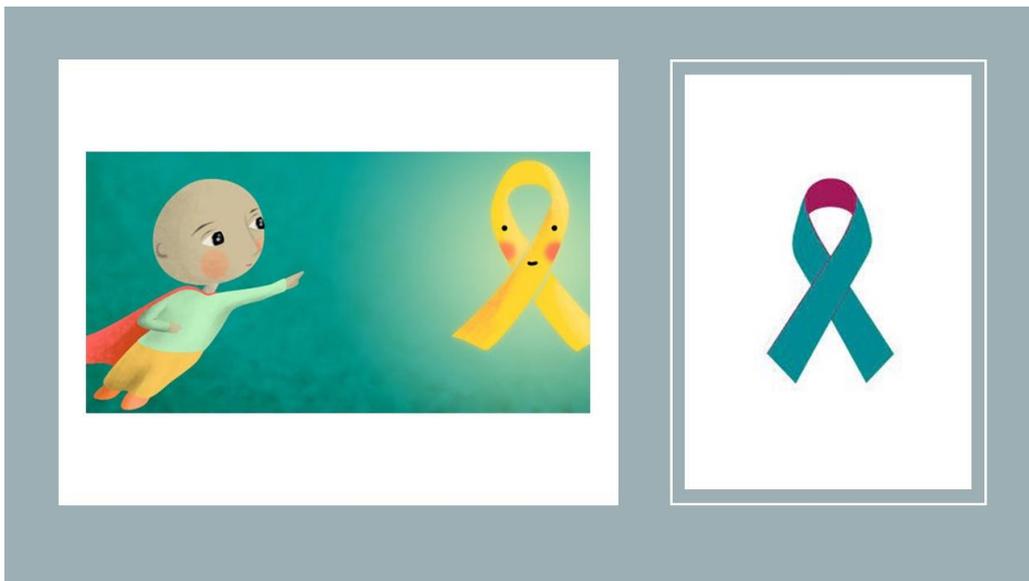


Máster Universitario en Biología y Tecnología aplicada a la Reproducción Humana Asistida

2020/2021

Módulo VII: Trabajo Fin de Máster

Preservación de la fertilidad en oncología pediátrica



M.^a Luisa Martínez de Carnero García

V^oB^oDirectores:

María Cruz Palomino

Universidad Europea de Madrid (Villaviciosa de Odón).

IVI-RMA

ABSTRACT/RESUMEN.....	3
1.INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. Desarrollo puberal.....	3
1.2. Cáncer.....	4
1.3. Influencia de las terapias antineoplásicas en las gónadas en desarrollo.....	5
1.4. Técnicas de preservación de la fertilidad en niños prepúberes.....	6
1.5. Trasplante.....	10
1.6. Seguimiento.....	11
1.7. Objetivos.....	12
2. MÉTODOS PARA LA OBTENCIÓN DE TEJIDO.....	13
2.1. Extracción de tejido testicular.....	13
2.2. Extracción de tejido ovárico.....	14
2.3. Revisión de la literatura.....	14
3. PRESERVACIÓN DE TEJIDO.....	16
3.1. Preservación de tejido testicular.....	16
3.2. Preservación de tejido ovárico.....	17
3.3. Revisión de la literatura.....	18
4. MADURACIÓN DE TEJIDO.....	20
4.1. Maduración de tejido testicular.....	20
4.2. Maduración de tejido ovárico.....	21
4.3. Revisión de la literatura.....	22
5. TRASPLANTE.....	24
5.1. Trasplante de tejido ovárico.....	24
5.2. Trasplante de tejido testicular.....	25
5.3. Revisión de la literatura.....	26

6. DISCUSIÓN.....	28
7. BIBLIOGRAFÍA.....	31

ABSTRACT

Puberty is the child's final growth period, when reproductive capacity is reached and fertile life begins. Germ cell tumors are a heterogeneous group of neoplasms and they can present between 1-3% of all pediatric neoplasms. The treatments these patients are subjected to endanger the integrity of the gonad, leading in many cases to infertility. The preservation of fertility in patients who are going to undergo gonadotoxic treatment is a point of great importance, especially if these patients are prepubertal.

The study about obtaining the tissue, its cryopreservation, culture and transplant is of vital importance to be able to preserve and restore fertility to these children. For this reason, the planning of strategies that allow us to preserve the fertility of these children before they start their gonadotoxic treatment is of the utmost importance.

RESUMEN

La pubertad es el período final de crecimiento del niño, cuando se alcanza la capacidad reproductiva y comienza la vida fértil. Los tumores de células germinales son un grupo heterogéneo y pueden presentar entre un 1 y un 3% del total de las neoplasias pediátricas. Los tratamientos a los que son sometidos estos pacientes ponen en peligro la integridad de la gónada, llevando en muchos casos a la infertilidad. La preservación de la fertilidad en pacientes que van a ser sometidos a un tratamiento gonadotóxico es una cuestión de gran importancia, sobre todo si esos pacientes son prepúberes.

El estudio acerca de la obtención del tejido, su criopreservación, cultivo y trasplante son cuestiones de vital importancia para poder preservar y devolver la fertilidad a estos niños. Por este motivo, es necesario el planteamiento de estrategias que nos permitan conservar la fertilidad antes de que inicien su tratamiento gonadotóxico.

Palabras clave: Patología oncológica, criopreservación de tejido testicular, criopreservación de corteza ovárica, fertilidad.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1.Desarrollo puberal.

La pubertad se inicia con cambios hormonales y neuroendocrinos; en las niñas, con la aparición del botón mamario y, en los niños, con el aumento del volumen testicular, consecuencia de la

liberación de gonadotropinas y esteroides sexuales, siendo la menstruación y la espermatogénesis los últimos pasos. Las gonadotropinas (LH: hormona luteinizante y FSH: hormona folículo estimulante), secretadas gracias a la liberación pulsátil de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) por parte del hipotálamo, se encargan en las niñas de inducir la síntesis de estradiol por parte del ovario necesaria para el crecimiento mamario y la maduración reproductiva, mientras que en los niños provoca la síntesis de testosterona por las células de Leydig y permite la maduración de los túbulos seminíferos.

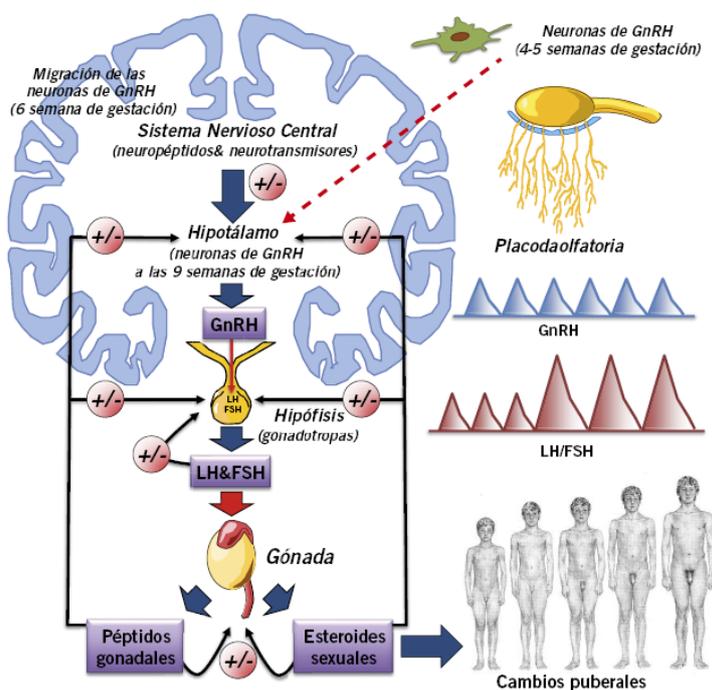


Figura 1: Eje hipotálamo-hipofisario-gonadal y cambios puberales relacionados con la liberación de gonadotropinas (LH y FSH) y de esteroides sexuales. (Fuente: <https://www.pediatriaintegral.es/publicacion-2020-06/pubertad-normal/>).

1.2. Cáncer.

El cáncer ocurre por una proliferación anormal de células que pierden el control de los mecanismos que permiten regular su multiplicación y diferenciación y, como consecuencia, se produce el desarrollo del tumor. La base de esta proliferación de células descontrolada puede ser genética o ambiental y produce un daño en el material genético de estas células, alterando su mecanismo de regulación. El cáncer puede comenzar en cualquier parte del cuerpo y expandirse hacia órganos cercanos, lo que llamamos metástasis.

Hay más de 100 tipos de cánceres y reciben el nombre del órgano o de la célula a la que afecte. En el caso de que los pacientes a los que afecte estén en edad pediátrica, se denomina cáncer

infantil. El cáncer infantil tiene distintos tipos de tratamientos en función del tipo de cáncer y lo avanzado que esté, siendo lo más comunes cirugía, quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia y trasplante de células madre.

Con el avance en los tratamientos de las neoplasias malignas pediátricas, la probabilidad de supervivencia de los pacientes que las padecen es cada vez mayor. La tasa de supervivencia del cáncer infantil ha aumentado del 58% en pacientes diagnosticados entre los años 1975 a 1977 al 83%, entre los diagnosticados entre los años 2002 a 2008 (14). Pero a pesar de este aumento de la supervivencia, los efectos secundarios debidos a los tratamientos que se utilizan pueden provocar a corto o a largo plazo pérdida de la fertilidad, entre otras patologías.

1.3 Influencia de las terapias antineoplásicas en las gónadas en desarrollo.

Las sustancias antineoplásicas son aquellas que impiden la proliferación y desarrollo de células malignas tumorales, interviniendo en alguna fase de su ciclo celular y destruyéndola. Tanto la radioterapia como la quimioterapia actúan sobre el DNA de las células cancerosas dañándolo, haciendo que la célula deje de dividirse y finalmente muera, pero este tratamiento no destruye las células de inmediato, sino que necesita días o semanas para que el DNA esté lo suficientemente dañado para que la célula muera.

La parte mala de estas sustancias es que no son capaces de distinguir entre una célula sana y una cancerosa, atacándolas por igual, lo que produce los llamados efectos secundarios.

