las mujeres, todas experimentan el cese de la actividad ovárica de manera fisiológica a una edad que varía generalmente entre los 45 y 55 años, es lo que se conoce como menopausia. Se puede diagnosticar clínicamente tras 12 meses consecutivos sin menstruación, siempre y cuando no se deba a ninguna otra causa.

En ocasiones, se puede alterar la capacidad reproductiva de una mujer de forma anticipada, lo que supone un gran impacto psicosocial para las pacientes y su entorno. Una de las causas principales de pérdida de la fertilidad en mujeres en edad fértil, es decir, antes de la edad propia de la menopausia, es el fallo ovárico prematuro que se produce como consecuencia del tratamiento oncológico gonadotóxico al que deben someterse las pacientes con cáncer. En estos casos, se ofrecen un conjunto de técnicas médicas o quirúrgicas destinadas a preservar la fertilidad de las pacientes.

5.1 HISTOLOGÍA DEL OVARIO

Los ovarios son órganos primordiales en la reproducción femenina. Están situados en la parte superior de la cavidad pélvica y su tamaño y posición varía en función de la edad y el estado reproductivo de la mujer. Están envueltos por una cápsula fibrosa, la albugínea ovárica, que posee un mesotelio revistiendo su superficie denominado epitelio germinal (1).

Hacia el interior se distinguen dos zonas; la médula y la corteza. La médula es la zona central más interna del ovario, está formada por tejido conjuntivo y contiene vasos sanguíneos, fibras nerviosas y vasos linfáticos. La corteza se caracteriza por la presencia de folículos ováricos en diversas fases del desarrollo; folículos primordiales, primarios, secundarios y estructuras preovulatorias y postovulatorias (2).

La etapa de **folículo primordial** es la más temprana del desarrollo folicular. Los folículos primordiales descansan en la periferia de la corteza. Están formados por un ovocito primario rodeado por una única capa de células planas de soporte llamadas células foliculares. El ovocito es pequeño y se encuentra en la profase (dictioteno) de la meiosis I.

En la pubertad, los folículos primordiales comienzan a crecer y dan lugar a lo que se conoce como **folículo primario**. El ovocito incrementa su tamaño y las células de soporte

también lo hacen convirtiéndose en células cúbicas. Estas células foliculares pasan a denominarse células de la granulosa. Cuando el ovocito primario está rodeado por una sola capa de células de la granulosa, el folículo se denomina folículo primario unilaminar. A medida que el ovocito aumenta de tamaño, las células de la granulosa acumulan más capas y el folículo pasa a denominarse folículo primario multilaminar. La zona pelúcida, una capa gelatinosa entre el ovocito y las células de la granulosa, aparece por primera vez en el folículo primario multilaminar (2).

A medida que las células de la granulosa siguen su proliferación, el tamaño del folículo aumenta y se desarrollan espacios llenos de líquido folicular entre las células. El folículo entra en fase de **folículo secundario**. Estos espacios se fusionan y forman un único y gran espacio llamado antro. Las células del estroma que cubren el folículo se desarrollan en una capa llamada teca folicular. La teca está bien desarrollada en el folículo secundario, incluye la teca interna y la externa. En su fase final, el folículo alcanza un tamaño máximo. Tiene un gran antro lleno de folículos líquidos. Ha alcanzado su fase de madurez y está preparado para liberar el ovocito, proceso conocido como ovulación. En este momento, recibe el nombre de **folículo de Graaf** (1).

5.2 RESERVA OVÁRICA

Los ovarios de una mujer tienen dos tipos de folículos; los folículos primordiales, formados por un ovocito y la granulosa (una única capa de células planas) y los folículos en crecimiento. La cantidad de folículos primordiales de los que dispone una mujer en un momento concreto de su vida se conoce como reserva ovárica. Será determinada en el desarrollo intrauterino y disminuirá con la edad conforme se produce la activación y crecimiento de los folículos primordiales. Al nacimiento, una niña tiene aproximadamente 2 millones, valor que disminuye hasta los 25.000 aproximadamente a los 37-38 años (3)

Finalmente, la disminución de la reserva ovárica resultará en la menopausia; cese de la función reproductiva y hormonal del ovario de manera fisiológica. Debido a distintos factores como enfermedades, intervenciones quirúrgicas o tratamiento oncológico, se puede perder la función ovárica de forma anticipada, produciendo lo que se conoce como fallo ovárico prematuro. Según sociedades como la ESMO, ESHRE y la ASRM, el diagnóstico viene dado por la combinación de diferentes factores. Los criterios diagnósticos incluyen una edad inferior a 40 años, un periodo superior a 4 meses de ausencia de menstruación o alteración significativa del ritmo menstrual y la alteración de valores hormonales, FSH y estradiol. Los niveles de FSH por encima de 25mU/mL en al menos dos determinaciones separadas 4 semanas son criterio obligado, mientras que los niveles bajos de estradiol (<50 pg/mL) apoyan el diagnóstico (4).

Por ello, la velocidad de activación de los folículos primordiales tiene un papel decisivo en la duración de la vida reproductiva de una mujer. Existen diferentes fases en el desarrollo de los folículos: folículo primordial, folículo primario, folículo secundario, folículo antral y folículos preovulatorios. La mayoría son primordiales y se encuentran en estado silente hasta que se produce su activación y entran en estado de crecimiento,

proceso que se conoce como reclutamiento inicial del folículo primordial. Es diferente del reclutamiento cíclico que se produce mensualmente previo a la ovulación en mujeres en edad fértil. El cíclico está regulado por las gonadotropinas, FSH y LH, mientras que el reclutamiento de los folículos primordiales está regulado por señales procedentes de los ovocitos y las células de la pre granulosa, así como factores de crecimiento o estrés en el microambiente del folículo. Una vez se produce la activación, entra en una fase de desarrollo y crecimiento irreversible (4).

5.2.1 Vías moleculares de activación folicular

La velocidad a la que disminuye la reserva ovárica depende principalmente de la activación de dos vías moleculares diferentes, que de forma fisiológica están reguladas de forma muy precisa para evitar un fallo ovárico prematuro. Una de ellas, PTEN/PI3K/AKT, se encarga de activar los folículos primordiales en estado latente, haciendo que entren en fase de crecimiento. La otra vía, ABL/TAp63, induce la apoptosis de las células del ovario (4). Se cree que el daño sobre el estroma ovárico podría desembocar también en fallo ovárico prematuro, pero la interacción entre los folículos y el estroma todavía no se conoce bien (3).

Se ha demostrado que los agentes quimioterápicos activan de forma excesiva e incontrolada estas vías. Esto permite explicar a nivel molecular la disminución o incluso pérdida de la capacidad reproductiva de las mujeres en tratamiento oncológico (3).

La vía de señalización PTEN-PI3K-AKT tiene gran importancia en la activación de los folículos primordiales y está relativamente bien estudiada. La proteína PTEN (homólogo de fosfatasa y tensina) es una enzima expresada principalmente por las células de la granulosa de los folículos primordiales en estado latente. Su función es inhibir la señalización PTEN-PI3K-AKT, encargada de activar los folículos primordiales. En condiciones normales las células de la granulosa expresan PTEN, pero ante situaciones de estrés oxidativo la vía de PI3K se activa continuamente, lo que provoca el agotamiento de la reserva ovárica (3). En el caso de producirse una delección del gen *Pten*, también se desencadenaría un fallo ovárico prematuro. La enzima PTEN dejaría de expresarse y los ovocitos se activarían de manera excesiva (5).

La vía de señalización Hippo interacciona con la vía comentada previamente. Se encarga de regular el tamaño tisular controlando la proliferación celular, la apoptosis y el estado de quiescencia. Si está activa, se inhibe la proliferación de células foliculares y los folículos permanecen en estado quiescente. Sin embargo, si se desactiva se produce crecimiento y activación folicular (6).

Por otro lado, la vía ABL/TAp63 induce la apoptosis de las células del ovario. Cuando se produce un daño en el DNA causado por el tratamiento gonadotóxico, se activa la kinasa ABL1. Esta última fosforila TAp63, produciendo su activación. TAp63 induce la transcripción de genes proapoptóticos activándose la muerte celular (4).

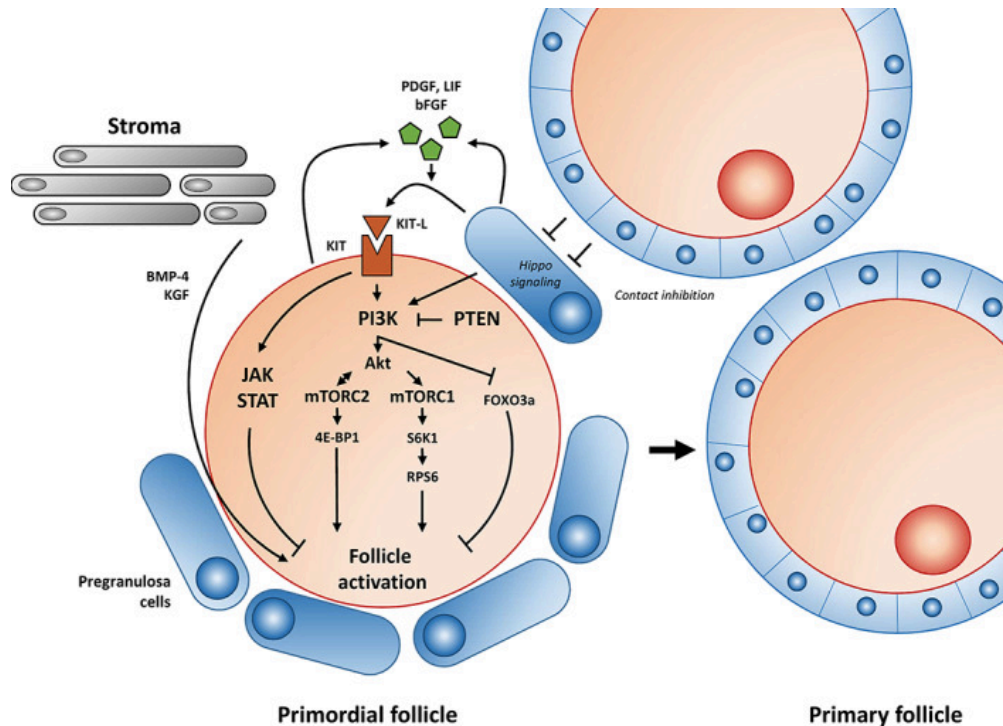


Figura 4. Vías moleculares de activación folicular (3).

