



VNIVERSITATĪ VALÈNCIA

Facultad de Medicina

Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología

Programa de doctorado: 290E Pediatría y áreas específicas

PROGRAMA DE PRESERVACIÓN DE FERTILIDAD EN NIÑAS Y ADOLESCENTES CON CÁNCER

MOMENTO ÓPTIMO DE REALIZACIÓN DE LA CRIOPRESERVACIÓN OVÁRICA EN
PACIENTES PEDIÁTRICAS CON LEUCEMIA AGUDA.

Tesis Doctoral presentada por:

M^a Mar Andrés Moreno

Dirigida por:

Prof. Dr. Rafael Fernández-Delgado Cerdá

Dra. Edurne Novella Maestre

Valencia, 2015

Dr. Rafael Fernández- Delgado Cerdá, profesor titular del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

Dra. Edurne Novella Maestre, doctora por la Universidad de Valencia en el Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral, titulada "Programa de preservación de fertilidad en niñas y adolescentes con cáncer. Momento óptimo de realización de la criopreservación ovárica en pacientes pediátricas con leucemia aguda" ha sido realizada íntegramente por Dña. M^a Mar Andrés Moreno bajo nuestra supervisión. Dicho trabajo está concluido y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos la presente certificación en Valencia 15 de octubre de 2015



Prof. Dr. Rafael Fernández-Delgado



Dra. Edurne Novella Maestre

Lo que caracteriza al hombre de ciencia no es la posesión del conocimiento o de verdades irrefutables, sino la búsqueda desinteresada e incesante de la verdad.

Karl Popper

A Jorge, Itziar y Unai.

Llega uno de los momentos más emotivos y dulces de este proyecto, pensar en mucha gente a la que aprecio y poder decirles con toda la humildad del mundo: GRACIAS

A mis directores de tesis Rafa y Edurne.

Rafa nos conocemos desde hace muchos años y no te puedes ni imaginar lo presente que tengo en muchas de las decisiones que he tomado a lo largo de mi vida. Eres un referente indudable como persona, médico, pediatra y oncólogo y me siento muy afortunada de poder contar contigo de una forma muy cercana. Gracias por estimularme, con la dosis justa de insistencia, a realizar este proyecto y ponerme siempre las cosas tan fáciles.

Edurne, has sido un pilar fundamental en este trabajo. Eres una gran profesional. Es muy sencillo trabajar contigo y he aprendido muchísimo en estos años. Gracias por tu paciencia, disponibilidad y entusiasmo en querer crecer y mejorar. Gracias por contagiarme en todo.

Gracias a toda la gente con la que trabajo en el hospital.

Gracias a todo el equipo de preservación de fertilidad: Chema, César, Pedro, Mónica, Patri, Cristina y Bea (entre otros). Ser la única pediatra en un mundo de reproducción tiene sus “riesgos”, pero desde luego claros beneficios. Me siento parte de este grupo y sé que los logros conseguidos han sido gracias a todos vosotros.

Un agradecimiento especial a Sonia. Ha sido muy fácil trabajar contigo y tu experiencia, eficiencia y amabilidad han sido clave en los resultados de este trabajo. Gracias también a Vicente del banco de tejidos por aportarme todos los datos que he necesitado y sobre todo por su cercanía y disponibilidad en todo momento.

Un “gran” gracias a Antonio Pellicer. Desde el primer momento me he sentido muy escuchada y te ha faltado tiempo para hacerme fácil el camino de un programa específico pediátrico. Tener a alguien de tu categoría en el equipo de preservación de fertilidad, estimulando y “provocando” es para mí un privilegio.

Gracias a María Sánchez, porque sin saberlo, encendiste la chispa en mi servicio hace ya muchos años y consiguió que este tema se convirtiera en una prioridad para los profesionales y en una realidad para nuestras pacientes.

Gracias al equipo del Dr. Wallace de Edimburgo, donde tuve la suerte de formarme hace unos años. La insistencia de trabajar este tema pero con la mirada de un oncólogo pediatra, me caló profundamente y así he intentado contagiarlo allá por donde he ido.

Gracias a Sara León, Eva Barragán, Esperanza Such, Cynta Sangüesa y Rafa Peris por toda la ayuda prestada para la elaboración de esta tesis, pero sobre todo por haberlo hecho con cariño y gran disponibilidad.

Gracias Carlos porque desde Portugal y sin pretenderlo, fuiste el punto de inflexión que me decidió a presentar esta tesis. Hay gente con la que se trabaja bien y otras como tú, que se proponen que las cosas funcionen y sobre todo que consiguen que todo parezca muy fácil.

Gracias a todo el equipo de cirugía pediátrica del Hospital la Fe (Javi, Jorge, Elisa, Segarra, Georgina, residentes y las enfermeras de quirófano, entre otros muchos). Vuestra implicación, cercanía y entusiasmo por el proyecto han sido fundamentales en su puesta en marcha y en los resultados obtenidos. Un gracias especial a Alfredo Marco, que liderando este equipo ha creído en mi y se ha volcado en que las cosas no sólo se hicieran, sino que además se hicieran bien.

Gracias a todos los oncólogos y hematólogos pediatras que han derivado pacientes al programa. Todos han estado muy atentos y disponibles a las necesidades que han ido surgiendo a lo largo de estos años.

Gracias a todo el equipo de oncología pediátrica de mi hospital por involucrarse activamente en el proyecto y dejarse contagiar. Gracias a los adjuntos, los residentes, enfermeras, auxiliares, profesores, psicólogos y cómo no a mis chicas de Adino. Un gracias especial a Victoria Castel, por ofrecerme este tema al acabar la residencia y dejarme que lo hiciera mío, convirtiéndose en una realidad. Gracias a Josep, porque desde su veteranía me has contagiado siempre tu preocupación por devolver a nuestros supervivientes a una vida con la mayor calidad posible.

Un gracias muy especial a Sofi, Sandra y Bárbara. Os he llevado locas recogiendo datos, llevando muestras y vuestra ayuda ha sido imprescindible en el funcionamiento de este programa y en la elaboración de esta tesis. Es un placer trabajar con vosotras y disfrutar de unos buenos aritos para celebrar lo que sea o hacer terapia anti-estrés.

Un gran gracias a Chema y Amparo. Me habéis enseñado mucho y os he escuchado y pedido consejo hasta llegar a ser muy pesada. Pensar siempre “en si yo fuera el paciente que haría” y trabajar para conseguir que los pacientes y sus padres sientan que están “en el mejor hospital del mundo”, son dos mensajes vuestros que llevo grabados a fuego lento. Gracias por ser excelentes profesionales y además muy buena gente.

Y desde luego un gracias enorme a mi familia y amigos.

Gracias papas, por ser un ejemplo diario de cariño, de afán de superación, de constancia. No he podido tener más suerte con la familia que tengo y contar con vosotros de forma incondicional es el mejor regalo. Gracias por ser tan buenas personas y por demostrarme que ser así, no está reñido con querer ser una buena profesional. Gracias por regalarme a Ane y a Gerardo, los mejores hermanos del mundo. Alguna vez nos hemos estirado de los pelos... pero sin duda yo no sería lo que soy, ni estaría donde estoy sin vosotros. Qué ejemplo de trabajo, de esfuerzo, de optimismo... qué ejemplo de querer mejorar el mundo pasito a pasito, desde la humildad y la alegría.

Gracias a Tomás, M^a Ángeles y Sergio, sin vuestra ayuda logística y vuestros ánimos este trabajo no hubiera sido posible. Me alegra mucho formar parte de esta otra gran familia.

Gracias a las amigas que son como hermanas: M^a Amparo, Noelia, María G, Isa, María B, Marta, Paula... qué suerte tengo de teneros cerca y de qué seáis personas tan increíbles. Vuestro interés en este tema me ha estimulado muchísimo a seguir adelante y a no desfallecer en el camino. Gracias a todos los demás amigos que me rodean, que son muchos y que sé que me quieren y me apoyan en todo lo que hago.

Un GRACIAS mayúsculo a Jorge. Por estar ahí, por ser así, por ponérmelo todo tan fácil, por ser tan buena persona y devolverme la esperanza en la humanidad en los momentos menos dulces. Un GRACIAS INFINITO por regalarme a nuestros dos tesoros Itziar y Unai, que si cabe le dan todavía más sentido al contenido de este trabajo.

Ojalá que todas las personas incluidas en el programa y muchas más que vendrán en el futuro, puedan emocionarse también con sus "tesoros" y comprobar que al final del camino tan duro que les ha tocado vivir, existen recompensas inimaginables. Gracias a todas vosotras y a vuestras familias por enseñarme tantas cosas y estimularme a no dejar de trabajar. Sois la verdadera llama de este proyecto.

:: ÍNDICE

1	ABREVIATURAS	19
2	JUSTIFICACIÓN	23
3	RESUMEN.....	25
4	ESTADO ACTUAL DEL TEMA.....	27
4.1	CÁNCER EN PEDIATRÍA.....	27
4.1.1	Epidemiología.....	27
4.1.2	Supervivencia	28
4.1.3	Tratamiento antineoplásico	30
4.2	EFFECTOS SECUNDARIOS DEL TRATAMIENTO ANTINEOPLÁSICO.....	32
4.2.1	Efectos secundarios sobre gónadas y sistema reproductor	34
4.2.1.1	Fisiología.....	35
4.2.1.1.1	Fertilidad	35
4.2.1.1.2	Desarrollo puberal.....	38
4.2.1.1.3	Definición de función gonadal normal en pediatría	39
4.2.1.1.4	Evaluación de la función gonadal en pacientes pediátricas y adolescentes con antecedentes de cáncer	40
4.2.2	Consecuencias clínicas relacionadas con la gonadotoxicidad del tratamiento antineoplásico.....	43
4.2.2.1	Fallo ovárico precoz (FOP)	43
4.2.2.2	Alteraciones de la pubertad	45
4.2.2.2.1	Pubertad retrasada (PR) en niñas.....	45
4.2.2.2.2	Pubertad precoz (PP) en niñas	45
4.2.3	Características de los tratamientos gonadotóxicos	46
4.2.3.1	Quimioterapia	46
4.2.3.1.1	Mecanismos de acción general de la QT	46
4.2.3.1.2	Mecanismos de lesión de la QT sobre el ovario	50
4.2.3.1.3	Importancia de la edad y el daño ovárico por QT.....	54
4.2.3.1.4	Importancia del tipo y dosis de los agentes citostáticos en el daño ovárico...54	
4.2.3.1.5	Resumen iconográfico de QT y gonadotoxicidad	62
4.2.3.2	Radioterapia	65
4.2.3.2.1	Mecanismo de acción general de la RT	65
4.2.3.2.2	Mecanismo de lesión sobre el ovario	65
4.2.3.2.3	Mecanismo de lesión sobre región Hipotálamo Hipofisaria	70
4.2.3.2.4	Daño sobre útero	72
4.2.3.2.5	Irradiación Corporal Total	73
4.2.3.3	Cirugía.....	74
4.2.4	Incidencia e impacto de la gonadotoxicidad en las pacientes supervivientes a un cáncer en edad pediátrica o adolescente.....	74
4.3	PRESERVACIÓN DE FERTILIDAD EN LOS PACIENTES ONCOLÓGICOS	80
4.3.1	Opciones de Preservación de Fertilidad.....	80

4.3.1.1	Varones.....	81
4.3.1.2	Mujeres (Tabla 6).....	84
4.3.1.2.1	Criopreservación de embriones	84
4.3.1.2.2	Criopreservación de ovocitos	84
4.3.1.2.3	Criopreservación corteza ovárica	86
4.3.1.2.4	Trasposición quirúrgica ovárica.....	87
4.3.1.2.5	Análogos de hormona liberadora de gonadotropina (aGnRH)	87
4.3.2	Criopreservación corteza ovárica.....	90
4.3.2.1	Descripción proceso	90
4.3.2.2	Resultados publicados hasta la fecha en relación a la CCO	91
4.3.2.3	Riesgo de contaminación en el tejido ovárico con células malignas	93
4.3.2.4	Momento óptimo de realización CCO.	95
4.3.2.4.1	Leucemias.....	96
4.3.2.5	Particularidades de CCO en población pediátrica.....	99
4.3.3	Programas de preservación fertilidad en pacientes pediátricas oncológicas.....	103
4.3.3.1	Situación actual a nivel internacional	104
4.3.3.2	Situación actual a nivel nacional.....	106
5	HIPÓTESIS	109
6	OBJETIVOS	111
7	MATERIALES Y MÉTODOS.....	115
7.4	PROGRAMA DE PRESERVACIÓN DE FERTILIDAD EN NIÑAS Y ADOLESCENTES CON CÁNCER	115
7.4.1	Pacientes	115
7.4.1.1	Criterios de inclusión	115
7.4.1.2	Clasificación Riesgo Gonadotóxico	116
7.4.2	Métodos	118
7.4.2.1	Circuito multidisciplinar previo al procedimiento	118
7.4.2.1.1	Adaptación del esquema a pacientes de otros hospitales	122
7.4.2.2	Examen clínico de los pacientes	122
7.4.2.3	Determinaciones analíticas hormonales	123
7.4.2.4	Ecografía pélvica.....	123
7.4.2.5	Circuito multidisciplinar durante el procedimiento de la CCO y tras su realización 124	
7.4.2.6	Programación seguimiento de las pacientes	126
7.4.3	Análisis descriptivo-estadístico	128
7.5	EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE QT SOBRE TEJIDO OVÁRICO EN PACIENTES PEDIÁTRICAS CON LEUCEMIA AGUDA.....	128
7.5.1	Pacientes	128
7.5.2	Métodos	131

7.5.2.1	Protocolo de extracción de tejido ovárico.....	131
7.5.2.2	Análisis del tejido.....	131
7.5.2.2.1	Estudios histológicos.....	131
7.5.2.2.2	Estudios inmunohistoquímicos.....	133
7.5.2.2.3	Estudios moleculares.....	134
7.5.2.2.4	Estudio de daño celular.....	141
7.5.2.2.5	Estudios morfométricos.....	141
7.5.3	Análisis estadístico.....	142

8 RESULTADOS..... 145

8.6 PROGRAMA DE PRESERVACIÓN DE FERTILIDAD EN NIÑAS Y ADOLESCENTES CON CÁNCER.....145

8.6.1 Descripción de las características generales de las pacientes incluidas en el programa de PF y diseño de la Clasificación Valencia 2015 para la estimación de riesgo gonadotóxico145

8.6.1.1.1 Características demográficas y diagnósticos145

8.6.1.1.2 Diseño de la clasificación Valencia 2015. Cálculo del Riesgo Gonadotóxico y su evolución temporal de acuerdo a los protocolos oncológicos utilizados151

8.6.1.1.3 Descripción del tratamiento antineoplásico previo a CCO156

8.6.1.1.4 Descripción del tratamiento antineoplásico posterior a CCO157

8.6.2 Proceso preparación y ejecución de la CCO162

8.6.2.1 Realización de estudio preoperatorio162

8.6.2.1.1 Resultados analítica hormonal previa162

8.6.2.1.2 Ecografía ovárica163

8.6.2.2 Caracterización del procedimiento quirúrgico.165

8.6.3 Estudio descriptivo de la corteza ovárica criopreservada169

8.6.3.1.1 Análisis de la población folicular y relación con las características clínicas y analíticas de las pacientes169

8.6.3.1.2 Derivación de muestras para estudio por servicio de biología molecular/Hematología171

8.6.3.1.3 Derivación de muestras al Banco de Tejidos de la Comunidad Valenciana ...171

8.6.4 Análisis descriptivo del seguimiento de las pacientes incluidas en el programa de PF172

8.6.4.1.1 Resumen situación actual de las pacientes172

8.6.4.1.2 Inicio del seguimiento función ovárica y controles analíticos realizados173

8.6.4.1.3 Evaluación general de la función ovárica. Prevalencia de FOP en la serie estudiada.....177

8.6.4.1.4 Análisis descriptivo de las 8 pacientes evaluables prepúberes al diagnóstico: 180

8.6.4.1.5 Análisis descriptivo de las 12 pacientes evaluables púberes al diagnóstico: .182

8.6.4.1.6 Técnicas PF post-tratamiento.....184

8.7 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE QT SOBRE TEJIDO OVÁRICO EN PACIENTES PEDIÁTRICAS CON LEUCEMIA AGUDA.....185

8.7.1 Estudio estructural del tejido ovárico186

8.7.2 Estudio de la activación folicular.....188

8.7.3 Estudio del daño celular.....	189
9 DISCUSIÓN	195
10 CONCLUSIONES	215
11 BIBLIOGRAFÍA	219

1 ABREVIATURAS

AA: Agentes Alquilantes

ACO: Anticonceptivos orales

ACTH: Hormona adenocorticotropa

aGnRH: análogos de hormonas liberadoras de gonadotrofinas

AMH: Hormona Antimülleriana

AMO: Aspirado de Médula Ósea

AP: Anatomía Patológica

ARA-C: Citarabina

BMO: Biopsia de Médula Ósea

BTCV: Banco de Tejidos de la Comunidad Valenciana

CI: Consentimiento Informado

CP: Cirugía Pediátrica

CCO: Criopreservación Corteza Ovárica

CCSS: Childhood Cancer Survivor Study

CFM: Ciclofosfamida

CVC: Catéter Venoso Central

Dg: Diagnóstico

EF: Exploración física

EGC: Enfermedad Granulomatosa Crónica

EH: Enfermedad Hodgkin

EMR: Enfermedad Mínima Residual

ESD: Dosis Esterilizante Efectiva

FOA: Fallo ovárico agudo

FOP: Fallo ovárico precoz

FP: Folículos Primordiales

FSH: Hormona Folículo Estimulante

GH: Hormona de Crecimiento

GnRH: hormona liberadoras de gonadotrofinas

GPre: Grupo Prepúber

GCPre: Grupo Control Prepúber

GP: Grupo Púber

GCP: Grupo Control Púber

HH: hipotálamo-Hipofisario

ICE: Irradiación Cráneo Espinal

ICT: Irradiación Corporal Total

IHQ: Inmunohistoquímica

IQR: Rango intercuartílico

ISPF: International Society Fertility Preservation

IVM: Maduración in vitro

LA : Leucemia Aguda

LH: Hormona Luteinizante	RR: Riesgo Relativo
LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda	RB: Riesgo Bajo
LMA: Leucemia Mieloide Aguda	RI: Riesgo Intermedio
LMC: Leucemia Mieloide Crónica	RA: Riesgo Alto
LNH: Linfoma No Hodgkin	SEHOP: Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátricas
MP: Menopausia Prematura	SMD: Síndrome Mielodisplásico
OP: Oncología Pediátrica	SNC: Sistema Nervioso Central
PR: Pubertad Retrasada	SSC : Spermatogonial Stem Cells
PP: Pubertad Precoz	TCG: Tumor Células Germinales
PF: Preservación de Fertilidad	TPH: Trasplante de Precusores Hematopoyéticos
PL: Punción Lumbar	THS: Tratamiento Hormonal Sustitutivo
PB: Partes Blandas	TSH: Hormona estimulante del Tiroides
QT: Quimioterapia	UCIP: Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos
QTS: Quimioterápicos	
RFA: Recuento de Folículos Antrales	
RC: Remisión completa	
RT: Radioterapia	

:: INTRODUCCIÓN

2 JUSTIFICACIÓN

Cuando empiezas en el mundo de la Oncología Pediátrica, una de las primeras cosas en las que piensas, es en el mérito que han tenido tus compañeros “veteranos” con su trabajo en las 4 últimas décadas. Ves cómo han conseguido crear desde cero una especialidad y sobre todo como han conseguido que el debut de una enfermedad oncológica en pediatría no sea sinónimo de paliación. Aumentar hoy en día un solo punto la supervivencia de algunos diagnósticos, es una labor de titanes. Por una parte se han alcanzado en algunos casos unos resultados muy brillantes y por otra parte, en los que lo son menos, parece difícil conseguirlo sin un cambio drástico de rumbo hacia nuevas terapias más dirigidas.

Cuando das de alta definitiva a un paciente de la consulta de oncología pediátrica (con mucha frecuencia cuando ya es un adulto), habitualmente enumeras el listado oficial de recomendaciones generales de hábitos de vida saludable y algunos consejos sobre controles específicos médicos que debería seguir en los próximos años. Cuando preguntan ellos, o sus padres, o sacas tú el tema de que el tratamiento administrado ha podido afectar a su capacidad para tener hijos, te das cuenta de que sí quedan cosas por hacer.

Globalmente este problema no es frecuente, pero a quien le toca le cambia la vida. Si la oncología pediátrica ha dado un giro en estas décadas, la medicina reproductiva también. ¿Por qué no aspirar a todo? Curar y devolver a alguien a su antigua/nueva vida con las menores cicatrices posibles, no debería ser una utopía.

Dejarse arrastrar por el entusiasmo de los compañeros de reproducción no es difícil. Ellos se enfrentan a estos temas todos los días y no les da miedo proponer, ejecutar... Convencerles de que este tema en niños y niñas no es sencillo y que tienen que contar con que los oncólogos pediátricos somos más protectores incluso que los propios padres, conlleva un esfuerzo que merece la pena.

¡Ponérselo fácil a mis compañeros oncólogos pediatras de este país! Este ha sido el objetivo de mi proyecto de estos años en relación a la preservación de la fertilidad en niñas y adolescentes y que se resume en estas páginas. ¿A quién? ¿Cómo? ¿Cuándo? ¿Con qué dosis? ¿Con qué riesgos? ¿Qué ventajas?... Cuando te metes en este tema encuentras baches, dificultades, dudas... pero también poco a poco y con ayuda de mucha gente, encuentras opciones, respuestas y una gran acogida.

El camino que ya he andado estos años, puede allanar el terreno para muchos profesionales y acercar los avances científicos a TODAS las pacientes que lo necesiten. A veces es sólo cuestión de organizarse.

:: INTRODUCCIÓN

Ahora bien, como todo en esta vida, las cosas pueden hacerse o pueden hacerse bien. Me encantaría que con este trabajo alguien pudiera convencerse de que los avances y el optimismo no están reñidos con el realismo. Anteponer los intereses de nuestros pacientes por encima de todo, es siempre un buen punto donde dirigir la mirada.

3 RESUMEN

Los avances de la terapia antineoplásica han llevado a un significativo aumento de los índices de supervivencia en las últimas décadas, especialmente en el ámbito del cáncer pediátrico. El objetivo en este momento es ofrecer una recuperación completa y segura, con aceptable calidad de vida y una reintegración plena en la sociedad. Desde el punto de vista endocrino-gonadal, sabemos que algunos de los tratamientos utilizados en el cáncer infantil, pueden ocasionar fallo ovárico prematuro (FOP). La capacidad de reproducción en el ser humano, no se considera un valor trivial y se relaciona de forma clara con las sensaciones de bienestar y de autonomía personal.

Paralelamente en los últimos años, las técnicas de reproducción asistida han conseguido verdaderos progresos y hoy en día el diseño de alternativas para preservar la fertilidad en pacientes diagnosticados de cáncer se ha convertido en una prioridad para muchos profesionales. La **criopreservación de corteza ovárica (CCO)** actualmente es la única opción viable para pacientes prepúberes, pero es importante remarcar su todavía carácter experimental y la necesidad de concretar algunos aspectos sobre su aplicación en pacientes menores de edad (A. R. Wallace WH 2005) (Lee SJ 2006) (Loren AW 2013)

Uno de los diagnósticos más frecuentes dentro de la oncología infantil es la leucemia aguda (LA). Aunque sólo parte de estas pacientes requerirá un trasplante de precursores hematopoyéticos (TPH), en este subgrupo las posibilidades de FOP son superiores al 80% (A. R. Wallace WH 2005). Considerar en estas pacientes la realización de técnicas de PF es fundamental pero por diferentes motivos no es fácil elegir el momento adecuado para llevarlas a cabo.

Conocer la situación del tejido ovárico previamente al TPH y tras haber sido expuesto a QT clásicamente descrita como poco gonadotóxica, tendría eminentes aplicaciones prácticas a la hora de establecer el momento óptimo de la CCO en estas pacientes. En dicho tejido, el mantenimiento de los folículos primordiales (FP) en estado “durmiente” (constituyendo nuestra principal reserva ovárica) o por el contrario su activación, tiene importantes consecuencias sobre el potencial fértil de una persona. La vía de señalización PTEN/PI3K/Akt, a través de la fosforilación de algunas proteínas clave, parece estar implicada de lleno en este mecanismo de activación folicular (Reddy P 2008).

Poner en marcha un programa específico de Preservación de Fertilidad (PF) para pacientes pediátricas y adolescentes requiere de un equipo multidisciplinar que englobe a pediatras oncólogos, cirujanos pediátricos, especialistas en reproducción, biólogos y psicólogos. La selección cuidadosa de las pacientes de mayor riesgo gonadotóxico, la aplicación de las técnicas disponibles en la actualidad de PF y el estudio desde diferentes ópticas de los

:: INTRODUCCIÓN

tejidos crioconservados, son algunos de los objetivos prioritarios actuales y para los próximos años.

La experiencia de nuestro equipo (muy amplia en mujeres adultas) y de casi 7 años con un programa específico para población infantil, con más de 50 pacientes incluidas, nos permite dar una visión completa e integradora del tema. Sería muy deseable que las opciones de PF con las que actualmente contamos estuvieran disponibles para todas las pacientes candidatas a nivel nacional y que el aprendizaje adquirido estos años y la revisión sistemática de la literatura nos permitiera, a partir de esta tesis doctoral, crear las bases de una guía clínica estandarizada.

4 ESTADO ACTUAL DEL TEMA

4.1 Cáncer en pediatría

4.1.1 Epidemiología

El cáncer infantil supone solamente un 0.5% de toda la patología oncológica. La incidencia anual varía mucho según países/regiones aunque globalmente en la infancia se estima en 240 casos por millón y por año (Spector LG 2015). Según datos recientes, en España anualmente se diagnostican 1100 casos nuevos de cáncer en niños de 0 a 14 años, a lo que se añaden otros 450 casos de adolescentes de 15 a 19 años (Peris R 2005). A diferencia de la incidencia del cáncer en el adulto, que incrementa de forma rápida con los años, en los niños existe una gran variabilidad dependiendo de la edad, con 2 picos en la primera infancia y la adolescencia (Gurney J 2004). En líneas generales existe un ligero predominio en la población masculina y también se han encontrado diferencias entre las distintas etnias, con patrones de distribución característicos en algunos subtipos de cáncer (Spector LG 2015).

Las diferencias geográficas no sólo se atribuyen a los diferentes métodos de registro, sino que también pueden explicarse por la etiología multifactorial del cáncer, donde pueden intervenir factores genéticos y ambientales. Los factores genéticos relacionados con el cáncer pediátrico sólo suponen un 5-10% de los casos siendo la neurofibromatosis tipo 1 y 2, el síndrome de Down, el síndrome de Beckwith-Wiedemann, la esclerosis tuberosa, la enfermedad de Von Hippel-Lindau, el xeroderma pigmentoso, la ataxia-teleangiectasia y el síndrome de Li-Fraumeni los trastornos genéticos que condicionan mayor susceptibilidad infantil al cáncer (Gurney J 2004).

En la etiología del cáncer pediátrico encontramos una proporción parecida de factores ambientales o exógenos establecidos, correspondiendo en su mayoría a la exposición a altas dosis de radiación ionizante, administración de quimioterapia (QT) y a agentes infecciosos como el virus de Epstein-Barr, el virus de la hepatitis B y C, el herpes virus 8 y el virus de la inmunodeficiencia humana (Linet MS 2003).

El pronóstico, la localización y la distribución histológica de los diferentes subtipos de cáncer, también difiere mucho respecto de la población adulta donde predominan los cánceres de tipo epitelial de órganos como el pulmón, el colon, la mama o la próstata, mientras que en la población infantil son mayoritarias las patologías oncológicas de estirpe hematopoyética y embrionario-mesenquimal. La distribución de los principales grupos diagnósticos en nuestro país de los pacientes oncológicos pediátricos ha sido recientemente

publicada en el informe del Registro Nacional de Tumores Infantiles (Peris Bonet R 2015) (Tabla 1).

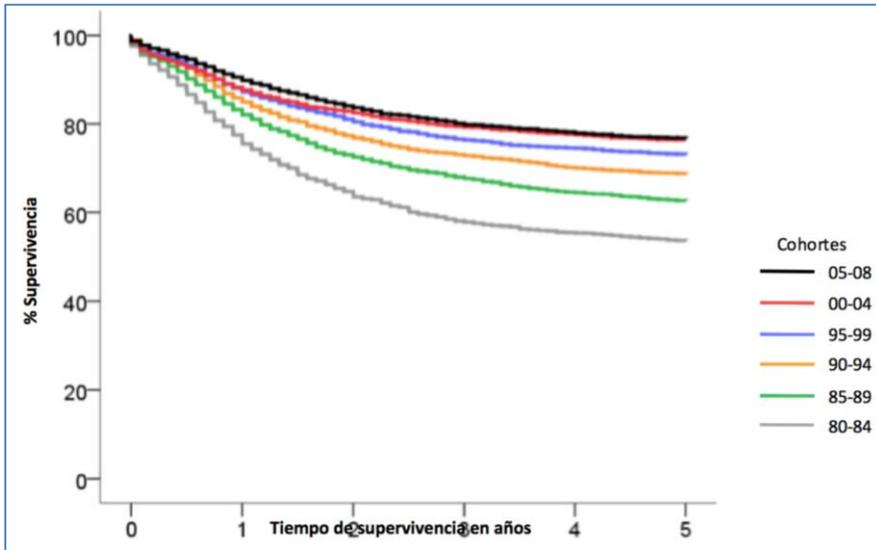
Tabla 1 : Distribución diagnósticos en oncología pediátrica según RNTI

Leucemias, enfermedades mieloproliferativas y mielodisplasias	29.9%
Tumores del SNC	22.2%
Linfomas y neoplasias reticuloendoteliales	12.7%
Neuroblastomas	8.5%
Retinoblastoma	3%
Tumores renales	5%
Tumores hepáticos	1.3%
Tumores óseos	5.7%

4.1.2 Supervivencia

Los avances en las terapias antineoplásicas han llevado a un aumento muy significativo de los índices de supervivencia en oncología pediátrica, siendo actualmente del 70% a los 10 años del diagnóstico (Wallace WHB 2014) y cifras considerablemente más altas si tenemos en cuenta periodos de seguimiento más cortos: 80 % a los 3 años y 77 % a los 10 años (Peris Bonet R 2015) (Figura 1). A pesar de este incremento en la supervivencia, sobre todo si lo comparamos con la población adulta, el cáncer continua siendo la segunda causa de muerte en los países industrializados, por detrás de los accidentes, en niños con edades comprendidas entre 1 y 15 años (Gurney J 2004).