Algunos de estos efectos secundarios en niños supervivientes de cáncer pueden presentarse como, pubertad retrasada, interrumpida o ausente (pubertad retrasada en el caso de niños y menopausia precoz en el caso de niñas); también puede aparecer falta de desarrollo mamario en niñas o de crecimiento testicular en niños.

1) Efecto en niños.

Las alteraciones testiculares se manifiestan en las células germinales y de Sertoli, provocando reducción del volumen testicular con azoospermia, oligozoospermia y esterilidad. En cuanto a la cirugía, puede presentar impotencia y eyaculación retrógrada después de la disección de los ganglios linfáticos retroperitoneales y, en pacientes con tumores que afecten al eje hipotálamo-hipófisis, puede desarrollar hipogonadismos.

Los testículos son muy sensibles a los tratamientos quimioterápicos y la radiación directa puede provocar una reducción en el contenido espermático y de testosterona en las células de Leydig, necesitando un tratamiento de reemplazo hormonal.

2) Efecto en niñas.

En niñas el retraso puberal puede manifestarse con oligomenorrea o amenorrea primaria o secundaria, que puede desembocar finalmente en esterilidad. Los tratamientos quimioterápicos y radioterápicos pueden ocasionar insuficiencia ovárica y una reducción en el número de folículos, que puede llevar al fallo ovárico. Si afecta al útero, puede verse comprometido su crecimiento y vascularización y, como consecuencia, también su capacidad para que el óvulo fecundado se adhiera al endometrio, siendo necesario en ocasiones, al igual que en niños, un tratamiento de reemplazo hormonal.

Otro riesgo bien documentado es que las niñas supervivientes de cáncer infantil, aunque menstrúen, tengan a largo plazo un mayor riesgo de desarrollar una insuficiencia ovárica prematura (IOP) antes de los 40 años; esto no solo hace que estos pacientes sean infértiles, sino que también se asocia con un mayor riesgo de mortalidad cardiovascular y osteoporosis (12). A pesar de que la reserva ovárica es mayor en niñas y se tolera un daño gonadotóxico más alto que las pacientes mayores, es difícil identificar que pacientes sufrirán un IOP en su vida (12). También es importante destacar que la radiación y algunos agentes alquilantes utilizados sobre la zona pélvico-abdominal altera la capacidad uterina para expandirse (útero más pequeño) lo suficiente y para llevar un embarazo a término (17).

Estos efectos que acabamos de nombrar son variables dependiendo de la edad a la que se reciba el tratamiento y de la dosis utilizada, pudiendo ser o no reversibles.

1.4. Técnicas de preservación de la fertilidad en niños prepúberes.

El primer paso importante es la obtención de tejido testicular y tejido ovárico para preservar, de tal manera que pueda ser utilizado por los pacientes ya en edades reproductivas cuando tengan la necesidad de concebir. Entre los distintos métodos que existen, lo más utilizados son: para tejido ovárico, la ooforectomía laparoscópica y, para tejido testicular, la biopsia.

Es necesario tener en cuenta que cualquiera de los procedimientos quirúrgicos utilizados para extraer tejido testicular o tejido ovárico, pueden producir daños en el órgano.

En el caso de la biopsia de tejido testicular (tomada quirúrgicamente), aunque el tratamiento es mínimamente invasivo, el daño testicular debido al procedimiento puede producir efectos inflamatorios y daño vascular (4) que hay que tener en cuenta a la hora de elegir un protocolo de extracción de tejido. La técnica microquirúrgica utilizada en algunos estudios tiene una gran ventaja, ya que se basa en una técnica de extracción de tejido testicular muy poco invasiva, conocida por dañar mínimamente el tejido testicular (4).

En tejido ovárico la ooforectomía parcial de corteza ovárica es la técnica de elección y la que mejores resultados ha tenido en modelo murino. Sin embargo, ambas técnicas que en adulto ha probado su eficacia en niños aun es experimental.

El segundo paso después de haber obtenido el tejido es preservarlo.

1) Preservación de tejido testicular.

Desde que aparecen los primeros informes en 2005 de criopreservación testicular como método para preservar las células germinales en niños sometidos a tratamientos gonadotóxicos, ha habido una cohorte creciente de niños a los que se les ha ofrecido este procedimiento como parte de estudios de investigación (1).

La vitrificación de tejido prepuberal ha surgido como una estrategia éticamente aceptable para preservar la fertilidad en niños prepúberes, siendo esta técnica la mejor opción, ya que evita la formación de cristales de hielo y las lesiones que pueden ocurrir con otros métodos como la congelación lenta (CL). Por otra parte, también se ha probado la CL controlada con dimetilsulfoxido (DMSO) como crioprotector penetrante (CP), que ha demostrado ser un enfoque prometedor para preservar el tejido testicular inmaduro (ITT) biopsiado, aunque aún se considera experimental (11).

2) Preservación de tejido ovárico.

La criopreservación y trasplante de tejido ovárico para preservar y restaurar la fertilidad es una de las únicas opciones para mujeres jóvenes que necesitan someterse a un tratamiento inmediato de cáncer o enfermedad benigna, y la única alternativa para niñas prepúberes (13). La criopreservación de tejido ovárico cortical (OCT) en niñas prepúberes es la única opción disponible, ya que sus ovarios no responderán a la hiperestimulación ovárica controlada, necesaria para la recuperación de ovocitos (14).

La congelación fue el primer método utilizado para la criopreservación pero evoluciono a la vitrificación que solventaba gran parte de los problemas que producen la formación de cristales de hielo. Aun así, la pérdida de folículos es común en todos los protocolos de congelación que hoy en día se siguen mejorando para recuperar la mayor cantidad posible.

El tercer paso es la maduración in vitro o in vivo antes de reimplantarlo.

1) Tejido testicular.

- Medio de cultivo con ácido retinoico (AR) y melatonina. El AR es un factor esencial para la diferenciación y mantenimiento de las células germinales (CG) y por otro lado la melatonina previene el daño tisular producido por las especies reactivas de oxígeno

(ROS) o por la cantidad de N₂ que da lugar a un ambiente citotóxico. Aunque estos medios mantienen la arquitectura testicular no son suficientes para estimular el inicio de la espermatogénesis in vitro.

- Medio de cultivo suplementado con FSH y LH, ya que estas hormonas juegan un papel clave en la maduración testicular y en el desarrollo de las CG, actuando la FSH sobre las células de Sertoli como sustento y apoyo para la espermatogénesis y la LH sobre las células de Leydig induciendo la producción de testosterona.

A pesar de que los resultados son prometedores, ya que en ambos medios se consigue el mantenimiento de la arquitectura testicular, sobreviviendo algunas espermatogonias e incluso permaneciendo proliferativas, se observa, no obstante, que a lo largo de cinco semanas de cultivo la tendencia es a una reducción en el número de espermatogonias y un aumento en las apoptosis de células intratubulares, independientemente de que el medio esté o no suplementado.

Existen diferentes estrategias para obtener células madre haploides (CG) a partir de células madre espermatogoniales (SSCs) criopreservadas antes de que el paciente reciba el tratamiento contra el cáncer: trasplante de suspensiones de CG purificadas propias, autoinjertos de piezas testiculares y maduración in vitro (IVM) hasta la etapa haploide (3). Los sistemas de cultivo organotípico para el desarrollo de ITT mantienen la integridad del tejido sin interrumpir las conexiones entre las células y la membrana basal, permitiendo conservar la arquitectura celular sin perturbar (3).

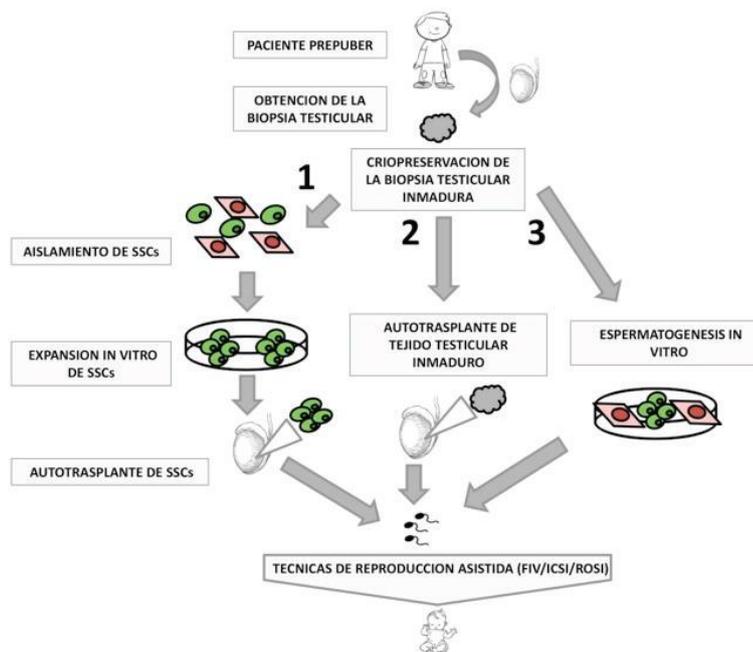


Figura 2. 1) Trasplante de SSCs expandidas in vitro; 2) Trasplante de tejido testicular inmaduro; 3) Espermatogénesis in vitro. (Fuente: <https://www.adolescenciasema.org>)

Los principales problemas planteados por los estudios sobre cultivo testicular humano son la incapacidad de replicar el proceso espermatogénico completo y la pérdida progresiva de CG durante el cultivo (3).

2) Tejido ovárico.

El crecimiento y desarrollo de folículos in vitro, en el caso de pacientes prepúberes es muy complicado y aún está en estudio, ya que los ovocitos de ovarios prepúberes carecen de competencia meiótica y es muy poco probable que consigan esta competencia y puedan producir embriones viables y nacidos vivos con una manipulación ex vivo (20), por este motivo está ahora en desarrollo el trasplante autólogo con el objetivo de poder desarrollar estos folículos en un contexto in vivo y permitir así que se inicie esa competencia meiótica necesaria para su desarrollo.