Conocer el riesgo que tiene cada paciente de forma individual de insuficiencia ovárica prematura puede ayudar a tomar decisiones en el momento de elegir el tratamiento oncológico óptimo y si se beneficiaría o no de medidas adicionales de preservación de la fertilidad. Se calcula que entre un 10 y un 70% de las pacientes que se someten a tratamiento oncológico pierden la fertilidad (3,7).

5.3 CÁNCER Y FERTILIDAD

Según las últimas estimaciones de la Organización Mundial de la Salud, el número de personas diagnosticadas de cáncer a nivel mundial ha aumentado en las últimas décadas y se espera que siga creciendo. Uno de los principales efectos secundarios del tratamiento oncológico es la disminución o incluso pérdida de la fertilidad debido a la activación de las vías moleculares explicadas anteriormente. Preocupa principalmente a los pacientes más jóvenes, niños y adolescentes, que aún no han alcanzado la madurez sexual y a sus familias. Por ello, el trabajo se va a centrar en este sector de la población.

5.3.1 Cáncer infantil

A nivel mundial, se calcula que cada año padecen cáncer unos 400.000 niños y adolescentes de entre 0 y 19 años. Los tumores más prevalentes son la leucemia, los tumores del sistema nervioso central, encabezados por el neuroblastoma y los linfomas. En países como España más del 80% se curan gracias al diagnóstico precoz y los avances de tratamiento que se han producido en las últimas décadas (8).

El desarrollo del tratamiento oncológico ha permitido aumentar la supervivencia de los pacientes diagnosticados de cáncer, sin embargo, produce efectos secundarios que afectan negativamente a la calidad de vida del paciente. Uno de los más relevantes en edad fértil y en edad pediátrica es la disminución o pérdida de la fertilidad debida a quimioterápicos gonadotóxicos y/o radioterapia en determinadas zonas corporales. Comparado con la población general, las mujeres que han sido diagnosticadas y tratadas de un proceso oncológico tienen un 38% menos de posibilidades de tener un embarazo (9). Estas cifras varían en función de diferentes factores como la edad de la paciente, tipo de neoplasia, duración del tratamiento, etc.

Por ello, el desarrollo de distintas técnicas o terapias en el ámbito de la medicina que mejoren la calidad de vida de las personas se hace imprescindible para poder garantizar su bienestar (10).

5.3.1.1 Quimioterapia

El efecto de la quimioterapia en la reproducción femenina empezó a estudiarse en la década de 1970. Desde entonces, se ha demostrado que los agentes quimioterápicos tienen efectos gonadotóxicos que afectan a la capacidad reproductiva de las pacientes (9). Producen afectación microvascular del tejido resultando en isquemia, necrosis o inflamación. Además, activan vías moleculares que producen apoptosis de las células y activación prematura de los folículos primordiales resultando en disminución de la reserva ovárica (11).

Sin embargo, la repercusión sobre la fertilidad de los diferentes agentes quimioterápicos de forma individual ha sido difícil de determinar debido a que la práctica clínica habitual generalmente implica el uso de varios de ellos de forma simultánea (9).

Hay fuerte evidencia científica de que los fármacos quimioterápicos alquilantes producen daño severo sobre las gónadas. Son capaces de generar enlaces covalentes entre grupos alquilo y el DNA bloqueando la división celular. Algunos de los más empleados en la edad pediátrica son la Ciclofosfamida y el Cisplatino. Dentro de los agentes no alquilantes, la Doxorubicina, generalmente conocida por su nombre comercial, Adriamicina, es la que más se relaciona con problemas de reproducción femenina. Se utiliza en el tratamiento de distintos tumores típicamente pediátricos como el tumor de Wilms, linfomas, algunos tipos de leucemia, etc (9).

En la actualidad están en investigación distintos agentes protectores del ovario frente a fármacos quimioterápicos concretos. Se requieren estudios que aseguren que estas sustancias no interfieren en la eficacia del tratamiento oncológico. Al mismo tiempo, se debe garantizar que no perjudican la capacidad de desarrollo de los ovocitos ni conducen a la supervivencia de células con daños en el DNA, ya sean mutaciones genéticas o epigenéticas (9).

5.3.1.2 Radioterapia

La radioterapia afecta a la capacidad reproductiva de pacientes tratadas en la zona de cabeza y cuello, pelvis y médula espinal. La radiación sobre cabeza y cuello puede dañar el sistema nervioso central incluyendo hipotálamo y/o hipófisis. Esto afecta al eje hormonal hipotálamo hipofisario y en consecuencia puede producir disfunción ovárica. Además, la radiación sobre la pelvis tiene efecto directo en las gónadas, resultando en infertilidad.

Hay varios factores que determinan el nivel de daño producido: dosis de radiación, edad en el momento de la exposición, zona irradiada y tamaño del área irradiada. Es de interés para la medicina optimizar el tratamiento para reducir al máximo los efectos secundarios. El objetivo será irradiar la menor zona posible con la mínima dosis que permita garantizar la efectividad total del tratamiento al mismo tiempo que la seguridad (12).

En cuanto a los efectos de la radiación sobre el **ovario**, interesa determinar el daño que produce sobre el tejido distintos niveles de radiación aplicada en la zona pélvica. *Wallace et al.* sugieren en su modelo matemático que una dosis de 2 Gy podría provocar una destrucción del 50% de los ovocitos inmaduros. La dosis de esterilización efectiva es la dosis que produce disfunción ovárica de manera inmediata en el 97.5% de los pacientes tras el tratamiento. Este valor disminuye con la edad: es de 20.3 Gy en recién nacidos; 18.4 Gy a los 10 años; 16.5 Gy para mujeres de 20 años y 14.3 Gy a los 30. Sin embargo, la variabilidad entre mujeres de la misma edad es muy amplia (13).

En cuanto a los efectos sobre el **cuerpo del útero**, aquellas mujeres que han recibido radiación sobre el abdomen y/o pelvis tienen más riesgo de complicaciones durante el embarazo incluyendo problemas de concepción, abortos espontáneos, partos prematuros o muerte perinatal. El estudio realizado por *Critchley et al.* comparó pacientes expuestas a radiación durante la infancia con mujeres sin historia de exposición. Se descubrió que el útero de las pacientes irradiadas era de menor tamaño y presentaba lesiones fibróticas. Además, la vascularización estaba alterada y el endometrio no experimentaba cambios en respuesta al estradiol y progesterona (13).

En cuanto a los efectos sobre **cabeza y cuello**, la radioterapia afecta al eje hipotálamo hipofisario. Se estima que el riesgo relativo (RR) de aborto espontáneo es de 1.40 (95% IC: 1.02-1.94) en mujeres que reciben radiación sobre el cráneo en comparación con las no tratadas. En aquellas que, además del cráneo, reciben radiación en la zona de la médula, el RR aumenta hasta 2.22 (95% IC: 1.7-7.78) (13).

Antes de iniciar la terapia oncológica es importante tener en cuenta el riesgo de fallo ovárico prematuro (FOP) que tiene cada paciente en función de distintas variables, una de ellas el tipo de tratamiento y su duración. La **Tabla 3** expone algunas de las terapias más empleadas en oncología y su riesgo de producir fallo ovárico en las pacientes.

Tabla 3. Riesgo de FOP según el tratamiento oncológico. Tabla propia adaptada de la Sociedad Americana de Oncología Clínica (14)

Nivel de riesgo	Tratamiento oncológico
Alto (>80%)	<ul style="list-style-type: none"> • Trasplante de células madre hematopoyéticas con ciclofosfamida/irradiación corporal total • Radioterapia externa a un campo que incluya ovarios • CMF, CEF, CAF x 6 ciclos en mujeres mayores de 40 años (terapia adyuvante de cáncer de mama)
Intermedio	<ul style="list-style-type: none"> • CMF, CEF, CAF x 6 ciclos en mujeres de 30-39 años • AC x 4 ciclos en mujeres mayores de 40 años
Bajo (<20%)	<ul style="list-style-type: none"> • AVBD • CHOP x 4-6 ciclos • Terapia AML • Terapia ALL • CMF, CEF, CAF x 6 ciclos en mujeres menores de 30 años • AC x 4 ciclos en mujeres menores de 40 años
Muy bajo/ sin riesgo	Vinicristina, metotrexato, fluoracilo
Desconocido	Taxanos, irinotecan, anticuerpos monoclonales

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras el diagnóstico de un proceso oncológico, el facultativo debe explicar con claridad al paciente (o sus padres en el caso de menores de edad) en qué consiste su enfermedad y los efectos secundarios que puede padecer debido al tumor o su tratamiento. Un aspecto importante que tratar será la fertilidad y las distintas técnicas de preservación disponibles, hablando de las ventajas y desventajas de cada una de ellas. Aquellos pacientes que expresen interés en someterse a estos procedimientos y aquellos que muestren dudas, serán derivados a consultas específicas de reproducción lo antes posible para que se pueda valorar su caso de forma individual (15).

La fertilidad de los pacientes se abordará de forma multidisciplinar mediante un equipo que incluya expertos en reproducción, profesionales del ámbito de la salud mental, trabajadores sociales y expertos en consejo genético entre otros. Su objetivo será ofrecer la mejor opción disponible en cada caso y orientar en la toma de decisiones, además de aportar apoyo psicosocial tanto a los pacientes como a sus familiares (14).

A continuación, se comparan los distintos métodos de preservación de la fertilidad disponibles en la actualidad, exponiendo sus indicaciones, ventajas y desventajas. Se explica de forma detallada la criopreservación de tejido ovárico y posterior trasplante, objeto de estudio de este trabajo.

6.1 CRIOPRESERVACIÓN DE OVOCITOS O EMBRIONES

Son las técnicas más utilizadas en preservación de la fertilidad, incluyendo en pacientes con cáncer, debido a las ventajas múltiples que ofrecen y los resultados obtenidos. Sin embargo, para poder llevarlas a cabo es necesario que las pacientes sean mujeres en edad fértil con cierta madurez sexual y el eje hipotálamo-hipofisario activo y que se sometan a estimulación ovárica controlada. En el caso de niñas en edad prepuberal sin actividad ovárica activa o pacientes que necesiten quimioterapia de manera inmediata no pueden utilizarse estos métodos, por ello, será necesario valorar otras alternativas (14).