Figura 1 : Supervivencia a 5 años del diagnóstico por cohortes de año de incidencia. 0-14 años, 1980-2008. N casos = 17.262



Extraído de: Peris Bonet E. Registro Nacional de Tumores Infantiles en su informe editado en el 2015.

La mayoría de los niños con cáncer sobreviven y ese incremento en la supervivencia ha puesto de manifiesto secuelas directamente relacionadas con la agresividad del tratamiento aplicado y el tipo de neoplasia tratada, así como un incremento del riesgo de fallecimiento por otras causas. En estos momentos ya no es suficiente el concepto de “curar a cualquier coste”, el objetivo es ofrecer una recuperación completa, con una buena calidad de vida y una reintegración plena en la sociedad. Por este motivo el desarrollo de protocolos y grupos de trabajo con este fin se han multiplicado enormemente en los últimos años. Particularmente en España, en noviembre de 1993, la Sociedad Española de Oncología Pediátrica (SEOP) constituyó una comisión nacional para el estudio y seguimiento de los efectos secundarios (Indiano JM 2005).

Alcanzar esta meta depende entre otras cosas de un buen seguimiento de los pacientes curados, en el que se intente identificar y manejar de una forma precoz los efectos tardíos del tratamiento. Los pacientes en quienes se van a valorar de una manera especial los efectos secundarios a largo plazo van a ser niños y adolescentes diagnosticados de cáncer que hayan superado los 5 años en remisión completa (RC) y que lleven más de 2 años sin necesidad de tratamiento.

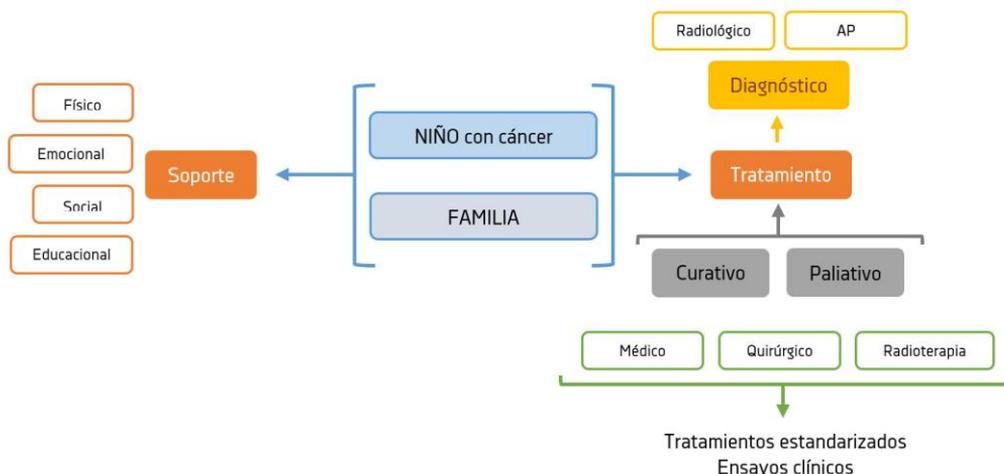
La adaptación de los diferentes protocolos de tratamiento para conseguir la menor toxicidad posible a la vez que se conservan excelentes tasas de curación, supone desde hace años, una prioridad para muchos profesionales

(Anderson RA 2015): Por otro lado el ofrecimiento de técnicas “protectoras” previas a la administración de un tratamiento con potenciales efectos secundarios a largo plazo, cobra cada vez mayor importancia (Andres MM 2009).

4.1.3 Tratamiento antineoplásico

La atención al paciente pediátrico y adolescente con cáncer requiere del esfuerzo cooperativo de múltiples especialistas. No se trata sólo de establecer un diagnóstico y tratamiento sino considerar al paciente y su familia como una unidad que necesita atención médica, psicológica, educativa y social (Figura 2).

Figura 2 : Abordaje multidisciplinar del paciente pediátrico y adolescente con cáncer



Tratamiento etiológico

- Cirugía

La **cirugía** es la base principal en el tratamiento de la mayoría de tumores sólidos malignos en pediatría. Conseguir una resección completa con márgenes libres es importante para alcanzar la curación o el control a largo plazo. En ocasiones la actuación quirúrgica puede no ser posible como primer paso, pero sí ser necesaria después del tratamiento con QT y/o Radioterapia (RT). La experiencia del cirujano es esencial en todo este proceso, así como en el de implantar o retirar dispositivos intravasculares necesarios en muchos casos para la administración de QT (Bleyer A 2004).

- **Quimioterapia**

El cáncer aparece como consecuencia de una proliferación anómala de células que han perdido el control de los mecanismos reguladores de la multiplicación y diferenciación. Las células cancerígenas entran en el ciclo celular para reproducirse y es aquí donde los agentes citostáticos interfieren evitando su replicación y favoreciendo la muerte celular. La **QT** por tanto constituye un pilar fundamental en el tratamiento antineoplásico, imprescindible en leucemias y en linfomas y fundamental en muchos tumores sólidos. La QT preoperatoria es capaz de reducir el tamaño tumoral, haciendo que la cirugía en muchos casos sea factible o menos agresiva. La QT adyuvante trata además la enfermedad micrometastásica y disminuye el riesgo de recaídas y metástasis tras la cirugía.

La administración combinada de varios fármacos con diferentes mecanismos de acción y toxicidades no superpuestas se ha convertido desde hace años en el tratamiento estándar de muchas entidades. La mayoría de los agentes citostáticos utilizados en el cáncer infantil se seleccionan de un amplio grupo, incluidos los agentes alquilantes (AA), antimetabolitos, antibióticos, hormonas, alcaloides vegetales e inhibidores de la topoisomerasa. Dado que la mayoría de ellos dependen del ciclo celular, sus efectos adversos se relacionan con la cinética de proliferación de poblaciones celulares concretas, siendo los tejidos y órganos más susceptibles aquellos que tienen un recambio celular rápido como la médula ósea, la mucosa oral e intestinal, la epidermis, el hígado y las espermatogonias.

- **Radioterapia**

La **RT**, también tiene como finalidad la erradicación tumoral. Mediante la irradiación se generan moléculas con radicales libres altamente reactivas que alteran la estructura del ADN, provocando una distorsión en la proliferación celular. Se puede utilizar antes de la cirugía en un tumor inoperable, o con posterioridad a la misma o la QT para eliminar restos tumorales. También se emplea en síndromes dolorosos o compresivos producidos por el tumor o sus metástasis.

La utilización de haces más enfocados, que intenten adaptarse al máximo al tumor evitando la irradiación de tejido sano, así como las mejoras en la sedación y técnicas de inmovilización, han permitido un uso más frecuente de esta modalidad de tratamiento en pacientes pediátricos. La dosis de RT, su fraccionamiento, la duración del tratamiento y el campo de irradiación dependerán del tipo de cáncer, extensión de la enfermedad, edad del paciente y su tolerancia al tratamiento.

- **Otros tratamientos**

Abarcando de alguna manera los 2 últimos apartados, cabe decir que algunos pacientes necesitarán en su esquema de tratamiento un TPH, ya sea

autólogo o alogénico y en su preparación al mismo recibirán como acondicionamiento fármacos quimioterápicos (QTS), así como irradiación corporal total (ICT) en algunos casos concretos.

Por otro lado, durante los últimos años, el tratamiento biológico se ha convertido en un arma importante contra algunas neoplasias infantiles. Por lo general este tipo de terapia, que habitualmente se asocia al estándar, hace referencia a la inmunoterapia: modificadores de la respuesta biológica o moléculas endógenas que tienen efectos terapéuticos a dosis suprafisiológicas.

4.2 Efectos secundarios del tratamiento antineoplásico

▪ Efectos secundarios agudos

Entre los efectos adversos asociados con las primeras fases del tratamiento (agudos) destacan los trastornos metabólicos, la supresión de la médula ósea, la afectación del tubo digestivo y la alopecia. Todo ello derivado de la acción de la QT y RT sobre los tejidos y órganos con recambio celular rápido. Algunos de estos efectos requieren de una monitorización cuidadosa y un manejo precoz de las potenciales complicaciones, pero por lo general suelen desaparecer conforme nos alejamos del momento de la administración.

▪ Efectos secundarios tardíos

Los efectos del tratamiento antineoplásico en tejidos con escasa capacidad regenerativa pueden determinar deficiencias a largo plazo o permanentes.

En general podemos decir que a pesar de que los pacientes pediátricos toleran la toxicidad aguda del tratamiento mejor que los pacientes adultos, son más vulnerables a las secuelas tardías de la terapia oncológica (Indiano JM 2005). Un estudio retrospectivo en Estados Unidos, analizó la morbilidad en más de 10.000 supervivientes de un cáncer infantil, observando que el 62% de los pacientes presentaban secuelas crónicas, siendo con frecuencia más de una y tratándose en un 25-30% de secuelas severas o amenazante para la vida (Hudson MM 2003). La importancia del tema queda también reflejada en otro trabajo llevado a cabo en supervivientes de un cáncer pediátrico que habían sido diagnosticados entre los años 1970 y 1986, donde se observó un riesgo de muerte prematura incrementado en 10,8 veces (Mertens AC 2001). Ese incremento del riesgo de muerte prematura es consecuencia en el 67,7 % de los casos, a la tasa de recidivas de la enfermedad oncológica y en un 21,3 % a causas relacionadas con el tratamiento recibido, siendo las más importantes el desarrollo de un cáncer secundario, toxicidad cardiaca y complicaciones pulmonares (Lanzkowsky 2005).

- Reconocimiento de los efectos secundarios tardíos

La incidencia de la mayoría de efectos tardíos del tratamiento aumenta con la edad. Algunos son fácilmente reconocibles por su visibilidad (una amputación por ejemplo) o por la afectación funcional que producen (retraso cognitivo severo). En otras ocasiones sólo son detectados por observadores más experimentados (escoliosis) o mediante analíticas o pruebas de screening (como el hipotiroidismo o infertilidad). Algunos de ellos pueden ser diagnosticados y tratados de forma sencilla y en otras ocasiones pueden cronificarse y verse influenciados por la aparición de otras enfermedades propias del envejecimiento como la diabetes mellitus o la hipertensión arterial, que afectarán a una función renal ya de por sí alterada en algunos casos por la utilización de agentes citostáticos como la ifosfamida (Hewitt M 2003).

Se han descrito secuelas de la terapia antineoplásica a nivel de todos los órganos y sistemas, dependiendo de: el tratamiento específico al que se haya expuesto cada paciente, severidad de la enfermedad y edad en ese momento. En muchos casos los efectos secundarios tardíos tienen un comienzo insidioso y pueden no manifestarse clínicamente hasta que el daño se haya hecho severo e irreversible (Indiano JM 2005).

- Efectos secundarios tardíos en relación al tratamiento recibido: cirugía, RT, QT

La resección quirúrgica completa puede conllevar la pérdida de estructuras funcionales necesarias. La RT puede causar un daño orgánico irreversible, con síntomas y limitaciones funcionales que dependen del órgano afectado y la gravedad de la lesión. Muchos problemas secundarios a la RT no son evidentes hasta que el paciente crece, como la asimetría entre zonas irradiadas y no irradiadas de las extremidades. La irradiación de campos que incluyen órganos endocrinos puede causar hipotiroidismo, disfunción hipofisaria o infertilidad como desarrollaremos en profundidad a continuación. Dosis suficientes de RT craneal pueden producir una disfunción neurológica, incluso provocar una leucoencefalopatía solo reversible de forma parcial (Lanzkowsky 2005).

La QT conlleva riesgo de lesiones orgánicas a largo plazo, entre las que destacan clásicamente entre otras: la leucoencefalopatía por dosis altas de metotrexato, las lesiones miocárdicas por antraciclina, la fibrosis pulmonar por bleomicina, la pancreatitis por asparraginasa, la disfunción renal por ifosfamida, nitrosourea o platino y la hipoacusia por cisplatino. También pueden aparecer efectos secundarios sobre el sistema endocrino-reproductor, atribuidos especialmente al grupo farmacológico de los AA (Bathia S 2006). Se deben solicitar los estudios necesarios antes de iniciar el tratamiento para confirmar que los órganos diana no tienen lesiones previas y poder controlar posibles cambios secundarios a su administración.

Quizá el efecto tardío más grave sea la aparición de una segunda neoplasia en los pacientes tratados con éxito de una previa. Parece que el riesgo es acumulativo y aumenta un 0,5% cada año, lo que se traduce en una incidencia del 12% a los 20 años del tratamiento y supone un riesgo 10-20 veces superior al de la población general. Entre las entidades más frecuentes encontramos: leucemia aguda no linfoblástica (18,3 %), tumores del SNC (18,3 %), tumores óseos (13,5%), carcinoma de tiroides (10,3 %) y los sarcomas de partes blandas (9,5%). En el 70% de los casos aparecen en un periodo inferior a los 10 años del primer diagnóstico y constituye una complicación muy grave con una supervivencia global inferior al 50% (Indiano JM 2005). En este sentido la administración de determinados agentes citostáticos como los AA se ha relacionado con aparición de osteosarcomas y leucemias, y concretamente el BCNU con aparición de tumores del SNC. El grupo de las epipodofilotoxinas (etóposido y teniposido) son conocidos leucemógenos. La RT ha demostrado clara relación con osteosarcomas, tumores del SNC y carcinomas de tiroides. Por otro lado, cada vez se confiere más importancia a la susceptibilidad genética, siendo un ejemplo clásico la aparición de segundos tumores (osteosarcomas) en pacientes afectos de retinoblastoma (Lanzkowsky 2005).

4.2.1 Efectos secundarios sobre gónadas y sistema reproductor

Los efectos secundarios tardíos endocrinológicos son frecuentes, diversos y pueden manifestarse muchos años después de finalizar la terapia antineoplásica. En muchas ocasiones van a ser tributarios de un tratamiento hormonal sustitutivo (THS). A veces preceden o se asocian a otros trastornos, por ejemplo el aumento de peso asociado a la RT craneal puede provocar a su vez dislipemias y resistencia insulínica que su vez pueden ser responsables de enfermedades cardiovasculares, incluyendo un infarto de miocardio (Tonorez ES 2015). Su aparición determina importantes consecuencias físicas y psicosociales, por lo que su prevención y/o su detección precoz es imprescindible.

En líneas generales su incidencia es mayor en aquellos tumores que han requerido RT administrada sobre el SNC, cuello y pelvis, pero también aparecen tras la administración de ciertos agentes QTS.

Engloban varias entidades: alteraciones del crecimiento, disfunción tiroidea, disfunción suprarrenal, trastornos metabólicos, alteraciones de la pubertad y alteraciones de la función gonadal.

Conocer la fisiología del sistema reproductor, así como su evaluación y definición de normalidad permite un mejor reconocimiento de su alteración derivada del tratamiento frente al cáncer.

4.2.1.1 Fisiología

Para entender el mecanismo gonadotóxico de algunos tratamientos, es importante tener presente la fisiología relacionada con la fertilidad y el desarrollo puberal.

4.2.1.1.1 Fertilidad

Existen una gran cantidad de factores implicados en que una mujer pueda tener hijos biológicos.

El eje hipotalámico-hipofisario-ovárico es el responsable de la maduración de los ovocitos, ovulación, revestimiento uterino y también está implicado en el inicio de la pubertad y el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios (De Bruin M 2009). Un embarazo exitoso requiere, además de un buen funcionamiento de este eje, un útero receptivo a una implantación y que sea capaz de crecer mientras se produce el desarrollo fetal.

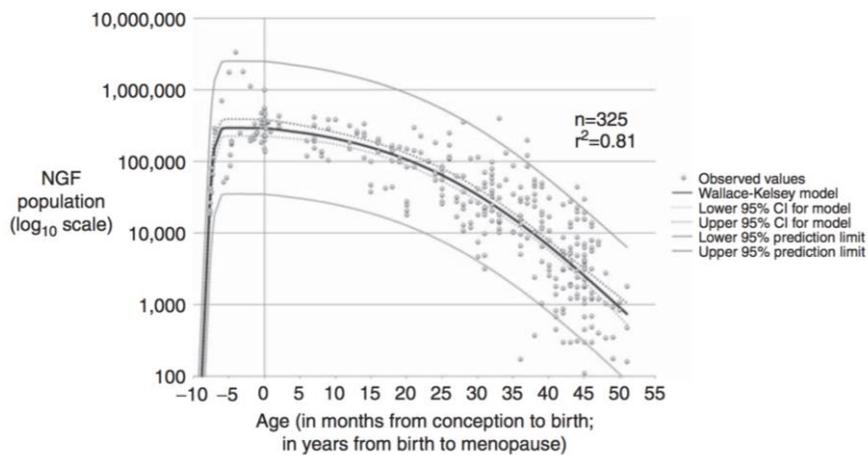
Al nacer el eje hipotálamo-hipofisario (HH) está activo por un breve periodo de tiempo y posteriormente permanece quiescente hasta el inicio de la pubertad. Llegado ese momento, el hipotálamo produce pulsos de GnRH (hormonas liberadoras de gonadotrofinas) que estimulan a la glándula pituitaria para que libere a su vez hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH). Estas 2 hormonas facilitan la maduración de ovocitos en los ovarios, donde a su vez se producen esteroides sexuales implicados en el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios. El inicio de la pubertad se produce de media a los 11 años y los estadios de Tanner van progresando cada 6-9 meses (De Bruin M 2009).

Si hablamos de las células de la línea germinal en el momento del nacimiento se dispone de un “pool” fijo de folículos primordiales, estimado en 1-2 millones, detenidos en la profase diplotene de la primera división meiótica. A partir de la primera menstruación y en cada uno de los periodos, bajo el estímulo de la FSH, un número de folículos primordiales quiescentes es reclutado, madurando y convirtiéndose en folículos antrales. Éstos a su vez producen hormonas como la inhibina B (que por mecanismos de feed back negativo inhibe la producción de FSH) o el estradiol que continua promoviendo el crecimiento folicular y el desarrollo del endometrio. El resto de folículos primordiales permanecen en la corteza ovárica a modo de “reserva”, disminuyendo progresivamente con la edad hasta la menopausia a una edad media descrita de 51 años (Faddy MJ 1995) (Figura 3)

De la cohorte de folículos antrales que están en proceso de maduración, sólo uno, el folículo dominante llegará en forma de óvulo a las trompas de Falopio, a través de la mediación de la hormona LH, mientras que el resto de folículos activados se reabsorben. Los restos del folículo dominante (cuerpo lúteo), tras la ovulación, producirán grandes cantidades de

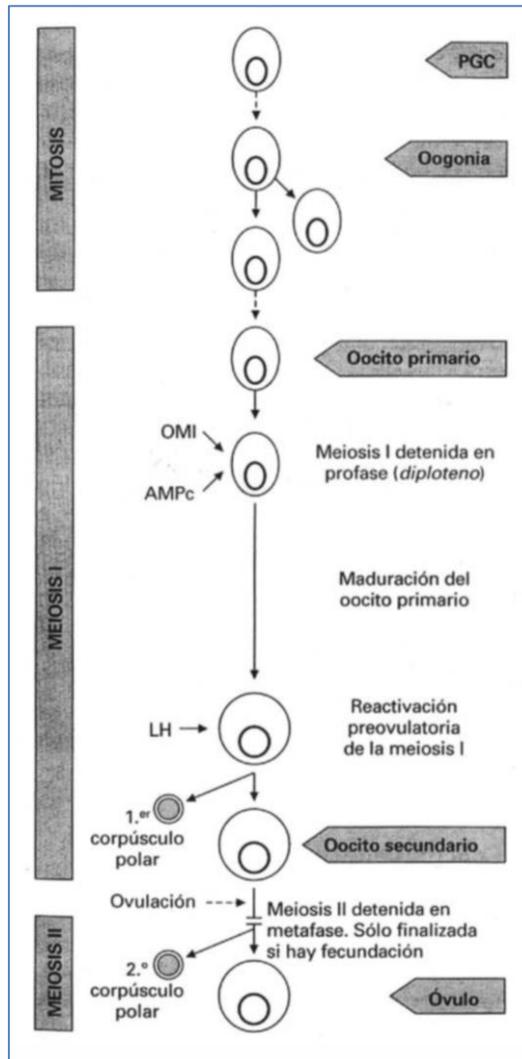
progesterona, implicada en el desarrollo y mantenimiento del revestimiento uterino (Figura 4) (Figura 5). En el caso de que el ovocito no sea fecundado y no tenga lugar la implantación del embrión, el endometrio se desprende produciéndose la menstruación.

Figura 3 : Descenso de la población de folículos no crecientes desde el nacimiento hasta la menopausia



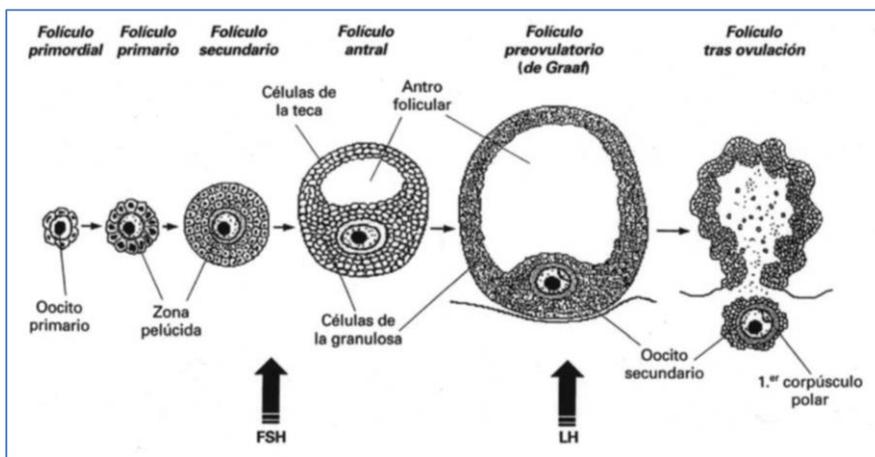
Extraído de : Wallace WH. Human ovarian reserve from conception to the menopause (2010).

Figura 4 : Etapas de la ovogénesis



Extraído de : Alberts y col. Biología Molecular de la célula (2004).

Figura 5 : Maduración y crecimiento folicular



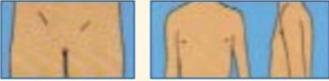
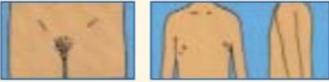
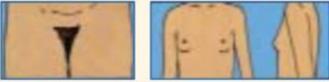
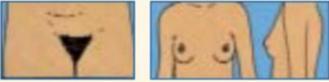
Extraído de : Alberts y col. *Biología Molecular de la célula* (2004).

4.2.1.1.2 Desarrollo puberal

La pubertad es el periodo final del crecimiento y maduración del niño o niña en el que se alcanza la capacidad reproductiva. Es una etapa de transición entre la infancia y la edad adulta. Comienza cuando aparecen los caracteres sexuales secundarios y aumenta la velocidad de crecimiento. Más adelante el niño o la niña va experimentando cambios somáticos y psicológicos que progresan ordenadamente, hasta que al final alcanza la talla adulta, la madurez psicosocial y la fertilidad (Temboury 2009).

En relación a la **cronología del desarrollo puberal** existe una variación muy amplia entre personas sanas de todo el mundo en el rango de inicio de la pubertad, que sigue un patrón familiar, étnico y de género. La escala de Tanner describe los cambios físicos que se observan en genitales, pecho y vello púbico, a lo largo de la pubertad en ambos sexos. Esta escala, aceptada internacionalmente, clasifica y divide el continuo de cambios puberales en 5 etapas sucesivas que van de niña (I) a adulta (V) (Tanner JM 1976) (Figura 6). La cronología fisiológica se sitúa **entre los 8 y los 13** años de edad.

Figura 6 : Escala de Tanner en niñas

	Estadio 1. Pecho infantil, no vello púbico.
	Estadio 2. Botón mamario, vello púbico no rizado escaso, en labios mayores.
	Estadio 3. Aumento y elevación de pecho y areola. Vello rizado, basto y oscuro sobre pubis.
	Estadio 4. Areola y pezón sobreelevado sobre mama. Vello púbico tipo adulto no sobre muslos.
	Estadio 5. Pecho adulto, areola no sobreelevada. Vello adulto zona medial muslo.

Extraído de : Tanner JM. Clinical longitudinal standards for height, weight, height velocity, weight velocity, and stages of puberty (1976).

4.2.1.1.3 Definición de función gonadal normal en pediatría

La función gonadal normal se define por la presencia de un desarrollo puberal espontáneo y adecuado a la edad, y valores séricos normales de FSH, LH y hormonas de producción gonadal, según valores de referencia existentes en la bibliografía en función del sexo y el estadio puberal (Tabla 2) (Moyano D 1996) (Crofton PM 2002) (Sehested A 2000).

Tabla 2: Resumen de los valores de referencia publicados para las concentraciones séricas basales de FSH, LH y estradiol. Los resultados vienen expresados con la mediana (rango)

ESTADIO PUBERAL	FSH (UI/L)	LH (UI/L)	ESTRADIOL (pmol/L)
I	1,7 (1,4-2,3)		<50
	1,43 (0,31-4,75)	<0,05 (<0,05-0,68)	22 (<18-52)
	2,3 (0,7-6,3)	1,0 (0,6-4,2)	51 (18-225)
II	1,8 (1,2-2,5)		<50 (<50-62)
	2,98 (0,61-6,84)	0,275 (<0,05-4,31)	40,5 (<18-290)
	3,6 (1,0-14,8)	1,8 (0,7-11,1)	72 (22-283)
III-IV	5,2 (4,7-6,1)		113(98-127)
III	4,61 (2,91-8,79)	2,16 (0,61-9,8)	128,5 (<18-1379)
	4,4 (1,8-13,1)	2,6 (0,7-7,4)	106 (37-246)
IV	5,07 (0,14-8,78)	4,11 (<0,05-20,02)	162 (<18-1094)
	5,4 (1,0-13,3)	7,1 (3,0-11,2)	182 (40-591)
V	4,45 (0,19-9,2)	3,77 (<0,05-20)	182 (27-1108)
	7,2 (0,5-10,2)	4,8 (0,6-12,4)	136 (55-426)

4.2.1.1.4 Evaluación de la función gonadal en pacientes pediátricas y adolescentes con antecedentes de cáncer

En la evaluación de la función ovárica de pacientes con antecedente de cáncer en edad pediátrica o adolescente pueden considerarse varias etapas:

- Anamnesis

Debe iniciarse con una adecuada anamnesis familiar y personal. Del primero aspecto interesa conocer el patrón de crecimiento y maduración de los padres y hermanos: talla final y edad a la que la alcanzaron, edad de la menarquia materna. En el ámbito personal hay que preguntar por los antecedentes perinatológicos (peso y talla al nacimiento) y por todo lo relacionado con el cáncer diagnosticado y tratado: edad al diagnóstico, tipo de cáncer, estudio de extensión, tipo de tratamiento antineoplásico recibido, duración del tratamiento, tipo de remisión, existencia de recaídas y tiempo

desde el final del tratamiento. Hay que considerar también la presencia de enfermedades crónicas y el uso de medicaciones durante largos periodos de tiempo como los corticoesteroides.

Es importante recabar información sobre aparición o no de menarquia, presencia y características de las menstruaciones, aun sabiendo que su normalidad no implica una adecuada reserva ovárica (Johnston RJ 2009)

▪ Exploración física (EF)

A continuación, se ha de realizar una exploración física general, con determinación del peso, la talla, la velocidad de crecimiento, las proporciones corporales y la maduración ósea, y evaluar el desarrollo puberal del paciente, que incluye la valoración de los genitales externos, el vello pubiano y axilar y desarrollo mamario bilateral (según Tanner, figura 6)

▪ Analítica hormonal

Habitualmente se realiza una analítica de sangre para determinación basal de la concentración de las hormonas del eje hipotálamo-hipofisario-ovárico. El estrógeno que se determina para valorar la función ovárica es el 17 β -estradiol. La determinación de progesterona en la adolescente como parámetro de ovulación es poco fiable, ya que un porcentaje de ciclos es anovulatorio. A veces son necesarias pruebas dinámicas de la función ovárica, como el test de estimulación con GnRH o test de Luforán[®], y el test del análogo de GnRH, acetato de leuprolide, o test de Procrin[®].

En los últimos años el valor de la hormona AntiMülleriana (AMH) como marcador predictivo de la reserva ovárica, está adquiriendo un papel cada vez más relevante. La AMH, forma parte de la superfamilia de los factores de crecimiento y diferenciación. Se produce por las células de la pregranulosa del pool de los FP cuando estos son reclutados para iniciar su crecimiento y desarrollo (Brougham MF 2012). El pool folicular en crecimiento se relaciona con el pool de los folículos primordiales. Su determinación varía muy poco a lo largo del ciclo menstrual, aventajando en eso a la FSH (Johnston RJ 2009), aunque siguen faltando datos sobre la fluctuación día a día, la pulsatilidad y las variaciones entre los distintos ciclos.

A pesar de las incertidumbres con esta hormona, se han publicado recientemente algunos datos clave de la AMH en pacientes pediátricas con cáncer (Brougham MF 2012):

- La AMH es detectable antes de la pubertad,
- Tanto en prepuberales como post-puberales, sus niveles descienden rápidamente poco después del inicio del tratamiento antineoplásico.

- Los niveles se recuperan al finalizar el tratamiento en pacientes de bajo-mediano riesgo gonadotóxico, mientras que no lo hacen en aquellas de alto riesgo, pudiendo indicar entonces una peor función ovárica futura.

▪ Ecografía ovárica

Como estudio anatómico y morfológico se utiliza la ecografía abdómino-pélvica. Se valoran las características del útero (topografía, tamaño y morfología) y los ovarios (topografía, tamaño, ecoestructura y presencia de folículos). El crecimiento del útero y los ovarios es proporcional a la edad cronológica, la edad ósea y el estadio puberal (Holm K 1995) (Tabla 3). Es importante señalar que en condiciones normales tanto el ovario inmaduro como el maduro tienen folículos en diferentes fases de desarrollo y en atresia.