Aún están en estudio las concentraciones de gonadotropinas necesarias para la maduración de las células germinales, al igual que el uso de factores esenciales como, por ejemplo, el AR o la melatonina.

También se han estudiado modelos de xenoinjertos, o el uso de células madre mesenquimales derivadas de diferentes fuentes para el trasplante de tejido ovárico (OTT), aprovechando sus propiedades proangiogénicas, antiapoptóticas y inmunomoduladoras (13).

No hay que olvidar y es de máxima importancia tener en cuenta las condiciones externas tales como la temperatura, el pH o la manipulación del tejido, al igual que la etapa de desarrollo en la que se encuentre el paciente (5, 9 o 11 años) ya que el tejido (testicular u ovárico) no se encuentra en el mismo estadio de desarrollo y, por tanto, el protocolo a seguir deberá diferir y ser individual en cada paciente, al igual que hay que tener en cuenta el tipo de enfermedad y el tratamiento que está recibiendo. Lo que es lo mismo: la puntuación individual de cada paciente es de máxima importancia, ya que el desarrollo prepuberal es variable en los individuos (5).

Existen nuevos enfoques para la preservación de la fertilidad en niñas, como es la hiperestimulación ovárica controlada que dio a conocer Azem en 2020, en su estudio acerca de la pubertad fisiológica, en el que desarrolla un enfoque novedoso al tratar con hormonas directamente los ovarios para llegar a conseguir folículos ováricos maduros. La administración de gonadotropina coriónica humana (HCG) y gonadotropinas recombinantes (FSHr y LHr) mostro que los ovarios eran capaces de inducir la maduración folicular a MII. Este procedimiento se debe realizarse con precaución y no es asequible para todas las pacientes,

teniendo especial cuidado en el grupo de pacientes prepuberales donde aún el eje hipotálamo-pituitario-ovárico aún es inmaduro, por ello la administración de un agonista de la hormona liberadora de gonadotropinas no produjo ningún resultado. Pero Azem si obtuvo resultados con HCG, lo que quiere decir que los receptores responder a las gonadotropinas circulantes. Aún está en estudio el protocolo que se debe desarrollar y el tipo de paciente a la que se puede aplicar, pero es una alternativa a la preservación de tejido ovárico. También es importante investigar la calidad de estos ovocitos criopreservados de pacientes prepuberes, y aún está por ver su capacidad reproductiva. No hay que olvidar que estos tratamientos pueden tener efectos secundarios en el paciente, tales como angustia, dolor o malestar, que al tratarse de un niño hay que cuidar e intentar minimizar lo máximo posible. Este sigue siendo un enfoque novedoso, pero aún necesita un gran camino en investigación.

1.5. Trasplante.

TIPO DE TEJIDO	TRANSPLANTE	LUGAR
Ovárico	Ortotópicamente	Tejido ovárico restante o peritoneo pélvico
Ovárico	Heterotópicamente	Antebrazo o pared abdominal
Ovárico	Xenoinjerto con esfingosina-1-fosfato	Tejido ovárico
Ovárico	Xenoinjerto suplementado con VEGF	Tejido ovárico
Testicular	Injerto de tejido testicular inmaduro (ITT)	Tejido testicular
Testicular	ITT suplementado con VEGF	Tejido testicular
Testicular	Células germinales	Tejido testicular

Tabla 1. Distintos tipos de técnicas para el trasplante de tejido ovárico y testicular.

1) Tejido ovárico.

El OCT se descongela y se trasplanta ortotópicamente al tejido ovárico restante o al peritoneo pélvico, o se puede trasplantar heterotópicamente a lugares como el antebrazo o la pared abdominal (14). Es importante que el tejido ovárico criopreservado contenga una buena cantidad de ovocitos, ya que el periodo isquémico tras el trasplante puede hacer que la reserva ovárica disminuya.

Otro enfoque que se ha probado en el ovario humano es el modelo de xenoinjerto con espingosina-1-fosfato (S1P), un inhibidor de la vía apoptótica inducida por ceramida que se observó que poseía propiedades vasculogénicas; la introducción continua de S1P en xenoinjertos de ovario humano dio como resultado una neovascularización acelerada, isquemia tisular reducida y preservación de la densidad de folículos primordiales a niveles similares a los previos al trasplante (19). Así pues, promover la neovascularización es un factor importante a tener en cuenta para mejorar la supervivencia del tejido trasplantado, así como el desarrollo y supervivencia de las CG. Por ello, en algunos estudios se ha utilizado el factor de crecimiento endotelial (VEGF) como inductor de la angiogénesis, promoviendo la proliferación y migración de células endoteliales y permitiendo la formación de nuevos vasos sanguíneos por vasculogénesis. La administración de VEGF, ya sea mediante cultivo del tejido antes del trasplante o mediante la administración de hidrogel, promueve la angiogénesis, la supervivencia folicular y mejora la función del xenotrasplante de tejido ovárico (2).

2) Tejido testicular.

Aunque en humanos aún es experimental, la investigación básica en modelos animales ha producido resultados alentadores, lo que indica que tanto el trasplante de CG como el injerto de ITT pueden ser técnicas fiables para la producción de espermatozoides funcionales capaces de dar a luz a una descendencia sana (15). La ventaja de la transferencia de tejido testicular es que se transfiere SSC dentro de su entorno natural, sin perturbar las interacciones entre las células de soporte y las CG. Al igual que ocurre en el tejido ovárico, el pretratamiento con VEGF mejora la vascularización, la integridad de los túbulos seminíferos y produce un aumento en el número de espermatogonias (2).

Hay que tener en cuenta que en el trasplante hay un riesgo importante de reintroducir células malignas de nuevo en el organismo del paciente. Una alternativa podría ser la espermatogénesis in vitro (IVS) con la que se podrá producir espermatozoides in vitro sanos y evitar el riesgo de poder introducir células cancerosas en el paciente.

1.6. Seguimiento.

El seguimiento en estos pacientes oncológicos es absolutamente necesario desde que vencen la enfermedad a lo largo del desarrollo de sus vidas, ya que pueden presentar problemas de salud meses o años después del tratamiento, lo que se denomina efecto tardío.

El apoyo psicológico es esencial en pacientes que van a sufrir un tratamiento para el cáncer y, sobre todo, en este grupo de estudio tan sensible como son los niños. En este sentido, desde la

psicología se han desarrollado y adaptado técnicas y programas con los objetivos de minimizar el impacto psicológico que implica el diagnóstico y tratamiento del cáncer en la infancia y la adolescencia (6), reconocer y entender las consecuencias que tiene a largo plazo, como es el caso que nos ocupa de la pérdida de la fertilidad, y decidir qué se puede hacer al respecto.

Por ello, el seguimiento y apoyo psicológico son de gran importancia desde que se inicia el tratamiento y se extrae el tejido que se quiere preservar (testículo y ovario) hasta que se decide reinjertar el tejido, no sólo para el propio paciente, sino también para los familiares o tutores a cargo de éste, que son los que deberán dar permiso para que se realice el tratamiento de preservación de fertilidad.

En mujeres supervivientes de cáncer, se puede desarrollar insuficiencia ovárica iatrogénica debido al tratamiento previo contra el cáncer y, aunque se consideran sanas y pueden lograr embarazos con ovocitos de donantes mediante reproducción asistida, después de la transferencia, el riesgo de parto prematuro es cinco veces mayor y tres veces más el riesgo de preeclampsia que en mujeres que no han padecido cáncer infantil (18). Por tanto, es importante para estas pacientes, una vez que están en edad reproductiva, que se les informe de las complicaciones obstétricas y perinatales que pueden sufrir, así como que se les brinde un buen asesoramiento.

El seguimiento es necesario, ya que pueden aparecer criolesiones que pueden exacerbar el daño isquémico después del injerto, actuando de forma sinérgica, que a su vez afectará a la población de folículos injertados (7). Por ello se realizan ajustes con crioprotectores tales como el dimetil sulfoxido (DMSO) que disminuye la formación de hielo en el tejido ovárico. En el caso de tejido testicular, es necesario este seguimiento por la aparición también de estas posibles criolesiones que puedan afectar al tejido testicular y a las células espermatogoniales.

Tanto en niños como en niñas se realizará la anamnesis y la exploración física adecuada, se determinarán los niveles normales de gonadotropinas, estradiol, progesterona, testosterona y hormona antimulleriana, así como el recuento de folículos ováricos a través de ecografía.

1.7. OBJETIVOS.

Con los antecedentes expuestos, surge este trabajo que tiene como objetivo estudiar la preservación de la fertilidad en pacientes oncológicos prepúberes, realizando una revisión bibliográfica sobre los distintos tipos de métodos que se estudian, desde la extracción del tejido hasta la preservación de este y su posterior reimplantación, para que estos pacientes puedan recuperar la fertilidad.

2. MÉTODOS PARA LA OBTENCIÓN DE TEJIDOS.

2.1. Extracción de tejido testicular.

- Biopsia testicular.

La biopsia testicular, es hoy en día la técnica más estudiada para preservar la fertilidad en niños. Esta técnica es ampliamente utilizada en varones adultos para recuperación espermática y para investigación, en cambio en pacientes prepúberes, no se puede utilizar con ese fin, debido a que la espermatogénesis no se inicia hasta la pubertad. Por esa causa el fin de la biopsia testicular es obtener un injerto ITT para su preservación y posterior maduración in vitro o in vivo.

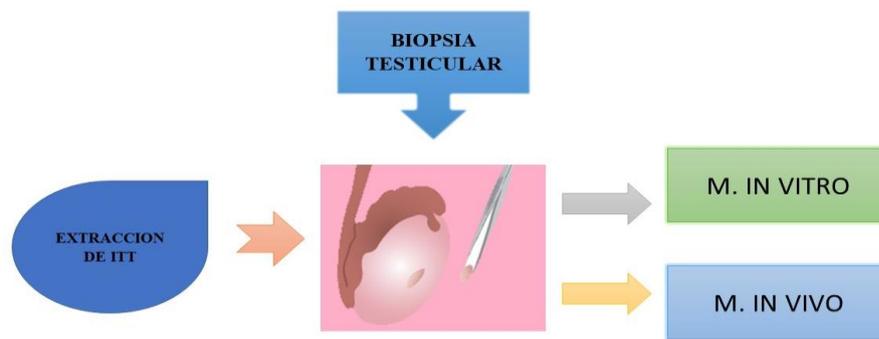


Figura 3. Esquema de extracción de ITT por biopsia, para su posterior maduración in vivo o in vitro.