La estimulación ovárica tiene como finalidad lograr la maduración de varios folículos a la vez para aumentar el número de ovocitos disponibles para criopreservar y/o fecundar. Conlleva una serie de riesgos a valorar de forma individual en cada paciente, puede producir hiperestimulación ovárica y supone un aumento del riesgo oncológico en el caso de tumores receptores de estrógenos positivos (16).

Los resultados obtenidos se valoran en función de la tasa de embarazo y el porcentaje de recién nacidos vivos, además de la tasa de abortos. En la [Tabla 4](#) se comparan los resultados de la criopreservación de embriones frente a la criopreservación de ovocitos. La eficacia es mayor en la primera (14).

Tabla 4. Resultado de la criopreservación de embriones vs ovocitos. Información obtenida de las guías de la Sociedad Americana de Oncología Clínica (14).

	Tasa de embarazo	Tasa de RN vivos	Tasa de aborto
Criopreservación de embriones	49%	35-41%	17-22%
Criopreservación de ovocitos	35%	26-32%	11%

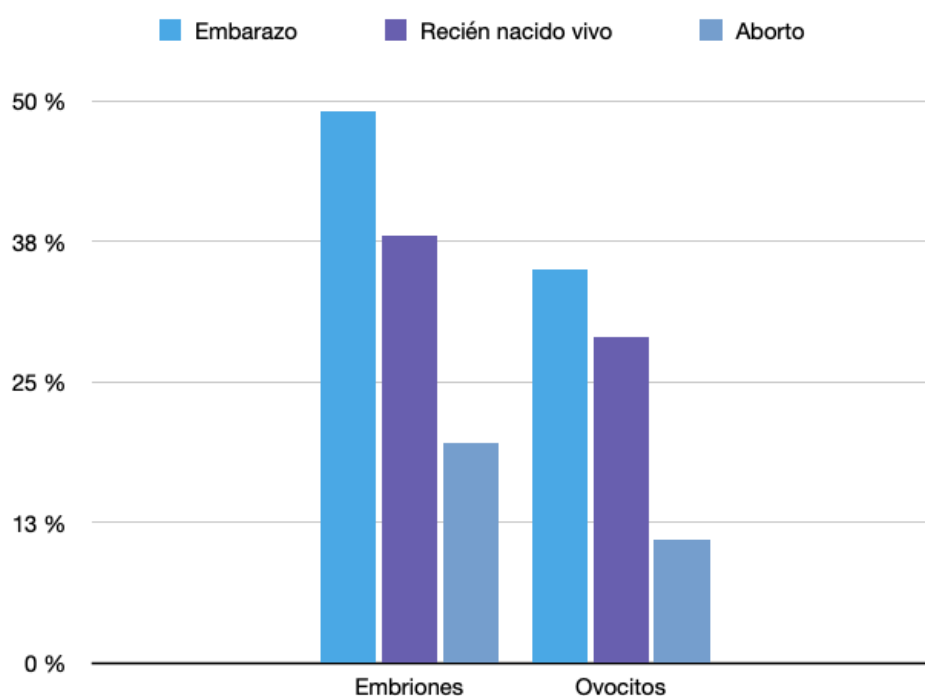


Figura 5. Criopreservación de embriones vs ovocitos. Información obtenida de la Sociedad Americana de Oncología Clínica (14)

6.2 CRIOPRESERVACIÓN DE TEJIDO OVÁRICO

Como ya se ha explicado previamente, en el caso de niñas pre púberes sin actividad ovárica activa o pacientes que necesiten quimioterapia de manera inmediata no es posible preservar ovocitos maduros o embriones. La criopreservación de la corteza ovárica (OTC por sus siglas en inglés) y su posterior trasplante es la única opción disponible. Además de preservar la función ovárica, también permite restaurar la función endocrina, permitiendo el desarrollo de caracteres sexuales secundarios en las niñas y aportando múltiples beneficios; óseos y cardiovasculares entre otros.

El desarrollo de los caracteres sexuales es un asunto que preocupa mucho a los familiares de las niñas, por lo que la OTC supone una ventaja frente a la preservación de embriones u ovocitos, en las cuales no se restaura la función hormonal de las pacientes (17). La OTC y OTT son consideradas técnicas seguras tanto en la edad adulta como en la infancia (18).

En el año 2004, *Donnez et al.* reportaron el primer caso de recién nacido vivo tras trasplantar tejido ovárico criopreservado a una mujer tratada con quimioterapia por un linfoma de Hodgkin en estadio IV (17). Desde entonces, a nivel mundial se estima que la técnica ha sido aplicada en más de 10.000 niñas y mujeres. Aproximadamente se han producido unos 200 nacimientos gracias al trasplante de tejido ovárico (19).

En cuanto a la función endocrina, el primer caso de restauración de la función hormonal se documentó en 2013 en una niña diagnosticada de sarcoma de Ewing a los nueve años. Cuatro años después del diagnóstico, tras completar el tratamiento oncológico se llevó a cabo el trasplante de tejido ovárico. A los cuatro meses apareció la primera menstruación, manteniéndose durante 19 meses. Además, se produjo el desarrollo de caracteres sexuales secundarios (estadio 4 de Tanner) (20).

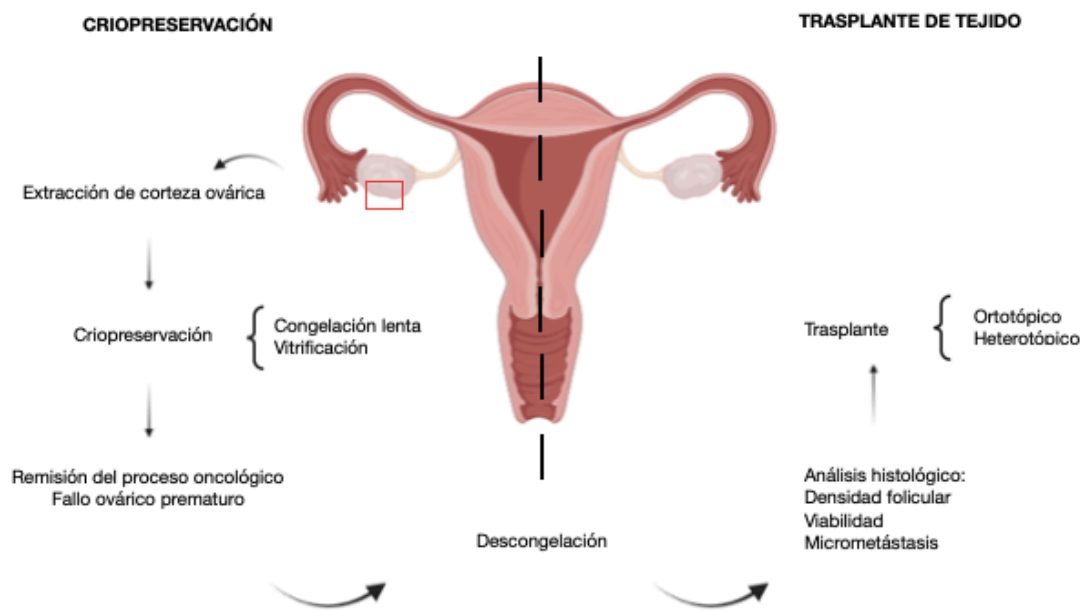


Figura 6. Criopreservación y trasplante de tejido ovárico. Figura adaptada con BioRender (20)

6.2.1 Indicaciones

En la actualidad, es difícil determinar qué tipo de paciente podía beneficiarse en mayor medida de este método de preservación de la fertilidad debido a la insuficiente evidencia científica. Por ello, hay una falta de consenso sobre los pacientes a los que se les debería ofrecer (12).

Se recomienda en mujeres cuya función ovárica se vea amenazada de forma directa o indirecta debido a un problema oncológico de base y que, además, no sean candidatas a otras técnicas de preservación de la fertilidad (criopreservación de óvulos o embriones). Se incluye en este grupo a niñas pre púberes sin función ovárica activa y aquellas mujeres que no puedan someterse a estimulación ovárica (necesidad de tratamiento oncológico inmediato o tumores positivos para receptores de estrógenos). El especialista debe ofrecer esta opción principalmente a las pacientes con un riesgo intermedio o alto de fallo ovárico prematuro. En el caso de riesgo bajo se sugiere valorar en función de los intereses individuales de cada paciente (18).

La edad es un factor clave en el éxito de la técnica, los 35 años se consideran el límite superior para poder llevarla a cabo, puesto que a partir de esta edad el número de folículos primordiales disminuye de forma significativa (11).

Por tipo de tumor, puede aplicarse tanto en tumores benignos como malignos, siendo más frecuente en este último grupo (74%). Hasta ahora las principales indicaciones son los linfomas (38%) y el cáncer de mama (27%). En pacientes menores de 20 años destacan la leucemia, tumores del sistema nervioso central y linfomas (12).

6.2.2 Contraindicaciones

Uno de los problemas que más preocupa a los investigadores es la probabilidad de reimplantar células malignas del tumor a la paciente en remisión completa al trasplantar el tejido ovárico congelado.

Los estudios han demostrado que el riesgo general es muy bajo, sin embargo, en tumores hematológicos, el riesgo aumenta. Principalmente en el caso de la leucemia, el tumor más prevalente de la edad pediátrica. Por ello, el trasplante de tejido ovárico en el caso de tumores hematológicos no siempre se recomienda (12). En este tipo de pacientes la maduración in vitro de los folículos primordiales presentes en el tejido podría ser una alternativa prometedora. El riesgo también es elevado en tumores de ovario, otra contraindicación de la criopreservación ovárica (12).

La radioterapia sobre la región pélvica afecta al riego sanguíneo de la zona y puede producir atrofia de endometrio y afectar a la función de la musculatura del útero. En consecuencia, disminuye la probabilidad de que se produzca un embarazo. Esta dificultad añadida puede contraindicar la criopreservación ovárica (12,13).

6.2.3 Preparación del tejido

Los folículos primordiales están localizados justo debajo de la superficie ovárica, en la región cortical. El objetivo de la criopreservación ovárica será obtener quirúrgicamente fragmentos de esta región para en un futuro, tras la curación de las pacientes, trasplantarlos de nuevo (21). La evidencia científica demuestra que cada paso es

importante en la preservación del tejido y la viabilidad posterior del trasplante ovárico (22).