Habitualmente el recuento de folículos antrales (RFA) con medidas entre 2-10 mm a través de ecografía transvaginal, ha demostrado la mejor correlación entre la edad cronológica en mujeres sanas con periodos menstruales normales y fertilidad. El número medio de folículos antrales entre los 25-34 años es de 15, mientras que entre los 41 y 46 años es de 4 (Scheffer GJ 2003).

La decisión de realizar ecografía abdominal o transvaginal en el seguimiento de pacientes pediátricas y adolescentes supervivientes de un cáncer dependerá de la edad, madurez psicológica y la urgencia o necesidad de conocer la situación de reserva ovárica

Tabla 3: Características ecográficas de los genitales internos femeninos en relación al desarrollo puberal. Los resultados se expresan con la mediana (rango)

Estadio Puberal	Volumen uterino (mL)	Volumen ovárico (mL)	Tamaño folicular mayor (mm)
I	1,6 (0,7-7,9)	1,2 (0,5-5,1)	4,0 (2,0-8,0)
II	2,8 (1,3-8,1)	2,2 (1,0-4,6)	5,0 (3,0-8,0)
III	8,0 (2,0-18)	4,1 (1,9-8,6)	5,0 (4,0-10)
IV	37 (11-56)	6,2 (1,3-28)	7,0 (3,0-38)
V	43 (12-82)	7,3 (1,9-23)	6,0 (3,0-36)
Adulto (≥19 años)	61 (37-130)	7,6 (2,9-37)	8,0 (3,0-36)

Extraído de: Holm K et al. Pubertal maturation of the internal genitalia: an ultrasound evaluation of 166 healthy girls (1995).

4.2.2 Consecuencias clínicas relacionadas con la gonadotoxicidad del tratamiento antineoplásico

Como se deduce del resumen fisiológico, cualquier “agresión” sobre el eje HH, ovarios o útero puede alterar la capacidad reproductiva de una mujer y el desarrollo puberal de las pacientes más jóvenes (De Bruin M 2009).

De forma muy general podemos sintetizar que:

1. Una lesión sobre el eje puede provocar retraso o interrupción en el desarrollo puberal provocando amenorrea primaria (si ocurrió antes del inicio de la misma) o secundaria (si ocurrió después).
2. El daño ovárico puede reducir significativamente tanto el pool de folículos en crecimiento (provocando amenorrea inmediata) como el pool de folículos primordiales, ocasionando infertilidad, una ventana fértil reducida o una menopausia prematura (MP) con los consiguientes riesgos y efectos secundarios adversos que de ello se derivan.
3. Los daños a nivel del útero pueden provocar recién nacidos prematuros o de bajo peso, así como abortos espontáneos debido a su incapacidad para albergar un feto en crecimiento.

4.2.2.1 Fallo ovárico precoz (FOP)

- Definición genérica

Se define como el cese de la actividad ovárica a una edad temprana. Se diagnostica cuando al menos 2 determinaciones de la hormona FSH se encuentra por encima de 40 UI/ml, independientemente de la presencia o ausencia de sangrado menstrual, ya que éste no es indicativo de función ovárica.

El FOP implica cese del funcionamiento del ovario como órgano implicado en la reproducción ocasionando futura infertilidad, es decir, incapacidad de lograr un embarazo clínico después de 12 meses o más, de relaciones sexuales no protegidas (Lee SJ 2006), pero también implica la interrupción de su función hormonal, asociada con problemas vasomotores, esqueléticos, genitourinarios y cardiovasculares.

Los síntomas reconocibles de fallo ovárico hormonal consisten en rubores, sudores nocturnos, insomnio, fluctuaciones del estado anímico, irritabilidad, sequedad vaginal, dispareunia y disminución de la libido. Es importante preguntar sobre ellos de forma sistemática en las consultas de seguimiento para conocer incidencia e instaurar precozmente tratamiento en el caso de existir un déficit real.

▪ Matices en la definición

A pesar de que una cifra de FSH por encima de 40 UI/ml, es universalmente reconocida como definición de FOP, en muchas ocasiones se utilizan puntos de corte inferiores (25 UI/ml, 20 UI/ml incluso 15 UI/ml) que además se valoran en el contexto del desarrollo puberal de las pacientes cuando se trata de pacientes en edades pediátricas (DeWire M 2014).

Con frecuencia suelen combinarse los criterios de gonadotropinas con cifras de estradiol, así como presencia o ausencia de menstruaciones (Raciborska A 2014) (Balachandar S 2014) (Anderson RA 2015). Una de las definiciones más repetidas y que además ha sido la utilizada en la descripción de los resultados de esta tesis es:

Presencia de FOP si se cumplen 2 o más de los siguientes criterios:

- amenorrea durante al menos 4 meses
- FSH >25 IU/l en al menos 2 ocasiones
- estradiol bajo concomitante a FSH > 25 IU/l

▪ Clasificación según cronología

Según diferentes autores podría clasificarse en 2 formas teniendo en cuenta el contexto del tratamiento frente al cáncer (Chemaitilly W 2006):

- **Fallo ovárico agudo (FOA)**, si ocurre poco después del final del tratamiento antineoplásico, generalmente entre 6-12 meses y normalmente hasta un máximo de 5 años tras el cese de la terapia.
- **Menopausia prematura** si el fallo ovárico se produce antes de los 40 años de edad y después de 5 años del diagnóstico del cáncer. Algunos pacientes podrían cumplir estos requisitos, aun habiendo recuperado una función ovárica normal durante los primeros años.

▪ Clasificación según su relación con el desarrollo puberal

En pacientes pediátricas el FOP puede tener implicado o no un retraso en el desarrollo puberal (ver más adelante pubertad retrasada). Según estas circunstancias podemos encontrar en la literatura descrito:

- Fallo ovárico precoz o fallo gonadal **COMPLETO**: cuando a la definición previa se asocia la ausencia de inicio o progresión del desarrollo puberal. Habitualmente encontramos estradiol sérico basal bajo y concentraciones séricas basales de gonadotropinas elevadas.

- Fallo ovárico precoz o fallo gonadal **INCOMPLETO O PARCIAL**: Definición previa pero con desarrollo puberal iniciado espontáneamente y en la cronología normal. En esta situación el estradiol sérico basal puede ser normal.

Es importante recalcar que para hablar de FOP o fallo gonadal es necesario el seguimiento de los pacientes en el tiempo con determinaciones hormonales seriadas, sobre todo, en pacientes pediátricos prepuberales o que no han completado el desarrollo puberal.

4.2.2.2 Alteraciones de la pubertad

Los tratamientos antineoplásicos en edad pediátrica pueden ocasionar alteraciones del desarrollo puberal, tanto en el sentido de retraso de su aparición como adelantamiento a la edad fisiológica.

4.2.2.2.1 Pubertad retrasada (PR) en niñas

Se define desde un punto de vista práctico cuando una niña a los 13 años no ha comenzado con el desarrollo mamario (S1). El concepto también incluye la detención de la pubertad ya iniciada o si su progresión es muy lenta y no alcanza el estadio final en tiempo normal. Se considera que existe un desarrollo incompleto cuando trascurren más de 5 años entre los primeros signos de pubertad y el desarrollo genital completo en el varón y la menarquia en la mujer (Cañete R 2011).

Dentro de los subtipos existentes el hipogonadismo hipo e hipergonadotrópico son los más frecuentes tras una patología tumoral. En el caso de afectación de la región HH normalmente secundaria a RT craneal, encontraríamos niveles bajos/normales de estradiol, FSH/LH y una falta de respuesta de FSH y LH a LHRH. En el caso de afectación ovárica, encontraríamos niveles bajos de estradiol y un aumento de FSH/LH.

El tratamiento se efectúa mediante administración sustitutiva de esteroides gonadales, estrógenos y progestágenos en niñas y testosterona en niños. Su inicio suele retrasarse respecto a la edad habitual de pubertad, pero sobre todo en niñas, conviene no diferirlo demasiado, para evitar la desmineralización ósea que acompaña al hipoestrogenismo (Ferragut J 2004).

4.2.2.2.2 Pubertad precoz (PP) en niñas

Se define como la aparición de caracteres sexuales secundarios a una edad no fisiológica, que se acepta antes de los 8 años en niñas para una población caucásica en países desarrollados.

La PP central es aquella producida por una activación prematura del factor liberador de gonadotrofinas. Es el subtipo más frecuente que aparece tras el tratamiento antineoplásico. Se observa en pacientes sometidos a irradiación

craneal (>25 Gy) por tumores del SNC y en el pasado cuando se hacía profilaxis de recaídas en LLA con RT a dosis bajas (24Gy) sobre todo en niñas. Existe una correlación positiva entre la edad de inicio de la pubertad y la edad en el momento de la RT, de modo que los niños irradiados a un edad más temprana tienden a un desarrollo sexual más precoz.

Su diagnóstico y manejo es fundamental para la normalización de los caracteres sexuales secundarios (incluyendo efecto sobre menstruaciones, volumen mamario y menos sobre vello púbico) pero sobre todo por las implicaciones en la velocidad de crecimiento y el pronóstico de talla final. La PP provoca una aceleración excesiva de la edad ósea y mantiene cierto ritmo de crecimiento pudiendo enmascarar además un déficit de GH, comprometiéndose aún más la talla final. En estos casos siempre hay que efectuar tratamiento combinado con GH y agonistas de LHRH (Vargas F 2011) (Ferragut J 2004).

4.2.3 Características de los tratamientos gonadotóxicos

El cáncer en sí mismo y su tratamiento pueden interferir en la función gonadal-reproductora. La toxicidad de los tratamientos puede darse a diferentes niveles. La RT por ejemplo puede afectar a todos ellos: eje HH, ovarios y útero, mientras que la QT tiene sus principales efectos lesivos sobre el tejido ovárico.

La intensidad de la toxicidad de los tratamientos oncológicos utilizados en pediatría a este nivel depende fundamentalmente de: los agentes elegidos (cirugía, QT, RT o su combinación), la dosis total administrada y la edad a la que se reciben. Se ha visto que los ovarios son algo más resistentes a la QT en la etapa prepuberal que en el resto de edades, sin implicar con ello que estén protegidos (Borgmann-Staudt A 2012), mientras que por el contrario el útero es especialmente vulnerable en la etapa prepúber particularmente a la radiación.

Las células germinales (FP quiescentes y folículos en crecimiento del ovario) son las principales células damnificadas por la QT y RT, pero no son las únicas. Paralelamente hace ya un años que se ha cuestionado la doctrina básica de reproducción en la que las hembras de los mamíferos perderían la capacidad de renovar sus células germinales durante la vida fetal. De manera experimental, el equipo de Johnson mostraron en el 2004, la producción de células germinales en el ovario del ratón adulto (Johnson J 2004).

4.2.3.1 Quimioterapia

4.2.3.1.1 Mecanismos de acción general de la QT

Las células cancerígenas entran en el ciclo celular para reproducirse. La acción de los fármacos antineoplásicos está dirigida a suprimir la proliferación del tumor. Para ello actúan sobre la maquinaria reproductora, bien sobre el ADN, el ARN o sobre componentes citoplasmáticos imprescindibles para la

división celular (citoesqueleto, microtúbulos). En otras ocasiones el objetivo es inhibir la síntesis proteica (Gonzalez 2003).

Los citostáticos pueden clasificarse:

- Atendiendo a su nivel de actuación en el ciclo celular. Pueden afectar a todo el ciclo o actuar en fases específicas: Fase G0 o reposo, Fase G1 (post-mitótica o pre-sintética), Fase S (síntesis de ADN), Fase G2 (pre-mitótica o post-sintética), Fase M (mitosis: periodo de división celular).
- Según su mecanismo de acción y estructura química. Siendo los principales grupos: AA, antimetabolitos, complejos del platino, antibióticos citostáticos y productos de origen natural.

De forma no deseada y debido a la baja especificidad de la mayoría de ellos, su acción también se manifiesta en otras localizaciones, siendo susceptibles aquellas que tienen un recambio celular rápido. En estos tejidos por lo general el efecto es reversible. Sin embargo en otros órganos, por ejemplo el ovario, pueden ocasionar una destrucción irreversible de las células germinales provocando como ya hemos descrito un FOP.

Estudiar los efectos adversos posibles de cada uno de los fármacos, es muy complejo, ya que la mayoría de las veces se utilizan en combinación y además con gran variabilidad en la dosis según edad, diagnóstico, estadio y protocolo utilizado.

▪ Agentes Alquilantes

Los agentes QTS más gonadotóxicos son los **AA**. Muestran gran afinidad por el ADN y las proteínas, a los que adicionan sus radicales altamente reactivos. Así se producen enlaces entre cadenas de ADN y otras transformaciones impidiendo su replicación y transcripción de ARN y actuando en cualquier fase del ciclo celular (Gonzalez 2003). Se utilizan de forma muy generalizada en Oncología Pediátrica (OP) para el tratamiento de leucemias, linfomas y sarcomas entre otros tumores.

Los AA tradicionales más usados en la actualidad en pediatría incluyen: ciclofosfamida (CFM), ifosfamida, busulfán, melfalán, dacarbacina, procarbacina, tiotepa y lomustina.

Los complejos del platino (carboplatino y cisplatino los más usados en pediatría), sin ser estrictamente AA, tienen un mecanismo de acción muy similar, por lo que en ocasiones según trabajos, pueden quedar englobados en el mismo grupo.

▪ Agentes no alquilantes

Respecto a los **agentes no alquilantes**, muchos son dependientes del ciclo celular, como por ejemplo los antimetabolitos. Afectan por tanto a las células que se encuentran en crecimiento o dividiéndose. La mayoría son análogos estructurales de los metabolitos que normalmente intervienen en los procesos de crecimiento y división, incorporándose a las moléculas de ADN y ARN, transmitiendo falsos mensajes. En el caso del ovario afectaría por ejemplo sólo aquellos folículos que se encuentren en fase de crecimiento o de maduración.

No existen muchos estudios sobre agentes no alquilantes y gonadotoxicidad a largo plazo, pero en general se considera que el efecto cuando se administra en edad pediátrica es muy pequeño.

Larsen y colaboradores encontraron de forma estadísticamente significativa ovarios de menor tamaño y menor RFA en pacientes tratadas sin agentes alquilantes y sin RT abdomino-pélvica respecto al grupo control. Estas pacientes presentaban menstruaciones regulares en el seguimiento y conservaban esa misma situación 10 años después en un trabajo complementario que realizó el mismo equipo (Larsen EC 2003) (Nielsen SN 2013).

El trabajo publicado por Meirou, cuantifica el riesgo de FOP atendiendo a los diferentes grupos de citostáticos y ajustado a la edad. Los agentes alquilantes presentan un OR de 3,98 y los derivados del platino OR de 1,77 mientras que el resto de grupos (antibióticos, antimetabolitos y alcaloides de la vinca) no provocan un fallo ovárico considerable (Meirou 2000).

Se recoge a continuación una clasificación general de los citostáticos más empleados en pediatría de acuerdo a su mecanismo de acción y globalmente su acción gonadotóxica publicada (Tabla 4).

Tabla 4: Resumen de los principales agentes QTS utilizados en pediatría y la gonadotoxicidad relacionada con ellos.

ACTUACIÓN GLOBAL	GRUPO FARMACOLOGICO	ACTUACIÓN ESPECÍFICA	FARMACOS MÁS USADOS EN PEDIATRIA	GONADO TOXICIDAD
ACTIVOS SOBRE EL ADN	AGENTES ALQUILANTES	DERIVADOS DE LA MOSTAZA NITROGENADA	Melfalán	↑↑
			Busulfán	↑↑↑↑↑
			Ciclofosfamida	↑↑↑↑
			Ifosfamida	↑↑
		NITROSOUREAS	Carmustina (BCNU)	↑↑
			Lomustina (CCNU)	↑↑
		TETRAZINAS-TRIAZENOS	Dacarbacina (DTIC)	↑
			Procarbacina	↑↑
			Temozolamida	↑
		ETILENOIMINAS	Tiotepa	↑↑↑↑
	AGENTES ANTIMETABOLITOS	ANÁLOGOS DEL ACIDO FÓLICO	Metrotexato	→
		ANÁLOGOS DE LAS PIRIMIDINAS	Citarabina	↑
			Gemcitabina	→
		ANÁLOGOS DE LAS PURINAS	Fludarabina	¿?
			Mercaptopurina	→
			Tioguanina	→
		DERIVADOS CAMPTOTECINA	Topotecan	¿?
			Irinotecan	¿?
		EPIIDOFILOTOXINAS	Etopósido (VP-16)	↑
			ANTIBIÓTICOS CITOSTÁTICOS	ANTRACICLINAS
Daunorrubicina	¿?			
Epirrubicina	→			
Idarrubicina	→			
Mitoxantrona	→			
OTROS ANTIBIOTICOS	Bleomicina			→ ¿?
	Dactinomicina			→
	DERIVADOS DEL PLATINO		Cisplatino	↑↑
			Carboplatino	↑
INHIBIDORES DE LA MITOSIS	ALCALOIDES DE LA VINCA		Vincristina	→↑
			Vinblastina	↑
			Vindesina	¿?
			Vinorelbina	¿?

	TAXOIDES		Docetaxel	¿?
			Paclitaxel	¿?
FACTORES EXTRACELULARES	ANTICUERPOS MONOCLONALES		Rituximab	¿?
			Gemtuzumab	¿?
			Alemtuzumab	¿?
	OTROS		Imatinib	↑
MISCELANEA			Asparraginas	→ ¿?

4.2.3.1.2 Mecanismos de lesión de la QT sobre el ovario

La QT tienen sus principales efectos adversos gonadotóxicos sobre el ovario, sin afectar o hacerlo de forma mínima al eje HH y al útero. Por otra parte no actúa igual sobre los folículos grandes que se encuentran en proceso de crecimiento, que sobre los PF “durmientes” que actúan como reserva.

- Actuación de la QT sobre Folículos en crecimiento

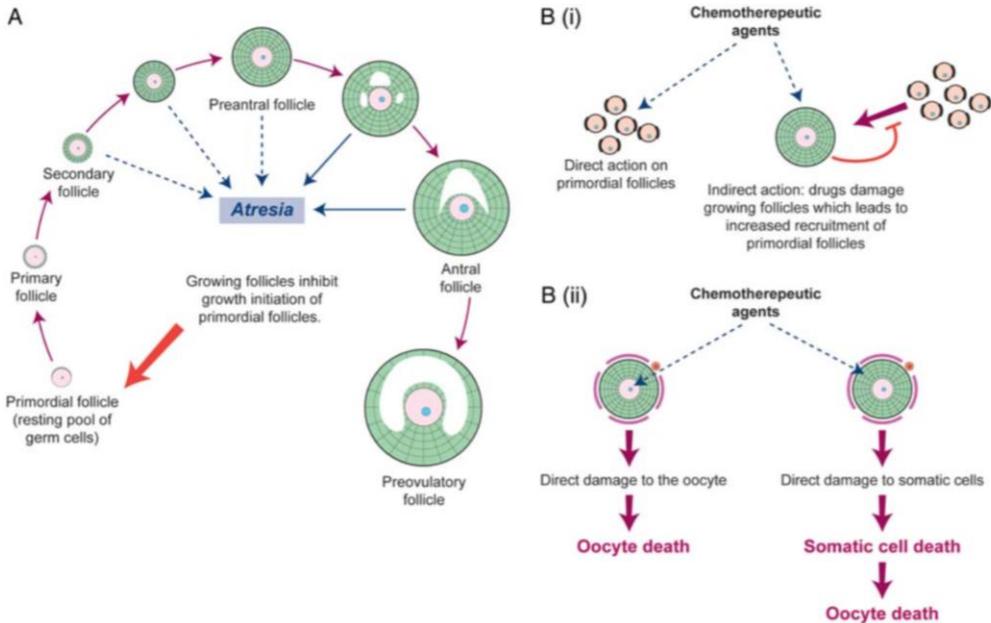
La QT afecta de forma predominante a células que se encuentran en proceso de división, por lo que destruyen los folículos maduros o en crecimiento, induciendo apoptosis en las células de la granulosa. Clínicamente se traduce en una interrupción de las menstruaciones y generalmente se produce un reinicio de las mismas tras un tiempo de recuperación. Incluso una dosis baja de QT puede provocar este efecto, sin ocasionar grandes cambios sobre la reserva ovárica (Meirow D 2010):

- Actuación de la QT sobre Folículos primordiales

El efecto de la QT en el ovario sobre este tipo de células no cumple el fenómeno del “todo o nada”, por lo que el número de FP que sobreviven tras su administración es dependiente de diversos factores: edad, dosis y tipo de agente utilizado (Meirow D 1999). La repleción de la reserva ovárica puede ser muy intensa, como la que se produce tras el acondicionamiento de un TPH, mientras que en otras ocasiones es más paulatina, pudiendo acortar en varios años (incluso décadas) la vida funcional de este órgano (Vatanen A 2013).

El mecanismo de afectación de los FP no está del todo claro. Existen 3 posibles opciones que de forma complementaria pueden dañar la reserva ovárica (Morgan S 2012) (Figura 7 : Mecanismos de lesión de FP por QT):

Figura 7 : Mecanismos de lesión de FP por QT



Extraído: Morgan S. How do chemotherapeutic agents damage the ovary? (2012)

a. Apoptosis

Se ha sugerido tras diferentes estudios in vitro e in vivo que la QT provoca una alteración de la arquitectura folicular e hinchazón de las células de la granulosa. Sería la apoptosis el principal mecanismo de destrucción. Se necesitan más trabajos que intenten aclarar si la apoptosis se produce directamente sobre el ovocito, o como consecuencia de la producida en las células de la granulosa que le rodean (Oktem O 2007).

b. Fibrosis del estroma

Un mecanismo alternativo más indirecto, es la alteración en la vascularización provocada por los citostáticos ocasionando una obturación de los vasos sanguíneos. Como consecuencia aparecerían áreas de **fibrosis** en la corteza ovárica, así como formación de vasos desestructurados para compensar la falta de riego (Meirow D 2007). La isquemia producida afectaría al crecimiento y supervivencia de los FP.

c. Burn-out folicular

Por otro lado, a estos mecanismos clásicamente descritos, se añaden recientemente nuevas hipótesis como la del **“burn-out” folicular**. Entender la situación de los folicúlos primordiales “durmientes”, que constituyen nuestra

principal reserva ovárica, resulta fundamental. En condiciones normales cuando estos folículos se activan, inician un crecimiento unidireccional e irreversible, que puede culminar en ovulación, pero para la mayoría de ellos en atresia (figura 7). El mantenimiento a largo plazo de esos folículos en ese estado durmiente es la clave para conseguir una óptima duración de la vida fértil (Novella-Maestre E 2015). En el ovario de mamíferos, la activación progresiva de los folículos primordiales sirve como fuente de ovocitos fértiles. La menopausia, o el final de la vida reproductiva de las mujeres, se produce cuando el pool de folículos primordiales se agota.

La teoría de “burn-out” propone que la pérdida de la reserva ovárica se debe al aumento del reclutamiento de estos folículos inactivos, que finalmente mueren por atresia.

La vía de señalización PI3K se compone de moléculas que regulan la proliferación celular, la supervivencia, la migración y el metabolismo. Estudios recientes, han demostrado la implicación del sistema **PTEN/PI3K/Akt** en la activación y maduración de los folículos ováricos. Ratones con falta de función de PTEN en los ovocitos presentaban un aumento de la activación del conjunto de los folículos primordiales. Posteriormente, cuando los animales llegaron a una edad adulta temprana, todos los folículos primordiales se agotaron causando un FOP (Reddy P 2008). Así mismo se ha estudiado como la estimulación in vitro de la vía PI3K/Akt da lugar a un incremento de la activación de los folículos “durmientes” observándose en las células de la granulosa, de los folículos activados, un aumento de los niveles de AMH indicador de la fase folicular secundaria/preantral (Li J 2010).

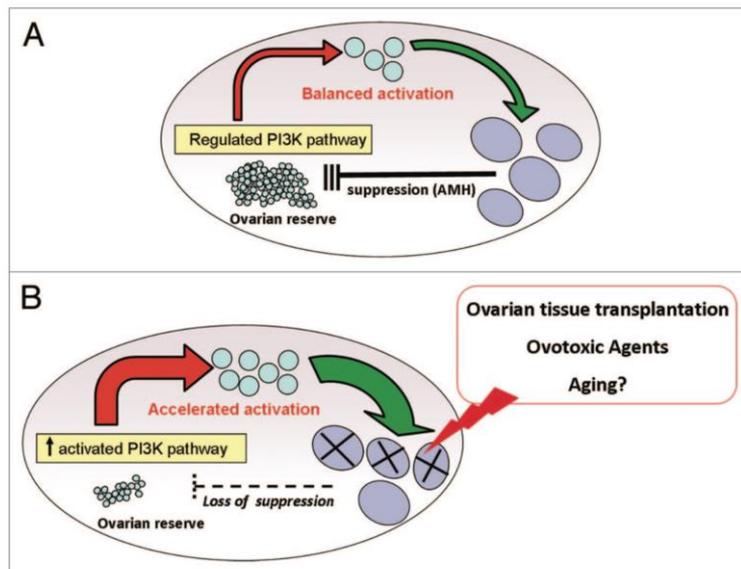
El pool de FP en estado quiescente se mantiene gracias a los mecanismos inhibidores de diversas moléculas, incluyendo PTEN, p27, FOXO3A, mTOR y FOXL2. El papel de estas moléculas en el ovario consiste en evitar la activación de todo el conjunto de todo ese “pool” y al mismo tiempo permitir la activación de un número limitado de FP. La pérdida de la función de cualquiera de estas moléculas inhibitoras parece ser suficiente para conducir a una activación excesiva de esa reserva (Adhikari D 2009). La activación de la vía **PTEN/PI3K/Akt** en los ovocitos conduce a la fosforilación de FoxO3A, su extrusión nuclear y como consecuencia la iniciación de la maduración del folículo (Gavish Z 2014).

Se ha descrito recientemente en el modelo animal, que algunos agentes QTS, como la CFM, provocarían FOP como consecuencia de provocar cambios en esa ruta (Kalich-Philosoph L 2013). Algunos citostáticos provocarían por tanto una activación masiva de FP que luego serán destruidos por atresia (Figura 8). Los mecanismos que conllevan a este fenómeno pueden ser dos (Roness H 2013) (Meirow D 2010):

1. La QT provoca apoptosis sobre los folículos en crecimiento. La pérdida de éstos, resulta en una disminución de los factores paracrinicos de señalización inhibitoria (tales como AMH) y un posible aumento en la activación de PF
2. Paralela o previamente a este hecho, la QT induciría la fosforilación de proteínas clave en la vía de señalización PI3K, alterando el equilibrio del sistema de control responsable del mantenimiento de la latencia de los FP

En un estudio realizado por el equipo de Meiorow, demostraban que la coadministración del agente AS101 atenuaba el burn-out folicular a través de su efecto sobre la vía PI3K y la reducción de la apoptosis en el cultivo de folículos. Sus resultados abren la puerta a otras moléculas que actúen sobre esta vía de activación y que por tanto puedan tener la capacidad de reducir el desgaste del folículo ovárico en el contexto de utilización de tratamientos gonadotóxicos o trasplante de tejido ovárico, donde también se ha observado el mismo fenómeno (Kalich-Philosoph L 2013).

Figura 8 : Mecanismo de inhibición de la activación folicular en condiciones normales y factores que pueden desequilibrar la situación provocando un activación masiva y acelerada



Extraído de: Roness H. Ovarian follicle burnout: a universal phenomenon? (2013)

4.2.3.1.3 Importancia de la edad y el daño ovárico por QT

El pool de FP disminuye de forma clara con la edad, por lo que la afectación ovárica de la QT y sus consecuencias clínicas serán mayores si se administran partiendo de una menor reserva ovárica.

Algunas publicaciones antiguas ya demostraban en 187 pacientes diagnosticadas de anemia aplásica o LA y expuestas a CFM e ICT previa al TPH (con edades comprendidas entre 13 y 49 años), que la probabilidad global de recuperación ovárica tan sólo era de un 0.24 y en clara relación con la edad de la pacientes. Concluían que con ese acondicionamiento la recuperación ovárica aparece en una alguna paciente joven y en ninguna de las mayores (Sanders JE 1988).

Uno de los trabajos de Meirow resume en la misma línea la importancia de la edad a la que se administra el tratamiento QT en pacientes afectas de cáncer de mama y enfermedad de Hodgkin (EH). Las mujeres mayores claramente tienen un riesgo mayor de FOP e infertilidad comparado con mujeres más jóvenes al recibir el mismo tratamiento (Meirow D 2001).

Vatanen y colaboradores publicaron un trabajo con 92 pacientes sometidas a TPH a una edad media de 9 años (1-19), confirmando que las pacientes más jóvenes tenían una mayor probabilidad de recuperar las función ovárica tras el TPH. En el estudio destaca por otra parte que algunas de las pacientes jóvenes que la habían recuperado inicialmente, presentaban posteriormente un FOP a edades cercanas a los 20, recalcando la necesidad de un adecuado seguimiento, por si además en el trascurso del mismo y ante un descenso de la reserva fueran pacientes candidatas a técnicas de PF post tratamiento (Vatanen A 2013).

A pesar de ello, como vemos el ovario de niñas y adolescentes no está protegido de la QT. La “resistencia” de la que muchos han hablado sobre todo en el ovario prepúber se explica por la mayor reserva folicular en el momento de iniciar el tratamiento (Rodriguez-Wallberg KA 2014). En el trabajo de Borgmann-Standt sobre 138 mujeres sometidas a TPH a una edad media de 13 años (rango 4-28), describen una frecuencia muy considerable de FOP en el 72% de las pacientes con edades entre 1-12 años, aunque menor comparada con el 91% de FOP observado en las mayores de 13 años. OR de 4.7 en pacientes puberales frente a prepuberales (IC 95% 1.5-14.9) (Borgmann-Staudt A 2012)

4.2.3.1.4 Importancia del tipo y dosis de los agentes citostáticos en el daño ovárico.

En condiciones normales es el oncólogo pediatra el que tiene que considerar el riesgo gonadotóxico de un tratamiento y el que ha de asesorar a las pacientes sobre la indicación y opciones de PF. Esta orientación no es sencilla, ya que aunque globalmente se conoce que los AA son los fármacos más

gonadotóxicos, no todos lo son por igual y además la dosis es crucial para determinar el riesgo. Del mismo modo la afectación no es la misma en varones/mujeres y como ya hemos visto la edad también puede modificar mucho el riesgo. Algunos fármacos por tanto clásicamente muy dañinos sobre las gónadas, pueden no serlo o serlo menos si hablamos de niñas y adolescentes (Shapira M 2014). Muchos protocolos incluyen entre las poliquimioterapias, algún AA, incluso más de uno, pero a dosis bajas o medias y por tanto hay que individualizar cuidadosamente cada caso.