Esta técnica utiliza anestesia local y mediante una pequeña incisión de 2-3cm. se extrae una parte del tejido testicular, la recuperación del paciente es rápida y no se han observado alteraciones en el crecimiento testicular del testículo biopsiado en comparación con el testículo no biopsiado.

Aunque es una técnica ampliamente utilizada en adultos, en niños hay que tener en cuenta varios puntos; uno de ellos es la cicatrización de la herida y la lesión posterior a la biopsia, ya que el tratamiento que van a recibir disminuye la capacidad celular de cicatrización, y hay que controlar el desarrollo de la herida, su recuperación y la posible aparición de lesiones. Las infecciones y las anomalías parenquimatosas (lesiones fibróticas intratesticulares) aunque son mínimas también hay que tenerlas en cuenta (4).

2.2. Extracción de tejido ovárico.

- Extracción quirúrgica ovárica.

La extracción del ovario completo (ooforectomía) o parte de la corteza ovárica, para su criopreservación y su posterior trasplante ortotópica o heterotópicamente, son algunos de los métodos que se estudian hoy en día. La extracción de este puede ser bien por cirugía o bien por vía laparoscópica, siendo esta última opción la menos invasiva y la que mejor recuperación tiene para la paciente. También es posible extraer parte del ovario (corteza ovárica) y no el ovario completo; esto dependerá de la edad de la paciente y del tamaño del ovario, pudiendo realizar una ooforectomía unilateral, o quizás extraer la mitad del ovario (ooforectomía parcial) dejando el otro ovario in situ para el posible autotransplante del que preservemos.

También como ya hemos comentado en otro punto del trabajo es necesario tener en cuenta el riesgo de reintroducción de células malignas de nuevo a la paciente, que dependerá del tipo de cáncer, siendo por ejemplo las leucemias uno de los cánceres con más riesgo, en estos casos la maduración in vitro (IVM) y la utilización de un ovario artificial sería la técnica elegida para madurar el tejido y obtener ovocitos competentes.

En ciertos casos es preferible extraer menos cantidad de tejido y criopreservar solo una pequeña porción de corteza ovárica, ya que es donde se encuentran la mayoría de los folículos y la mayor parte de ellos como folículos primordiales, de menor tamaño y más resistentes a la congelación, con lo que en la descongelación la tasa de supervivencia será mayor. Hay que destacar que todas estas técnicas llevan asociados procedimientos invasivos, 2 intervenciones quirúrgicas y el uso de anestesia general, lo que implica ya de por sí un riesgo para pacientes tan jóvenes.

- Transposición ovárica u ovariopexia.

Esta técnica que se utilizaría solo en aquellas pacientes que van a recibir tratamiento RT consiste en reposicionar los ovarios por vía laparoscópica en otra zona (2-5cm. de la zona a zona a irradiar), para así poder protegerlos de la radiación que el paciente va a recibir. Esta técnica no es muy utilizada ya que, por lo general, los pacientes suelen recibir tanto RT como QT, y además implica un riesgo por la propia intervención que puede ocasionar lesiones vasculares en el tejido ovárico.

2.3. Revisión de la literatura.

Una vez que se han explicado las diferentes técnicas de extracción de tejido ovárico y/o testicular, la revisión de la literatura muestra que hay gran cantidad de artículos publicados,

tales como Ujildert, en los que se trata la biopsia testicular como método seguro y ampliamente utilizado en los centros de fertilidad. En el caso de pacientes prepuberales, la biopsia testicular es también el método de elección, ya que ha demostrado ser una opción eficaz que no deja secuelas intra/post-operatorias, aunque no hay que olvidar que esta técnica siempre puede albergar algún tipo de riesgo para el paciente; en estos casos, la microdissección puede surgir como técnica alternativa, aunque hay muchos autores que todavía le confieren cierto carácter experimental (Ramanasy et al).

EXTRACCIÓN DE TEJIDO	TÉCNICA	ESTUDIO	AUTOR, AÑO PUBLICACIÓN Y REVISTA
Testicular	Biopsia Testicular	Development of the testis in pre-pubertal boys with cancer after biopsy for fertility preservation	Ujildert y colaboradores, (2017); <i>Human Reproduction</i>
Testicular	Microdissección testicular	Microdissection testicular sperm extraction: effect of prior biopsy on success of sperm retrieval.	Ramasamy y colaboradores, (2007); <i>Journal of Urology</i>
Ovárico	Ooforectomía total o parcial por laparoscopia	Cryopreservation of in vitro matured oocytes in addition to ovarian tissue freezing for fertility preservation in paediatricfemale cancer patients before and after cancer therapy	Abir y colaboradores (2016); <i>Human Reproduction</i>
Ovárico	Extracción corteza ovárica por laparoscopia	Efficacy of ovarian tissue cryopreservation for fertility preservation: lessons learned from 545 cases	Jaloul y colaboradores (2017); <i>Human Reproduction</i>

Tabla 2. Evolución de las técnicas de extracción de tejido testicular y ovárico, con artículos publicados acerca de las diferentes técnicas. La microdissección en pacientes prepuberales aún es experimental.

En cuanto al tejido ovárico, la mayoría de los autores (Abrir et. al) optan por la extracción y preservación del tejido cortical, bien por laparoscopia y/o por ooforectomía parcial; se han

aplicado ambas técnicas en mujeres adultas con buenos resultados en relación con la preservación de la fertilidad.

Aunque la extracción de tejido está muy estudiada y es algo que se utiliza en la práctica rutinaria en mujeres y hombres adultos, es necesario más estudios que incluyan grupos muestrales más grandes en pacientes pediátricos.

3. PRESERVACIÓN DE TEJIDO.

3.1. Preservación de tejido testicular.

- Congelación Lenta.

La CL en crioviales es una técnica que consiste en reducir la temperatura 0,3°C por minuto hasta que se alcanzan los -196°C, para posteriormente meter la muestra en nitrógeno líquido (NL). Los protocolos de congelación precisan del uso de crioprotectores que pueden ser: 1.5 M de etilenglicol y sacarosa, 0,7M de DMSO y sacarosa, solo DMSO entre otros. La CL controlada con DMSO como crioprotector penetrante (CP), es una técnica que, aunque aún es experimental es prometedora, con buenos resultados en modelo animal.

Varios estudios han probado que la congelación lenta programada para ITT es una buena opción para congelar de manera eficaz y preservar la integridad celular, sin embargo, es un procedimiento costoso y complejo pudiendo ser el tiempo medio de realización entre una y cuatro horas dependiendo del protocolo. La descongelación se realiza rápidamente colocando los crioviales a 37°C y posteriormente en una serie de soluciones dependiendo del protocolo elegido para poder procesarlas.

- Vitrificación.

En contraposición a la CL programada surge la vitrificación de ITT como un método eficaz más simple y menos costoso, siendo el tiempo medio necesario de 30 minutos, en función del protocolo que se elija. Este método podría ser la mejor opción para preservar ITT, ya que evita la formación de cristales de hielo y las consiguientes lesiones por congelación (11).

Ya se elija un protocolo u otro, hay que tener en cuenta lo que queremos criopreservar, pues en tejido testicular, compuesto por varios tipos celulares distinto; células de diferente tamaño y con diferente metabolismo, implica un reto en cuanto al protocolo que se utilice, ya que

debemos criopreservar todos los grupos celulares de manera adecuada. Con esto, se desarrollaron estudios en modelos de ratón en los que se compara el cultivo de ITT con el cultivo de suspensión celular testicular (TCS), siendo la criopreservación de ITT la técnica de elección para preservar la fertilidad de estos pacientes prepúberes.

Otros estudios también tienen en cuenta el tiempo de exposición de la muestra al crioprotector, observándose resultados alentadores en aquellos protocolos que disminuyen este tiempo. Es importante considerar en la elección de un protocolo de criopreservación la formación de cristales de hielo, que producen daño celular y tisular, por ello en muchos casos se opta por la vitrificación en lugar de la CL, aunque aún es experimental.

3.2. Preservación de tejido ovárico.

Antes de proceder a la criopreservación se debe preparar el tejido, que se realizará en frío con el fin de evitar pérdida de folículos primordiales y con cuidado se separará la corteza de la médula, dejando una parte de estroma para la revascularización.

- *Congelación lenta.*

La preservación de OCT es uno de los métodos de elección para preservar la fertilidad de niñas prepúberes. Al igual que en el tejido testicular la CL consiste en reducir la temperatura 0.3°C por minuto hasta alcanzar los -196°C para después almacenar la muestra en NL y, al igual que en el tejido testicular, existen varios protocolos con diferentes crioprotectores. Este procedimiento en ocasiones, puede ser una fuente de daño iatrogénico, afectando a la viabilidad del tejido, causando la muerte de células del estroma y del folículo aumentando la fibrosis (7), pudiendo afectar a la población de folículos que se encuentren en el tejido. Un descenso controlado de la temperatura y una adecuada concentración de crioprotector mejoraron sustancialmente los protocolos de CL reduciendo la cantidad de hielo intratisular.

En otros estudios, Gallardo y colaboradores evaluaron la permeación de crioprotector permeable (CPA) en tejido ovárico y vieron, que los protocolos podrían mejorarse, lo que tendría una influencia positiva en el desarrollo y supervivencia de los folículos preantrales del tejido después de ser injertado. Disminuir la velocidad de enfriamiento, agregar solutos no permeables o aumentar las concentraciones de CPA (siendo el más utilizado en DMSO) para potenciar la deshidratación, son algunos de los pasos para poder mejorar los protocolos de CL. Es importante tener en cuenta que no solo la toxicidad por la concentración del CPA puede influir en la cantidad de folículos, sino que también el choque osmótico, el estrés oxidativo y

las lesiones por la manipulación y el propio proceso de congelación, podrían afectar más a la concentración de folículos que el propio CPA.