6.2.3.1 Extracción del tejido

Hasta hace poco la práctica habitual consistía en extraer el ovario completo y fragmentarlo en láminas para su posterior preservación. Sin embargo, se observó que el riesgo/beneficio no justificaba la extracción de la gónada completa debido a que en muchos casos el riesgo de fallo ovárico primario no era extremo. En la actualidad, se extrae únicamente parte del tejido, reservando la extracción del ovario completo para casos en los que la mujer presenta un riesgo de fallo ovárico superior al 80% (21).

Para valorar el riesgo individual de fallo ovárico de cada paciente se deben tener en cuenta distintos factores como la edad, el tipo de tumor y el tratamiento necesario. El riesgo será mayor cuanto más avanzada sea la edad de la paciente y más agresivo sea el tumor y su tratamiento (21). En pacientes pre púberes se ha observado que el riesgo presentado es menor, por lo que generalmente se tiende a ser más conservador (23).

Si el riesgo de fallo ovárico es inferior al 80%, se extrae únicamente la corteza ovárica. Para separar la médula de la corteza se han descrito distintos métodos de decorticación: raspado con una hoja de bisturí, corte con tijeras microquirúrgicas y corte en láminas mediante un *slicer*. Durante el proceso pueden producirse daños y verse afectado el estroma o la viabilidad folicular. Para evaluar la repercusión que tienen sobre el tejido ovárico cada uno de los métodos de decorticación, se comparan distintos parámetros: grosor del injerto, viabilidad folicular y del estroma y la dinámica de activación de los folículos (21).

El estudio llevado a cabo por *Herrainz et al.* muestra que tras tres horas de cultivo in vitro el porcentaje de folículos morfológicamente normales es similar en los tres grupos. En los folículos anómalos, la alteración observada principalmente es el desprendimiento de la lámina basal y la contracción del citoplasma. A pesar de no encontrar diferencias estadísticamente significativas en la densidad folicular ni en el número de folículos primordiales, primarios o secundarios, parece que el uso de tijeras microquirúrgicas permite conservar un número mayor de folículos (22).

En cuanto a los resultados obtenidos in vivo, se valoran las características del tejido a los 21 días del trasplante. Los resultados obtenidos en los tres grupos a estudio son similares, no se encuentran diferencias significativas entre ellos. Además, la investigación de *Herrainz et al.* valora el daño producido sobre el estroma. Parece que el bisturí y las tijeras microquirúrgicas producen más fibrosis que el microtomo en las células estromales (22).

Ateniéndonos a la información aportada por distintos investigadores, no se puede concluir qué método de extracción de tejido es mejor. Se valoran diferentes características tisulares y cada método ofrece ventajas e inconvenientes con respecto a los otros. En la práctica habitual se emplean principalmente las tijeras microquirúrgicas o el bisturí (21).

En cuanto a la **técnica quirúrgica**, han sido empleadas la laparotomía, mini laparotomía, laparoscopia y cirugía robótica. El abordaje laparoscópico se considera la técnica más adecuada. Una de las ventajas que ofrece es la recuperación rápida de las pacientes, permitiendo comenzar la quimioterapia lo antes posible. La cirugía robótica podría aportar más beneficios que la laparoscopia, entre ellos, precisión, delicadeza y reducción del tiempo quirúrgico (11).

Se recomienda la extracción de tejido y su criopreservación antes del inicio de la quimioterapia debido a que el tratamiento puede producir alteraciones cualitativas y cuantitativas en los folículos y ovocitos, además de daño vascular y fibrosis en el ovario (24). En el caso de que no sea posible, la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología indica que aquellos pacientes que ya han recibido tratamiento gonadotóxico en dosis bajas pueden ser candidatos a preservación del tejido ovárico como una opción de conservación de la fertilidad. Estudios recientes han demostrado que no se ven alterados los resultados, por ello, ya no supone una contraindicación (18).

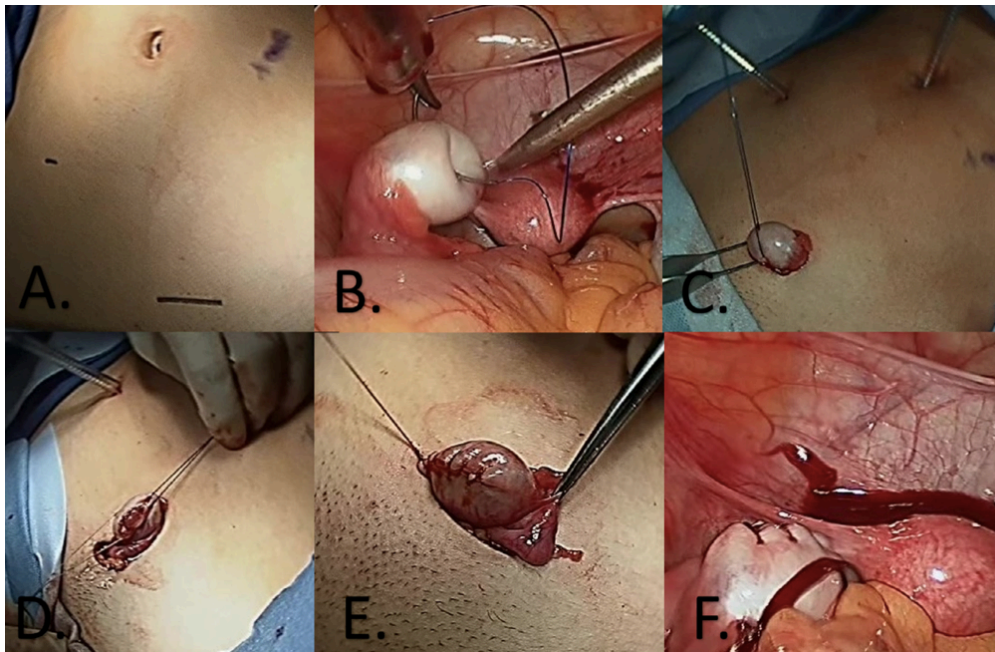


Figura 7. Procedimiento de extracción de tejido ovárico (21). A. Localización de los puntos de entrada a cavidad abdominal. B. Sutura de tracción para facilitar la manipulación y exteriorización. C. Exteriorización del ovario a través de la incisión suprapúbica izquierda. D. Resección en cuña del ovario con bisturí con ayuda de suturas de fijación y control vascular intermitente. E. Hemostasia mediante electrocauterización y cierre de la cápsula ovárica con una sutura continua de Vicryl. F. El ovario se coloca en su posición anatómica.

6.2.3.2 Cantidad de tejido

La corteza ovárica debe tener un grosor lo suficientemente fino como para facilitar la entrada y eliminación posterior de los agente crioprotectores, pero a su vez, lo suficientemente grueso como para preservar los folículos primordiales ováricos (25). Además, las dimensiones tienen importancia en la supervivencia del tejido al periodo hipóxico inicial al que se somete (26). Se recomienda un grosor de corteza ovárica de aproximadamente 1-2 mm (25).

6.2.3.3 Crioprotectores

Tras extraer el tejido ovárico, se procede a su congelación. La exposición de células a temperaturas por debajo de 0°C sin la presencia de sustancias crioprotectoras es generalmente letal. Los tejidos corporales tienen un 80% de agua en su composición, ya sea intracelular o extracelular. Su congelación genera daños bioquímicos y cambios estructurales que producen la muerte de las células. Con el objetivo de mitigar estos efectos se deben emplear crioprotectores (permeantes o no permeantes) (27).

AGENTES PERMEANTES O PENETRANTES

La capacidad que tienen estos componentes de proteger las células de los efectos mecánicos y osmóticos de la congelación depende de distintas propiedades. Deben ser solubles en agua a temperaturas bajas, ser capaces de cruzar membranas biológicas e idealmente, ser mínimamente tóxicos. Su tamaño (menos de 100 daltons generalmente) y su naturaleza anfipática les permite penetrar las membranas. Tienen la capacidad de formar enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua disminuyendo la formación de cristales de congelación. Como resultado, disminuyen los daños mecánicos que producen estos cristales en las células (27).

Algunos de los agentes permeantes más conocidos son el glicerol (primero en ser descubierto), dimetilsulfóxido, etilenglicol y propilenglicol.

AGENTES NO PERMEANTES O NO PENETRANTES

El polietilenglicol, polivinilpirrolidona, rafinosa, glucosa, sacarosa y trehalosa son los más comúnmente usados. Debido a sus características; peso molecular elevado y ausencia de naturaleza anfipática, no son capaces de atravesar las membranas celulares, por lo que ejercen su influencia protectora fuera de ella. Al actuar desde el exterior de la célula es necesario emplear concentraciones elevadas para garantizar su eficacia. Se emplean en procesos de vitrificación (20).

La toxicidad producida por agentes permeantes y no permeantes en concentraciones elevadas es uno de los factores más limitantes en el procedimiento de criopreservación. Para disminuir el efecto tóxico, las células deben ser expuestas el menor tiempo posible a la menor concentración posible, siempre y cuando se asegure la viabilidad del proceso (27).

A pesar de que el uso de EG y DMSO de forma individual ha sido la práctica habitual en el campo de la criopreservación, estudios llevados a cabo por *Kojayan et al.* han demostrado que la combinación de agentes crioprotectores disminuye los efectos adversos. En la actualidad, se sugiera la combinación de varios para ofrecer una viabilidad celular mayor post criopreservación (27). Además de los agentes crioprotectores, se han estudiado otras sustancias que podrían mejorar los resultados al añadirles al medio. Numerosos estudios han destacado la importancia de antioxidantes como la vitamina E o la melatonina (28).

6.2.3.4 Velocidad de enfriamiento

La criopreservación ovárica puede emplear dos métodos de enfriamiento del tejido, la congelación lenta y la congelación rápida o vitrificación. La técnica más utilizada tradicionalmente a nivel internacional es la congelación lenta, con más de 200 nacimientos tras el trasplante del tejido ovárico. Sin embargo, en los últimos años la vitrificación ha demostrado resultados prometedores (29).