Para intentar homogeneizar las dosis de alquilantes, poder dar una valoración global y además poder comparar diferentes estudios de toxicidad en supervivientes de cáncer, desde hace años se utilizan unas puntuaciones “score” que suman los distintos AA y sus dosis. La “AAD” Alkylating Agent Dose score se confeccionó hace ya más de 20 años teniendo en cuenta los siguientes factores: Para cada agente alquilante, se suma la dosis por metro cuadrado. Para cada agente, la distribución de la dosis se divide en tertiles. Si la dosis que recibe el paciente se encuentra en el primer tercil, se asigna una puntuación de 1 y respectivamente de 2 y 3 si se encuentra en el segundo o tercer tercil. Si un paciente no recibe un agente alquilante en particular recibe un score de cero para ese agente. La puntuación para cada agente se suma y se obtiene la AAD de ese paciente. Según los diferentes estudios la puntuación puede oscilar entre 0 y 5, 0 y 9, 0 y 12, etc. dependiendo de la patología estudiada. Recientemente se ha publicado un trabajo por el grupo del CCSS, en el que de forma similar definen la dosis equivalente de ciclofosfamida “CED” (Figura 9) y proponen una fórmula para el cálculo de la misma. Los autores defienden que su uso generalizado podría ayudar mucho en la comparativa de publicaciones en relación a las toxicidades a largo plazo (Green DM 2014).

Figura 9 : Fórmula para el cálculo de la dosis equivalente de CFM

The Cyclophosphamide Equivalent Dose is calculated using the following equation:

$$\text{CED (mg/m}^2\text{)} = 1.0 \text{ (cumulative cyclophosphamide dose (mg/ m}^2\text{))} + 0.244 \text{ (cumulative ifosfamide dose (mg/m}^2\text{))} + 0.857 \text{ (cumulative procarbazine dose (mg/m}^2\text{))} + 14.286 \text{ (cumulative chlorambucil dose (mg/m}^2\text{))} + 15.0 \text{ (cumulative BCNU dose (mg/m}^2\text{))} + 16.0 \text{ (cumulative CCNU dose (mg/m}^2\text{))} + 40 \text{ (cumulative melphalan dose (mg/m}^2\text{))} + 50 \text{ (cumulative Thio-TEPA dose (mg/m}^2\text{))} + 100 \text{ (cumulative nitrogen mustard dose (mg/m}^2\text{))} + 8.823 \text{ (cumulative busulfan dose (mg/m}^2\text{))}$$

Extraída de: Green D et al. The cyclophosphamide equivalent dose as an approach for quantifying alkylating agent exposure: a report from the Childhood Cancer Survivor Study (2014):

Dados lo anteriormente expuesto, resumimos los trabajos más relevantes publicados sobre agentes citostáticos específicos utilizados en primera línea en OP relacionados con gonadotoxicidad, haciendo hincapié en la importancia de la dosis.

- Ciclofosfamida (CFM)

Es un AA, ampliamente utilizado en OP y con conocido efecto lesivo sobre las gónadas. Tras su activación en el hígado, un gran número de metabolitos pasa a la circulación y origina toxicidad directa sobre distintas células y tejidos. Se cree que la mostaza de fosforamida constituye su principal metabolito gonadotóxico. Su efecto sobre gónadas y la dosis que necesita para provocarlo es diferente en el caso de los hombres y mujeres, siendo los primeros mucho más susceptibles y afectando de forma distinta dependiendo de la edad.

La CFM ha sido ampliamente estudiada y en ocasiones administrada en monoterapia a pacientes con enfermedades reumatológicas y hematológicas. La edad y la dosis de CFM son claves para determinar el riesgo de FOP. En un estudio de mujeres afectas de LES tratadas con pulsos de CFM, la amenorrea prolongada aparece únicamente en un 12% de las mujeres menores de 25 años, en comparación con 27% entre 26-30 años y casi un 50% en las mayores de 31 años (Katsifis GE 2004).

Blumenfeld, propone en una revisión sobre agentes citotóxicos y función ovárica, una dosis acumulada de 48 gr/m², para causar prácticamente siempre FOP en pacientes prepuberales, siendo entre 20-50 gr/m² necesarios en pacientes entre los 20-35 años, 6-10 gr/m² a pacientes entre 35-45 años y de 5gr/m² en aquellas con 45 años (Blumenfeld 2012). En el mismo trabajo, se considera un riesgo de FOP prácticamente nulo en pacientes prepuberales y hasta los 20 años, que hayan recibido dosis inferiores a 7,4gr/m².

En la misma línea, el trabajo de Sanders, refleja cómo las 27 pacientes menores de 26 años diagnosticadas de anemia aplásica y sometidas a TPH, que recibieron una dosis de CFM equivalente a ≤6gr/m² recuperaban su función ovárica tras el TPH. Por el contrario tan solo lo hicieron 5 de las 16 mayores de esa edad (Sanders JE 1988).

En otra publicación muy reciente, se estudiaron 105 pacientes supervivientes a un cáncer pediátrico con edad media al diagnóstico de 9.3 años (rango 0.04-17.7) y de 25 años (rango 17-40) durante el momento del estudio. Quedaban excluidas las pacientes tratadas con ICT, busulfán, tiotepa, RT pélvica, tumor cerebral o gonadal y aquellas con fallo ovárico conocido. En 71 casos habían recibido CFM (dosis media de 4,6gr/m² y en 12 pacientes con dosis por encima de 10gr/m²). Otras 33 pacientes habían recibido Ifosfamida (dosis media 48gr/m² y en 20 casos por encima de 40gr/m²). En 19 casos se había administrado además RT subdiafragmática (no pélvica) y en 14 se había

realizado TPH autólogo sin los acondicionamientos excluidos. En los resultados destacan: tan sólo el 8% presentaba un función ovárica alterada (FSH- AMH alterada y amenorrea). Tras análisis estadístico explicaban las variables de estudio: la edad a la evaluación, haber recibido procabarcina o el diagnóstico de EH y haber recibido altas dosis de AA para el auto-TPH. **No** las explicaban ni la CFM ni la Ifosfamida, ni tampoco la RT subdiafragmática (no pélvica). Por otra parte en los 3 grupos de tratamiento que proponen, se observa una superficie ovárica, una cifra de AMH y volumen ovárico inferiores a los controles, pudiendo indicar que estas pacientes cuentan con una menor reserva ovárica. Los autores no consideran que estos hallazgos impliquen infertilidad en un futuro (Thomas-Teinturier C 2015).

- Ifosfamida

La relación de Ifosfamida con FOP ha sido menos estudiada que la CFM. Con frecuencia existen en la literatura muchas limitaciones para aclarar su implicación y a qué dosis (Williams D 2008).

Se han descrito algunos casos de FOP tras recibir tratamiento para osteosarcomas óseos, sin que haya podido quedar clara la responsabilidad de este agente en su aparición ya que la mayoría de veces su administración está asociada a CFM y/o cisplatino (Palmert MR 2004). Con este mismo diagnóstico y con una población homogénea, otro grupo describe la experiencia en 92 pacientes. Tras recibir entre 24-30 gr/m² de Ifosfamida en combinación con una media de 600 mg/m² de cisplatino (además de otros agentes considerados no gonadotóxicos) describen una amenorrea durante el tratamiento en un alto porcentaje de los casos (69% de las postpuberales al dg), pero que solo es permanente en 2 de ellas siendo además dos de las pacientes más mayores de la serie (39 y 43 años) (Longhi A 2000).

Williams y su equipo estudiaron este tema en 32 varones y 13 mujeres que en edad pediátrica habían sido diagnosticados de sarcoma de Ewing y habían recibido en su tratamiento sólo ifosfamida como agente gonadotóxico. Entre sus resultados se observan diferencias evidentes entre varones y mujeres, siendo éstos primeros más susceptibles. En los hombres una cifra de dosis total de ifosfamida 60gr/m² marca en el trabajo la diferencia entre un mayor riesgo de alteraciones hormonales y resultados de espermiograma (mediana de ifosfamida administrada 96gr/m² con rango de 94-114 gr/m²). En el grupo de mujeres, la mediana de dosis administrada fue 59,4 gr/m² (IQR 27-90) y entre los resultado 4 de ellas presentaban niveles de AMH inferiores a los de su grupo de control (siendo el resto de hormonas normales), pudiendo indicar una menor reserva ovárica y un potencial problema de FOP en edades más avanzadas. Recaltar que contaban con los datos adicionales de 9 mujeres más con las mismas características que no habían participado en el estudio y que tenían 11 hijos en ese momento. Aunque el número limitado de participantes hace difícil extrapolar los resultados, según los autores no parece que este fármaco

implique una afectación gonadal considerable en la población femenina (Williams D 2008).

Como ya se ha comentado con la CFM, el trabajo de Thomas-Teinturier, no encuentra que la administración de ifosfamida sea predictiva de alteración de la función ovárica en 33 pacientes (dosis media 48gr/m² y en 20 casos por encima de 40gr/m²) (Thomas-Teinturier C 2015).

En el trabajo publicado recientemente por Raciborska y colaboradores se analiza la función ovárica en 27 supervivientes de sarcoma de Ewing. En 12 casos fueron tratadas sólo con QT según regímenes VIDE/VAI con una dosis acumulada de Ifosfamida de 102 gr/m² o según esquema VIDE/VAC con dosis acumulada de Ifosfamida de 60 gr/m² más CFM 10,5 gr/m². En estas pacientes se observa una insuficiencia ovárica transitoria en el 75 % de los casos y en 25% de ellas de forma permanente (Raciborska A 2014).

- Busulfan

Es otro de los AA gonadotóxicos más conocidos. Es uno de los acondicionamientos clásicos previos a TPH y con frecuencia la alternativa a la ICT cuando la edad es un factor limitante para administrarla. La OR de FOP en pacientes sometidas a TPH con este fármaco es de 47,5 (IC 95% 5,4 – 418,1) (Borgmann-Staudt A 2012). Otros trabajos dan cifras igual de contundentes demostrando que tan solo el 25% de las pacientes pediátricas y adolescentes que lo habían recibido recuperaban su función ovárica a largo plazo (Vatanen A 2013).

Las dosis totales entre 400 y 600 mg/m² son las más utilizadas, y se relaciona con muy alto riesgo de FOP e infertilidad en cualquier franja de edad.

- Melfalán

El melfalán es otro AA utilizado principalmente en el acondicionamiento de TPH. Aunque puede usarse como fármaco único normalmente va asociado a otros, completando así regímenes mieloablativos o bien de intensidad reducida. La dosis habitual es de 140m/m².

Su responsabilidad individual en relación a la gonadotoxicidad no ha sido tan estudiada como el busulfán, pero a día de hoy y en general se sigue considerando un factor de riesgo de FOP (Thomas-Teinturier C 2015). A pesar de ello, algunos trabajos defienden su perfil mucho menos lesivo al compararlo con otros regímenes.

En una publicación reciente, se analizan las diferencias al respecto entre el esquema busulfán-CFM (mieloablativo), y el acondicionamiento de intensidad reducida melfalán-fludarabina. Aunque el grupo es pequeño (23 y 21 pacientes

respectivamente) se encuentran diferencias estadísticamente significativas en: desarrollo puberal espontáneo (56% vs 90%), mayor aumento medio de gonadotropinas en el grupo que contiene busulfán (FSH 64,3 IU/l vs 6,1 IU/l) y necesidad de THS bien para inducir pubertad o en el manejo de MP (61 % vs 9,5%) (Panasiuk A 2015). Estos hallazgos son superponibles a los descritos por el grupo de Singhal en el año 1995, donde la tasa de embarazo fue significativamente más alta para aquellas mujeres acondicionadas sólo con melfalán (3 embarazos en 4 mujeres), comparado con aquellas que recibieron otros regímenes (0 de 53) (Singhal S 1996).

El grupo de Even-Or publica recientemente una serie pequeña de 8 mujeres diagnosticadas de LMA que recibieron TPH autólogo a una edad media de 10,5 años (1-19) sólo acondicionado con Melfalán y que previamente no habían llevado ningún AA. Realizan seguimiento a una edad media de 25,5 años (13-36) y aunque encuentran RFA y AMH bajos en todas ellas, 2 pacientes habían tenido niños y 2 estaban embarazadas durante el estudio, en todos los casos de forma espontánea. Otra paciente de 16 años, por descenso de AMH durante seguimiento, se sometió a vitrificación de ovocitos, extrayendo exitosamente 16 sin incidencias (Even-Or E 2015).

- Tiotepa

Citostático del grupo de los AA, usado en acondicionamiento de TPH, con frecuencia en aquellos tumores del SNC que requieren megaterapia con rescate autólogo (por ejemplo meduloblastoma) y en estos casos con frecuencia se utiliza esquema en “tándem” (2-3 megaterapias consecutivas). También usado clásicamente en acondicionamiento de leucemias la mayoría de veces en asociación con busulfán. Las dosis habitualmente utilizadas se encuentran entre 300-900 mg/m². Existe muy poca información publicada sobre los efectos gonadales de este fármaco en humanos aunque habitualmente se ha englobado como agente de alto riesgo gonadotóxico. Balachandar y su equipo han publicado recientemente los datos del seguimiento de 31 pacientes diagnosticadas de meduloblastoma, que habían recibido irradiación craneo-espinal (ICE) y QT estándar y en 5 de los casos habían precisado además TPH acondicionado en todos ellos con tiotepa (asociada a carboplatino y etopósido). En el estudio sólo un 5,9% de las pacientes con ICE más QT estándar presentan FOP, respecto al 60% de las que precisaron TPH (Balachandar S 2014).

- Procarbacin

Es un AA utilizado desde hace varias décadas y en pediatría con uso preferente en la actualidad en la EH. Su potencial efecto tóxico sobre gónadas, ha sido ampliamente descrito. Sabemos, como en otros fármacos, que la susceptibilidad es mayor en varones que en mujeres (Brougham MF 2003), aunque su acción deletérea sobre la función ovárica también ha sido reportada.

Los datos publicados en adultos, son numerosos, pero también existen cifras de pacientes con cáncer infantil una vez llegan a la edad adulta.

Entre los trabajos pediátricos, el grupo de Thomas-Teinturier sobre 105 supervivientes y tras análisis multivariante, refieren el uso de la procabarcina como variable explicativa del FOP, además de la edad y el uso de altas dosis de alquilantes como acondicionamiento previo a un TPH. Como su uso, con frecuencia se relaciona con el diagnóstico de EH, en ocasiones es difícil separarlos como factores de riesgo (Thomas-Teinturier C 2015). En la misma línea, Green en el 2009, publicaba sobre el tema en el trabajo del Childhood Cancer Survivor Study (CCSS) y de nuevo haber recibido procabarcina, además independientemente de la edad, era predictivo de FOA (Green DM 2009). El uso de este agente (el que más entre los agentes alquilantes estudiados), también se ha relacionado con una depleción de la reserva ovárica (medida a través de AMH) pudiendo ocasionar en un futuro una MP en pacientes pediátricos con cáncer (Charpentier AM 2014).

Por el contrario y de forma muy llamativa, un trabajo muy reciente alemán longitudinal prospectivo, con 467 supervivientes mujeres diagnosticadas de EH en edad pediátrica, ha puesto en entredicho todas estas afirmaciones anteriores. Describen un grupo de mujeres diagnosticadas con menos de 18 años de EH, con más de 5 años de seguimiento y comparan sus cifras de maternidad con la población alemana, haciendo subgrupos de 5 en 5 años, desde los 16 hasta los 50 años. Entre las supervivientes la incidencia acumulada de maternidad a los 27,7 años es de 67% (64-75) y de 69% a los 39,8 años (61-74), datos absolutamente equiparables a los de la población alemana, salvo en la franja de 40-44 años (los autores refieren que habían llevado algo más QT y RT que sus predecesoras por protocolo diferente). Para los autores la única variable explicativa de una menor tasa de maternidad es haber recibido RT en zona pélvica. En estas pacientes la incidencia acumulada de maternidad es del 37%, respecto a las que habían recibido RT por encima del diafragma o por debajo pero sin estar en zona pélvica (65% y 58% respectivamente). Las grandes novedades que este trabajo aporta son: ni el uso de procabarcina (con dosis de hasta 11gr/m²), ni de CFM (dosis de hasta 6gr/m²), ni una puntuación alta en el score de AA, ni el grupo de tratamiento ni protocolo recibido, ni la edad al tratamiento, tienen un efecto significativo sobre la maternidad. Refuerzan además los datos ya ampliamente publicados sobre la no diferencia en incidencia de malformaciones entre los hijos de supervivientes respecto a la población general (Brämswig JH 2015).

A pesar del carácter esperanzador de trabajos como este, desde hace unos años de forma paralela se está realizando un gran esfuerzo, en tratar de optimizar los protocolos para estas pacientes. Se pretende que sin bajar en ningún caso las probabilidades de curación, que en el caso de EH en edad pediátrica son por encima del 90-95% (Peris Bonet R 2015), se minimicen al máximo los efectos secundarios a largo plazo. El estudio europeo EURONET para

niños y adolescentes con EH, ha conseguido en estos últimos años substituir en el tratamiento de primera línea a la procarbacin por dacarbacin, con conocido menor efecto esterilizador (Schmidt KT 2012) (Anderson RA 2015).

- Lomustina

Derivado de la nitrosourea con acción antineoplásica, que se utiliza habitualmente en pediatría para tumores del SNC. Las dosis acumuladas habituales según protocolo son entre 300 y 600 mg/m². Varios trabajos lo incluyen en el grupo de agentes de mayor riesgo gonadotóxico (Rodríguez-Wallberg KA 2014) o con probable afectación ovárica aunque no segura (Hyman JH 2013). Los datos publicados en pediatría en referencia a este fármaco y sus efectos secundarios son mínimos. Balachandar, en el trabajo previamente descrito sobre 31 pacientes afectas de meduloblastoma en la infancia y con mediana de edad en el seguimiento de 16,6 años (IQR 10,22-32,6) incluye a 14 pacientes que habían recibido lomustina como parte de su QT estándar. Contrariamente a lo publicado e incluso a pesar de que su administración se asoció con ICE, tan sólo el 5,9% presentaban FOP (Balachandar S 2014).

- Derivados del platino

Como ya hemos comentado, los derivados del platino, y especialmente el cisplatino, se han relacionado con gonadotoxicidad. No existen apenas estudios que cuantifiquen el riesgo específico de su uso en población pediátrica.

Wikstrom publicó en el 2003, el seguimiento de 10 pacientes que habían sido diagnosticadas de osteosarcoma a una edad media de 12,9 años (IQR 6.4-15.2). Tras un seguimiento medio de 4,6 años, tan solo una ellas presentaba una situación de hipergonadotropismo y requería THS. Tres pacientes más presentaron alteraciones hormonales durante un tiempo aunque progresivamente se normalizaron. En 3 de estos 4 casos las dosis de ifosfamida fueron más altas que en las demás (54,63,60 gr/m²) y además asociaban cisplatino a dosis elevadas (600, 710, 670 mg/m² respectivamente) (Wikström AM 2003). A pesar de la pequeña muestra, este trabajo refuerza el carácter transitorio de la toxicidad gonadal por cisplatino ya descrita por otros autores (Wallace WH 1989), así como la limitada toxicidad gonadal en este perfil de pacientes que suman 2 agentes potencialmente gonadotóxicos en dosis medias-altas (Longhi A 2000).

- Otros citostáticos a comentar

Por su uso tan frecuente en OP, la citarabina (ARA-C) merece una mención especial. Se engloba en el grupo de citostáticos antimetabolitos, y concretamente es un análogo de la pirimidina. Las dosis pueden ser muy oscilantes, entre 4000-15000 mg/m² son las que encontramos en los protocolos nacionales para LLA y LMA (aquí dosis más elevadas).

No existe literatura específica en relación a este fármaco y su toxicidad gonadal, pero sí la hay respecto a la población pediátrica con Leucemia Mieloide Aguda (LMA) que no han precisado TPH y cuyo pilar fundamental del tratamiento era este fármaco. En esta línea, el trabajo de Molgaard-Hansen en 2013, analiza la función ovárica en más de 100 supervivientes con LMA de los países nórdicos, utilizando como grupo control a los hermanos de las pacientes. Las dosis de ARA-C administradas oscilaban entre 49600-61300 mg/m². Aunque se trata de una población joven, informan de 20 nacimientos en 10 supervivientes, resultando unas tasas de maternidad totalmente comparables a las del grupo control. Tan solo encuentran en un 13% de las pacientes unos valores bajos de AMH (con FSH normales), que podrían sugerir una baja reserva ovárica, aunque los autores cuestionan que por este dato pueda estar comprometida la fertilidad de las pacientes (Molgaard-Hansen L 2013).

Estos hallazgos concuerdan con lo previamente publicado por otros autores, que cuantifican entre un 13-25 % de efectos secundarios gonadales en supervivientes de LMA manejados exclusivamente con QT (Leung W 2000) (Leahey AM 1999).

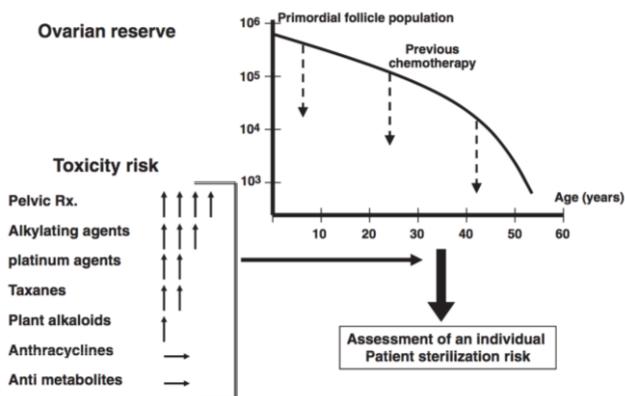
Del mismo modo el trabajo reciente de Shapira y colaboradores en 2014, sitúa categóricamente el riesgo de gonadotoxicidad en pacientes con LLA y LMA que no han sido sometidos a TPH en menor del 20% (Shapira M 2014).

Llamativamente, la publicación de Wallace en el 2005 (y sus posteriores actualizaciones) y que ha sido guía para muchos en el campo de la PF, sitúa a los pacientes afectados de LMA en el grupo intermedio de gonadotoxicidad (riesgo entre 20-80%), en lugar del bajo riesgo deducible por los datos previos. Las razones podrían encontrarse en los diferentes protocolos utilizados por algunos países, o que en esta tabla no se hace distinción entre varones y mujeres y la cifra en los primeros podría ser algo mayor.

4.2.3.1.5 Resumen iconográfico de QT y gonadotoxicidad

A continuación y por su potencial aplicación clínica se exponen las principales figuras encontradas en la bibliografía reciente sobre los diferentes agentes citostáticos y gonadotoxicidad, sin hacer referencia concreta a la edad de las pacientes que las reciben (Figura 10) (Figura 11)(Figura 12):

Figura 10 : Clasificación agentes citostáticos y relación con daño ovárico



Extraído de: Meiorow D. Toxicity of chemotherapy and radiation on female reproduction (2010).

Figura 11 : Agentes QTS con riesgo alto o intermedio gonadotóxico

Table 4 Chemotherapy agents with high or intermediate gonadotoxic impact in females and males

Prolonged azoospermia in males or amenorrhea in females

High risk

- Cyclophosphamide
- Ifosfamide
- Melphalan
- Busulfan
- Nitrogen mustard
- Procarbazine
- Chlorambucil

Intermediate risk

- Cisplatin with low cumulative dose
- Carboplatin with low cumulative dose
- Adriamycin

Low risk

- Treatment protocols for Hodgkin's lymphoma without alkylating agents
- Bleomycin
- Actinomycin D
- Vincristine
- Methotrexate
- 5-Fluorouracil

Extraído de: Rodriguez-Wallberg KA. Fertility preservation during cancer treatment: clinical guidelines (2014)

Figura 12 : QT y toxicidad ovárica

Table 1. Chemotherapy and ovarian toxicity.

Drug	Class (action)
Definitely associated with ovarian damage	
Nitrogen mustard	Mechlorethamine (alkylating agent)
L-phenylalanine mustard	Mechlorethamine (alkylating agent)
Chlorambucil	Chloroethylamine (alkylating agent)
Cydophosphamide	Chloroethylamine (alkylating agent)
Melphalan	Mechlorethamine (alkylating agent)
Busulfan	Alkylalkane sulfonate (alkylating agent)
Procarbazine	Substituted hydrazine
Dacarbazine	Alkylating agent
Doxorubicin	Anthracycline
Probably associated with ovarian damage	
Vinblastine	Vinca alkaloid
Cytosine arabinoside (Ara-C)	Antimetabolite
Cis-platinum	Heavy metal
Carmustine	Nitrosourea (alkylating agent)
Lomustine	Nitrosourea (alkylating agent)
VP-16 (etoposide)	Podophyllotoxin
Imatinib	Tyrosine kinase inhibitor
Low probability of ovarian damage	
Methotrexate	Antimetabolite
Fluorouracil (5-FU)	Antimetabolite
6-mercaptopurine	Antimetabolite
Vincristine	Vinca alkaloid
Mitomycin	Antibiotic (alkylating agent)
Unknown	
VM-26	Podophyllotoxin
Daunorubicin	Anthracycline
Bleomycin	Peptide
Melphalan	Chloroethylamine
Decarbazine	Substituted hydrazine
Vindesine	Vinca alkaloid

Reproduced with permission from: Welt CK, Shapiro CL. Ovarian failure due to anticancer drugs and radiation. In: UpToDate, Martin, KA (Ed), UpToDate, Waltham, MA 2013. Copyright ©2013 UpToDate, Inc. For more information visit www.uptodate.com.

Extraído de: Hyman JH. Fertility preservation options after gonadotoxic chemotherapy (2013).

4.2.3.2 Radioterapia

4.2.3.2.1 Mecanismo de acción general de la RT

La RT es otro brazo fundamental en el tratamiento de los tumores infantiles. Aunque sin duda su uso se restringe más que en adultos debido a los conocidos efectos a largo plazo, sigue teniendo especial relevancia en el manejo de tumores sólidos para mejorar el control local de la cirugía o conseguirlo cuando ésta no es posible o no puede ser radical.

Su mecanismo de acción se basa en la destrucción selectiva del tejido neoplásico mediante la administración de radiaciones ionizantes. Estas radiaciones interactúan con el agua intracelular creando radicales libres altamente reactivos. Se producen entonces rotura de enlaces químicos, alteración en la síntesis de ADN y ARN y alteraciones cromosómicas que conducen a la inhibición de la actividad mitótica. La respuesta de los diferentes tejidos a la RT depende de su radiosensibilidad y esta es directamente proporcional al índice mitótico de cada tipo celular e inversamente proporcional al grado de diferenciación morfológica y del tiempo requerido para proliferar (Pizzo PA 2006).

Los efectos adversos de la RT sobre los tejidos en general depende además de varios factores como son: la dosis absorbida, la edad del paciente, el campo de irradiación y el esquema de fraccionamiento de la dosis aplicada.

4.2.3.2.2 Mecanismo de lesión sobre el ovario

- Importancia de la dosis de RT y la edad a la que se recibe

El ovocito humano es muy radiosensible. Se estima que la dosis en la que se pierden la mitad de los folículos primordiales (LD₅₀) es de ≤ 2 Gy (Wallace WH 2003). La edad a la que se recibe RT sobre los ovarios también es importante y a diferencia del útero, el daño es mayor cuanto mayor es la paciente (Meirow D 2010).

La dosis esterilizante efectiva (ESD) se define como aquella que provoca un fallo ovárico permanente e inmediato después del tratamiento en el 97,5% de los pacientes. La ESD disminuye al aumentar la edad a la que se recibe el tratamiento. La ESD al nacimiento es de 20,3 Gy, a los 10 años 18,4 Gy, a los 20 años 16,5 Gy y a los 30 años 14,3 Gy (Wallace WH 2005).

Este trabajo de Wallace del 2005 ha supuesto un punto de inflexión en el conocimiento de la afectación ovárica por RT. Se plantea un modelo matemático por el cual dada la edad de una paciente (desde nacimiento hasta los 50 años) y la dosis de RT recibida (desde 1 Gy hasta la ESD) es posible calcular con un IC del 95% la edad a la que producirá el fallo ovárico en esa persona (Wallace WH 2005) (Figura 13) (Figura 14) (Figura 15). El modelo tiene importantes aplicaciones prácticas en la clínica a la hora de orientar a las

pacientes sobre el riesgo de FOP antes y después de haber recibido el tratamiento. Por ejemplo si la dosis de RT recibida sobre zona ovárica es de 3 Gy (como la que puede recibir tras ICE), la información sobre la “ventana futura de fertilidad” puede ser optimista, ya que seguramente pasarán muchos años antes de que ocurra una MP. Por el contrario, en una paciente prepuberal, si la dosis a recibir es alta (por ejemplo 12-14 Gy que es la utilizada habitualmente la ICT previa al TPH) es muy probable que la paciente quede infértil al poco de recibir el tratamiento o pocos años después de alcanzar la pubertad, sin tener por tanto opciones realistas reproductivas en el futuro. En estos casos la información a la familia y el planteamiento de técnicas de PF antes del inicio del mismo, resulta crucial (Andres M 2009).