- Vitrificación.

La necesidad de reducir la formación de cristales de hielo hizo que la criopreservación de tejido ovárico evolucionara hacia la vitrificación, una técnica rápida y eficaz que es ampliamente utilizada con éxito para la preservación de embriones y ovocitos. Con la vitrificación sometemos a las células a soluciones muy concentradas de solutos, lo que hace que se deshidrate más rápido y el crioprotector entre antes de que se inicie el proceso de congelación, el crioprotector pasa de un estado líquido a un estado vítreo, que para alcanzarlo además de aumentar la viscosidad de la solución, tenemos que realizar una bajada rápida de temperatura de -15.000 a -30.000°C por minuto, este rápido descenso permite que se minimice la formación de cristales de hielo, pero a diferencia de la CL, la cantidad de crioprotector que debemos utilizar es mayor aumentando el daño que este pueda causar sobre las células del tejido que queremos preservar. En cuanto a la elección del crioprotector, el DMSO y el etilenglicol son los que más se utilizan en protocolos de vitrificación.ç

Las dos técnicas mencionadas están ampliamente estudiadas y son utilizadas en la clínica diaria en el caso de mujeres adultas para preservar ovocitos y embriones, pero para niñas y mujeres prepuberes que requieren tratamiento inmediato contra el cáncer, la preservación de OCT es la única opción para asegurar su fertilidad (8).

3.3. Revisión de la literatura.

En pacientes pediátricos, la criopreservación tanto de ITT y de OCT aparece actualmente como la única opción disponible; aunque no se ha descrito un protocolo específico como tal, y tanto la congelación lenta como la vitrificación aún están en estudio, hay autores como Curaba et al. o Jensen et al. que han destacado las ventajas de la vitrificación sobre la congelación lenta.



Figura 6. Técnicas de criopreservación de tejido testicular y ovárico. Evolución de congelación lenta a vitrificación. Artículos relacionados.

Como hemos comentado anteriormente, la amplia mayoría de estudios publicados hasta la fecha optan por la vitrificación en lugar de la congelación lenta para preservación de tejido ovárico y/o testicular. Al igual que en adultos la vitrificación se aplica rutinariamente en la criopreservación de ovocitos, espermatozoides, tejido testicular derivado de biopsia y OCT, esta misma técnica ha evolucionado de forma similar en pacientes pediátricos con respecto a la CL. Por otro lado, la mayoría de los estudios también confirman al DMSO como el crioprotector con mejores tasas de supervivencia.

Son necesarios más estudios experimentales que desarrollen los protocolos de vitrificación ya que en el caso de niños aún no se ha conseguido iniciar la espermatogénesis. Quizás el proceso de vitrificación puede afectar de distinta manera a estos tejidos prepuberales, haciéndolos más sensibles a los crioprotectores y/o a la propia técnica en sí. La realización de estudios comparativos donde se puede evaluar el tipo de crioprotector y tiempo de vitrificación nos llevaría a resultados más específicos y protocolos personalizados, dependiendo del tipo de tejido que queramos preservar.

4. MADURACIÓN DEL TEJIDO.

4.1. Maduración de tejido testicular.

En ITT humano aún no se ha conseguido desarrollar por completo la espermatogénesis, y poder conseguir con ello espermatozoides maduros, pero sí se han conseguido resultados alentadores en modelos de ratón, donde se han obtenido espermatozoides funcionales maduros.

Numerosos estudios tienen como objetivo determinar si el cultivo de ITT humano prepuberal, puede ser una estrategia para desarrollar la espermatogénesis *in vitro*. También se investigó si el bajo éxito en el cultivo de ITT humano podría deberse a daños producidos en los protocolos de criopreservación, lo que llevó al desarrollo de estudios donde se comparase tejido fresco y criopreservado, y cultivado con o sin suplementación gonadotrópica (LH y FSH). Dichos estudios no observaron ninguna diferencia entre tejido fresco y criopreservado en cuanto al inicio de la espermatogénesis, la cual no se produjo en ambos, aunque sí observaron que la suplementación con FSH permitía el inicio de la meiosis (21) tal como desarrollaron también Michelle y colaboradores, donde esa suplementación con FSH y LH era fundamental (22) y posteriormente Medrano y colaboradores observaron que después de la suplementación, se producía un bloqueo en la etapa premeiótica, motivo que podría causar la no finalización de la espermatogénesis *in vitro* (23).

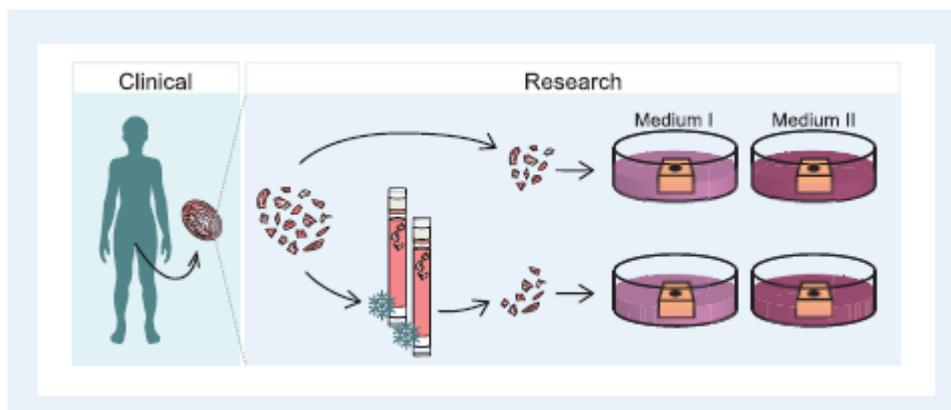


Figura 4. Descripción esquemática del diseño experimental. El tejido testicular biopsiado para investigación se procesó previa criopreservación en pajuelas antes del cultivo. Fragmentos de testículo (1-2 mm³) se cultivaron en la parte superior de las masas de agarosa por un máximo de 5 semanas (34 ° C, 5% CO₂) en dos medios diferentes sin (medio I) o con suplementación hormonal (medio II). (Fuente: Portella et al; (2019) Assessment of fresh and cryopreserved testicular tissues from (pre)pubertal boys during organ culture as a strategy for *in vitro* spermatogenesis. *Human Reproduction*)

También, como se ha dicho anteriormente en la introducción de este trabajo, se realizaron experimentos suplementando el medio con ácido retinoico y melatonina, demostrando en modelos de roedores, que son esenciales para la diferenciación, mantenimiento y protección frente al daño tisular de las CG. El tipo de medio de cultivo que se elija está influenciado por el estado madurativo del tejido que lo determina la edad del paciente. Así que los requisitos hormonales y moleculares varían según el momento del desarrollo del tejido, como ocurre de manera normal en el desarrollo de un niño hasta que alcanza la pubertad y la madurez.

Al mismo tiempo fueron necesarios, para conferir al medio de cultivo unas condiciones ideales que genere un microambiente que imite al nicho testicular fisiológico al inicio de la pubertad, la adición de hormonas específicas (FSH, testosterona y HCG) y factores como el ácido retinoico (3), siendo esencial la testosterona como agente antiapoptótico y para la supervivencia de las CG.

En cuanto a los diferentes métodos de reproducir células haploides a partir de SSCs criopreservadas, la IVM es el método más seguro que evita la reintroducción de células cancerosas. Hay diferentes métodos de cultivo entre los que podemos nombrar; cultivo con linaje Vero, cultivo organotípico y cultivo en 3D son algunos de los métodos que están en estudio.

En humanos aún no se ha conseguido desarrollar la espermatogénesis in vitro, pero sí se ha conseguido en ratones, utilizando sistema de cultivo organotípico, en el cual se mantienen las conexiones celulares; se considera el mejor método para conseguir la espermatogénesis que el cultivo de células aisladas. Los principales problemas planteados por los estudios sobre el cultivo de tejido testicular humano son, la incapacidad de replicar el proceso espermatogénico completo y la pérdida de CG durante el cultivo (3). También hay que tener en cuenta la inmadurez del tejido testicular prepuberal, que va a influir en las condiciones en las que se realice el cultivo.

Son necesarios estudios en los que se tenga una homogeneidad en cuanto a la edad del paciente, ya que va a influir en la madurez celular en el aporte de hormonas y en otros componentes que van a variar dependiendo de en qué momento de desarrollo se encuentre el paciente.

4.2. Maduración de tejido ovárico.

En cuanto a la maduración del tejido ovárico, existen varios enfoques cuyo fin es procurar la supervivencia de la mayor cantidad de folículos en un tejido que sea viable para el trasplante. El período de hipoxia e isquemia vascular que sufre el tejido antes de la revascularización progresiva hace que se produzca una pérdida de folículos post-injerto importante. Para resolver

estos problemas, se han desarrollado modelos de xenoinjerto con factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), N-acetilcisteína, eritropoyetina, vitamina E y melatonina, entre otros.

Los nuevos enfoques incluyen el uso de células madre derivadas del tejido adiposo (ASC), una sustancia fácilmente obtenible, fuente de células mesenquimales autólogas (MSC) que constituyen una población de células madre con potencial de diferenciación multilineaje probado (13). Manavella y colaboradores observaron que altas concentraciones de ASC mejoraban la vascularización del tejido injertado, aumentando con ello la supervivencia de los folículos. Así desarrollaron un procedimiento de injerto en dos pasos, que implica la preparación del lugar del trasplante con ASC distribuidos dentro de un trasplante de fibrina dos semanas antes del trasplante en sí, consiguiendo con ello mejorar la vascularización en la zona del injerto y una tasa de supervivencia folicular aumentada 7 días después del injerto del 68% comparado con el 25% que se consigue sin el procedimiento en dos pasos con ASC. También se vio reducida la tasa apoptótica gracias a las propiedades antiapoptóticas de las células MSC, relacionado con la reducción del daño hipóxico severo.