CONGELACIÓN LENTA

La congelación lenta o *slow freezing* disminuye gradualmente y de forma controlada la temperatura a la que se expone el tejido gracias a congeladores programables. El tiempo necesario para llevar a cabo el proceso es de horas (20).

Es necesario el uso de crioprotectores en concentración baja o moderada. Su principal riesgo es la formación de cristales de hielo intracelulares al congelar el tejido demasiado rápido. Para minimizarlo, la salida de agua de las células se produce de forma gradual (25). Sin embargo, si el proceso es excesivamente lento, puede originar daño celular irreparable al producirse una deshidratación excesiva. Por ello, es importante encontrar un equilibrio que permita criopreservar el tejido en las mejores condiciones y al mismo tiempo asegurar su viabilidad (20).

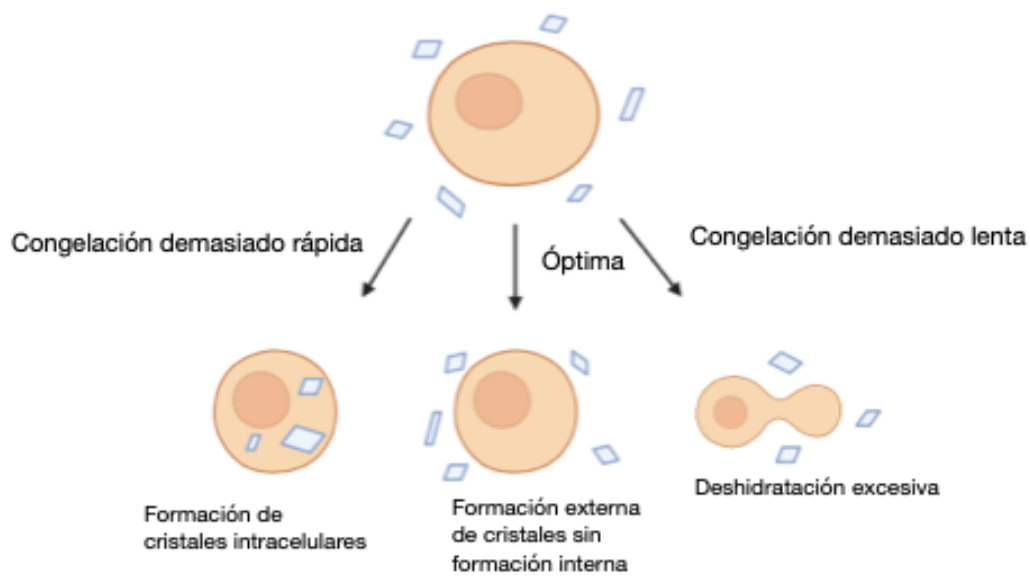


Figura 8. Problemas asociados a diferentes velocidades de congelación. Adaptada con BioRender (20).

La temperatura óptima es diferente para cada célula, en el caso del tejido ovárico se ha observado que lo mejor es programar el congelador de forma que disminuya la temperatura gradualmente en distintas fases.

En una primera fase se reduce desde los 16°C hasta -7°C a una velocidad de 2°C/min. Se mantiene durante 10 minutos la temperatura obtenida, para en una tercera fase alcanzar los -30°C a una velocidad de 0.3°C/min. Finalmente, se disminuye la temperatura hasta -150°C a un ritmo de 5°C/min. Una vez alcanzado el objetivo de temperatura, se mantiene unos 30 minutos y después se transfiere a tanques de nitrógeno líquido a una temperatura de -196°C para su almacenamiento a largo plazo (20).

CONGELACIÓN RÁPIDA O VITRIFICACIÓN

La formación de agua sólida con una estructura amorfa e irregular se conoce como vitrificación. Se consigue mediante el uso de crioprotectores y una apropiada velocidad de enfriamiento. Conlleva la solidificación instantánea del tejido pasando de temperatura ambiente a -196°C de forma extremadamente rápida, en solamente unos minutos. Debido a la velocidad de enfriamiento el tejido se vitrifica, por lo que no existe riesgo de formación de cristales de hielo intracelulares. A diferencia de la congelación lenta, para poder emplear esta técnica es necesaria una dosis muy alta de crioprotectores, que si no se manejan bien puede suponer una toxicidad muy elevada para el tejido y resultar en muerte celular.

Tiene la ventaja de disminuir el coste y el tiempo necesarios para congelar el tejido ovárico, además de que la cantidad de nitrógeno líquido que utiliza es menor y no necesita un sistema de congelación programable (25).

Tabla 5. Congelación lenta vs vitrificación

CARACTERÍSTICA	CONGELACIÓN LENTA	VITRIFICACIÓN
Velocidad de enfriamiento	Lenta	Muy rápida
Formación de cristales	Si	No
Crioprotectores	Concentración baja	Concentración alta
Tiempo necesario	Horas	Minutos
Uso actual	En disminución	En aumento

Existen kits de vitrificación comerciales diseñados para la congelación de ovocitos, embriones y tejido ovárico. Consisten en varias soluciones con concentraciones escalonadas de crioprotectores. Un ejemplo es el kit de la marca Kitazato, contiene componentes como la threalosa, DMSO, hidroximetilcelulosa y gentamicina. Estudios clínicos han demostrado tasas de supervivencia superiores al 90% en muestras vitrificadas utilizando este sistema. Además, destaca por su seguridad y facilidad de uso, diseñado para minimizar el riesgo de contaminación y facilitar su manejo en el laboratorio (20).

CONGELACIÓN LENTA VS VITRIFICACIÓN

Recientemente se han estudiado las características del tejido ovárico tras un proceso de congelación lenta en comparación con un proceso de vitrificación.

En cuanto a la morfología del folículo, no se han encontrado diferencias significativas entre ambos grupos. El porcentaje de folículos primordiales y folículos primarios morfológicamente normales es equivalente (11). Además, no se encontraron diferencias en la proporción de folículos en fase primaria y secundaria inmediatamente después de la descongelación. Tampoco tras 8 días de cultivo in vitro (25).

Como la mayoría de los folículos morfológicamente normales no son activos, es crucial estudiar la viabilidad folicular y la expresión genética en la valoración del tejido ovárico. Para ello se llevan a cabo distintos métodos analíticos que permiten diferenciar células vivas de muertas, determinar daño en el DNA y apoptosis celular, medir la actividad mitocondrial y medir el diámetro folicular para estudiar su crecimiento in vitro. Determinados autores han concluido que la vitrificación produce menor daño en el material genético de las células, sin embargo, es controvertido y no todas las investigaciones lo apoyan, incluso algunos estudios concluyen lo contrario. En cuanto a la proporción de células vivas y muertas, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas. La actividad mitocondrial parece ser menor en el caso de la vitrificación (25,29).

En cuanto a la respuesta endocrina, ningún estudio encontró diferencias estadísticamente significativas en la producción de estradiol ni de hormona antimülleriana. Sin embargo, se debe tener en cuenta que el número de estudios es limitado y varían considerablemente en cuanto a la metodología (25).

A pesar de los datos limitados con respecto a la vitrificación, los resultados histológicos y bioquímicos obtenidos tan prometedores han convencido a varios centros europeos y estadounidenses de aumentar el porcentaje de muestras de tejido que son criopreservadas con esta técnica. En el caso de Japón, se ha convertido en el método predominante con un 93.7% de los centros empleando la vitrificación. Es necesario llevar a cabo más estudios que comparen ambos métodos de forma homogénea y en el caso de demostrar que son técnicas equivalentes en cuanto a los resultados obtenidos, la vitrificación se consideraría superior debido a que es una estrategia más eficiente económicamente (25).

6.2.3.5 Descongelación

La descongelación del tejido es un punto clave en el que la viabilidad puede verse afectada. La velocidad a la que se descongela el tejido depende de los agentes crioprotectores utilizados y la técnica de congelación. En el caso de la vitrificación, se deja la muestra durante 2 minutos a temperatura ambiente en una solución de descongelación para posteriormente introducirla en agua a 37°C. El tejido que se ha sometido a congelación lenta se coloca en agua a 90-95°C hasta que el hielo se derrite. Después se introduce en soluciones rehidratantes a 25°C (27). Otros métodos como el láser infrarrojo están en investigación (11).

Normalmente el tejido ovárico de las pacientes permanece congelado durante un largo periodo de tiempo. Se ha demostrado que el paso del tiempo no tiene impacto en la preservación del tejido ni en la recuperación de la función ovárica. Tras años congelado, mantiene la integridad morfo funcional y permite recuperar la función ovárica al ser trasplantado (18).

6.2.3.6 Análisis del tejido

Uno de los problemas que más preocupa a los investigadores es la probabilidad de reimplantar células malignas del tumor a la paciente en remisión completa al trasplantar el tejido ovárico congelado.

Una vez extraído el tejido se analiza su histología para estudiar distintos parámetros de viabilidad, entre ellos la presencia de células cancerígenas. Se comprueba la fase de desarrollo en la que se encuentran los folículos, la densidad folicular (número de folículos por mm²) y las características morfológicas de los folículos y de las células del estroma. Además, se analiza a nivel molecular e inmunohistoquímico con el objetivo de detectar micrometástasis (30).

Parte del tejido extraído se tiñe con hematoxilina eosina para valorar la presencia de células malignas y las características morfológicas de los folículos y las células del

estroma. Otra parte del tejido se incubaba con anticuerpos para inmunohistoquímica con el mismo objetivo, la detección de micrometástasis. A pesar de esto, no hay garantía total de que esté libre de células cancerosas (30).

Los estudios han demostrado que el riesgo general es muy bajo, sin embargo, en tumores hematológicos, el riesgo aumenta. Principalmente en el caso de la leucemia, el tumor más prevalente de la edad pediátrica. Por ello, el trasplante de tejido ovárico en el caso de tumores hematológicos no siempre se recomienda (19). Este tipo de pacientes se podrían someter a quimioterapia antes de extraer el tejido ovárico para disminuir las posibilidades de encontrar células malignas. Sin embargo, tampoco garantiza la ausencia de contaminación (24). Con todo ello, la maduración in vitro de los folículos podría ser una alternativa prometedora.

6.2.4 Trasplante del tejido

Se realiza tras un periodo de remisión de al menos 2 años y tras la aprobación por parte del equipo de oncología/hematología. Antes del OTT todas las mujeres deben someterse a múltiples controles médicos incluyendo un TC, densitometría ósea y mamografía para valorar su salud general. Además, su pareja, si la tuviera, es valorada para descartar otras posibles causas de infertilidad (30).