Las alteraciones celulares ováricas también se relacionan con la dosis aplicada. Con dosis de 1-2 Gy se pueden observar alteraciones de las células de la granulosa y clínicamente se ven alteraciones menstruales transitorias. Con dosis de 3Gy se comprueba degeneración de los ovocitos, atrofia folicular y muerte celular. Con frecuencia la RT se administra concomitantemente con la QT. Si la dosis de RT es elevada, el potencial tóxico de la QT tiene un papel mucho más insignificante

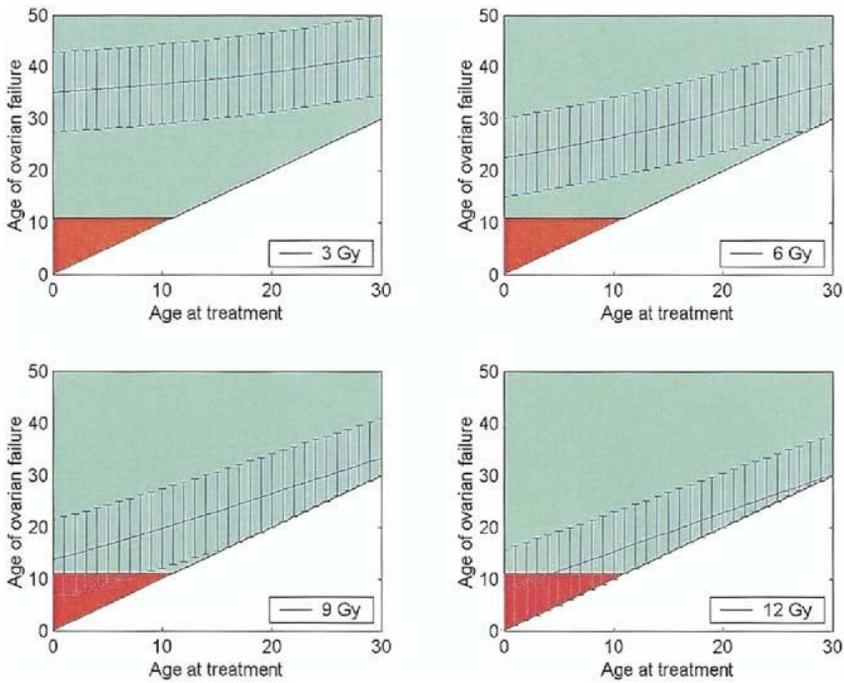
- Importancia del campo de irradiación

La localización de un órgano, en este caso los ovarios, dentro del campo de irradiación, supone que estos reciben el 100% de la dosis, mientras que estos pueden verse afectados en mucho menor porcentaje, en el caso por ejemplo de la ICE. Diferentes trabajos han realizado los cálculos para averiguar qué dosis están recibiendo ambos ovarios en estos casos y en general se considera que es un 5% de la dosis total recibida. Por ejemplo en ICE con dosis ≤ 24 Gy esto equivale a una dosis ovárica de 1 Gy y en el caso de dosis ≥ 35 Gy, aproximadamente unos 2 Gy (Balachandar S 2014). Otros 2 autores realizan un cálculo algo más elevado, considerando que la dosis que recibirían los ovarios tras ICE podría ser 3 Gy o 5-6 Gy respectivamente (Wallace WH 2005) (DeWire M 2014).

Los trabajos que demuestran la relación clara entre RT en región pélvica y FOP son numerosos y contundentes. Raciborska, analiza la función ovárica en 27 supervivientes de sarcoma de Ewing tratados con: QT únicamente (incluyendo AA), QT más RT pélvica, QT con auto-TPH y por último QT, Auto-TPH y RT pélvica. La cifra global de fallo ovárico permanente es de 67% y atendiendo al tratamiento recibido de: 25 %, 100%, 87.5% y 100% respectivamente. En esta publicación el RR de presentar FOP en el caso de las pacientes que han recibido RT respecto a las que no es de 3.9 (IC 95 % 1,1-13,6) (Raciborska A 2014).

En la misma línea, la RT pélvica se describe como principal factor de riesgo en el desarrollo de FOP en pacientes pediátricas, adolescentes y adultas (Brämswig JH 2015) (Reulen RC 2009) (Chiarelli AM 1999) (Green DM 2009) (Figura 15).

Figura 13 : Predicción de edad de FOP en menores de 30 años según si la radiación recibida es 3,6,9,12 Gy



Extraído de: Wallace WHB. Predicting age of ovarian failure after radiation to a field that includes the ovaries (2005)

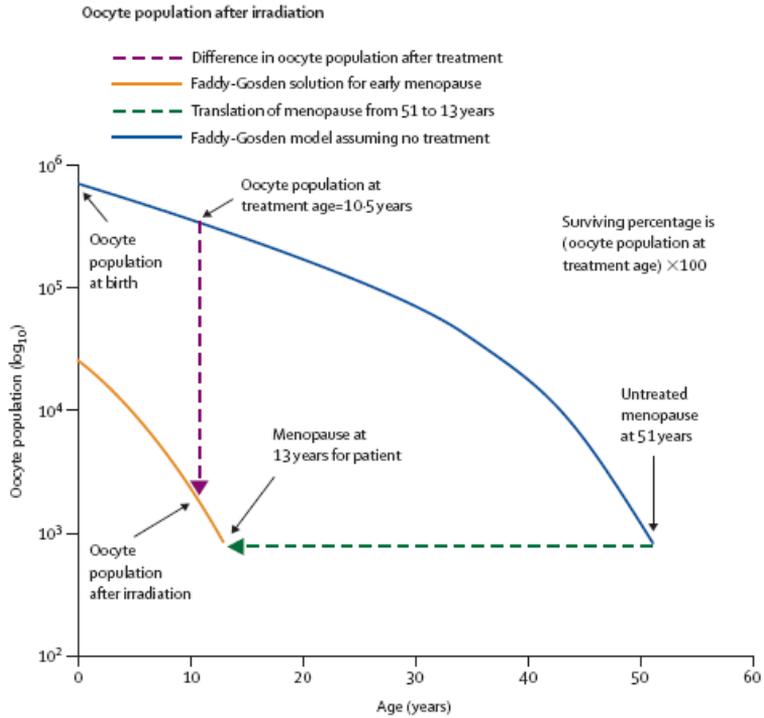
Figura 14 : Predicción de edad de FOP tras recibir radiación ovárica en dosis de 3,6,9,12 Gy desde el nacimiento hasta los 30 años

Table 1. Predicted age at ovarian failure with 95% confidence limits for ages at treatment from 0 to 30 years and for doses 3, 6, 9, and 12 Gy

Age	3 Gy			6 Gy			9 Gy			12 Gy		
	Low	Mean	High	Low	Mean	High	Low	Mean	High	Low	Mean	High
0	31.2	35.1	39.0	18.7	22.6	26.5	9.8	13.7	17.6	4.0	7.9	11.8
1	31.3	35.2	39.1	19.0	22.9	26.8	10.4	14.3	18.2	4.8	8.7	12.6
2	31.5	35.4	39.3	19.3	23.2	27.1	10.9	14.8	18.7	5.5	9.4	13.3
3	31.6	35.5	39.4	19.7	23.6	27.5	11.5	15.4	19.3	6.2	10.1	14.0
4	31.7	35.6	39.5	20.1	24.0	27.9	12.1	16.0	19.9	6.9	10.8	14.7
5	31.9	35.8	39.7	20.5	24.4	28.3	12.7	16.6	20.5	7.7	11.6	15.5
6	32.1	36.0	39.9	20.9	24.8	28.7	13.3	17.2	21.1	8.4	12.3	16.2
7	32.2	36.1	40.0	21.3	25.2	29.1	13.9	17.8	21.7	9.1	13.0	16.9
8	32.4	36.3	40.2	21.7	25.6	29.5	14.6	18.5	22.4	9.9	13.8	17.7
9	32.6	36.5	40.4	22.1	26.0	29.9	15.2	19.1	23.0	10.6	14.5	18.4
10	32.8	36.7	40.6	22.6	26.5	30.4	15.8	19.7	23.6	11.4	15.3	19.2
11	33.0	36.9	40.8	23.0	26.9	30.8	16.5	20.4	24.3	12.1	16.0	19.9
12	33.2	37.1	41.0	23.5	27.4	31.3	17.1	21.0	24.9	12.9	16.8	20.7
13	33.4	37.3	41.2	23.9	27.8	31.7	17.8	21.7	25.6	13.6	17.5	21.4
14	33.6	37.5	41.4	24.4	28.3	32.2	18.5	22.4	26.3	14.4	18.3	22.2
15	33.9	37.8	41.7	24.9	28.8	32.7	19.1	23.0	26.9	15.1	19.0	22.9
16	34.1	38.0	41.9	25.4	29.3	33.2	19.8	23.7	27.6	15.9	19.8	23.7
17	34.3	38.2	42.1	25.9	29.8	33.7	20.5	24.4	28.3	17.0	20.5	24.4
18	34.6	38.5	42.4	26.4	30.3	34.2	21.2	25.1	29.0	18.0	21.3	25.2
19	34.9	38.8	42.7	27.0	30.9	34.8	21.8	25.7	29.6	19.0	22.0	25.9
20	35.1	39.0	42.9	27.5	31.4	35.3	22.5	26.4	30.3	20.0	22.8	26.7
21	35.4	39.3	43.2	28.0	31.9	35.8	23.2	27.1	31.0	21.0	23.5	27.4
22	35.7	39.6	43.5	28.6	32.5	36.4	23.9	27.8	31.7	22.0	24.3	28.2
23	36.0	39.9	43.8	29.1	33.0	36.9	24.6	28.5	32.4	23.0	25.0	28.9
24	36.3	40.2	44.1	29.7	33.6	37.5	25.3	29.2	33.1	24.0	25.7	29.6
25	36.7	40.6	44.5	30.3	34.2	38.1	25.9	29.8	33.7	25.0	26.5	30.4
26	37.0	40.9	44.8	30.8	34.7	38.6	26.6	30.5	34.4	26.0	27.2	31.1
27	37.3	41.2	45.1	31.4	35.3	39.2	27.3	31.2	35.1	27.0	27.9	31.8
28	37.7	41.6	45.5	32.0	35.9	39.8	28.0	31.9	35.8	28.0	28.7	32.6
29	38.0	41.9	45.8	32.5	36.4	40.3	29.0	32.6	36.5	29.0	29.4	33.3
30	38.3	42.2	46.1	33.1	37.0	40.9	30.0	33.2	37.1	30.0	30.1	34.0

Extraído de: Wallace WHB. Predicting age of ovarian failure after radiation to a field that includes the ovaries (2005)

Figura 15 : Estimación del pool de PF desde nacimiento hasta menopausia. Ejemplo de porcentaje del pool de FP disponible tras administración de un tratamiento gonadotóxico concreto (14,4Gy).



Extraído de: Wallace WHB. Fertility preservation for young patients with cancer: who is at risk and what can be offered? (2005).

Figura 15: Protocolos de RT utilizados con riesgo gonadotóxico alto o intermedio sobre testículos y ovario atendiendo al desarrollo puberal.

Table 3 Radiation therapy protocols with high or intermediate impact on ovarian and testicular function

Prolonged azoospermia in males or amenorrhea in females

High risk

Total body irradiation for bone marrow transplant/stem cell transplant

Testicular radiation dose >2.5 Gy in adult men

Testicular radiation dose ≥ 6 Gy in prepubertal boys

Pelvic or whole abdominal radiation dose ≥ 6 Gy in adult women

Pelvic or whole abdominal radiation dose ≥ 10 Gy in postpubertal girls

Pelvic or whole abdominal radiation dose ≥ 15 Gy in prepubertal girls

Intermediate risk

Testicular radiation dose 1–6 Gy from scattered pelvic or abdominal radiation

Pelvic or whole abdominal radiation dose 5–10 Gy in postpubertal girls

Pelvic or whole abdominal radiation dose 10–15 Gy in prepubertal girls

Craniospinal radiotherapy dose ≥ 25 Gy

Note: Reprinted with permission from Rodriguez-Wallberg KA, Oktay K. Fertility preservation medicine: options for young adults and children with cancer. *J Pediatr Hematol Oncol.* 32(5):390–396.⁴⁸

Extraído de: Rodriguez-Wallberg KA. Fertility preservation during cancer treatment: clinical guidelines (2014).

4.2.3.2.3 Mecanismo de lesión sobre región Hipotálamo Hipofisaria

Los efectos adversos relacionados con la región HH que actúa como centro regulador de todo el sistema endocrino, son consecuencia por un lado de la presencia de tumores cerebrales en dicha zona, pero más frecuentemente aparecen derivadas de la RT utilizada en su manejo. Aquí las acciones de las radiaciones tienen numerosas secuelas a medio y largo plazo, sobre todo en los pacientes más jóvenes. Al no aparecer de inmediato y no ser siempre definitivas, es obligado un seguimiento cuidadoso a largo plazo, más allá de la adolescencia y a lo largo de toda la vida.

- Afectación general sobre la producción hormonal

Tras la RT craneal se ha propuesto la siguiente secuencia en la aparición de endocrinopatía por déficit hormonal: hormona de crecimiento (GH) 4,5 años, LH/FSH 8 años, hormona adenocorticotropa (ACTH) 9-10 años, hormona

estimulante del tiroides (TSH) más de 10 años. La hiperprolactinemia y la diabetes insípida suelen acontecer después (Güemes M 2014).

La fisiopatología no se conoce con exactitud. Dosis altas de radiación lesionan tanto el hipotálamo como la hipófisis, pero con dosis menores no está claro cuál es el origen del daño. El trabajo publicado por Chieng analiza el tema y concluye que la causa es la lesión directa a las células HH más que la alteración del flujo sanguíneo al hipotálamo. (Chieng PU 1991).

- Importancia de la dosis de RT sobre esa región

Las secuelas suelen ser dosis dependientes, por lo que en la actualidad estos niños se tratan con la mínima dosis efectiva de radiación, intentando irradiar el menor campo posible y fraccionando la dosis total en varias etapas. A lo largo de las últimas décadas, se han adecuado los protocolos para evitar al máximo posible esta exposición eliminando por ejemplo la RT profiláctica que anteriormente se administraba a los niños diagnosticados de LLA si no hay afectación del SNC y restringiéndola al máximo en el caso de que la haya (Ferragut J 2004). A pesar de ello en los tumores del SNC (segunda neoplasia más frecuente en la infancia) la mediana de dosis que recibe la región HH es de 53,6 Gy (IQR 40-70 Gy) (Güemes M 2014).

El hipotálamo es más radio sensible que la hipófisis. Con dosis bajas de radiación (<30Gy) se produce déficit de GH aislado en el 30% de pacientes y PP en algunas niñas; dosis entre 30-50 Gy aumentan la proporción del déficit de GH hasta un 50-100%, pudiendo producirse también alteraciones en las gonadotropinas, TSH y ACTH (20-30%, 3-9 %, 3-6 % respectivamente) y PP en ambos sexos; dosis mayores de 60Gy producen deficiencia múltiple hormonal entre 30-60% de los pacientes seguidos a 10 años e hiperprolactinemia (Darzy KH 2009).

- Importancia de la edad a la que se recibe RT en esa región

Sobre cómo la edad influye en el impacto de la radiación sobre el eje, existen datos controvertidos en la literatura, demostrando unos estudios mayor riesgo a menor edad. La disfunción HH es tiempo dependiente, incrementándose tanto la incidencia como la severidad del déficit hormonal conforme aumenta el tiempo de seguimiento debido a la atrofia secundaria de la hipófisis (Chueca M 2014).

- Afectación específica de la RT sobre eje gonadotrófico

Después de la afectación del eje de la GH, la afectación gonadotrófica es la segunda en frecuencia tras la irradiación craneal. La prevalencia en el déficit de gonadotropinas se ha descrito entre 20-50% de los pacientes sometidos a RT (Gleeson HK 2004).

Cuando se utiliza RT craneal pueden observarse amenorrea secundaria o progresión puberal escasa o retardada, debida a la afectación hipotalámica (LHRH) y consiguiente déficit de gonadotropinas (hipogonadismo hipogonadotropo). A veces la ausencia de signos puberales se debe a fallo mixto, central o periférico.

A nivel clínico y de forma característica la irradiación sobre región HH puede ocasionar tanto PP como PR. La aparición de PP o acelerada se produce al interrumpir las influencias inhibitorias corticales sobre las neuronas GnRH hipotalámicas. A dosis más bajas suele ocurrir con mayor frecuencia en chicas, mientras que entre 25-50 Gy puede aparecer en ambos sexos. La edad a la que se recibe la RT también importa, cuanto menor es el paciente, antes ocurre la PP (Gleeson HK 2004).

- Datos prevalencia pubertad retrasada y pubertad precoz

Los datos sobre la prevalencia de PR y PP son bastante variables. La PP es más habitual en hamartomas, gliomas vía óptica, ependimomas y astrocitomas. La PR suele asociarse con craneofaringiomas, histiocitosis de Langerhans y germinomas. Las incidencias publicadas oscilan entre 16-40%. DeWine sobre una población de 30 supervivientes diagnosticados de meduloblastoma describe una PP del 11,1% y PR del 11,8% (DeWine M 2014). Un estudio muy reciente español, analiza la situación endocrinológica de 38 supervivientes a un tumor de SNC con edades medias al diagnóstico de $5,34 \pm 3,07$ años, siendo los tumores más frecuente el meduloblastoma (26%) y el craneofaringioma (21%). Encuentran que en el 76% de los casos existe al menos 1 déficit hormonal, en el 21,1 % un déficit de LH/FSH y en el 21,1 % una PP. Las alteraciones en el eje de gonadotropinas se producen tras un tiempo medio de $8,7 \pm 3,6$ años tras el tratamiento con RT, poniendo de manifiesto la importancia del seguimiento a largo plazo (Güemes M 2014).

4.2.3.2.4 Daño sobre útero

Existen otra serie de alteraciones secundarias a la RT administrada que pueden tener impacto en la fertilidad. La RT abdomino-pélvica administrada en la infancia produce una reducción del volumen, elasticidad y vascularización uterina que puede dar lugar en la edad adulta a alteraciones de la implantación fetal, abortos de repetición, prematuridad, recién nacidos de bajo peso y retraso de crecimiento intrauterino. Dosis entre 14 y 30 Gy probablemente provocarán esta disfunción uterina con los riesgos clínicos comentados (Wallace WH 2005) (Green DM 2009). Este efecto de la RT se observa tanto más, cuanto menor es la edad de la paciente, si el tratamiento se produce a una edad más avanzada la afectación uterina será menor (Larsen EC 2004).

4.2.3.2.5 Irradiación Corporal Total

La ICT por su potencial gonadotóxico se merece una mención aparte. El procedimiento consiste en irradiar con campos de fotones de alta energía la totalidad del cuerpo y se asocia a una QT intensiva cuyo objetivo es preparar al organismo para recibir un TPH. La técnica se ha demostrado útil en una serie de enfermedades neoplásicas (leucemias, agudas y crónicas, síndromes mielodisplásicos y linfomas entre otros) y no neoplásicas (aplasias medulares, inmunodeficiencias severas y desórdenes genéticos del sistema hematopoyético). La dosis más habitual en pediatría es 12-14 Gy repartida en 6 fracciones durante 3 días.

Desde hace ya varias décadas la ICT se ha convertido en una técnica habitual en los servicios de Radioterapia Oncológica. Los avances terapéuticos y el desarrollo de las técnicas de irradiación y de dosimetría han contribuido a disminuir el riesgo de toxicidad aguda y tardía, aumentando la eficacia en términos de supervivencia a largo plazo. A pesar de ello, la disfunción endocrinológica y el daño sobre la placa de crecimiento epifisario, son los principales efectos directos de la ICT.

Son muy numerosos los trabajos que relacionan FOP con el uso de ICT y no parece que haya dudas en catalogarla como de alto riesgo gonadotóxico, entendiéndose por ello que más del 80% de las pacientes que la reciban lo presentarán (Wallace WH 2005).

Larsen, divide a más de 100 supervivientes de cáncer pediátrico en 3 grupos de tratamiento y describe un 70% de FOP con necesidad de THS para las 35 pacientes que se encuentran en el tercero donde casi más de la mitad habían recibido ICT como acondicionamiento de su TPH (Larsen EC 2003). En la misma línea y sobre una población de 144 supervivientes de leucemia en edad pediátrica que precisaron un TPH y se acondicionaron con CFM + ICT, reportan que la probabilidad de recuperar la función ovárica es de 24% y que además este dato se relaciona de forma clara con la edad, siendo menor la probabilidad de recuperación cuanto mayor es la paciente (Sanders JE 1988).

En un trabajo más reciente sobre 92 pacientes que recibieron TPH a una mediana de edad de 9 años (1-19), tan sólo recuperaron la función ovárica el 29% y también con menor probabilidad al incrementar la edad (Vatanen A 2013). Paralelamente otro equipo describe la situación de 138 supervivientes mujeres trasplantadas entre los 4 y 28 años de edad, donde el 83% de las pacientes tomaba THS, destacando que el RR de FOP entre las que se acondicionaron con ICT frente a las que no lo hicieron (excluyendo Busulfán) es de 4,9 (IC 95 % 1,2-19,9) (Borgmann-Staudt A 2012).

4.2.3.3 Cirugía

La cirugía sobre las gónadas puede tener repercusión a largo plazo sobre la función gonadal y reproductora dependiendo del tipo de intervención que se realice. La ausencia de ambos ovarios como consecuencia de una cirugía, conlleva a falta de desarrollo puberal y amenorrea primaria si la intervención se produjo antes de la pubertad, ocasionando además infertilidad y MP en todas las mujeres.

La posibilidad sin embargo de que en edad pediátrica y adolescente se diagnostique un cáncer con afectación de ambos ovarios es muy pequeña. La mayoría de lesiones ováricas malignas en estas franjas de edades se corresponden a tumores de células germinales con excelente pronóstico a largo plazo. Suelen ser manejadas con cirugía sobre el ovario afecto, más menos QT dependiendo de la histología y estudio de extensión. La necesidad de doble anexiotomía en patologías oncológicas es más prevalente en mujeres adultas, aunque en los últimos años las indicaciones también son cada vez más restringidas.

Poco está descrito sobre la fertilidad de mujeres con un solo ovario. La mayoría de trabajos publicados en relación a cirugías conservadoras de tumores ováricos con extirpación completa de un anexo, informan de normalidad en las menstruaciones y tasas de embarazos comparables a las de la población general (Yoo SC 2010) (Low JJ 2000). Ahora bien, según otros autores, ya que no existe mecanismo compensador de hipertrofia colateral y el número de FP es finito, estas mujeres podrían tener en cierta medida acortada su vida reproductiva (Lass 1999).

4.2.4 Incidencia e impacto de la gonadotoxicidad en las pacientes supervivientes a un cáncer en edad pediátrica o adolescente.

Aunque ya hemos dado datos concretos sobre los agentes gonadotóxicos más conocidos, conocer la magnitud del problema sobre todos los supervivientes de un cáncer en edad pediátrica o adolescente no es fácil. Los trabajos que dan cifras al respecto son escasos y ausentes en referente a la población española femenina (Andres MM 2009).

Varios autores defienden que en líneas generales la función gonadal femenina tras someterse a un tratamiento oncológico en la infancia es **normal**. Sin embargo sí que parece claro que existe un subgrupo de alto riesgo y su detección y ofrecimiento de alternativas para intentar paliar dichos efectos secundarios resulta crucial (Wallace WH 2005) (Wallace WHB 2014).

- Dificultades para encontrar datos concretos

Entre las principales dificultades para obtener respuesta, es que se necesitan muchos años (incluso décadas) para determinar la aparición de estos problemas cuando hablamos de pacientes diagnosticadas en edades muy tempranas. No existe además uniformidad en las definiciones de FOP en pediatría y además hay que incluir en este grupo de pacientes las alteraciones del desarrollo puberal.

Por otra parte, con frecuencia se ha asumido que la reaparición de las menstruaciones tras un tratamiento frente al cáncer, implicaba normalidad en la función ovárica y por tanto muchas de estas pacientes no han recibido un seguimiento específico al respecto. En algunos casos podría subestimarse la cifra de pacientes que van a contar con una reserva ovárica disminuida, no ausente y por tanto en riesgo de presentar una MP y/o problemas de fertilidad en el futuro.

Otras limitaciones para obtener estos datos son: series pequeñas, falta de información del tratamiento recibido, dificultad para discernir entre causa central y gonadal en el cese de las menstruaciones (por ejemplo por déficit de gonadotrofinas) y también para separar las causas quirúrgicas de las no quirúrgicas de MP (Green DM 2009).

- Resumen de estudios que aportan datos generales de FOP

En la literatura encontramos varios estudios con suficiente seguimiento a largo plazo, que pueden dar una visión global del tema (Tabla 5):

- Chiarelli (1999)

Chiarelli y colaboradores estudiaron este tema en 830 supervivientes de un cáncer pediátrico en Ontario a través de encuesta telefónica. El seguimiento de los pacientes fue entre 5 y 30 años tras el diagnóstico. Establecían diferentes grupos de tratamiento: QT con AA (siguiendo un score para cuantificar la dosis recibida), RT abdomino-pélvica (también diferenciando según dosis recibida) y sólo cirugía (no esterilizante) como grupo control. Globalmente encontraron en esta población una prevalencia de **8,8 % de MP**, a una mediana de edad de 24 años. Atendiendo a los grupos de tratamiento, el riesgo era significativamente mayor en aquellas pacientes que habían recibido combinación de AA con RT abdomino-pélvica (RR 2,58, IC 95% 1,14-5,80). El riesgo también era mayor, conforme aumentaba la dosis de RT siendo el RR de 3,27 (IC 95% 1,57- 6,80) cuando la dosis era ≥ 3500 cGy y en el subgrupo que había recibido mayor score en la dosis de alquilantes con un RR de 3,08 (IC 95% 1,15- 8,21). La **infertilidad** globalmente fue del **15,5%**, aumentando también el riesgo de forma significativa en las pacientes que habían recibido RT y siendo mayor todavía cuanto mayor era la dosis recibida (infertilidad del 32 % si la RT recibida era ≥ 3500 cGy).

El estudio da una idea global de la magnitud del problema, pero cuenta con una serie de limitaciones importantes entre las que destacan las diferencias entre los grupos de tratamiento: edad en el momento de recibir el tratamiento, edad al realizar la encuesta y también en los años de seguimiento. Las pacientes que habían recibido RT eran mayores, pudiendo subestimarse las cifras de FOP en los otros grupos ya que algunos de estos problemas podrían detectarse en los siguientes años (Chiarelli AM 1999).

- Estudio CCSS

Los datos aportados por el CCSS a través de sus diversas publicaciones son otra fuente importante de información, especialmente por el gran número de población que analizan, con más de 14.000 supervivientes a un cáncer pediátrico durante los años 1970-1986 en EEUU y Canadá. Comparan los datos obtenidos con un grupo control de 4000 hermanos y entre los cuestionarios que rellenan (24 hojas) hay apartado amplio para intentar detectar déficits en la función ovárica. Globalmente es destacable en este estudio que entre las participantes tan solo un 1.7 % habían sido sometidas a TPH.

Los datos sobre fallo ovárico agudo (FOA) tras el tratamiento ascienden globalmente a un **6.3%** de las pacientes, aunque casi el 75% de ellas habían recibido RT abdomino-pélvica. El riesgo de FOA tras haber recibido ≥ 20 Gy sobre los ovarios era superior al **70%**, cifra también muy alta si la dosis era ≥ 10 Gy (60%), especialmente si las pacientes tenían ≥ 13 años durante el tratamiento. La procarbina a cualquier dosis y la exposición a CFM entre los 13-20 años de edad también resultaron factores de riesgo independientes para FOA en el análisis multivariante (Green DM 2009) (Chemaitilly W 2006).

Los datos de MP del CCSS, tienen más limitaciones ya que una parte importante de la población encuestada estaba tomando anticonceptivos orales (ACO) en el momento de completar el cuestionario, lo que podría infraestimar las cifras. Según los autores el **8%** de las supervivientes a un cáncer pediátrico experimentaron una MP (definida como ausencia de menstruaciones durante 6 meses antes de los 40 años, quedando descartadas otras causas) respecto al 0.8 % del grupo control (RR 13,21 IC 95% 3,26-53,51). Esta cifra se eleva hasta los **30-40%** en el caso de pacientes que recibieron combinación de RT pélvica y AA. En el modelo de regresión múltiple los factores de riesgo fueron: mayor edad, mayor dosis de RT, Score calculado de AA elevado y el diagnóstico de EH (Sklar CA 2006) (Nielsen SN 2013).

Respecto a lo datos de embarazos de este estudio, en todos los grupos de tratamiento y entre los 15 y los 30 años de edad, las probabilidades de tener un hijo son menores respecto al grupo control. Además los hijos de pacientes que han recibido RT pélvica comparado con los de aquellas que no la recibieron, tienen más riesgo de prematuridad (21% vs 12,6%) y de ser pequeños para la edad gestacional (18 % vs 7,8%). Según este trabajo además el tratamiento

previo con doxorubicina o daunorrubicina incrementa el riesgo de bajo peso al nacimiento independientemente de la historia de irradiación. El riesgo de aborto solo se ve incrementado en aquellas pacientes con historia de RT craneal a altas dosis o ICE. Destacan por otra parte que los hijos de estas supervivientes no presentan mayor riesgo de malformaciones, síndromes genéticos o defectos genéticos aislados.

- Stillmann (1981)

Stillmann, en un trabajo mucho más antiguo estudia una cohorte de 182 supervivientes de un cáncer pediátrico y cifra la tasa global de FOA en **12%**, siendo de **68%** en aquellas pacientes cuyos 2 ovarios quedaban incluidos en el campo de irradiación. La distribución de tumores en este estudio difiere en gran medida de la actual ya que incluye un gran número de pacientes supervivientes a un tumor de Wilms (29 %) que recibieron RT en zona ovárica y sólo un 5% de pacientes con LA, pudiéndose justificar así esa mayor incidencia global que la descrita por otras series (Stillman RJ 1981).