Por otro lado, la IVM de ovocitos de pacientes prepuberes se trata de una opción complicada, ya que estos ovocitos no tienen la competencia meiótica necesaria para poder madurar. Los estudios animales sugieren que la adquisición de la competencia meiótica está relacionada con la expresión y producción de niveles adecuados de receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en las células del cúmulo, sugiriendo que la señalización del EGFR somático integra la maduración del folículo en el momento de la formación del antro con cambios críticos en la maquinaria de maduración de los ovocitos (20). Por ello, el autotrasplante podría ser la solución para conseguir esta competencia meiótica y producir la maduración de los ovocitos en un contexto in vivo. Segers y colaboradores desarrollaron un estudio utilizando IVM de ovocitos recuperados de tejido ovárico extracorpóreo (OTO-IVM). El principal problema es conseguir la maduración de los folículos más pequeños, para poder conseguirla se desarrolló un sistema de IVM en dos pasos que incluye la incubación con péptido natriurético tipo C (CNP), aunque este nuevo enfoque aún es experimental y sigue en desarrollo.

4.3.Revisión de la literatura.

Con todo lo comentado en cuanto a la maduración de tejido ovárico y/o testicular encontramos en la literatura que el cultivo con gonadotropinas mejoro las condiciones del tejido y permitió un avance en el desarrollo de la espermatogénesis in vitro tal como desarrollaron en sus estudios

Medrano (15) y Michelle entre otros, aunque ninguno ha podido desarrollar aun la espermatogénesis de ITT (3).

Muchas son las causas que pueden influir en esta maduración, como por ejemplo el estado evolutivo del paciente. Un punto importante durante el cultivo es conseguir una neovascularización idónea para permitir que el tejido siga evolucionando, observándose mejoras con el uso de células madre derivadas de tejido adiposo como muestra Manavella en su estudio (13).

MADURACION DEL TEJIDO	TÉCNICA	AUTOR	AÑO	ARTICULO	REVISTA
TESTICULAR	Suplementación del medio de cultivo con gonadotropinas y AR y melatonina	Portella y colaboradores	2019	Assessment of fresh and cryopreserved testicular tissues from (pre)pubertal boys during organ culture as a strategy for <i>in vitro</i> spermatogenesis	<i>Human Reproduction</i>
TESTICULAR	Cultivo Organotípico	Michele y colaboradores	2017	Preserve seminiferous tubule integrity with spermatogonial survival and induction of Sertoli and Leydig cell maturation after long-term organotypic culture of prepubertal human testicular tissue	<i>Human Reproduction</i>
OVÁRICO	Cultivo con células madre derivadas del tejido adiposo	Manavella y colaboradores	2018	Two-step transplantation with adipose tissue-derived stem cells increases follicle survival by enhancing vascularization in xenografted frozen-thawed human ovarian tissue.	<i>Human Reproduction</i>
OVÁRICO	Maduración In Vitro	Pasquales y colaboradores	2019	Old is bad, young is good, but what about very young? Oocytes obtained from pre-pubertal ovarian tissue of very young patients are incapable of in vitro maturation	<i>Fertility and Sterility</i>

Tabla 3. Técnicas utilizadas para madurar tejido testicular y ovárico antes del trasplante al paciente. Artículos publicados sobre estas técnicas.

Es necesario desarrollar estudios que tengan una homogeneidad en cuanto a la muestra elegida. La gran mayoría de los artículos concluyen que la suplementación con gonadotropinas como otros componentes no solo mejora los resultados, sino que es esencial para mantener un

microambiente lo más parecido al nicho natural. Sin embargo, muchos de ellos toman grupos muestrales de distintas edades y sexo, lo que podría llevar a sesgo y que no daría resultados concluyentes ya que sabemos que tanto la concentración de gonadotropinas como de otros factores varían a lo largo de la vida puberal del paciente. Esto nos lleva no solo a la homogeneidad antes comentada, sino a realizar estudios experimentales donde tengamos cultivos secuenciales que varíe en función de las necesidades del tejido.

5. TRANSPLANTE

5.1. Trasplante de tejido Ovárico.

El trasplante de OCT no solo permite recuperar una gran parte de folículos primordiales para restaurar la fertilidad de estas pacientes, sino que además permite recuperar la función endocrina. Entre los tipos de trasplante de OCT podemos destacar; trasplante ortotópico (el tejido se implanta sobre la médula ovárica) al tejido ovárico restante o al peritoneo pélvico, o heterotópicamente (el tejido se implanta en cualquier sitio distinto de la médula ovárica) a lugares como el antebrazo o la pared abdominal. Es importante recalcar el riesgo que supone el reintroducir células malignas de nuevo en el cuerpo de la paciente que ya ha superado la enfermedad, por ello el grupo de Díaz-García ha evaluado dicho riesgo mediante el xenotrasplante de corteza ovárica de pacientes con leucemia en ratones inmunodeficientes, obteniendo resultados contradictorios.

Por ello algunos grupos sugieren el cultivo de la corteza ovárica con fármacos que eliminen las células cancerosas del tejido antes del trasplante sobre todo en aquellos pacientes en los que el trasplante este contraindicado, como por ejemplo con dexametasona (DXM). La DXM induce eficazmente la diferenciación y apoptosis de la leucemia mieloide y linfoide, tanto in vivo como in vitro (16).

Una vez trasplantado lo que se necesita es que se inicie una revascularización que permita el mantenimiento del tejido y el desarrollo del ovario para poder producir óvulos fecundables. Sin embargo y aunque se inicie esta vascularización ya sea con VEGF u otras sustancias, el tejido ovárico trasplantado parece sufrir un hiper reclutamiento inicial de folículos acompañado de una foliculogénesis alterada, llegando a perder una parte importante de folículos por isquemia e hipoxia tisular.

El trasplante de tejido ovárico prepuberal también encuentra diferencias en cuanto a la edad de la paciente y en el momento del desarrollo en el que se encuentre, algunos estudios ya en 2014 demostraron la capacidad del tejido ovárico criopreservado para desarrollarse y activar la

foliculogénesis en niñas prepuberales, teniendo el tejido ovárico prepuberal una mayor densidad folicular que en adultos, pero se observaron diferencias en pacientes muy jóvenes (3 años) y pacientes mayores (11 años) influyendo la edad en el momento de la biopsia de tejido. Algunos autores hablan sobre el desarrollo del eje hipotalámico-pituitario-gonadal y su influencia en la supervivencia folicular. Por otro lado, el tejido ovárico de pacientes muy jóvenes puede responder más alto a estímulos externos y hormonales después del trasplante. También la competencia meiótica, la maduración citoplasmática y metabólica influye en que los ovocitos más jóvenes puedan alcanzar la madurez, sin olvidar el desarrollo angiogénico del tejido ovárico.

5.2. Trasplante de tejido Testicular.

El principal objetivo que aún no se ha conseguido y que sigue en desarrollo es obtener de ITT espermatozoides con capacidad reproductiva; no obstante, se han conseguido resultados alentadores con cultivo organotípico de tejido testicular humano prepuberal.

Para mejorar el cultivo in vitro del tejido testicular, se ha optimizado el microambiente creando organoides de ITT (10). Otra técnica con resultados exitosos en modelos animales es el autotrasplante de SSCs; esta técnica requiere de un proceso anterior al autotrasplante de aislamiento y propagación in vitro, para obtener un número necesario para recolonizar el testículo. El autotrasplante (autólogo) se puede realizar en el mismo testículo del paciente, en el escroto o ectópicamente bajo la piel. Hay que destacar que tanto en individuos adultos como en prepuberes se ha cultivado in vitro SSCs sin perder su capacidad de recolonizar túbulos seminíferos en un modelo de xenotrasplante. Por lo tanto, este es un buen enfoque para poder restaurar la fertilidad, pudiendo a la vez eliminar cualquier rastro de células cancerosas que pueda estar presente en el tejido.

Otro abordaje es el trasplante de pequeños fragmentos de ITT preservado por CL o vitrificación, conservando el ambiente natural del testículo. También es importante mantener las conexiones entre las SSCs y las células somáticas y gracias a los propios nutrientes y hormonas que genera el cuerpo del paciente poder comenzar el proceso espermatogénico.

En cuanto al xenotrasplante de ITT si se ha conseguido el desarrollo de espermatozoides en modelo murino, en cambio en humano aún no se ha conseguido la espermatogénesis completa. La vascularización del trasplante es un punto fundamental que influye en la captación de nutrientes, oxígeno y factores que influyen en la supervivencia y desarrollo celular. Por lo tanto, estimular la neovascularización en los trasplantes puede mejorar la supervivencia del trasplante y la proliferación y diferenciación de CG (2). Una de las opciones que hemos comentado

anteriormente es el pretratamiento del xenotrasplante con VEGF que consigue mejorar la vascularización, consiguiendo un mejor desarrollo de los túbulos seminíferos mejorando el microambiente y un aumento de espermatogonias.

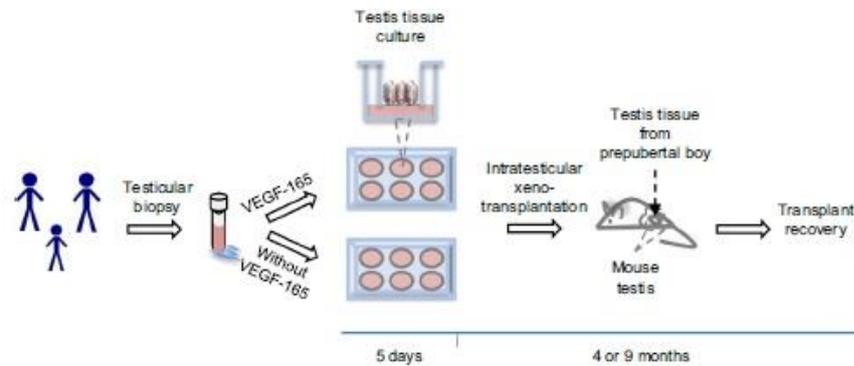


Figura 5. Diseño experimental. Se cultivaron fragmentos de tejido testicular criopreservados de tres niños prepúberes como explantes de tejido con factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) -165 (100 ng / ml) o sin VEGF-165 (control). Pasados 5 días, se trasplantaron fragmentos de testículo a los testículos de ratones inmunodeficientes. Los xenotrasplantes se recuperaron a los 4 o 9 meses postrasplante. (Fuente: Ntemou et al; (2019) Effect of recombinant human vascular endothelial growth factor on testis tissue xenotransplants from prepubertal boys: a three-case study. *RBMO*).