La cantidad de tejido transferido varía según el caso: en la mayoría se transfiere aproximadamente un 50% en un primer trasplante. Si la mujer es de edad avanzada o su reserva ovárica es baja se requiere más tejido (30). En algunas pacientes se puede valorar un segundo trasplante de tejido ovárico, ya sea por recurrencia de la enfermedad oncológica o corta función del tejido trasplantado (31).

El tejido se puede implantar en distintas localizaciones. En función de la ubicación podemos diferenciar entre trasplante ortotópico, se trasplanta el tejido en el espacio fisiológico del ovario y trasplante heterotópico, se trasplanta en la pared pélvica o en una bolsa peritoneal preparada previamente. Es posible implantarlo al mismo tiempo en dos zonas diferentes (ortotópico + heterotópico) (32). El trasplante en el propio ovario aumenta la viabilidad del tejido al ser el mismo tipo celular y poder localizar fácilmente el lugar exacto donde se debe colocar. Sin embargo, hay que tener en cuenta el riesgo de hemorragia y la posibilidad de traumatismo ovárico debido a las suturas. La posibilidad de producirse un embarazo de forma natural sin necesidad de técnicas de reproducción asistida dependerá de la cercanía a las trompas de Falopio. A mayor cercanía, mayor facilidad. Si el tejido ovárico restante no es suficiente para llevar a cabo un trasplante ortotópico, la bolsa peritoneal debe valorarse. La tasa de fertilidad es inferior, por lo que será una alternativa al trasplante ortotópico (11).

No se han reportado complicaciones específicas relacionadas con el trasplante de tejido ovárico diferentes a las complicaciones que pueden producirse en una cirugía laparoscópica o una laparotomía ginecológica (32).

Uno de los problemas a tener en cuenta al trasplantar tejido ovárico es la pérdida folicular que se produce en el periodo de post trasplante temprano, conocida como fenómeno *burn out* o consumo folicular. Se calcula que es del 50% en mujeres adultas. Es debida a la activación anormal de vías moleculares encargadas de activar los folículos primordiales (24).

Numerosos grupos de investigación están desarrollando estrategias para mitigar la pérdida folicular a gran escala que se produce tras el injerto del tejido. Su objetivo es mejorar el proceso de revascularización inmediatamente después del trasplante con el fin de reducir los daños relacionados con la hipoxia. Se han obtenido resultados prometedores en relación con el uso de células madre adultas con potencial proangiogénico, factores de crecimiento proangiogénicos como el factor de crecimiento de fibroblastos y potenciadores de la revascularización como la esfingosina-1-fosfato. Los resultados en ratones demuestran que los niveles de hipoxia son mucho menores, resultando en una mayor reserva ovárica y una distribución folicular más fisiológica (24).

6.2.5 Seguimiento posterior y recuperación de la función ovárica

La función ovárica se monitoriza en intervalos de unas 4 semanas mediante ecografías ginecológicas y estudio de la función hormonal (FSH, LH, estradiol, progesterona y testosterona). Tras la aparición del primer ciclo menstrual las revisiones pasan a programarse en función de las necesidades de cada paciente (30).

El estudio realizado por *Fabbri et al.* con una muestra de 30 mujeres con insuficiencia ovárica post tratamiento oncológico, demuestra la elevada tasa de recuperación de la función endocrina tras el trasplante de tejido ovárico (30).

Aproximadamente tres meses tras el primer injerto, las pacientes notificaron el cese de síntomas menopáusicos. Los niveles de FSH y LH comenzaron a disminuir hasta alcanzar niveles pretrasplante (FSH <25 IU/l y LH <15 IU/l) a las 19 semanas y 19.5 semanas respectivamente. Los niveles de estradiol aumentaron hasta alcanzar valores de normalidad (>200 pmol/l) a las 19.5 semanas. Al mismo tiempo, se observó desarrollo de los folículos ováricos mediante ecografía en la localización del trasplante (30,32). En cuanto a los valores de hormona antimülleriana, un único estudio aportó datos suficientes pre y postrasplante. En aquellas mujeres con valores inferiores a 1 ng/ml previos al trasplante (indicativo de baja reserva ovárica anterior a la intervención) se produjo una tasa de embarazo del 27% (30).

Todas las mujeres recuperaron sus ciclos menstruales regulares y niveles hormonales propios de mujeres de su edad. El primer sangrado menstrual espontáneo apareció a los 4.2 ± 0.8 meses tras OTT (30). En contraposición, *Khattak et al.* observaron regreso de la menstruación en un 72% de las pacientes, con unas 18 semanas de tiempo medio hasta el retorno (32). Las pacientes que recibieron un segundo trasplante de tejido ovárico recuperaron la función entre los 2 y 4 meses posteriores (31).

La duración de la función injerto ovárico depende de diversos factores: edad en el momento de la criopreservación, reserva ovárica de base, tipo tratamiento oncológico y su duración, las técnicas de preparación del tejido ovárico, protocolos de congelación, cantidad de tejido cortical trasplantado, localización del trasplante y técnica, grado de isquemia postrasplante y el número de folículos ováricos en el tejido trasplantado (17). La duración media fue estimada en 2.5 años en un conjunto de 19 estudios. En el grupo de mujeres estudiadas la media de edad fue de 27.1 años (32).

6.2.6 Resultados de OTC

La criopreservación de tejido ovárico era un procedimiento considerado experimental hasta que en 2019 las guías ASRM la consideraron una técnica aceptable de preservación de la fertilidad (33). La Sociedad Americana de Oncología Clínica en 2025 la considera una técnica con evidencia científica moderada y de recomendación fuerte (14).

Una vez se ha comprobado que la paciente ha experimentado el retorno de la función hormonal y reproductiva mediante su seguimiento en los meses posteriores al trasplante se estudia el porcentaje de embarazo, recién nacido vivo y aborto. Además, en los últimos años son muchos los estudios que comparan las técnicas de preservación de la fertilidad utilizadas mayoritariamente a nivel internacional (preservación de ovocitos y de embriones) con la criopreservación de tejido ovárico.

Un ejemplo es el metaanálisis dirigido por *Fraison et al.* en el año 2022. Un total de 8 estudios relativos a la **preservación de ovocitos** son incluidos en el metaanálisis. El porcentaje de mujeres que tuvo un embarazo tras someterse a fecundación in vitro y posteriormente dio a luz a un recién nacido vivo fue del 32% (IC 95%: 25-39). Un 11% de las pacientes sufrió un aborto espontáneo (IC 95%: 6-19) (33).

La **preservación de embriones** es valorada mediante un total de 14 estudios. La tasa de embarazo dando a luz a un recién nacido vivo fue del 41% (IC 95%: 34-48). Un 22% de las pacientes tuvo un aborto espontáneo (IC 95%: 14-30) (33).

En cuanto a la **criopreservación de tejido ovárico**, recoge los resultados obtenidos en un total de 15 estudios. Un 33% de las pacientes (IC 95%: 25-42) tuvo un embarazo espontáneo sin necesidad de someterse a técnicas de reproducción asistida. El porcentaje de mujeres que tuvieron al menos un embarazo dando a luz a un recién nacido vivo tras FIV fue del 17% (IC 95%: 13-22). Además, un 14% de las pacientes sufrió un aborto espontáneo (IC 95%: 9-21) (33). Casi la totalidad de las mujeres recuperó la función endocrina ovárica, únicamente en un 6% (IC 95%: 3-12) de los casos no se observó restauración de la función (33).

El metaanálisis concluye que la OTC es una técnica aceptada en la actualidad que puede ser ofrecida en casos en los que no sea posible llevar a cabo la criopreservación de ovocitos o embriones. Además, resalta la ventaja que ofrece con respecto a otros métodos de restaurar la función endocrina de las pacientes.

La Sociedad Americana de Oncología Clínica en la última actualización de sus guías de preservación de la fertilidad (2025) llega a las mismas conclusiones y aporta resultados similares. La tasa de embarazo tras OTC es del 44%, dando lugar a un recién nacido vivo en un 19-32% de los casos. El porcentaje de aborto varía del 7.5% al 14% en función del estudio. Concluye también que permite restaurar la función ovárica hasta en un 95% de las mujeres (14).

6.2.7 Factores predictivos de regreso de la función ovárica

Como se ha demostrado anteriormente, las pacientes que se someten a criopreservación ovárica y trasplante posterior del tejido son estudiadas con el objetivo de determinar la eficacia del proceso. Tras años de investigación, se ha tratado de identificar los factores relacionados con la paciente más determinantes en el regreso de la función hormonal y reproductiva tras el trasplante de tejido ovárico criopreservado. Conocerlos puede ayudar a establecer un protocolo concreto que permita determinar qué tipo de paciente se beneficiaría en mayor medida de la técnica. Los más destacados se desarrollan a continuación (32).

EDAD

Es el factor más importante. La tasa de embarazo y de retorno de la función hormonal depende en gran medida de la edad de la paciente en el momento de extracción del tejido ovárico. Se ha demostrado que a partir de los 35 años desciende considerablemente la reserva ovárica de las mujeres y en consecuencia, el éxito del proceso. Debido a este motivo, se recomienda proponer la criopreservación ovárica en pacientes menores de 35 años (34).

ESTADO REPRODUCTIVO

Las mujeres adultas con una función ovárica activa (ciclos menstruales regulares, recuento adecuado de folículos antrales y niveles adecuados de AMH) y las pacientes pre-púberes tienen más posibilidad de recuperar la función ovárica (34).

TRATAMIENTO ONCOLÓGICO PREVIO A LA EXTRACCIÓN DE TEJIDO

Se valora el retorno de la función endocrina y la tasa de embarazo en mujeres que han recibido tratamiento oncológico previo a la criopreservación ovárica y en aquellas que no lo han recibido. Los resultados dependen del tipo de agente quimioterápico empleado y el número de ciclos necesarios. A dosis bajas, no son estadísticamente significativos, por lo que el tratamiento quimioterápico en este tipo de pacientes la criopreservación de tejido ovárico no está contraindicada (32).