- Larsen (2003)

El grupo de Larsen publicó información sobre la función ovárica de 100 supervivientes de un cáncer (edad media al diagnóstico de 25,7 años) comparándola con un grupo control de 21. Sus cifras globales de FOP son del **17 %**, es decir 1 de cada 6 pacientes, teniendo en cuenta que otro 13 % de la población estudiada estaba tomando ACO en el momento del estudio. Dividen a las pacientes en 3 grupos de tratamiento de acuerdo a la gonadotoxicidad esperada, ampliando el espectro de los agentes QTS potencialmente gonadotóxicos y no sólo teniendo en cuenta a los clásicos AA. El grupo 3 de tratamiento incluía a aquellas pacientes sometidas a TPH que recibieron acondicionamiento con ICT más CFM. De las 10 pacientes de ese grupo, el **70%** tomaban THS por FOP. En el grupo 2, que incluía 55 pacientes con diferentes tratamientos alquilantes (ampliado) más menos RT por encima o debajo del diafragma encontraban: ningún caso de FOP en aquellas que sólo habían recibido AA, tres casos de 18 (**16%**) en aquellas que habían recibido AA y RT por encima del diafragma y 7 casos de 25 (**28%**) en aquellas que habían recibido RT por debajo del diafragma \pm AA. Finalmente en el grupo 1 donde se incluían pacientes que no habían llevado AA \pm RT por encima del diafragma (en este caso siempre craneal 24 Gy) no se observó ningún caso de FOP, aunque 7 pacientes estaban tomando ACO.

El trabajo además hace referencia a que el 70% de los casos de pacientes con menstruaciones espontaneas y normales tras finalizar el tratamiento antineoplásico, presentaban de forma significativa ovarios de menor tamaño y menor RFA que el grupo control, pudiendo indicar una menor reserva ovárica con potenciales consecuencias en el futuro (Larsen EC 2003).

:: INTRODUCCIÓN

- Nielsen (2013)

De nuevo el equipo de Larsen, esta vez en 2013, publica un trabajo pionero donde por primera vez se revalúan a las mismas supervivientes 10 años más tarde para estudiar cuál ha sido la evolución de su función ovárica. Consiguen esa revaluación en 71 pacientes y sus principales conclusiones son:

- ♦ La gran mayoría de pacientes con menstruaciones normales en el estudio anterior continúan en la misma situación. Tan solo distinguiendo un menor número en el RFA con una media de 15 vs 18 del grupo control.
- ♦ Existen diferencias estadísticamente significativas respecto a la cuantificación de hormona AMH y RFA, siendo ambas mayores en el grupo 1 de tratamiento vs grupo 2 y 3 antes descritos.
- ♦ La tasa de recién nacidos vivos es de 69% y destacan las principales limitaciones en comparar esta tasa respecto a la población normal debido a la maternidad retrasada por motivos psicosociales. En el año del estudio el 46% de las pacientes tenía una edad media de 34,9 años y en Dinamarca según registros tan solo el 19,4 % de mujeres a los 36 años tiene hijos.

En general confirma el efecto tóxico de los tratamientos considerados de alto riesgo y de forma optimista muestra que si cuando las supervivientes tenían entre 20-30 conservaban su función ovárica es probable que cuando se encuentren entre los 30 y los 40, también lo hagan. Monitorizando además AMH y el RFA se les puede dar alguna orientación sobre como programar su futura maternidad (Nielsen SN 2013)

- Reulen (2009)

En el 2009 el equipo de Reulen, publicó los datos sobre embarazo y problemas asociados al mismo en una larga cohorte de supervivientes pediátricos británicos (10483 pacientes) entre los años 1940-1991 (suponiendo menos del 7% los anteriores al año 1962). Entre los principales hallazgos describen: una probabilidad de tener hijo vivo del **0,64** respecto a la población general, siendo de **0,5** en aquellos pacientes que habían recibido RT abdominal o craneal. Además corroboran que el riesgo de bajo peso al nacimiento se multiplicaba por 2 en el caso de haber recibido RT abdominal y por 3 la probabilidad de que fuera prematuro. Hacen hincapié en la dificultad para discernir si la disminución de probabilidad en tener hijos biológicos puede deberse a motivos de FOP, a una mayor dificultad para encontrar pareja o la preocupación por la salud de la descendencia (Reulen RC 2009).

- Madanat (2008)

Madanat en el 2008, describe la situación de descendencia de más de 25.000 supervivientes finlandeses que fueron diagnosticados de un cáncer antes de los 35 años. Los datos que aportan se obtuvieron a través del registro nacional de tumores y de los datos informáticos administrativos de

identificación relativos a sus hermanos. En relación a las mujeres supervivientes refieren una probabilidad reducida del **0,46** de tener un primer hijo (IC 95% 0,44-0,48) al compararlas con el grupo de hermanos (Madanat LM 2008).

Tabla 5 : Resumen de los diferentes estudios en supervivientes pediátricas de cáncer y FOP

	Datos FOP	Datos FOA	Datos Infertilidad	Comentarios
Stillman (1981) n=182			Global: 15 % Grupo AR:68% (si ambos ovarios en campo de irradiación)	Distribución dg poco real (muchos T. Wilms, muy pocas LA)
Chiarelli (1999) n= 830	Global: 8,8 % MP Grupo AR (RT pélvica + AA): RR 2,5 (IC 95% 1.14- 5.80)		Global: 15 % Grupo AR:32% (RT pélvica)	Las características de los grupos de tratamiento no son comparables
Larsen (2003) n= 100	Global: 17 % Grupo AR:70%			Incluye como AA otros QT: Ara-C, Dauno, Vinblastina
Chemaitilly (2006) n= 3390		Global: 6,3 % Grupo AR:70%		CCSS
Green (2009) Sklar (2006) n= 2819	Global: 8 % Grupo AR:30-40%			CCSS Muy pocas pacientes TPH
Madanat (2008) n= 25784			RR 0,46 (IC 95% 0,44-0,48) de fertilidad respecto a población general	Todo por registros informáticos y RNTI Incluye pacientes de 1953-2004 Pacientes de <35 años al dg
Reulen (2009) n= 10483			Globalmente entre los supervivientes O/E 0.64; IC 95%, 0.62-0.66 de fertilidad respecto a PG O/E 0,55 IC 95%	British CCSS

			0,50-0,61) si RT pélvica o O/E 0,55 IC 95% 0,50-0,61) si RT cerebral	
--	--	--	--	--

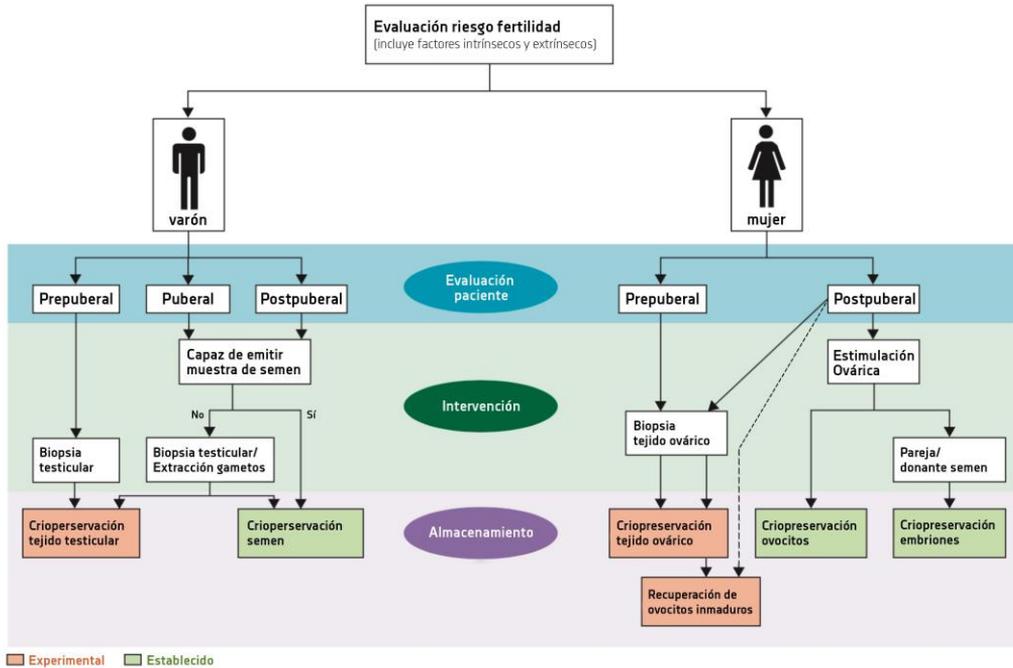
4.3 Preservación de fertilidad en los pacientes oncológicos

En la población pediátrica y adolescente, el impacto del diagnóstico de cáncer y la preocupación por el inicio del tratamiento lo más precozmente posible, han contribuido a que pacientes, padres y facultativos, no hayan considerado rutinariamente el uso de técnicas de PF. Aún así el escollo más importante en este terreno para los pediatras oncológicos es que hasta hace poco **no existían** técnicas disponibles plenamente desarrolladas con este objetivo en el caso de pacientes prepuberales y éstos suponen la mayor población diana en el cáncer infantil (Andres MM 2009).

4.3.1 Opciones de Preservación de Fertilidad

Existen diferentes opciones de PF en pacientes oncológicos, tanto de carácter experimental como establecidas a nivel de uso clínico (Figura 16). Se desarrollan a continuación los detalles de cada una de ellas. A pesar de que los pacientes varones no son la población de estudio de este proyecto se describen igualmente debido a la puesta en marcha recientemente de un programa de PF en niños oncológicos por nuestro equipo, lo que nos sitúa como centro de referencia en estas técnicas a nivel internacional junto con Bélgica.

Figura 16 : Resumen de las opciones de PF actuales



Extraído y adaptado de: Anderson RA. Cancer treatment and gonadal function: experimental and established strategies for fertility preservation in children and young adults (2015)

4.3.1.1 Varones

- Adultos y adolescentes

La técnica más habitual en varones adolescentes maduros es la **criopreservación de espermatozoides** obtenidos por masturbación. Se han descrito otros métodos de aislamiento de semen que podrían tener una particular utilidad en aquellos casos de adolescentes que por motivos psicológicos no pudieran emitir dicha muestra y entre ellos destacan: la electroestimulación vibratoria del pene, la electroestimulación rectal bajo anestesia, así como realización de biopsia testicular o el aspirado del epidídimo (Brougham MF 2003) (Postovsky S 2003). Todas ellas suponen alternativas viables pero la realidad es que son ofrecidas por muy pocos centros hospitalarios y se dispone de escasa información en cuanto a sus resultados en este subgrupo de población. Por otra parte, es destacable el desarrollo de nuevas técnicas de reproducción asistida, como la microinyección de espermatozoides (ICSI), que ha permitido en los últimos años la realización de tratamientos eficaces con un número muy bajo de espermatozoides, resultando especialmente útil en

aquellos pacientes que por su enfermedad basal o edad cuenten con un recuento anormalmente bajo (Postovsky S 2003).

La criopreservación de semen es una técnica hoy por hoy bien establecida, y a priori menos compleja que las ofertadas para la población femenina, pero cuando hablamos de población adolescente se han de tener en cuenta algunas consideraciones. Según estudios recientes es ofrecida solamente a un 50% de los nuevos pacientes en el momento del diagnóstico (Schover LR 2002) y estos números podrían ser menores si consideramos a la población más joven. La dificultad para definir con certeza a qué edad una persona es capaz de emitir una muestra de semen, así como la tendencia a no considerar esta opción en aquellos pacientes con diagnósticos de mal pronóstico inicial, se han apuntado como las principales causas de estas cifras (Lee SJ 2006) (Edge B 2006). No hay indicaciones claramente establecidas, todo paciente masculino sexualmente maduro (con un volumen testicular superior a 10 ml) y psicológicamente preparado, que vaya a ser sometido a un tratamiento potencialmente gonadotóxico, debería ser un candidato a su ofrecimiento, dadas sus potenciales ventajas y los mínimos efectos secundarios (Egdar A 2008).

La integridad del ADN de los espermatozoides puede dañarse con una simple sesión de QT, por lo que es imprescindible referir a estos pacientes antes del inicio de cualquier tratamiento gonadotóxico (Lee SJ 2006). No hay publicaciones que demuestren mayor número de malformaciones en los hijos espontáneos de pacientes que han recibido un tratamiento oncológico en el pasado (Green DM 2009) pero los pacientes deberían conocer que no hay datos suficientes de seguridad al respecto del uso de técnicas de reproducción asistida (ICSI) con semen recogido tras la administración reciente de QT (Tournaye H 2004).

El término “facilidades para los adolescentes” en este contexto ha sido utilizado en varias publicaciones (Brougham MF 2003) (Egdar A 2008) (Wallace WH 2005). Personal entrenado y cómodo en este tipo de conversaciones debería ser el encargado de dirigir la información y las propuestas de una manera sensible y abierta, valorando en cada caso la conveniencia o no de la presencia de los padres en el momento de la charla y en el momento de acompañar a los pacientes a la unidad de reproducción. La posibilidad de recoger la muestra en un lugar diferente a la unidad de fertilidad de adultos (domicilio, algún lugar habilitado de la unidad de OP) podría mejorar el rendimiento de la misma (Chapple A 2007).

- Pacientes Prepúberes

Los varones prepúberes no cuentan en la actualidad, con ninguna opción disponible para preservar sus células germinales en la práctica clínica diaria. La criopreservación de tejido testicular inmaduro con posterior maduración in vivo/in vitro es una estrategia experimental, que ha obtenido

buenos resultados en modelos animales pero que todavía no tiene aplicación práctica fuera de este ámbito (Anderson RA 2015).

- Preservación de células madres espermatozonales

Una posible opción futura sería la preservación de células madre espermatozonales (SSC) para un posterior trasplante autólogo (Geens M 2008) (Baert Y 2013), cuyo salto a la clínica ya se está ensayando de manera pionera a nivel mundial en Bruselas desde el año 2002 (Wyns C 2010) (Goossens E 2013).

Desde un punto de vista más básico, las SSC son las células madre de la línea germinal masculina. Están presentes en la membrana basal de los túbulos seminíferos desde el momento del nacimiento en el tejido prepúbere, y son las responsables del mantenimiento de la espermatogénesis a lo largo de toda la vida adulta. En el caso de niños prepúberes, la población de células germinales del testículo está constituida exclusivamente por las SSCs.

En este sentido, se han ensayado y en la actualidad se están depurando diferentes técnicas que permiten la identificación, purificación, criopreservación y trasplante de las SSCs (Wyns C 2010) (Goossens E 2013).

Una posible opción capaz de permitir la recuperación de la fertilidad de forma permanente es la realización de un trasplante autólogo. El trasplante de SSCs en ratón es una de las pruebas funcionales que definen a las SSCs como subpoblación celular capaz de colonizar el epitelio seminífero de ratones esterilizados químicamente, siendo capaces de regenerar su espermatogénesis (Geens M 2008). Resultados similares se han conseguido con el trasplante de SSCs en otros modelos animales, incluidos primates, trasplantando tanto SSCs purificadas como un pool de células germinales en distintos estadios de diferenciación, consiguiendo descendencia fértil tras más de 10 años criopreservadas (Hermann BP 2012).

Alternativamente en estos momentos, se están ensayando diferentes estrategias de maduración de SSCs *in vitro* para la obtención de células haploides *in vitro* que permitan a los pacientes tener descendencia tras someterse a procesos de reproducción asistida, principalmente ICSI (Geens M 2008).

Otra posibilidad que está siendo ampliamente explorada es el xeno-injerto de tejido testicular completo en ratones inmunodeprimidos. Así, se han conseguido resultados muy prometedores al injertar, a nivel subcutáneo, escrotal e incluso intra-testicular, fragmentos de tejido testicular de diferentes especies, incluido humano, en ratones inmunodeprimidos (Goossens E 2013). De este modo, la técnica de xeno-injerto se propone como una opción adecuada en el intento de generar espermatozoides humanos funcionales a partir de tejido testicular criopreservado procedente de pacientes prepúberes antes de

someterse al tratamiento antitumoral. Sin embargo, hasta la fecha no se ha observado un avance en la maduración de la meiosis más allá de paquiteno en ensayos con tejido humano. Desde esta perspectiva, deben seguir realizándose más estudios, dado que el xeno-injerto podría suponer una alternativa para impedir la transferencia de células cancerígenas de nuevo al paciente (Wyns C 2008).

- Administración de análogos de gonadotropinas

La administración de hormonas análogas de las gonadotropinas como mecanismo protector del eje hipotálamo-hipofisario gonadal, no ha mostrado ninguna efectividad en la población humana masculina (Loren AW 2013) (Meistrich ML 2008).

4.3.1.2 Mujeres (Tabla 6)

4.3.1.2.1 Criopreservación de embriones

La criopreservación de embriones es una de las técnicas, junto a la criopreservación de ovocitos, clínicamente bien establecida y considerada no experimental, con una tasa de éxitos elevada.

Supone una de las primeras opciones para la PF pero requiere de una estimulación ovárica para la obtención de ovocitos, que ocasiona una demora en el inicio del tratamiento antineoplásico de 2 a 5 semanas. Este tiempo puede considerarse excesivo para pacientes que deben iniciar su tratamiento inmediatamente. Destacar que recientemente se están barajando nuevos métodos de estimulación, que acortarían mucho ese tiempo necesario, con índices de éxito similares a los métodos tradicionales (Loren AW 2013).

Por otra parte el hecho de criopreservar embriones requiere que la paciente tenga una pareja estable. En niñas y adolescentes esta opción no se contempla y en personas sin parejas, el uso de donantes de semen puede generar controversia.

Existe una problemática ética y legal asociada sobre la acumulación y destino final de embriones obtenidos de pacientes que se someterán a un tratamiento de QT o RT, y que potencialmente pueden no sobrevivir a la enfermedad.

4.3.1.2.2 Criopreservación de ovocitos

- Criopreservación de ovocitos maduros

La criopreservación de ovocitos es desde hace unos años la técnica más común en PF. Desde el 2012 ya no se considera experimental. No es necesario tener pareja ni el uso de semen de donante evitando así problemas morales, religiosos y legales y además no requiere cirugía.

Cuando se habla de este procedimiento habitualmente se hace referencia a la criopreservación de **ovocitos maduros** (en la segunda división meiótica), que son extremadamente frágiles debido a su tamaño, contenido en agua y disposición de cromosomas. Los recientes avances producidos en las técnicas de congelación y descongelación de los mismos, han conseguido sortear dichos obstáculos.

Gracias a la técnica de vitrificación de ovocitos, la tasa de supervivencia tras la desvitrificación es del alrededor del 95% y la tasa de fecundación es similar a la obtenida con ovocitos en fresco (Cobo A 2008) (Domingo J 2009).

Por otra parte, es necesario someterse a un ciclo de estimulación ovárica y algunas pacientes oncológicas no tienen tiempo de completarlo antes de iniciar el tratamiento frente al cáncer. A pesar del éxito en la población adulta, de momento pocos centros se han planteado ofrecerla en menores de edad, aunque pacientes postpúberes, que estén de acuerdo con el procedimiento y con el consentimiento de sus responsables legales, podrían considerarse candidatas en situaciones muy concretas (Loren AW 2013).

Un aspecto importante al plantear esta técnica es que las pacientes no deben haber llevado QT reciente, sin ninguna excepción (a diferencia de las pacientes que se someten a CCO como veremos a continuación). Los resultados de la estimulación son peores y además se ha descrito la posible afectación genética de dichos ovocitos, así como efectos adversos reproductivos (abortos y mayor tasa de malformaciones en estudios animales) (Shapira M 2014).

- Criopreservación de ovocitos tras maduración in vitro

Paralelamente a este procedimiento también pueden conservarse **ovocitos inmaduros** que se encuentran en estadio de diplotene de la profase I (vesícula germinal) y que son menos vulnerables a los daños de la criopreservación. Este proceso no requiere de estimulación ovárica, lo que supondría un gran beneficio para pacientes que no pueden retrasar el tratamiento. Con cierta frecuencia se ha asociado esta técnica a la CCO, aspirando dichos ovocitos durante el procedimiento (Escribá MJ 2012). Tras la aspiración se someten a un proceso de maduración in vitro (IVM) y posterior criopreservación. Varios trabajos describen embarazos y recién nacidos sanos gracias a este procedimiento (Söderström-Anttila V 2005).

Como desventaja descrita en publicaciones más antiguas es que se encontraban dificultades importantes en conseguir la maduración coordinada de núcleo y citoplasma para una posterior fecundación. Después del proceso de IVM de las vesículas germinales, podían aparecer anomalías en el huso y una condensación prematura y parcial de los cromosomas (Goud A 2000).

De forma optimista el grupo de Jadoul defiende este procedimiento en la actualidad como opción alternativa o complementaria, alegando que en centro experimentados las tasas de maduración llegan a ser del 50-60% y las de fertilización 60-70% (K. S. Jadoul P 2012). Fasano y su equipo alcanzan tasas de maduración más bajas del 31% (rango muy variable de 0-100%) en una cohorte de 57 pacientes que se sometían a una criopreservación de tejido ovárico por problemas oncológicos, con una mediana de edad 26 años (8-35). Llamativamente incluyen a 4 pacientes prepuberales, donde los resultados fueron totalmente superponibles a las pacientes adultas (Fasano G 2011).

El planteamiento y perfeccionamiento de esta técnica es especialmente relevante para pacientes con enfermedades hematológicas, donde el reimplante del tejido está contraindicado, y todavía más importante en las pacientes más jóvenes, que cuentan con muchas menos opciones de PF.

- Viabilidad de estas opciones durante el seguimiento de pacientes oncológicas jóvenes libres de enfermedad

Como algunas de las técnicas que hemos comentado se han empezado a usar relativamente hace poco, existe un colectivo de pacientes a tener en cuenta. Se trata de mujeres jóvenes, en RC de su enfermedad, que recibieron un tratamiento con elevado riesgo gonadotóxico cuando eran niñas y adolescentes y que en su momento no se les realizó ninguna técnica de PF.

La situación de estas mujeres puede ser doble, por una parte existirá un subgrupo en el que su reserva folicular se agotó del todo poco después de recibir el tratamiento. En estas mujeres es difícil plantear opciones de descendencia biológica y estarán más encaminadas en un futuro a la utilización de óvulos de donante o adopción. Pero existe un subgrupo, en el que presentando un reserva ovárica relativamente baja, pero no agotada, pudiera beneficiarse de algunas de las técnicas referidas a la crioconservación de ovocitos. Dicho ofrecimiento tendría sentido en pacientes habitualmente ya mayores de edad y con unas probabilidades altas de agotamiento de reserva ovárica en edades tempranas (Vatanen A 2013) (Anderson RA 2015).

Existen experiencias aisladas publicadas en este sentido con buenos resultados (Oktay K 2014) (Even-Or E 2015). Resulta de vital importancia el seguimiento clínico y analítico de las pacientes, sobre todo las de alto riesgo gonadotóxico, para poder monitorizar su situación ovárica y valorar quién sería candidata, tras analizar los pros y las contras de estas opciones en cada caso particular (Nielsen SN 2013) (Wallace WH 2005).

4.3.1.2.3 Criopreservación corteza ovárica

La **criopreservación de corteza ovárica** (CCO) es actualmente es la única opción de PF para pacientes prepuberales. Sin embargo es importante remarcar que a pesar de que el primer niño nacido mediante esta técnica se remonta al

año 2004 (Donnez J 2004), continua considerándose de carácter experimental y hay que considerar varios factores cuando se va a realizar en pacientes menores (Anderson RA 2008) (Fallat ME 2008). El desarrollo y características de la CCO se detallan en el apartado 1.3.2

4.3.1.2.4 Trasposición quirúrgica ovárica

La transposición quirúrgica de los ovarios fuera del campo de irradiación puede preservar la función ovárica. Es una técnica clásicamente descrita y potencialmente utilizable en la edad pediátrica de PF (Loren AW 2013). Varios trabajos recientes, presentan buenos resultados en pequeñas series y animan a los profesionales a su consideración, cuando el principal factor limitante sea la RT pélvica (Bisharah M 2003) (Terenziani M 2009).

Los ovarios deben desplazarse lo más lejos posible, en el caso de que vaya a recibirse ICE o si se va a recibir RT pélvica, anclarlos lo más alto y lateral posible en la pared abdominal anterior (goteras paracólicas). Deben utilizarse clips de titanio en los bordes opuestos del ovario para que posteriormente éstos puedan ser identificados radiológicamente antes de la RT (Jadoul P 2012).

Puede realizarse por laparotomía durante el tratamiento quirúrgico propio de la enfermedad o mediante laparoscopia antes de recibir la RT. Es importante recalcar que si los ovarios son trasladados a una posición abdominal, se puede lograr una gestación espontánea, sin necesidad de someterse a una segunda cirugía de reubicación de los ovarios a una zona pélvica. Además esta técnica puede practicarse sola o en combinación con otras técnicas de PF (Martin JR 2007). Por otra parte, existe riesgo de remigración de los ovarios, por lo que en la medida de lo posible se debería realizar lo más próxima a la administración de RT (Loren AW 2013).

A pesar de las ventajas teóricas la realidad es que hasta la fecha no se emplea rutinariamente en todos los centros bajo las premisas de requerir un procedimiento quirúrgico adicional y no evitar la gonadotoxicidad provocada por QT que, con frecuencia se ha de utilizar conjuntamente.

4.3.1.2.5 Análogos de hormona liberadora de gonadotropina (aGnRH)

La **manipulación hormonal** en mujeres con aGnRH como alternativa de PF, continua suponiendo un tema controvertido en la actualidad. Clásicamente se ha descrito que podrían proteger frente a los efectos tóxicos de los tratamientos antineoplásicos creando un estado hipogonadotropo similar a la etapa puberal, siendo posible la protección de los folículos en crecimiento; pero éstos solo constituyen el 10% de la población folicular, por lo que su uso supondría una protección a corto plazo (Oktay K 1997).

Se sabe por otra parte, que podría tener beneficios alternativos para los pacientes como disminuir el sangrado vaginal cuando existe trombopenia

:: INTRODUCCIÓN

secundaria a la administración de QT, pero deberían sopesarse igualmente los posibles riesgos: pérdida ósea, sofocos y potencial interferencia con la respuesta a la QT en algunos tumores con receptores estrogénicos.

El trabajo reciente de Moore, defendía su uso concomitante a la QT en el cáncer de mama. El estudio a pesar de ser randomizado presenta una serie de limitaciones, como considerar como uno de los objetivos principales, la recuperación de menstruaciones (no utilizan RFA ni niveles de AMH). Por este y otros motivos ha sido cuestionado con contundencia por Oktay y colaboradores en su última revisión. (Moore HC 2015) (Oktay K 2015)

A día de hoy y según el panel de expertos de la sociedad americana de Medicina Reproductiva en el 2013, su uso no está indicado como método único de PF y su utilización debería restringirse a ensayos clínicos (Loren AW 2013).

Tabla 6 : Resumen de las características prácticas de las diferentes opciones de FP en mujeres

	CRIOPRESERVACION DE EMBRIONES	CRIOPRESERVACIÓN DE OVOCITOS MADUROS	CRIOPRESERVACIÓN DE OVOCITOS TRAS IVM	CRIOPRESERVACIÓN DE CORTEZA OVÁRICA	OOFOROPEXIA
¿Se considera experimental?	NO	NO	Sí ¿?	SÍ	NO
¿Requiere pareja o semen de donante?	SÍ	NO	NO	NO	NO
¿Requiere estimulación hormonal con tiempo mínimo 2-3 semanas?	SÍ	SÍ	NO	NO	NO
¿Requiere cirugía?	NO	NO	NO	SÍ	SÍ
¿Se puede plantear a pacientes prepúberes?	NO	NO	SÍ	SÍ	SÍ
¿Se puede plantear a pacientes púberes?	NO	Posible	SÍ	SÍ	SÍ
¿Se puede plantear con QT previa reciente?	NO	NO	NO	SÍ	SÍ
¿Se puede plantear post-tratamiento?	SÍ ¿?	SÍ	SÍ ¿?	Posible	NO
Comentarios	Tasas de fecundación altas Mayores dilemas éticos	Tasas de fecundación altas. Puede asociarse a CCO. Buena opción si existe riesgo de reintroducir células malignas	Tasas de fecundación más bajas Puede asociarse a CCO Buena opción si existe riesgo de reintroducir células malignas	Posibilidad de realizar maduración in vitro de FP. Posibilidad de recuperación hormonal tras reimplante. No indicado el reimplante en neoplasias hematológicas	Principal indicación cuando vaya a administrarse RT pélvica. De forma aislada no es útil si hay QT gonadotóxica. Puede asociarse a CCO. No requiere cirugía de recolocación.

4.3.2 Criopreservación corteza ovárica

La CCO supone la única opción de PF disponible para pacientes prepuberales y la más ampliamente utilizada en adolescentes. Es también la primera alternativa que se plantea en mujeres adultas cuando se requiere de inmediato empezar el tratamiento. Continúa considerándose una técnica experimental (Anderson RA 2015) (Loren AW 2013), sobre todo en población pediátrica, aunque algunos profesionales, tras los avances conseguidos en los últimos años defienden con rotundidad su salto a técnica establecida (Donnez J 2015).

Es un procedimiento que puede realizarse rápidamente, sin retrasar el inicio de los tratamientos oncológicos y que no requiere de estimulación ovárica previa, por lo que pacientes con cáncer hormono-dependiente también pueden beneficiarse de ella. En general implica un menor número de dilemas éticos respecto a otras opciones.

La CCO consiste en la extracción de la corteza con su reserva folicular correspondiente previamente a la administración del tratamiento oncológico, su congelación durante un periodo indefinido de tiempo y su posterior “autotrasplante” orto o heterotópico siempre que la paciente se encuentre libre de enfermedad. Con esta técnica se conservan muchos FP in situ que contienen ovocitos arrestados en fase de diplotene de la primera división meiótica. Los FP son de pequeño tamaño y quiescentes, y los ovocitos en su interior no tienen zona pelúcida ni gránulos corticales, lo que les confiere mayor tolerancia a los procesos de congelación-descongelación que los folículos maduros.

Como ventaja adicional sobre otras opciones es que tras su ortotrasplante, se puede restablecer la función ovárica global, es decir, mantener la capacidad reproductiva o exocrina y la producción hormonal o endocrina siempre que exista una adecuada población folicular (Donnez J 2015).

La CCO puede asociarse a otros procedimientos descritos anteriormente como la aspiración de los folículos antrales y posterior IVM. También puede simultanearse con la técnica de vitrificación de ovocitos, realizándose una estimulación controlada entre los días -1 y +3 del ciclo. Con estas combinaciones se permite aumentar considerablemente el espectro de opciones de PF para las pacientes oncológicas (Donnez J 2015).