El co-trasplante de ITT con células madre mesenquimales podría ser también una estrategia alternativa gracias a su capacidad de migrar a sitios donde se produzca daño tisular y regenerarlo.

5.3.Revisión de la literatura.

Como hemos mencionado anteriormente el trasplante de tejido testicular y ovárico en algunos tipos de cánceres está contraindicado por la posibilidad de reintroducir células malignas de nuevo en el paciente, por ello la IVM se desarrolló como una opción para estos pacientes, sin embargo algunos estudios como el de Pascualle (20) no ofrece buenos resultados, obteniendo muy bajas tasas de maduración folicular en el caso de pacientes muy jóvenes (4 años o menos) o el de Avellino (23) no consiguiendo finalmente la espermatogénesis in vitro. Por ello se evolucionó a técnicas que permitieran esta maduración, pero sin el peligro de reintroducir células cancerosas. Diaz-García (16) y Ntemau (2) desarrollan el xenotrasplante, tanto de OCT como de ITT. Estas técnicas han tenido grandes resultados en modelo animal, pero en humano aún es experimental.

Aunque se están estudiando diferentes técnicas de trasplante tanto de tejido testicular como ovárico, se ha visto que el trasplante no se podría realizar si la preparación previa del tejido que incluye un paso muy importante y respecto al que coinciden numerosos artículos, que es la angiogénesis y la correcta vascularización. El desarrollo de nuevos vasos sanguíneos a partir de los ya preexistentes es fundamental para la supervivencia del tejido preservado. Muchos estudios concluyen que la utilización de VEGF mejora esta neovascularización, tratando el tejido antes de ser trasplantado.

Por ello, el éxito del trasplante no solo depende de que el tejido haya sido bien conservado, sino de que una vez descongelado tenga un desarrollo específico que permita el trasplante.

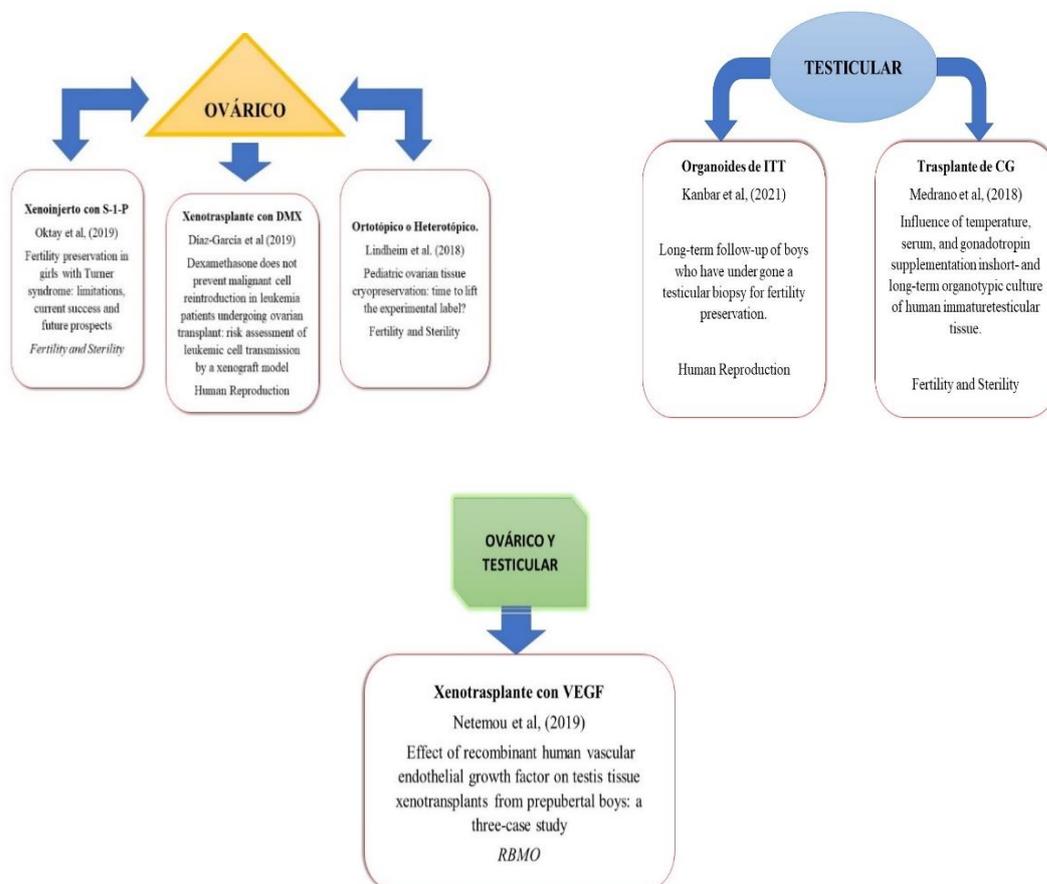


Figura 7. Tipos de trasplante de tejido ovárico y testicular y artículos relacionados. La utilización de VEGF se ha probado en ambos tipos de tejido.

El trasplante de tejido aún sigue siendo experimental, y, aunque hay buenos resultados en modelo murino, aún no hay bibliografía suficiente en humano para poder llegar a conclusiones. Es necesario dar el salto al modelo humano y ver si estas prácticas mejorarían las condiciones

del trasplante y, como hemos mencionado anteriormente, teniendo una homogeneidad en cuanto al momento evolutivo del paciente.

6. DISCUSIÓN.

Los avances en los tratamientos antineoplásicos han supuesto un aumento en la supervivencia de pacientes con cáncer, sobre todo en pacientes pediátricos aumentando hasta en un 70%. Pero los tratamientos a los que son sometidos ponen en peligro la gónada en desarrollo provocando en la gran mayoría de los casos problemas de fertilidad o la pérdida de esta.

La *American Society of Clinical Oncology* (ASCO), reconoció la importancia que tiene preservar la fertilidad al desarrollar la guía clínica en 2006, (actualizada en 2013), en la que se abordan los aspectos de la fertilidad en aquellas pacientes en las que esta puede estar comprometida.

A pesar de estas recomendaciones, muchos centros de oncología no llegan a abordar este asunto por diferentes motivos, falta de preparación o de equipo especializado, edad joven de la paciente, falta de datos sobre eficacia en los tratamientos entre otras, y como consecuencia son pocos los pacientes que están bien informados y a tiempo antes de iniciar su tratamiento.

El impacto que supone la noticia de la enfermedad sobre el paciente y sobre los tutores y la preocupación por realizar el tratamiento lo antes posible, han contribuido a que no se considere habitualmente el uso de técnicas de preservación de la fertilidad y a que sean muy pocos los centros hospitalarios que ofrecen estas alternativas. Por este motivo, aunque hay gran cantidad de estudios que en modelo animal consiguen buenos resultados, es difícil extrapolarlo al modelo humano con estudios que tengan una buena cohorte de individuos para permitir obtener resultados representativos según el tipo de enfermedad neoplásica que sufra el paciente, así como su edad que, como se ha comprobado, es importante en el desarrollo gonadal. La criopreservación de ITT en modelo murino ha conseguido desarrollar la espermatogénesis y tener espermatozoides competentes, sin embargo, en modelo humano aún es puramente experimental. Los estudios de Kanbar y colaboradores son los primeros con una gran cohorte de niños que se sometieron a biopsia testicular para preservar la fertilidad y a los cuales se les realizó un seguimiento a largo plazo y clasificados según la etapa pre y peri-puberal, pero hay que tener en cuenta que tanto la clasificación de estadio de Turner de la etapa puberal, como el volumen testicular tiene también sus propias limitaciones. Por lo tanto, se necesita aún la generación de unos parámetros fiables que nos indiquen el inicio de la pubertad para poder así asignar los grupos de estudio y poder crear una gran base de datos internacional que permita la creación de estudios tanto prospectivos como retrospectivos. La criopreservación de corteza ovárica es la única opción viable para pacientes prepuberal y puberales; esto ha supuesto sin

lugar a duda una revolución a todos los niveles, permitiendo abrir una ventana para más investigaciones en el campo de la fertilidad en niñas oncológicas. Esta técnica no requiere de una estimulación ovárica previa, lo que da una alternativa en multitud de casos en que no está recomendada esta estimulación y en niñas en que aún no se ha demostrado que la hiperestimulación sea una opción. La maduración y el tipo de trasplante son claves para conseguir recuperar la fertilidad, la suplementación con gonadotropinas y con otros factores que permitan la neovascularización del tejido y el mantenimiento de la arquitectura celular, se ha visto que son necesarias y se han relacionado con una mayor supervivencia del folículo y una reducción de la apoptosis, sin embargo, aún queda un largo camino. Se han notificado 130 nacimientos vivos en todo el mundo con la técnica de criopreservación de OCT, sin embargo, los datos en pacientes prepuberal son escasos.

Al igual ocurre con los tipos de trasplante que en pacientes puberales aún sigue siendo experimental. Factores como la homogeneidad de la muestra, el control de la temperatura, del pH así como el tipo de medio en el que se van a madurar son puntos a considerar para próximos estudios. Es muy importante valorar la individualidad de cada paciente y ofrecer tratamientos personalizados que finalmente permitan devolverle la fertilidad.