TIPO DE CÁNCER

No hubo datos suficientes para relacionar el tipo de cáncer con la tasa de embarazo y de recién nacidos vivos. Se observó que en el caso de las pacientes con cáncer de cérvix no

se produjo ningún embarazo, por ello el número de pacientes con este tipo de cáncer a las que se ofrece la criopreservación ovárica es muy limitado (estadios muy iniciales que generalmente no requieran tratamiento adyuvante). A pesar de los pocos beneficios reproductivos, el regreso de la función hormonal podría ser indicación de trasplante de tejido ovárico (32).

6.3 OTRAS TÉCNICAS

Además de los métodos descritos, existen otras técnicas de preservación de la fertilidad menos empleadas que podrían valorarse en casos concretos.

6.3.1 Transposición ovárica

Fue descrita por primera vez en 1958 por *McCall et al.* como una estrategia para proteger los ovarios de la radioterapia en pacientes tratadas en la zona pélvica. Principalmente se ofrece a pacientes en edad reproductiva que requieren radiación pélvica para tratar tumores de cérvix, colorrectales o linfomas en la región de la pelvis. Consiste en mover uno o los dos ovarios a una localización diferente al campo de radiación. Hay distintas variantes en la técnica, pero el procedimiento básico consiste en separar el pedículo útero ovárico y diseccionar la arteria y vena del ovario. De esta manera se puede desplazar de la zona y unir a la pared abdominal, variando la localización exacta en función del tratamiento planeado. Tras el tratamiento, el ovario puede ser recolocado o se pueden obtener ovocitos vía transabdominal si el ovario no se sitúa de nuevo en la pelvis (35).

Estudios demuestran un éxito variable en la protección de la función ovárica. Un estudio retrospectivo de casos y controles comparó la tasa de supervivencia ovárica a los 5 años en pacientes a las que se realiza transposición ovárica frente a un grupo control en el que no se aplica la técnica. Los resultados fueron de un 60.3% de supervivencia ovárica en el grupo a estudio frente a un 0% en el grupo control ($p < 0.001$) (35).

Se cree que el tipo de tratamiento radioterápico influye también en los resultados. Un metaanálisis reciente evalúa un total de 892 pacientes sometidas todas ellas a transposición ovárica. Se compara el porcentaje de preservación de la función ovárica en pacientes tratadas mediante braquiterapia y radioterapia externa. El primer grupo conservó la función ovárica tras la radiación en un 94% de los casos. Sin embargo, en el caso de las mujeres tratadas mediante radiación externa (con o sin braquiterapia añadida) se preservó la función en un 65% de las pacientes (35).

Aunque el planteamiento y la técnica quirúrgica sean adecuados, se pueden no obtener los resultados deseados por diferentes motivos. A pesar de separar los ovarios del campo de radiación existe riesgo de que se produzca pérdida de la función ovárica debido al tratamiento radioterápico. El riego puede no ser suficiente y afectar a la reserva ovárica. Además, existe la posibilidad de que los ovarios migren de nuevo a la pelvis resultando en fallo de la función ovárica. Para evitarlo, se recomienda colocar un marcador radiopaco cerca del ovario en el momento de la cirugía para permitir al oncólogo radioterápico

ajustar el campo de radiación en el caso de necesidad (35). Además, lo ideal sería llevar a cabo la cirugía de transposición ovárica lo más cercana posible en el tiempo al tratamiento radioterápico para evitar que el ovario migre a la cavidad pélvica (14).

Aunque se haya demostrado que aporta beneficios es una técnica poco habitual en la práctica médica. En un grupo de 828 mujeres menores de 35 años tratadas con radioterapia pélvica, la prevalencia de la transposición ovárica fue del 6.9% (IC 95%: 5.2-8.6) variando de un 8.2% en cáncer de cérvix a un 5% en cáncer de ano (35).

6.3.2 Supresión ovárica con análogos de la GnRH

Con intención de proteger la función ovárica se ha estudiado el efecto de la administración de análogos de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). Son medicamentos hormonales que producen supresión ovárica en mujeres en edad fértil. Se espera que al reducir la actividad del ovario durante el tratamiento oncológico disminuya el número de óvulos que son afectados. Sin embargo, la evidencia científica es limitada. No se debe ofrecer en sustitución a métodos de preservación de la fertilidad probados científicamente como la criopreservación de embriones, ovocitos o tejido ovárico (14).

6.4 INVESTIGACIÓN EN EL MOMENTO ACTUAL

6.4.1 Agentes antiapoptóticos

Aunque se sabe que estas sustancias contribuyen a la protección de los folículos tras el trasplante de tejido ovárico, se requiere más investigación y en la actualidad no se emplean de rutina (11,16).

La revascularización del tejido y la prevención de la apoptosis son factores clave en la supervivencia del trasplante ovárico. La **esfingosina-1-fosfato** es una sustancia antiapoptótica que actúa inhibiendo la ceramida, promotora de la apoptosis celular. Ha demostrado proteger frente a la isquemia y promover la neoangiogénesis en los trasplantes ováricos. Sin embargo, no aumenta la proliferación de los folículos ni disminuye el daño en el DNA que se produce durante el proceso de congelación. En contraste, la administración de la sustancia Z-VAD-FMK mejora la preservación y proliferación de los folículos, además de prevenir el daño al DNA (16).

La **hormona antimülleriana** tiene un papel importante en el control de la diferenciación sexual y la génesis folicular. Se utiliza en el ámbito de la reproducción como marcador de la reserva ovárica y en los últimos años ha sido investigada como agente protector. Se ha demostrado que la administración de AMH recombinante inhibe el reclutamiento de los folículos primordiales (16).

El nitrógeno líquido tiene una eficacia limitada como refrigerante debido al efecto Leidenfrost, hierve inmediatamente al entrar en contacto con un objeto más caliente formando gas nitrógeno. Recientemente el *Slush nitrogen* se ha propuesto como un

nuevo agente para evitar el efecto Leidenfrost. Aumenta la velocidad de enfriamiento, lo que permite reducir la concentración de los crioprotectores y el tiempo de exposición (11).

El éxito de la vitrificación depende en gran medida de la velocidad de calentamiento. Un estudio reciente obtuvo altas tasas de supervivencia de ovocitos y embriones tras un proceso de vitrificación sin crioprotectores y posterior calentamiento utilizando un **láser infrarrojo ultrarrápido**. También se ha empleado el láser para deshidratar las células antes de la vitrificación, observando mejoras significativas en los resultados clínicos debido a la disminución de la formación de cristales de hielo (11).

6.4.2 Maduración in vitro de ovocitos inmaduros

La criopreservación de tejido ovárico y su posterior trasplante es la única opción de preservación de la fertilidad en el caso de pacientes pre púberes y mujeres que no pueden someterse a estimulación ovárica porque necesitan tratamiento oncológico de manera inmediata. El principal riesgo de la técnica es la reintroducción de células malignas presentes en el tejido trasplantado, principalmente presente en el caso de tumores hematológicos. En el caso de estos pacientes, el desarrollo in vitro de los folículos es una alternativa prometedora.

Las células y tejidos requieren un sistema in vitro optimizado que imite las condiciones naturales proporcionando los nutrientes y gases necesarios. El desarrollo de un sistema in vitro que permita la maduración de los folículos primordiales supondría un gran avance en las opciones de preservación de la fertilidad. No solamente permitiría evitar la reintroducción de células malignas, también evitaría la degeneración de la mayoría de los folículos primordiales que se produce al trasplantar el tejido ovárico (16).

En la actualidad, se considera un método experimental. La foliculogénesis completa desde el estado de folículo primordial hasta el nacimiento de un ser vivo se ha logrado en animales y en el ser humano(16). Primero fue posible en animales. En un inicio, los ratones nacidos como resultado de este método desarrollaron graves problemas en la edad adulta. Se llevaron a cabo cambios importantes en la técnica logrando finalmente obtener ratones sin anomalías detectables (36). En cuanto a los estudios en el ser humano, el artículo publicado por *Xiao et al.* demuestra que el desarrollo folicular en humanos también es posible mediante maduración in vitro. Sin embargo, aún no se ha conseguido que la calidad de los ovocitos sea óptima (19).

Las últimas líneas de investigación destacan la necesidad de disponer de un sistema de cultivo in vitro que divida el proceso en diferentes etapas. El primer paso consiste en eliminar los folículos en crecimiento y la mayoría de las células del estroma, de manera que el tejido resultante este formado principalmente por folículos primordiales y primarios. Posteriormente, se cultivan los fragmentos en un medio libre de suero. A los 6-10 días, un número significativo de folículos primordiales entrará en fase de crecimiento. Los resultados obtenidos son muy variables en función del medio de cultivo

empleado y la preparación del tejido. Es necesaria más investigación en el ámbito para poder determinar las características óptimas de ambos (36).

6.4.3 Trasplante de ovario completo

El trasplante completo de un ovario permitiría la revascularización inmediata del tejido tras la anastomosis de los vasos sanguíneos, lo que disminuiría el riesgo de daño por isquemia. Sin embargo, preservar el ovario completo intacto es un reto debido a la dificultad que supone distribuir los agentes crioprotectores en toda la masa y el posible daño causado por la formación de hielo en los vasos sanguíneos (16).

Aunque todavía persisten dificultades y obstáculos, el procedimiento se ha llevado a cabo con éxito en estudios experimentales con animales. Más investigación en el ámbito podría solventar las dificultades de la técnica en humanos (37).

6.4.4 Ovario artificial

Es una estrategia biomédica en desarrollo, aún experimental pero prometedora, cuyo objetivo es imitar las funciones naturales del ovario tanto en términos reproductivos como endocrinos, permitiendo el desarrollo y maduración de los folículos ováricos, además de reestablecer la función hormonal. El componente principal de un ovario artificial es el andamio biocompatible, compuesto por hidrogeles, polímeros sintéticos o una matriz extracelular descelularizada. En él se cultivan los ovocitos inmaduros aislados del tejido ovárico de la paciente. Será necesario añadir factores de crecimiento y señales bioquímicas además de células de soporte de la granulosa y la teca. La función de todos estos componentes será estimular la maduración de los ovocitos y la producción hormonal (38).

El ovario artificial permitiría preservar la fertilidad de niñas sometidas a tratamiento oncológico sin necesidad de que hayan alcanzado la madurez ovárica. Además, no supondría riesgo de reintroducción de células malignas. En estudios con animales (ratones y primates) se han logrado embarazos con éxito. En el ser humano se encuentra en fase preclínica (38).