4.3.2.1 Descripción proceso

La **extracción** de tejido ovárico requiere de un procedimiento quirúrgico, realizado normalmente mediante laparoscopia en el cual puede extraerse el ovario entero, un fragmento o realizar múltiples biopsias. Se plantea

extraer mayor tejido ovárico cuando el riesgo de FOP es muy elevado (Jadoul P 2012) o el tamaño del ovario muy pequeño.

El tejido ovárico se **corta** en fragmentos y puede criopreservarse mediante técnicas de congelación lenta o mediante vitrificación. La criopreservación no es sencilla debido a su composición de diferentes tipos celulares: células del estroma, folículos formados por ovocitos más células de la granulosa y de la teca, vasos sanguíneos y nervios del tejido ovárico.

La **criopreservación** mediante **congelación lenta** se realiza en una solución acuosa con diferentes solutos presentes. A medida que se produce un descenso de la temperatura se forman núcleos de hielo en el medio extracelular, dejando los solutos progresivamente más concentrados en la fracción líquida. Las células en suspensión deben deshidratarse para mantener el equilibrio osmótico con un medio extracelular cada vez más hipertónico. El agente crioprotector debe penetrar de manera uniforme a través del estroma, de las células de la granulosa y de los ovocitos, pero al mismo tiempo, se debe evitar la toxicidad asociada su uso (Hovatta 2005). El método estándar de criopreservación es un programa de congelación lenta usando un medio con agentes penetrantes de bajo peso molecular que contenga albúmina humana sérica con propanodiol, Dimetilsulfóxido (DMSO) o etilenglicol combinado con sucrosa (Hovatta O 1996).

Por otro lado, en los últimos años se está trabajando para mejorar las estrategias de **vitrificación** de tejido ovárico. Las principales diferencias entre los 2 procedimientos son el proceso de congelación y la concentración del crioprotector utilizado. Aunque se han publicado estudios en los que muestran que la vitrificación pudiera ser más efectiva (Hovatta 2005), hasta el momento todos los embarazos obtenidos mediante esta técnica (excepto 2) provienen de corteza criopreservada mediante congelación lenta (Donnez J 2015).

En ocasiones, por motivos de logística no se puede realizar la criopreservación del tejido inmediatamente posterior a su extracción. Se ha demostrado viabilidad del mismo a 4 ° C durante 20-24 horas tras su extracción (Dittrich R 2012) (Jadoul P 2012).

4.3.2.2 Resultados publicados hasta la fecha en relación a la CCO

La primera experiencia con éxito en este ámbito fue descrita por el equipo de Gosden, consiguiendo restaurar la fertilidad en una oveja tras autotrasplante de corteza ovárica hace más de 20 años (Gosden RG 1994) y desde entonces su aplicación en humanos ha crecido de forma exponencial.

▪ Función hormonal

La restauración de la función hormonal ha sido demostrada en varios trabajos (von Wolff M 2009). La recuperación de la actividad ovárica se suele

conseguir entre los tres meses y medio y los seis meses y medio después del reimplante, detectándose un aumento de los niveles de E₂ y una disminución de FSH a una media de 4,5 meses (Donnez J 2013).

▪ **Fertilidad**

En el campo de la fertilidad son a día de hoy, 60 los recién nacidos vivos publicados o comunicados tras el implante de corteza ovárica, bien espontáneamente o tras estimulación hormonal y técnicas de reproducción asistida (Donnez J 2015) (Figura 17). Se desconoce el número exacto de cortezas conservadas y el número de reimplantes realizados, por lo que durante muchos años ha sido difícil dar una estimación de las probabilidades de concebir tras CCO. Un trabajo muy reciente, recoge “ese denominador” que representa el número de cortezas implantadas en las principales series conocidas de pacientes de 5 países (España, Dinamarca, Bélgica, Alemania y Australia) y sobre un total de 111 reimplantes, se han comunicado 33 nacimientos, de forma que la proporción de madres que han concebido gracias a esta técnica es del 29 %. Es destacable que al menos 2 de ellas, han tenido 2 hijos cada una, confirmando la eficacia a largo plazo de la técnica. Este dato obtenido recientemente, ayuda en gran medida a dar una información realista a las pacientes y sus familias sobre el procedimiento y por otra parte porque según varios autores es más una cifra suficiente para dejar de considerar la CCO como una técnica experimental (Donnez J 2015).

La edad de la paciente y la reserva ovárica inicial son factores cruciales para el éxito de la técnica. Pacientes mayores de 40 años no son buenas candidatas para la CCO ya que el índice de embarazo después del trasplante es muy bajo en este subgrupo (von Wolff M 2009).

▪ **Pacientes prepúberes**

Hace muy poco, se ha publicado el primer recién nacido procedente del implante de tejido ovárico recogido en etapa prepúber. El equipo de Demestere, describe el caso de una paciente de 13 años, prepúber, que fue sometida a TPH por una anemia de células falciformes avanzada. Su acondicionamiento incluyó busulfán y CFM, ocasionándole FOP poco después. Se le indujo hormonalmente la menarquia con 15 años y posteriormente precisó THS. Tras 10 años de seguimiento manifestó su deseo de ser madre y se reimplantaron 2 fragmentos que normalizaron los niveles hormonales y reinstauraron la menstruación. A los 2 años del implante y de manera espontánea, la paciente quedó embarazada dando a luz a un niño sano (Demeestere I 2015).

La inducción de la pubertad a través del implante de tejido ovárico, es un tema muy controvertido en cuanto a su indicación, pero que demuestra el funcionamiento del tejido recogido a edades muy precoces (Poirot C 2012).

Figura 17 : Resumen de los 60 recién nacidos tras autotrasplante de corteza ovárica

Table 1 Series of 60 live births after transplantation of frozen-thawed ovarian cortex

	Cryopreservation procedure	Number of transplanted women desiring pregnancy	Number of live births (..)=ongoing pregnancies
Donnez and Dolmans et al.	SF	19	8 (+1)
Meirow et al.	SF	NA	6
Demeestere et al.	SF	NA	3
Andersen's et al.	SF	25	8
Silber et al.	SF	6	4
Piver et al. and Roux et al.	SF	NA	3 (+1)
Pellicer et al.	SF	33	6 ^a (+3)
Revel et al.	SF	NA	2
Ditrich et al.	SF	20	6
Revelli et al.	SF	NA	1
Callejo et al.	SF	NA	1
Stern, Gook, and Rozen	SF	14	3 ^a
Kawamura and Suzuki et al.	VF	NA	2
Burmeister and Kovacs, et al.	SF	2	1
Rodriguez-Wallberg and Hovatta et al.	SF	NA	1
Tanbo et al.	SF	2	2
Agarwal et al. ^b	SF	NA	1
Makolkin et al., and Kalugina et al. ^b	SF	NA	2

Adapted from Fertil Steril [9], the Lancet [10], from two correspondences to the Lancet by Rozen et al. [16], by Andersen [11], and from two publications by Rodriguez-Wallberg et al. [17] and by Tanbo [18]

SF slow freezing, VF vitrification

^aTwins

^bPersonal communication

Extraído de: Donnez J. Ovarian cortex transplantation: 60 reported live births brings the success and worldwide expansion of the technique towards routine clinical practice (2015)

4.3.2.3 Riesgo de contaminación en el tejido ovárico con células malignas

La posibilidad descrita de reintroducir células malignas en el momento del auto trasplante y el potencial riesgo de que reaparezca la enfermedad oncológica es un apartado de especial consideración.

▪ Posibilidad de metástasis en el ovario

La mayoría de tumores sólidos en edad pediátrica tienen poca capacidad de metastatizar al ovario. Esto incluye tumores cerebrales, óseos, tumor de Wilms y EH entre los más frecuentes. Por el contrario y de forma llamativa un estudio demostró que hasta el 25-50 % de las autopsias de pacientes con neuroblastoma presentaban metástasis ováricas (Oktay K 2001).

Por otra parte las neoplasias hematológicas, como las leucemias e incluyendo también el linfoma Burkitt y linfoblástico presentan un riesgo mayor. En edad adulta se añaden a este grupo los cánceres de mama y colon en estadio avanzado.

Actualmente se dispone de técnicas altamente sensibles que podrían detectar macro o micro metástasis en el ovario: Inmunohistoquímica (IHQ), reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR), además de las tradicionalmente utilizadas pruebas de imagen preoperatorias y de la histología convencional (von Wolff M 2009) (Meirow D 2008) (Rosendahl M 2013).

▪ **Trabajos relacionados**

En los últimos años se han multiplicado los trabajos que intentan investigar a fondo este tema. Un estudio de Meirow en el que se analizó mediante histología 8 muestras de CO de pacientes con LMA no revelaba infiltración neoplásica en el tejido. En este mismo estudio estudiaron 2 muestras mediante RT-qPCR y en una de ellas se detectó la presencia de células malignas (Meirow D 2008).

Rosendahl y su grupo, analizaron la corteza ovárica criopreservada de 26 pacientes con leucemia. No encontraron células malignas a nivel histológico, pero sí fueron detectadas mediante técnicas moleculares (Rosendahl M 2010). Dolmans y colaboradores llevaron a cabo un estudio más exhaustivo incorporando experimentos in vivo para comprobar la existencia de células malignas en el tejido ovárico criopreservado. Analizaron la corteza criopreservada de 18 pacientes leucémicas 6 de ellas con Leucemia Mieloide Crónica (LMC) y 12 con LLA. Nueve de los casos estudiados (2 de LMC y 7 de LLA), con marcadores moleculares rastreables, resultaron ser positivos indicando la presencia de células malignas en el tejido ovárico. Mediante técnicas tradicionales de detección de metástasis (IHQ) no se detectaron células malignas en ninguno de ellos. Además observaron que la QT antes de la CCO no excluía la contaminación con células malignas del tejido (Dolmans MM 2010).

Por otro lado, Greve y colaboradores han publicado recientemente que pacientes con leucemia en RC no presentan células malignas en el tejido ovárico. Estudiaron el tejido in vivo de 25 pacientes con leucemia en RC, tanto antes del xenotrasplante a ratones, como pasadas 20 semanas, mediante técnicas histológicas, IHQs y moleculares. Ninguno de los trasplantes reveló signos de enfermedad, ni en la pieza de tejido ovárico trasplantado ni en los órganos murinos evaluados. Con estos resultados sugieren que la CCO y posterior autotrasplante en pacientes con leucemia en RC podría estar indicada (C.-L. E. Greve T 2012). Más tarde el mismo grupo llevó a cabo el análisis de corteza ovárica procedente de 16 pacientes con sarcoma (9 con sarcoma de Ewing, 4 con osteosarcoma, 2 con sarcoma sinovial y 1 con condrosarcoma) mediante técnicas histológicas, IHQs y moleculares. En ninguno de los casos encontraron contaminación de células tumorales en el tejido ovárico criopreservado (Greve T 2013).

De los principales trabajos publicados se deduce que las técnicas moleculares son mucho más sensibles que las histológicas en la detección de células malignas. Globalmente la mayoría de grupos sigue considerando contraindicado el reimplante del tejido criopreservado en pacientes con neoplasias hematológicas a pesar de la negatividad de las pruebas de detección (Dolmans MM 2010).

▪ **Opciones para evitar el reimplante de células malignas**

La maduración in vitro de algunos de los FP extraídos con la CCO y su posterior fecundación cuando la paciente alcance la edad adulta (gracias a técnicas de reproducción asistida), ha abierto en los últimos años un nuevo frente experimental muy prometedor para pacientes con algún riesgo de contaminación de células malignas durante el reimplante. Su aplicación en modelos animales se ha conseguido en la actualidad y se están dando pasos importantes en la especie humana aunque todavía queda lejos de aplicarse en la clínica. El equipo de Telfer desde hace varios años, está trabajando intensamente en este tema, ya que de conseguirse, se abrirían opciones reales para las paciente púberes y prepúberes con enfermedades hematológicas que solo cuentan con la CCO como alternativa de PF (Telfer EE 2013) (Telfer EE 2008). Recientes publicaciones describen la existencia de diferencias en la activación y crecimiento de folículos dependiendo de si proceden de un ovario prepúber o adulto, haciendo hincapié en los cambios fisiológicos que la pubertad ocasiona sobre el pool folicular (Anderson RA 2014).

Del mismo modo la IVM de folículos antrales en el mismo momento de la CCO tal y como se ha descrito anteriormente también amplia las opciones a este subgrupo de pacientes.

4.3.2.4 Momento óptimo de realización CCO.

La realización de esta técnica y sus posibilidades de éxito se fundamentan en una adecuada reserva folicular en el tejido ovárico (Donnez J 2013). La premisa de no haber recibido QT previa a su realización, es uno de los pilares de sus indicaciones para la mayoría de grupos, aunque son bien conocidas las excepciones en todas las series.

Bajas dosis de QT pueden afectar al ovario, sobre todo al pool de folículos en crecimiento o maduros con la consecuente interrupción de las menstruaciones poco después de iniciar tratamiento antineoplásico (Meirow D 2010). Aunque teóricamente dosis bajas de QT respetarían el pool de FP, en cierta medida también puede haber un impacto negativo sobre la función ovárica a largo plazo incluyendo el potencial fértil. Este efecto dependería del tipo de agente utilizado, la dosis administrada y sobre todo la edad de la paciente.

El grupo de Wallace, en referencia a este tema, plantea entre las indicaciones la posibilidad de incluir a pacientes menores de 15 años que hubieran recibido QT no gonadotóxica a dosis bajas, constatando así la importancia de estos 3 factores (Anderson RA 2015).

Los motivos por los que una paciente candidata a CCO puede haber recibido QT antes del procedimiento son diversos. La necesidad de iniciar un tratamiento con urgencia, una mala situación clínica inicial y el no disponer de un equipo de PF en el mismo hospital, suelen ser los motivos más habituales. Por otra parte en ocasiones es difícil saber al debut cual va a ser el tratamiento completo de una paciente, ya que hay algunos factores (número de ciclos totales, o la decisión de administrar RT o no y su dosis) que dependen fundamentalmente de la respuesta al mismo.

4.3.2.4.1 Leucemias

La leucemia aguda es el tipo de cáncer más común en la edad pediátrica. Presenta una incidencia de 3-4 casos por cada 100000 niños suponiendo el 30% de todos los casos oncológicos infantiles. En el 80-85% de los casos se trata de una LLA, con unos altos índices de curación a largo plazo (85%) y en el 15-20 % LMA con unas probabilidades globales menores (hasta un 60%) (Peris Bonet R 2015) (Pizzo PA 2011).

▪ Leucemia Linfoblástica Aguda

En la mayoría de pacientes el tratamiento se limita a la QT. Se inicia con la fase de **inducción** que busca conseguir la RC empleando agentes QTS múltiples: prednisona, vincristina, asparraginas, daunoblastina y CFM a dosis bajas. Le sigue la fase de **consolidación** y profilaxis de recaídas extramedulares con metotrexate y arabinósido de citosina a altas dosis. Los pacientes de alto riesgo reciben a continuación tratamiento de **intensificación**. Se completa el tratamiento con mercaptopurina y metotrexate oral durante 2 años en aquellos pacientes que no tienen indicación de TPH.

Los pacientes considerados de muy alto riesgo y los lentos respondedores a esteroides o a la QT pueden necesitar consolidar el tratamiento con TPH. Las indicaciones no están absolutamente definidas y varían según los protocolos terapéuticos y los grupos de estudio-tratamiento (Ribelles A 2015) (Figura 18).

▪ Leucemia Mieloblástica Aguda

El pronóstico de la LMA es peor que el de la LLA, pero ha mejorado los últimos años como consecuencia de la intensificación terapéutica e inclusión del TPH. A diferencia de la LLA, la prolongación del tratamiento no mejora los resultados. Se utilizan ciclos intensivos de QT con el fin de eliminar todo el clon leucémico. Son ciclos muy mielosupresores dado que la enfermedad se localiza

en la hematopoyesis mieloide. Los fármacos más eficaces son las antraciclinas y la citarabina. En nuestro protocolo en curso (SHOP LMA-2007) se administran dos ciclos de idarrubicina, ara-c y etopósido. Si se logra la RC, se completa con 1-2 ciclos de consolidación con ara-c a altas dosis y mitoxantrone y en la mayoría de los casos posteriormente con TPH (Figura 18).

Tanto en la LLA como en la LMA se emplea QT intratecal con metotrexato, arabinósido de citosina e hidrocortisona como profilaxis y/o tratamiento de la posible infiltración del SNC.

Como vemos entonces, en el caso de las leucemias, la indicación o no del TPH, se basa fundamentalmente en 2 aspectos: características morfológicas, inmunofenotípicas, citogenéticas o moleculares de la enfermedad (datos estos últimos que con frecuencia no se disponen hasta pasados unos días del diagnóstico) y fundamentalmente la respuesta al tratamiento, que suele evaluarse habitualmente tras el primer mes de QT (Pizzo PA 2011).

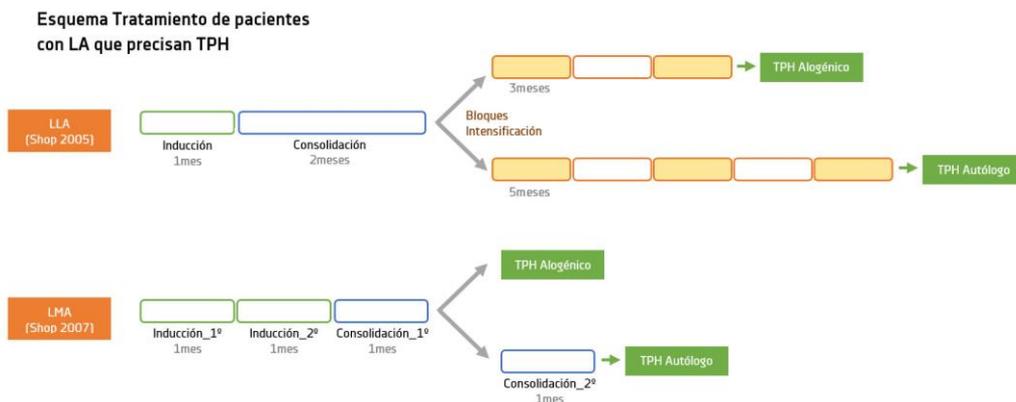
▪ **CCO en pacientes con leucemia**

La necesidad del TPH es lo que justifica la indicación de CCO ya que la QT administrada previamente es considerada poco gonadotóxica. Los agentes utilizados en LLA globalmente no afectan a la reserva folicular y la CFM que sí se utiliza y que es el único AA se emplea a bajas dosis. Como ya se ha comentado, la citarabina empleada en la LMA no parece perjudicar a largo plazo la función ovárica (Leung W 2000) (Molgaard-Hansen L 2013) (ISFP Practice Committee 2012). Globalmente se considera que las LLA y LMA que no van a precisar un TPH presentan un riesgo gonadotóxico inferior al 20% (Shapira M 2014).

Nos encontramos por tanto con un perfil de pacientes muy concreto:

1. Pacientes clínicamente inestables al debut dada la enfermedad de base.
2. Iniciarán en todos los casos QT (considerada poco gonadotóxica) para conseguir entrar en RC lo antes posible, y en condiciones normales lo conseguirán en 1-2 meses. En ese tiempo habitualmente se conocerá en cuáles está indicado el TPH.
3. Una vez asentada la indicación del TPH recibirán varios ciclos de QT adicionales (también considerada poco gonadotóxica) para consolidar la RC (entre 2-6 ciclos, dependiendo de si LMA/LLA).
4. Posteriormente se acondicionarán habitualmente con regímenes que incluyen TBI y/o Busulfán (ambos con conocido efecto esterilizante y causantes de FOP) y posterior rescate con TPH.

Figura 18 : Esquema de tratamiento en pacientes pediátricas con LA



La necesidad de ofrecer técnicas de PF a pacientes con estas características queda confirmada en numerosos trabajos publicados hasta la fecha, ya que se consideran de alto-muy alto riesgo gonadotóxico superior al 80% (Lee SJ 2006) (Loren AW 2013) (Wallace WH 2005) (Shapira M 2014). La indicación es clara para muchos grupos aun sabiendo que el auto trasplante de tejido a día de hoy no está indicado en estas pacientes y que muy probablemente deberán beneficiarse de estrategias alternativas en marcha o en experimentación (IVM, maduración folículos primordiales) (Dolmans MM 2010).

- Momento óptimo de CCO en pacientes con LA

Decidir en todo este proceso, cuál es el momento óptimo de realizar la CCO, no es sencillo. Las opciones pueden variar desde:

- Realizarla poco después del inicio del tratamiento con la ventaja de haber recibido menos carga de QT y las desventajas de: no conocer con exactitud si existe indicación del TPH, posibilidades de no estar en RC y probablemente la necesidad de procedimiento anestésico /quirúrgico independiente para la CCO.
- Una segunda opción sería plantearla tras conseguir la RC y antes de someterse a los ciclos de consolidación e intensificación, con la ventaja de haber recibido también relativa poca carga de QT previa a la CCO. La desventaja del procedimiento anestésico/quirúrgico adicional sería igual que en el caso anterior y cabe la posibilidad de que la indicación del TPH todavía no esté bien establecida.
- Una última opción sería realizar la CCO tras conseguir la RC y justo antes de recibir el TPH. Las ventajas que ello supondría incluyen: RC conseguida y consolidada, indicación certera del TPH y la posibilidad de hacer coincidir el procedimiento con la colocación bajo anestesia general de un CVC, habitualmente tipo Hickman, necesario para la

realización del TPH en la mayoría de los centros. Al ser el TPH un procedimiento de alta complejidad y que requiere de una programación muy concreta, esta opción también permitiría derivar a las pacientes a un centro de referencia de PF con la suficiente antelación. La desventaja principal sería contar con una dosis acumulada de QT mayor (inducción, consolidación \pm intensificación) aunque considerada en su totalidad como de baja gonadotoxicidad.

▪ **Experiencias publicadas de CCO con o sin QT previa**

Sobre estas opciones descritas no existe mucha literatura publicada y cada centro realiza el procedimiento según su criterio. El grupo de Donnez, sobre un total de 58 pacientes pediátricas y adolescentes, tan sólo refieren 5 casos que hubieran llevado QT previa y en 3 se trataba de recurrencia, por lo que probablemente su administración estuviera bastante alejada de la CCO (Jadoul P 2010).

Contrariamente, Poirot y colaboradores publicaron su experiencia pediátrica en 2007, con 47 pacientes pediátricas y en todos los casos habían recibido QT con distinta intensidad previa a la CCO y al tratamiento considerado altamente gonadotóxico (Poirot CJ 2007). Feigin en 2007, sobre un total de 27 pacientes con mediana de edad de 14 años en el momento de CCO, informa de administración de citostáticos previamente en la mitad de los casos (Feigin E 2007).

Respecto a las pacientes **hematológicas**, el trabajo de Shapira en 2014, propone que las pacientes con leucemia (LMA y LLA), puedan recibir inicialmente varios ciclos de QT antes de la CCO, eliminando así las células malignas de la sangre y que ésta técnica se realizaría sólo en aquellos casos donde fuera a realizarse un TPH. Bajo la premisa de que si la paciente se encuentra en RC la probabilidad de encontrar células leucémicas en el ovario son mínimas y que además podrían ser rastreables gracias a las técnicas de enfermedad mínima residual (EMR), este y otros equipos no hacen una oposición franca al reimplante del tejido en este grupo de pacientes (Greve T 2012) (Shapira M 2014).

4.3.2.5 Particularidades de CCO en población pediátrica

Al seguir considerándose una técnica experimental, la CCO en edad pediátrica debería: restringirse a unas indicaciones muy concretas, tener en cuenta una serie de particularidades por tratarse de paciente menores y realizarse en centros con experiencia, a ser posible en el ámbito de ensayos clínicos.

▪ **Criterios de inclusión en un programa de PF**

Desde hace 10 años los criterios planteados por el equipo de Wallace en Edimburgo (Figura 19) han sentado las bases de los programas de PF que incluyen a pacientes menores y globalmente son aceptados aunque con algunos matices.

Figura 19 : Criterios de inclusión de pacientes para criopreservación de tejido gonadal según el equipo de Edimburgo

Panel 2: The Edinburgh Selection Criteria for gonadal tissue cryopreservation

These criteria were established with ethics committee review and approval because they refer to experimental procedures, and should be regarded as a starting point for future discussion, research, and refinement.

Female patients¹²

- Age younger than 35 years
- No previous chemotherapy or radiotherapy if aged 15 years or older at diagnosis, but mild, non-gonadotoxic chemotherapy is acceptable if younger than 15 years
- A realistic chance of 5-year survival
- A high risk of premature ovarian insufficiency (>50%)
- Informed consent (parent and, when possible, patient)
- Negative HIV, syphilis, and hepatitis serology
- Not pregnant and no existing children

Male patients

- Age 0–16 years
- A high risk of infertility (>80%)
- Unable to produce a semen sample by masturbation
- No clinically significant pre-existing testicular disease (eg, cryptorchidism)
- Informed consent (parent and, when possible, patient)
- Negative HIV, syphilis, and hepatitis serology

Extraído de: Anderson RA. Cancer treatment and gonadal function: experimental and established strategies for fertility preservation in children and young adults (2015)

- Cálculo del riesgo de FOP

Habitualmente el cálculo de riesgo de FOP tras un cáncer pediátrico surge de la clasificación también publicada por Wallace en el 2005 (Figura 20) atendiendo a la intensidad de tratamiento que iban a recibir cada uno de los pacientes diagnosticados y su posterior adaptación a los distintos protocolos según países/centros (Wallace WH 2005). La propuesta de este grupo es ofrecer técnicas de FP aquellas pacientes con un riesgo de gonadotoxicidad > 50%.

Por otra parte, cabe destacar que a lo largo del tiempo esta clasificación ha ido sufriendo alguna modificación según los datos de seguimiento de función ovárica a largo plazo y según las adaptaciones de algunos protocolos

internacionales que han intentado minimizar al máximo los efectos secundarios gonadales, como por ejemplo en la EH donde se ha substituido en la primera línea de tratamiento a la procarbacin por dacarbacin (Anderson RA 2015).

El riesgo de insuficiencia ovárica para cada caso concreto en ocasiones es difícil de calcular y algunos autores proponen un límite algo menor a la hora de plantearse técnicas de PF (> 30%) (ISFP Practice Committee 2012).

Figura 20 : Riesgo gonadotóxico calculado según diagnóstico y posible tratamiento previsto

RIESGO ESTIMADO DE DISFUNCIÓN GONADAL SEGÚN CÁNCER		
ALTO RIESGO (>80%)	INTERMEDIO	BAJO RIESGO (<20%)
TBI	LMA ¿?	LLA ¿?
RT LOCALIZADA	HEPATOBLASTOMA	TUMOR WILMS
ACONDICIONAMIENTO TPH	OSTEOSARCOMA	RETINOBLASTOMA
L. HODKING (ALQUILANTES)	L. HODKING (OTROS TT*)	TUMOR CÉLULAS GERMINALES (NO RT Y PRESERVACIÓN DE GÓNADAS)
SARCOMA PB ESTADIO IV	SARCOMA PB ESTADIO II-III	SARCOMA PB ESTADIO I
S. EWING METASTÁSICO	S. EWING NO METAST	
	LINFOMA NH	
	NEUROBLASTOMA	
	TUMOR CEREBRAL: RT CRANEOESPINAL O CRANEAL > 24 Gy	TUMOR CEREBRAL: SÓLO CIRUGÍA O RT CRANEAL < 24 Gy

Extraído/Traducido de: Wallace WHB. Fertility preservation for young patients with cancer: who is at risk and what can be offered? (2005).

- Pronóstico y técnicas de PF

La esperanza razonable de vida, también es un punto controvertido. Globalmente las cifras de supervivencia en el cáncer infantil son superiores a las de los adultos y decidir por debajo de qué porcentaje descrito de curación a largo plazo se pueden plantear técnicas de PF no es sencillo y hasta la fecha nadie ha publicado dicho límite. Parece claro que existen algunas entidades donde la intención inicial del tratamiento ya es paliativa, y donde sería altamente cuestionable su indicación, pero globalmente en pediatría estos casos suponen una excepción (Andres MM 2009).

- Edad mínima para realizar CCO

La edad máxima para su proposición es un punto muy controvertido especialmente entre los especialistas de reproducción ya que a mayor edad, menor es la posibilidad de encontrar una reserva folicular adecuada en la CCO.

Sin embargo se ha publicado muy poco sobre un punto de corte inferior. Dada la fisiología del ovario, es una técnica potencialmente utilizable desde el nacimiento, pero actualmente se cuenta con muy pocos datos en pacientes por debajo de los 5 años. El equipo de Donnez en su serie, publica una paciente de 10 meses (Jadoul P 2010) sin especificar si existía límite de edad inferior entre las indicaciones, mientras que otros grupos si han considerado ofrecerla a mayores de 1 año por el riesgo anestésico añadido en pacientes menores de esta edad (Shapira M 2014).

- Coincidencia con otros procedimientos que requieran anestesia

La técnica habitualmente se realiza por vía laparoscópica y varios grupos consideran importante que su ejecución coincida con otros procedimientos que requieran anestesia como inserción catéter venoso central (CVC), intervención del tumor, punción lumbar (PL) o aspirado de Médula ósea (AMO) (Anderson RA 2008) (Revel A 2009).

- QT previa a la CCO

Idealmente las pacientes no deberían haber recibido ninguna QT previa, pero en el caso de las pacientes pediátricas, como ya hemos comentado y bajo la premisa de una mayor reserva ovárica, es aceptable plantearlo en aquellas de alto riesgo, que hayan recibido previamente una QT no gonadotóxica (Anderson RA 2015) (Shapira M 2014).

- Consideraciones éticas y legales

La aplicación de estas técnicas ha de tener presente el marco legal de cada país, incluso comunidad autónoma. En este caso no sólo está implicada la normativa sobre recogida y uso de células germinales, sino que además se ha de plantear en el contexto de pacientes menores de edad.

Las decisiones tomadas de acuerdo a “**los mejores intereses para el niño**”, respaldan a padres y profesionales cuando los menores no tienen madurez suficiente para decidir (Wallace WH 2005). Cuando hablamos del caso concreto de ensayos clínicos en menores de edad, debemos tener en cuenta además que éstos solo pueden ser realizados si ellos son los beneficiarios directos del ensayo. Si además son pacientes mayores de 12 años, la ley vigente determina, que deberían ser consultados y dar su aprobación en el caso de entender y asimilar adecuadamente la información recibida (Andres MM 2009).