Aunque la experiencia científica y las consideraciones psicológicas apoyan la utilización de la criopreservación como método de conservación de la fertilidad, existen numerosas consideraciones éticas y legales que hay que tener en cuenta. La preservación de la fertilidad en pacientes prepuberales plantea varios problemas éticos, incluida la dificultad de asesorar a un paciente tan joven y a sus familiares que son los que, en estos casos, van a tener que tomar las decisiones. Un punto ético clave es el de ofrecer a estos pacientes la posibilidad de tener un futuro abierto, permitiendo que se proteja el derecho de este niño a tomar una decisión importante antes de que tenga la capacidad de tomarla por sí mismo. Permitiendo que el menor participe en la medida de lo posible en la toma de decisiones, y no sean solo los adultos los que decidan sobre su fertilidad futura. Las creencias religiosas y culturales que posean los tutores pueden influir negativamente en el futuro del niño, por ello hay que trabajar en la toma de decisiones entre el oncólogo, los tutores y el paciente. El uso póstumo de gametos, en el caso de que el niño fallezca si los tutores quisieran un niño biológicamente similar al niño fallecido no está permitido, lo que puede suponer un problema añadido a la toma de decisiones. Son muy pocos los centros médicos que ofertan estos tratamientos cubriéndolos el seguro sanitario y por lo general se realizan en clínicas privadas con unos altos coste que no puedan estar al alcance de todas las familias. También es importante tener en cuenta que en muchos casos el deseo de preservar la fertilidad puede retrasar el inicio del tratamiento contra el cáncer que en muchas

circunstancias no es una opción, y más aún cuando el tratamiento que existe todavía es experimental.

Es de gran importancia, que el médico oncólogo que realiza el tratamiento contra el cáncer, brinde un buen asesoramiento sobre los diferentes métodos de preservación de fertilidad que existen, informando a las familias sobre el riesgo de infertilidad y las opciones que pueden tomar de cara al futuro fértil del paciente. Aunque también deben ser conscientes de que en la actualidad las opciones aún son limitadas y muchas de ellas experimentales.

La preservación de la fertilidad en pacientes pediátricos es un gran campo de estudio que, aunque aún sigue siendo en su mayor parte experimental en modelo humano, ya desde los inicios del siglo XXI ha dado lugar a estudios prometedores que abren las puertas a técnicas y procesos que permitirán ayudar a estos pacientes que van a ser sometidos a unos tratamientos agresivos y altamente gonadotóxicos.

BIBLIOGRAFIA

- (1). Mitchell R. T. (2021) Let's hear it for the boys. *Human Reproduction*. Vol.36, No.1 pp.3–4.
- (2). Ntemou E., Kadam P., Van Laere S., Van Saen D., Vicini E., Goossens E. (2019) Effect of recombinant human vascular endothelial growth factor on testis tissue xenotransplants from prepubertal boys: a three-case study. *RBMO*. Vol.39, No.1 pp.119-133.
- (3). De Michele F., Poels J., Weerens L., Petit C., Evrard Z., Ambroise J., Gruson D., and Wyns C. (2017) Preserved seminiferous tubule integrity with spermatogonial survival and induction of Sertoli and Leydig cell maturation after long-term organotypic culture of prepubertal human testicular tissue. *Human Reproduction*. Vol.32, No.1 pp.32–45.
- (4). Uijldert M., Meißner A., De Melker A.A., Van Pelt A.M.M., Van de Wetering M.D., Van Rijn R.R., Van Wely M., Van der Veen F., and Repping S. (2017) Development of the testis in pre-pubertal boys with cancer after biopsy for fertility preservation. *Human Reproduction*. Vol.32, No.12 pp.2366–2372.
- (5). Heckmann L., Langenstroth-Röwer L., Pock T., Wistuba J., Stukenborg J.B., Zitzmann M., Kliesch S., Schlatt S., and Neuhaus N. (2018) A diagnostic germ cell score for immature testicular tissue at risk of germ cell loss. *Human Reproduction*. Vol.33, No.4 pp.636–645.
- (6). Ortigosa J.M., Mendez F.X., Riquelme A., (2009) Afrontamiento psicológico de los procedimientos médicos invasivos y dolorosos aplicados para el tratamiento del cancer infantil y adolescente: la perspectiva cognitivo-conductual. *Psicooncología*. Vol.9, No 2-3 pp.413-428.
- (7). Gallardo M., Paulini F., Corral A., Balcerzyk M., Lucci C.M., Ambroise J., Merola M., Fernandez-maza L., Risco R., Dolmans M.M., Amorim C.A. (2018) Evaluation of a new freezing protocol containing 20% dimethyl sulphoxide concentration to cryopreserve human ovarian tissue. *RBMO*. Vol.37, No.6 pp.653-665.
- (8). Mulder C.L., Eijkenboom L., Beerendonk C.C.M., Braat D.D.M., and Peek R. (2019) Enhancing the safety of ovarian cortex autotransplantation: cancer cells are purged completely

from human ovarian tissue fragments by pharmacological inhibition of YAP/TAZ oncoproteins. *Human Reproduction*. Vol.34, No.3 pp.506–518.

(9). Jadoul P., Guilmain A., Squifflet J., Luyckx M., Votino R., Wyns C. and Dolmans M.M. (2017) Efficacy of ovarian tissue cryopreservation for fertility preservation: lessons learned from 545 cases. *Human Reproduction*. Vol.32, No.5 pp.1046–1054.

(10). Kanbar M., De Michele F, Giudice M.G., Desmet L., Poels J., and Wyns C. (2021) Long-term follow-up of boys who have undergone a testicular biopsy for fertility preservation. *Human Reproduction*. Vol.36, No.1 pp.26–39.

(11). Mara Curaba, M.S., Jonathan Poels, M.S., Anne van Langendonck, P.D., Jacques Donnez, M.D., Ph.D. and Christine Wyns, M.D. (2011) Can prepubertal human testicular tissue be cryopreserved by vitrification? *Fertility and Sterility*. Vol. 95, No. 6 pp.2123-e9-2123-e12.

(12). Jensen A.K., Rechnitzer C., Macklon K.T., Ifversen M.R.S., Birkebæk N., Clausen N., Sørensen K., Fedder J., Ernst E., and Yding Andersen C. (2017) Cryopreservation of ovarian tissue for fertility preservation in a large cohort of young girls: focus on pubertal development. *Human Reproduction*. Vol.32, pp.154–164.

(13). Manavella¹ D.D., Cacciottol L., Pommé S., Desmet C.M., Jordan B.F., Donnez J., Amorim C.A., and Dolmans M.M. (2018) Two-step transplantation with adipose tissue-derived stem cells increases follicle survival by enhancing vascularization in xenografted frozen–thawed human ovarian tissue. *Human Reproduction*. Vol.33, No.6 pp.1107–1116.

(14). Mindy S., Christianson, M.D., Steven R. Lindheim, M.D., M.M.M. (2018) Pediatric ovarian tissue cryopreservation: time to lift the experimental label?. *Fertility and Sterility*, Vol. 190, No.5 pp.805-806.

(15). Medrano JV, Vilanova-Perez T, Fornes-Ferrer V, Navarro-Gomezlechón A, Martínez-Triguero ML, García S, Gómez-Chacón J, Povo I, Pellicer A, Andrés MM et al. (2018) Influence of temperature, serum, and gonadotropin supplementation in short- and long-term organotypic culture of human immature testicular tissue. *Fertility and Sterility*, Vol. 110, No. 6 pp.110:1045–1057.

- (16). Díaz-García C., Herraiz S., Such E., Andrés M.M., Villamón E., Mayordomo-Aranda E., Cervera J.V., Sanz M.A., and Pellicer A. (2019) Dexamethasone does not prevent malignant cell reintroduction in leukemia patients undergoing ovarian transplant: risk assessment of leukemic cell transmission by a xenograft model. *Human Reproduction* . Vol.34, No.8 pp. 1485–1493.
- (17). Laurence E. X. M., Van de Loo M.D., Van den Berg M.H., Annelies Overbeek, M.D., Van Dijk M., M.Sc., Layla Damen, M.D., Cornelis B. Lambalk, M.D., Ph.D., Cecile M. Ronckers, Ph.D., Marry M. van den Heuvel-Eibrink, M.D., Ph.D., Leontien C. M. Kremer, M.D., Ph.D., Helena J. van der Pal, M.D., Ph.D., Joop S. E. Laven, M.D., Ph.D., Wim J. E. Tissing, M.D., Ph.D., Jacqueline J. Loonen, M.D., Ph.D., Birgitta Versluys, M.D., Ph.D., Dorine Bresters, M.D., Ph.D., Gerardus J. L. Kaspers, M.D., Ph.D., Flora E. van Leeuwen, Ph.D., and Eline van Dulmen-den Broeder, Ph.D. (2018) Uterine function, pregnancy complications, and pregnancy outcomes among female childhood cancer survivors. *Fertility and Sterility*. Vol.111, No.2 pp.372-379.
- (18). Kenny A. Rodriguez-Wallberg, M.D., Ph.D., Jan I. Olofsson, M.D., Ph.D. (2019) Future fertility in survivors of childhood cancer—examining the impact of cancer treatment on uterus function. *Fertility and Sterility*. Vol.111, No.2 pp. 262-263.
- (19). Oktay k., M.D., Ph.D., Bedoschi g., M.D. (2019) Fertility preservation in girls with Turner syndrome: limitations, current success and future prospects. *Fertility and Sterility*. Vol.111, No.6 pp. 1124-1126.
- (20). Pasquale P., M.D., Albertini D., Ph.D. (2019) Old is bad, young is good, but what about very young? Oocytes obtained from pre-pubertal ovarian tissue of very young patients are incapable of in vitro maturation. *Fertility and Sterility*. Vol.112, No.2 pp. 239-140.
- (21). Portela J.M.D., deWinter-Korver C.M., Van Daalen S.K.M., Meißner A., de Melker A.A., Repping S., and van Pelt A.M.M. (2019) Assessment of fresh and cryopreserved testicular tissues from (pre)pubertal boys during organ culture as a strategy for in vitro spermatogenesis. *Human Reproduction*, Vol.34, No.12, pp. 2443–2455.

(22). De Michele F., Poels J., Vermeulen M., Ambroise J., Gruson D., Guio Y., Wyns C. (2018) Haploid germ cells generated in organotypic culture of testicular tissue from prepubertal boys. *Front Physiol*, Vol.9, pp.1–18.

(23) Avellino G.J., M.D., Hwang K., M.D. (2018) Is in vitro organotypic culture the key to spermatogenesis of human immature testicular tissue? . *Fertility and Sterility*, Vol.110, pp. 1030-1031.