6.4.5 Células madre

Estudios recientes han investigado el uso de células madre en preservación de la fertilidad. Se ha conseguido detectar y aislar células madre ováricas en animales y humanos. Una vez aisladas, el objetivo posterior es favorecer su diferenciación a ovocitos maduros que puedan ser fecundados e implantados. Hasta el momento se ha conseguido en ratones. Este descubrimiento sugiere que la manipulación de células madre adultas podría prevenir el fallo ovárico prematuro y ser una opción para niñas en edad pre púber o mujeres con problemas de fertilidad asociados a un proceso oncológico (11).

7 CONCLUSIONES

- La criopreservación de tejido ovárico es la **única alternativa disponible** de preservación de la fertilidad en pacientes pre púberes que aún no han alcanzado la madurez sexual.
- La evidencia científica demuestra que cada fase de la preparación del tejido es importante en la preservación y la viabilidad posterior del trasplante ovárico.
- Aunque la congelación lenta haya sido el método más empleado de forma tradicional a nivel mundial, la **vitrificación** ha demostrado resultados similares, lo que ha propiciado que en determinados países se haya convertido en el **método más empleado** en la actualidad.
- Es necesaria mayor investigación con el objetivo de optimizar el proceso o de desarrollar nuevas técnicas que permitan solventar las principales limitaciones del mismo.

8 BIBLIOGRAFÍA

1. Cui D, Daley WP. *Histología con correlaciones funcionales y clínicas*. 2ª ed. Madrid: Wolters Kluwer; 2023.
2. Boya J. *Atlas de histología y organografía microscópica*. 3ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2011.
3. Vallet N, Boissel N, Elefant E, Chevillon F, Pasquer H, Calvo C, et al. Can Some Anticancer Treatments Preserve the Ovarian Reserve? *Oncologist*. 2021 Jun 1;26(6):492–503.
4. Zhang T, He M, Zhang J, Tong Y, Chen T, Wang C, et al. Mechanisms of primordial follicle activation and new pregnancy opportunity for premature ovarian failure patients. *Front Physiol*. 2023 Feb 28;14.
5. Albamonte MI, Calabró LY, Albamonte MS, Vitullo AD. FOXO3 and PTEN expression in the ovary of girls with extra-gonadal cancer with or without chemotherapy treatment prior to cryopreservation. *BMC Womens Health*. 2023 Sep 22;23(1):509.
6. Masciangelo R, Hossay C, Chiti MC, Manavella DD, Amorim CA, Donnez J, et al. Role of the PI3K and Hippo pathways in follicle activation after grafting of human ovarian tissue. *J Assist Reprod Genet*. 2020 Jan 15;37(1):101–8.
7. Anderson RA, Cameron D, Clatot F, Demeestere I, Lambertini M, Nelson SM, et al. Anti-Müllerian hormone as a marker of ovarian reserve and premature ovarian insufficiency in children and women with cancer: a systematic review. *Hum Reprod Update*. 2022 May 2;28(3):417–34.
8. World Health Organization. *Cáncer infantil*. 2025.
9. Spears N, Lopes F, Stefansdottir A, Rossi V, De Felici M, Anderson RA, et al. Ovarian damage from chemotherapy and current approaches to its protection. *Hum Reprod Update*. 2019 Nov 5;25(6):673–93.
10. López-González R, Parra-Blázquez D, Moñino D, Pino-Rosón C, Pollán M, Aragonés N. Cancer incidence and stage at diagnosis in children and adolescents in the Community of Madrid, 2015–2018. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2024 Dec 4;
11. Lee S, Ozkavukcu S, Ku SY. Current and Future Perspectives for Improving Ovarian Tissue Cryopreservation and Transplantation Outcomes for Cancer Patients. *Reproductive Sciences*. 2021 Jun 31;28(6):1746–58.
12. Gjeterud J, Kristensen SG, Fedder J. Indikasjoner for kryopreservering og autotransplantasjon av eggstokkvev. *Tidsskrift for Den norske legeförening*. 2021;
13. Biedka M, Kuźba-Kryszak T, Nowikiewicz T, Żyromska A. Fertility impairment in radiotherapy. *Współczesna Onkologia*. 2016;3:199–204.
14. Su HI, Lacchetti C, Letourneau J, Partridge AH, Qamar R, Quinn GP, et al. Fertility Preservation in People With Cancer: ASCO Guideline Update. *Journal of Clinical Oncology*. 2025 Mar 19;
15. Chen L, Dong Z, Chen X. Fertility preservation in pediatric healthcare: a review. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023 May 3;14.
16. Del-Pozo-Larida S, Salvador C, Martínez-Soler F, Tortosa A, Perucho M, Giménez-Bonafant P. Preservation of fertility in patients with cancer (Review). *Oncol Rep*. 2019 Mar 14;
17. Kim JM, Kim S, Lee S. Role of Stem Cells in the Ovarian Tissue Cryopreservation and Transplantation for Fertility Preservation. *Int J Mol Sci*. 2021 Nov 19;22(22):12482.

18. Fabbri R, Vicenti R, Magnani V, Paradisi R, Lima M, De Meis L, et al. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: 20 years experience in Bologna University. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022 Oct 12;13.
19. Malo C, Oliván S, Ochoa I, Shikanov A. In Vitro Growth of Human Follicles: Current and Future Perspectives. *Int J Mol Sci*. 2024 Jan 26;25(3):1510.
20. Marco A, Gargallo M, Ciriza J, Shikanov A, Baquedano L, García Pérez-Llantada J, et al. Current Fertility Preservation Steps in Young Women Suffering from Cancer and Future Perspectives. *Int J Mol Sci*. 2024 Apr 15;25(8):4360.
21. Lukish JR. Laparoscopic assisted extracorporeal ovarian harvest: A novel technique to optimize ovarian tissue for cryopreservation in young females with cancer. *J Pediatr Surg*. 2021 Mar;56(3):626–8.
22. Herraiz S, Monzó S, Gómez-Giménez B, Pellicer A, Díaz-García C. Optimizing ovarian tissue quality before cryopreservation: comparing outcomes of three decortication methods on stromal and follicular viability. *Fertil Steril*. 2020 Mar;113(3):609-617.e3.
23. Lantsberg D, Farhi A, Zaslavsky-Paltiel I, Silverman BG, Lerner-Geva L, Orvieto R. Deliveries following fertility preservation by ovarian tissue cryopreservation without autotransplantation—what should be expected? *J Assist Reprod Genet*. 2019 Feb 29;36(2):335–40.
24. Dolmans MM, von Wolff M, Poirot C, Diaz-Garcia C, Cacciottola L, Boissel N, et al. Transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a series of 285 women: a review of five leading European centers. *Fertil Steril*. 2021 May;115(5):1102–15.
25. Kometas M, Christman GM, Kramer J, Rhoton-Vlasak A. Methods of Ovarian Tissue Cryopreservation: Is Vitrification Superior to Slow Freezing?—Ovarian Tissue Freezing Methods. *Reproductive Sciences*. 2021 Dec 3;28(12):3291–302.
26. Shen AY, Rozen WM, Polyakov A, Stern K, Rozen G. Applying plastic surgery principles to ovarian tissue transplantation. *Gland Surg*. 2021 Jul;10(7):2266–74.
27. Whaley D, Damyar K, Witek RP, Mendoza A, Alexander M, Lakey JR. Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations. *Cell Transplant*. 2021 Jan 1;30.
28. Sun TC, Liu XC, Yang SH, Song LL, Zhou SJ, Deng SL, et al. Melatonin Inhibits Oxidative Stress and Apoptosis in Cryopreserved Ovarian Tissues via Nrf2/HO-1 Signaling Pathway. *Front Mol Biosci*. 2020 Jul 29;7.
29. Behl S, Joshi VB, Larson NB, Young MC, Bilal M, Walker DL, et al. Vitrification versus slow freezing of human ovarian tissue: a systematic review and meta-analysis of histological outcomes. *J Assist Reprod Genet*. 2023 Mar 21;40(3):455–64.
30. Fabbri R, Vicenti R, Magnani V, Paradisi R, De Meis L, Raimondo D, et al. Ovarian tissue transplantation: 10 years of experience at the Bologna University. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2024 Mar 7;15.
31. Sheshpari S, Shahnazi M, Mobarak H, Ahmadian S, Bedate AM, Nariman-Saleh-Fam Z, et al. Ovarian function and reproductive outcome after ovarian tissue transplantation: a systematic review. *J Transl Med*. 2019 Dec 29;17(1):396.
32. Khattak H, Malhas R, Craciunas L, Afifi Y, Amorim CA, Fishel S, et al. Fresh and cryopreserved ovarian tissue transplantation for preserving reproductive and endocrine function: a systematic review and individual patient data meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2022 May 2;28(3):400–16.
33. Fraison E, Huberlant S, Labrune E, Cavalieri M, Montagut M, Brugnion F, et al. Live birth rate after female fertility preservation for cancer or haematopoietic stem cell transplantation: a systematic review and meta-analysis of the three main

- techniques; embryo, oocyte and ovarian tissue cryopreservation. *Human Reproduction*. 2023 Mar 1;38(3):489–502.
34. Mgboji GE, Cordeiro Mitchell CN, Bedrick BS, Vaidya D, Tao X, Liu Y, et al. Predictive factors for fertility preservation in pediatric and adolescent girls with planned gonadotoxic treatment. *J Assist Reprod Genet*. 2021 Oct 9;38(10):2713–21.
 35. Christianson MS, Oktay K. Advances in fertility-preservation surgery: navigating new frontiers. *Fertil Steril*. 2019 Sep;112(3):438–45.
 36. Telfer EE, Andersen CY. In vitro growth and maturation of primordial follicles and immature oocytes. *Fertil Steril*. 2021 May;115(5):1116–25.
 37. Hossay C, Donnez J, Dolmans MM. Whole Ovary Cryopreservation and Transplantation: A Systematic Review of Challenges and Research Developments in Animal Experiments and Humans. *J Clin Med*. 2020 Oct 2;9(10):3196.
 38. Chen J, Todorov P, Isachenko E, Rahimi G, Mallmann P, Isachenko V. Construction and cryopreservation of an artificial ovary in cancer patients as an element of cancer therapy and a promising approach to fertility restoration. *Hum Fertil*. 2022 Aug 8;25(4):651–61.