La propuesta de un **consentimiento informado** en 2 etapas, la primera para permitir la recolección de células germinales en el momento del diagnóstico y la segunda para decidir su uso cuando el paciente alcance la edad adulta, cobra cada vez mayor importancia en algunos centros (Grundy R 2001) (Grundy R 2001) (Patrizio P 2005) (Wallace WH 2005). Por otra parte, la custodia

de las muestras en el caso de fallecimiento de los pacientes, también debería quedar recogida en estos documentos (Patrizio P 2005) (Robertson 2005).

El abordaje multidisciplinar del tema, incluyendo los aspectos biológicos y psicosociales del paciente y su familia es fundamental, especialmente en el caso de menores. No es habitual ni fácil plantear el tema de la descendencia de pacientes tan jóvenes teniendo en cuenta que además coincide en el tiempo con una enfermedad muy grave recién diagnosticada (Andres MM 2009).

4.3.3 Programas de preservación fertilidad en pacientes pediátricas oncológicas

En los últimos años los avances cometidos en el campo de la medicina reproductiva, han sido muy importantes. El desarrollo de las diferentes técnicas de PF ha abierto un camino muy esperanzador para muchas pacientes y recientemente también para las más jóvenes.

El abordaje multidisciplinar de este tema resulta fundamental. La colaboración entre oncólogos, ginecólogos, cirujanos, urólogos, anestesiastas, biólogos y psicólogos es totalmente necesaria ya que se entremezclan cuestiones médicas con aspectos psicosociales de los pacientes, en un tema nada trivial, como es el deseo y capacidad para tener hijos (Andres MM 2009). Ese abordaje, cuando se trabaja con pacientes menores, es todavía más importante y aquí la familia directa adquiere un papel protagonista.

El grupo de Wallace y Anderson en Edimburgo, lidera el abordaje desde la perspectiva de la OP y propone en un trabajo muy reciente toda una serie de factores a tener en cuenta a la hora de plantear estrategias de FP en niños y adultos jóvenes, muchos de ellos ya comentados anteriormente (Anderson RA 2015) (Figura 21).

Figura 21 : Factores intrínsecos y extrínsecos a considerar en estrategias de PF en niños y adultos jóvenes

Panel 1: Intrinsic and extrinsic factors for fertility preservation strategies in children and young adults⁹

Intrinsic factors

- Health status of patient
- Psychosocial factors
- Consent (patient or parent)
- Assessment of pubertal status
- Assessment of ovarian reserve (female patients)

Extrinsic factors

- Risk of predicted treatment (high, medium, low, or uncertain risk)
- Time available
- Expertise and technical options available

Extraído de: Anderson RA. Cancer treatment and gonadal function: experimental and established strategies for fertility preservation in children and young adults (2015)

El diseño de programas específicos de PF en centros con experiencia, son la clave para conseguir ofrecer estas opciones a un número cada vez mayor de personas y además ir progresivamente mejorando, complementando y ampliando las alternativas para cada subgrupo de pacientes atendiendo a su edad, enfermedad, necesidad de tratamiento precoz y riesgo futuro de gonadotoxicidad.

4.3.3.1 Situación actual a nivel internacional

A nivel internacional son varios los grupos que trabajan con intensidad este tema y es previsible un efecto dominó en los próximos años, como se refleja en el gran número de publicaciones recientes. El año 2009 se creó la Sociedad Internacional de Preservación de la Fertilidad (ISFP), que agrupa a los principales equipos de Europa, América y Asia que lideran esta sección de la medicina reproductiva y cuyo objetivo es servir de plataforma de investigación y colaboración en este campo.

No existen grupos pediátricos específicos de PF y habitualmente las personas más implicadas en el trabajo con menores suelen formar parte de los equipos generales integrados mayoritariamente por especialistas en reproducción. Hay que destacar que algunos centros, que ofrecen técnicas de PF para adultas, no realizan ninguna para pacientes pediátricas. El Dr. Hamish Wallace, oncólogo pediatra en Edimburgo, es a nivel internacional la persona

que lidera actualmente los temas relacionados con la PF en los niños, niñas y adolescentes con cáncer.

▪ **Actividad publicada de series de pacientes en los que se ha realizado CCO que incluyen a pacientes menores**

Resumimos la actividad de los equipos más importantes en relación a la PF con CCO en niñas y adolescentes (fundamentalmente con cáncer) que haya sido publicada.

• Grupo de Donnez (2010)

El grupo de Donnez en Bruselas, publicaba en 2010 su experiencia en menores de 16 años. Informaban de 58 pacientes sometidas a CCO desde el 2001 al 2009, con una edad media de $10,4 \pm 4,4$ años y 48 de ellas diagnosticadas de un cáncer (incluyendo 14 casos de LLA/LMA). La paciente más pequeña de la serie contaba sólo con 10 meses en el momento de la intervención y 38 eran prepúberes. Solamente 5 de ellas habían recibido QT previa, 3 por recurrencia. Entre los 0 y 5 días tras CCO iniciaron tratamiento antineoplásico. Aunque en la mayoría se realizaron biopsias múltiples de corteza ovárica, en 20 casos se practicó una ooforectomía y en 4 además se asoció ooforopexia. De acuerdo a los criterios propuestos por Wallace, 14 eran de bajo riesgo gonadotóxico, 32 de medio y 4 de alto, aunque 4 pacientes del primer grupo y 4 del segundo, finalmente y dada la evolución de la enfermedad finalmente quedaron en del alto riesgo, destacando por parte de los autores la dificultad inicial para seleccionar a las pacientes candidatas (Jadoul P 2010).

• Grupo de Wallace (2014)

El equipo de Wallace y Anderson en Edimburgo publicaban en 2014, una revisión de su experiencia entre los años 1996 y 2012 y evaluaban la aplicación de sus criterios de inclusión (Panel de Edimburgo). La gran mayoría eran tumores sólidos. Globalmente habían ofrecido CCO al 8% de las pacientes y la habían realizado en 5%. En total CCO realizada a 20 pacientes, con edades comprendidas entre 1,2 y 16,4 años. Comparaban la prevalencia de FOP entre aquellas a las que se les había ofrecido y las que no (en el caso de que fueran evaluables en ambos casos) y encontraban un 35% de FOP en las que se había ofrecido COP vs 1% en las que no, con un RR de FOP en aquellas en las que se había planteado de 56,8 (IC 95% 6,2-521,6) (Wallace WHB 2014).

• Grupo de Poirot (2007)

El equipo de Poirot en París, publicaba en el 2007, su experiencia desde 2000 a 2005 en 49 pacientes prepúberes, incluyendo 20 casos de neuroblastoma metastásico y 6 de neoplasias hematológicas. En todos las pacientes el riesgo gonadotóxico era muy alto y en todos los casos las pacientes habían recibido QT previa no/poco gonadotóxica. Realizaron ooforectomía completa en todas ellas.

En la AP de 43 de ellas se observaba la presencia de FP con una fuerte correlación inversa entre el número de folículos y la edad (Poirot CJ 2007).

- Grupo de Revel (2009)

El equipo de Revel en Jerusalem, publicaba una serie de 19 pacientes con una mediana de edad de 15 años (rango 5-20). Asociaban la CCO a IVM donde encontraron 129 ovocitos inmaduros en 17 casos, con un mediana de 9 (rango 0-37). Encontraron 7, 8 y 17 ovocitos inmaduros en 3 pacientes de 5, 8 y 10 años respectivamente, obteniendo una tasa de maduración global del 34%, no influenciada por la edad. En la franja de 5-10 años, en el 33% de las pacientes se criopreservaron dichos ovocitos tras la maduración. En todas realizaron ooforectomía completa, con las premisas de alto riesgo gonadotóxico, pequeño volumen ovárico y no demostración de empeoramiento de fertilidad en pacientes con un solo ovario (Revel A 2009).

- Grupo de Demesteree (2014)

El grupo de Demesteree en Bruselas, presenta en 2014, una serie de 225 pacientes sometidas a CCO, donde 45 de ellas (20%) eran prepúberes, con rango de edades comprendidos entre 0,8 y 17 años. De este grupo, el 58% de los casos estaban diagnosticadas de enfermedades benignas hematológicas que iban a requerir TPH y el 27% de los casos eran pacientes con LA. En la serie no encontraron diferencias en la densidad folicular entre las que habían recibido QT previa y las que no. El seguimiento de las prepúberes, solo se describe en 13 casos (8 todavía en edad prepúber) y 10 de las mismas estaban diagnosticadas de FOP.

- Grupo de Feigin (2007)

Feigin, publica en 2007 una serie de 23 pacientes procedentes de Tel Aviv, con una mediana de edad de 14 años a las que se había sometido a CCO desde el año 1998. En 11 casos habían llevado QT previa (Feigin E 2007).

4.3.3.2 Situación actual a nivel nacional

La inquietud de los profesionales sanitarios dedicados a la OP de nuestro país por reducir o evitar al máximo los efectos secundarios derivados del tratamiento oncológico es y ha sido en el pasado muy alta. En los últimos años se han creado diversos grupos de trabajo con enfoque prioritario a este tema.

Desde el grupo de la Sociedad Española de Oncología Pediátrica (SEHOP), el interés por el tema de la fertilidad ha sido creciente y se comprueba en la inclusión de este tema en muchos foros y congresos recientes. Tanto el grupo específico de efectos secundarios como el de reciente creación de adolescentes, han realizado encuestas a nivel de todos los centros integrantes para: conocer la situación de información e interés de los profesionales por el

tema de la PF, analizar en qué proporción se realizan derivaciones de los pacientes a centros específicos y con qué recursos se cuentan en las diferentes comunidades autónomas (resultados de la encuesta todavía no disponibles).

A día de hoy, el principal escollo, es que a pesar de que los profesionales y familias están muy sensibilizados con el tema son pocos los hospitales que cuentan con los requisitos legales para realizar estos procedimientos en pacientes menores (y tampoco en adultas).

En España, a día de hoy sólo son 2 centros (en Comunidad Valenciana y Cataluña) los que cuentan con técnicas de PF que incluyan a niñas en el ámbito de instituciones sanitarias y banco de tejidos público, aunque sólo nuestro hospital cuenta con un programa específicamente diseñado para pacientes pediátricas y adolescentes.

La primera CCO llevada a cabo en España fue realizada en El hospital San Joan De Deu de Barcelona en año 2000. Sin embargo, hasta el año 2010 no se consiguió en España la primera gestación mediante esta técnica llevada a cabo en el Hospital Dr. Peset de Valencia de la mano de la Dra. María Sánchez que inició dicho programa en el año 2005 convirtiéndose así en el grupo pionero en la técnica de CCO en nuestro país y un referente a nivel internacional (Sánchez M 2010) (Sánchez M 2007) (Sánchez M 2008). En 2008 se inició el Programa de PF en el Hospital La Fe y ambos se fusionaron un año más tarde, convirtiéndose este último centro, en la sede del Programa Valenciano de Preservación de Fertilidad.

El Programa Valenciano de Preservación de Fertilidad compuesto por un equipo multidisciplinar de ginecólogos, pediatras, biólogos y psicólogos, atiende y asesora de manera individualizada a pacientes de la Comunidad Valenciana, así como de otras muchas regiones como Murcia, Castilla-La Mancha, Cantabria, Navarra, País Vasco, Galicia, Madrid y Andalucía. Este programa ofrece todas las alternativas de PF que existen en la actualidad, incorporando también desde 2012, la técnica de vitrificación de ovocitos. A día de hoy son 700 cortezas ováricas las que se encuentran criopreservadas, con rango de edades entre los 2 y 40 años y con historia oncológica en la mayoría de ellas. Hasta la fecha se han llevado a cabo un total 33 reimplantes en mujeres adultas los cuales han resultado en 6 niños nacidos hasta la fecha y habiendo 3 embarazos en camino.

En el año 2008 se creó en el mismo centro un programa de PF específico para pacientes pediátricas atendiendo a las particularidades biológicas, psicológicas, sociales, éticas y legales que presentan, ampliándose en 2015 y por primera vez en nuestro país a niños prepúberes con patologías oncológicas. El Programa de PF para pacientes pediátricas se describe en la presente tesis doctoral, con el objetivo de estandarizarlo en niñas y adolescentes con cáncer a nivel nacional.

:: INTRODUCCIÓN

5 HIPÓTESIS

El establecimiento y la estandarización de un programa de preservación de fertilidad específico para niñas y adolescentes con cáncer a nivel nacional, puede realizarse en distintas etapas de la enfermedad y el tratamiento, con el objetivo de mejorar muy significativamente la calidad de vida de las supervivientes en la época adulta.

La definición de los criterios de selección y homogeneización de: las pruebas previas a la criopreservación de corteza ovárica, procedimiento quirúrgico, manipulación de las muestras y seguimiento de pacientes, contribuirá a mejorar el proceso en relación a su seguridad y eficacia, al tratarse de un procedimiento experimental y existir muy escasa experiencia en el campo de la pediatría tanto a nivel nacional como internacional.

Los tratamientos oncológicos aplicados a las pacientes pediátricas con leucemia aguda previos al trasplante de precursores hematopoyéticos, podrían conllevar un daño en el tejido ovárico y una pérdida de la población de folículos primordiales, que hiciese replantear la cronología de la criopreservación ovárica en este grupo de pacientes.

:: INTRODUCCIÓN

6 OBJETIVOS

El **objetivo principal** de esta tesis doctoral es la puesta en marcha y estandarización a nivel nacional e internacional de un programa de PF específico para pacientes pediátricas y adolescentes con riesgo gonadotóxico y establecer la cronología más adecuada de la CCO en pacientes con LA que vayan a recibir un TPH.

Los objetivos concretos son:

1. Adaptación y estandarización de los protocolos de CCO ya establecidos en pacientes adultas a pacientes pediátricas y adolescentes.
2. Diseñar una clasificación de riesgo gonadotóxico para pacientes pediátricas y adolescentes con cáncer tratadas en nuestro país.
3. Definir los criterios de selección a nivel nacional para el planteamiento de técnicas de FP.
4. Desarrollar circuito multidisciplinar previo a la realización de la CCO.
5. Establecer la técnica quirúrgica óptima para la CCO y las circunstancias idóneas del procedimiento anestésico.
6. Estructurar la manipulación y organización de muestras, así como los estudios necesarios para descartar presencia de células tumorales en las mismas
7. Desarrollar un circuito de seguimiento de pacientes pediátricas sometidas a CCO.
8. Determinar la prevalencia de FOP en un cohorte de pacientes pediátricas sometidas a CCO.
9. Estudio estructural tejido ovárico tras la administración de tratamiento QT previo al TPH en pacientes con LA.
10. Evaluación del grado de activación folicular del tejido ovárico mediante el estudio de la expresión proteica y génica del FoxO3 tras la administración de tratamiento QT previo al TPH en pacientes con LA.
11. Estudio del daño celular a nivel del estroma ovárico tras la administración de tratamiento QT previo al TPH en pacientes con LA.
12. Establecer con los datos obtenidos el momento idóneo de CCO en pacientes pediátricas diagnosticadas de LA.

:: METODOLOGÍA

7 MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se ha estructurado en 2 apartados diferenciados con algunos aspectos comunes en cuanto a metodología.

- La primera línea de trabajo, se trata de un estudio retrospectivo descriptivo trasversal de todas las pacientes pediátricas que han formado parte del programa de PF.
- La segunda línea de trabajo consiste en un estudio observacional de casos y controles en un subgrupo de las propias pacientes incluidas en el programa de PF.

La realización de este trabajo fue aprobado por el comité ético de Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia. El lugar de realización ha sido el mismo centro. Todos los padres o responsables legales de las pacientes fueron informados de las características del programa y firmaron un consentimiento informado para participar voluntariamente en el mismo. Las pacientes mayores de 12 años, al tratarse de un procedimiento considerado experimental firmaron ellas junto con sus padres el consentimiento.

La puesta en marcha del programa fue inicialmente financiada (2008-2010) por la Fundación de Investigación La Fe a través de una beca contrato post-Mir (Bancaja) adjudicada a la doctoranda.

7.4 Programa de preservación de fertilidad en niñas y adolescentes con cáncer

7.4.1 Pacientes

Revisión de base de datos e historia clínica de pacientes de la Unidad de OP del Hospital Universitario y Politécnico La Fe que han sido sometidas a CCO como método de PF. Las pacientes podían haber sido diagnosticadas y tratadas en el propio centro o bien en otros hospitales y ser remitidas para este procedimiento.

7.4.1.1 Criterios de inclusión

- Pacientes mayores de 2 años y menores de 15 años (mayores de 15 años, quedan incluidas en el programa de PF de adultas del propio hospital)
- Diagnosticadas de una neoplasia o enfermedad hematológica cuyo tratamiento curativo se considera de elevado riesgo gonadotóxico: mayor al 50% según nuestra propuesta de clasificación, es decir alto riesgo (AR) (>80%) o riesgo intermedio- riesgo alto (RI-RA) (50-80%).

- Diagnosticadas de una neoplasia o enfermedad hematológica cuyo tratamiento curativo se considera de riesgo bajo- riesgo intermedio (RI-RB) (20-50%) según nuestra propuesta pero con algún condicionante adicional (edad, interés familiar)
- Clínicamente estables
- Que no hayan recibido QT considerada gonadotóxica o en el caso de haberla recibido que fuera a bajas dosis.
- Pacientes con una expectativa de supervivencia razonable o que al menos la intención de tratamiento de primera línea sea curativa

En total y en el periodo estudiado (octubre 2008-agosto 2015) han sido incluidas 51 pacientes.

7.4.1.2 Clasificación Riesgo Gonadotóxico

Especificamos a continuación la clasificación actualizada de riesgo gonadotóxico propuesta por WHB Wallace (2015) (Figura 22) y posteriormente nuestra propuesta para niñas y adolescentes de nuestro país.

Figura 22 : Riesgo Gonadotoxicidad según Wallace (Actualizado 2015) en Diagnósticos Oncológicos Pediátricos

Low risk (<20%)	Medium risk	High risk (>80%)
ALL	AML	Total Body Irradiation
Wilms' tumour	Osteosarcoma	Pelvic/testes RT
Brain tumour	Ewing's sarcoma	Chemo pre BMT
Sx, RT < 24Gy	STS: stage II/III	Metastatic Ewing's
Soft tissue sarcoma (stage I)	Neuroblastoma	HL (Pelvic RT)
Hodgkin's Lymphoma HL (Low stage)	NHL	
	Brain tumour RT>24Gy	
	HL (High Stage)	

Wallace, Anderson, Irvine. Lancet Oncology 2005

Extraído de: WHB Wallace. Oncofertility: State of the art for young people with cancer. Conference Paper. Bruselas (2015)

En base a toda la bibliografía revisada antes del inicio del programa y durante la ejecución del mismo, la clasificación propuesta por Wallace, así como el análisis en profundidad de los diferentes protocolos nacionales e internacionales utilizados en este momento en nuestro país (suma de dosis por citostáticos, RT con dosis y localización), se propone la siguiente clasificación de

riesgo gonadotóxico para niñas y adolescentes con cáncer y los diagnósticos que los cumplirían (Tabla 7):

- Riesgo Bajo (RB) (<20 % de posibilidades de gonadotoxicidad)
- Riesgo Bajo-Intermedio (RB-RI) (entre 20-50%)
- Riesgo Intermedio-Alto (RIRA) (entre 50-80%)
- Riesgo Alto (RA) (>80%)

Tabla 7 : Clasificación Valencia 2015 de riesgo gonadotóxico de niñas y adolescentes con cáncer

BAJO <20%	BAJO-INTERMEDIO 20-50%	INTERMEDIO-ALTO 50-80%	ALTO >80%
LLA NO TPH	OSTEOSARCOMA LOCALIZADO	OSTEOSARCOMA METÁSTASICO	ICT
LMA NO TPH		TPH CON MELFALAN	TPH CON BUSULFAN
LNH			TPH CON TIOTEPA
			CUALQUIER TUMOR CON INDICACIÓN RT PELVICA O ABDOMINAL TOTAL
LH SIN PROCARBACINA O CON PROCARBACINA GRUPO 1	LH CON PROCARBACINA GRUPOS 2-3		
SARCOMAS PB BAJO RIESGO Y RIESGO ESTANDAR	SARCOMA PB ALTO RIESGO Y MUY ALTO RIESGO	SARCOMA DE PB METÁSTASICO	
TUMOR WILMS		SARCOMA EWING GRUPO 1	SARCOMA EWING GRUPOS 2-5
NEUROBLASTOMA BAJO RIESGO	NEUROBLASTOMA RIESGO INTERMEDIO		NEUROBLASTOMA ALTO RIESGO
TUMOR CEREBRAL TRATADO SOLO CON CIRUGÍA O CON RT < 24 GY		TUMOR CEREBRAL CON RT > 24 GY	
RETINOBLASTOMA	HEPATOBLASTOMA		
TUMOR CÉLULAS GERMINALES EXTRAGONADAL SIN RT o RT < 24 GY	TUMOR CÉLULAS GERMINALES GONADAL		

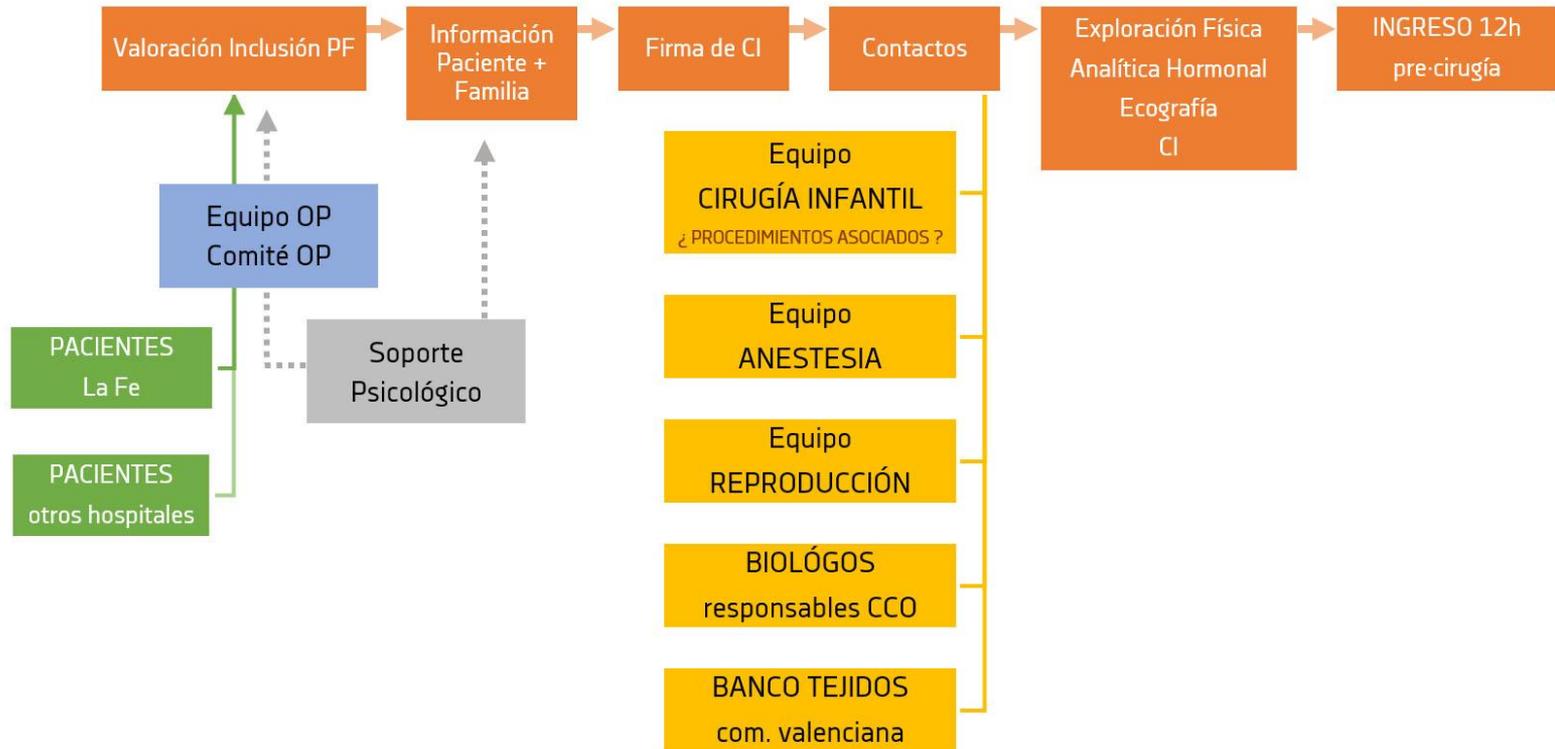
Los protocolos en los que se ha basado la clasificación son: LLA (SHOP-PETHEMA 2013); LMA (SHOP 2007); Sarcoma de Ewing (SEOP 2001); Enfermedad de Hodgkin (EURONET); Sarcomas de PB rhabdomyosarcomas y no rhabdomyosarcomas (EpSSG RMS 2005- NRST 2005); Tumor de células germinales (SIOP CNS GTC II); Osteosarcoma (SEHOP 2010); Tumor de Wilms (SIOP 2001); Neuroblastoma (SIOPEN para Neuroblastoma de riesgo bajo, intermedio y HR-NBL); Hepatoblastoma (SIOPEL 6).

7.4.2 Métodos

7.4.2.1 Circuito multidisciplinar previo al procedimiento

(Figura 23)

Figura 23 : Circuito multidisciplinar previo a CCO



▪ **Primera etapa**

Ante una nueva paciente con criterios de inclusión en el programa, se inicia en el servicio de OP del hospital, un circuito de información, coordinación y ejecución del procedimiento.

En el mismo día del conocimiento del caso, las características de la paciente y de su posible tratamiento se comentan y debaten en la sesión diaria multidisciplinar de OP. La indicación del procedimiento, así como la urgencia de inicio de tratamiento son valoradas, individualizando cada caso (ver criterios de inclusión + clasificación riesgo). En ocasiones dicho debate puede ser trasladado al comité multidisciplinar de OP (frecuencia de reunión semanal) al conocerse los detalles del diagnóstico y estadio en ese momento.

Habitualmente se programa la CCO previamente al inicio de cualquier tratamiento en el caso de tumores sólidos, valorando su indicación o no en el caso de que sean pacientes que hayan recibido algún tipo de QT con anterioridad. En el caso de neoplasias hematológicas, se programa CCO para realizarse previo al TPH y en la mayoría de los casos con colocación simultánea de CVC tipo Hickman. (Figura 24)

Figura 24 : Esquema cronología CCO en el caso de los tumores sólidos o leucemias



La presencia en las sesiones de OP de la psicóloga de la unidad, que conoce o va a conocer al paciente y su familia, permite la adecuada valoración del caso ante ofrecimiento de una técnica experimental.

▪ **Segunda etapa**

Tras valoración favorable de su inclusión en el programa de PF se procede a información de la paciente y su familia, así como entrega de documentación informativa. La información sobre la aparición de posibles efectos gonadotóxicos a largo plazo y el ofrecimiento de CCO, se realiza preferiblemente en un momento distinto y posterior al del diagnóstico inicial, con la intención de favorecer una mejor asimilación de la nueva situación. Habitualmente se realiza pasadas 24 horas de la información inicial. En la

mayoría de los casos la información completa se proporciona por la doctoranda como parte del equipo de adjuntos de OP o por otros médicos adjuntos del servicio tras formación.

Se ofrece a los pacientes y sus familias un periodo de reflexión para poder decidir adecuadamente sobre el procedimiento, así como un segundo momento de información para poder resolver las dudas que hayan podido surgir. El tiempo de reflexión depende de la urgencia por iniciar el tratamiento y puede oscilar entre 12 horas y hasta 1 semana. Se ofrece posibilidad de asesoramiento psicológico específico.

▪ **Tercera etapa**

En caso de que los padres/responsables legales acepten la inclusión de su hija en el programa de PF, se procede a la firma del CI, donde las mayores de 12 años asienten y consienten también el procedimiento. En el CI queda especificado la posibilidad de utilización de una muestra para investigación. Queda igualmente reflejado el deseo de la paciente y su familia de utilización del tejido en el futuro si por alguna circunstancia no fuera posible su uso clínico personal, siendo las opciones existentes: destrucción de la muestra o utilización para proyectos de investigación. Se firma adicionalmente consentimiento para conservación de CCO en BTCV.

▪ **Cuarta etapa**

Tras la firma de CI se procede a activar circuito de ejecución. Se contacta con equipo de cirugía infantil especialistas en OP para programación en quirófano de la laparoscopia y decidir si hay necesidad de procedimientos asociados: colocación de CVC, PL, AMO, BMO, intervención del tumor, otras biopsias, etc. Se solicita también valoración por el servicio de anestesia infantil y se firman ambos CI.

Se programan entonces pruebas analíticas y ecográficas (ver 8.4.2.3 y 8.4.2.4) para hacer durante el mismo ingreso o programar de acuerdo con la fecha de CCO.

▪ **Quinta etapa**

Se contacta y se informa del caso al equipo de reproducción del hospital para que, en determinadas ocasiones, realicen valoración clínica y ecográfica previa a la cirugía (caso de las pacientes puberales, próximas al punto de corte del programa) y para que conozcan el caso de cara a un futuro seguimiento a medio-largo plazo en consultas externas.

Se contacta con el equipo de biólogos de reproducción encargados de la manipulación y procesamiento del tejido ovárico para confirmar su disponibilidad en el día del quirófano asignado.

Se contacta con BTCV para comunicar fecha de llegada del tejido para criopreservación y almacenamiento.

7.4.2.1.1 Adaptación del esquema a pacientes de otros hospitales

En el caso de pacientes de OTROS HOSPITALES, se realizan por igual todos los pasos, añadiendo un contacto previo del médico responsable de la paciente con el coordinador del programa PF (habitualmente por teléfono) para comentar/confirmar indicación, valorar posibles fechas de quirófano, necesidad de procedimientos asociados e inicio de tratamiento posterior.

Los médicos responsables realizan una primera información en los hospitales de origen y en el caso de estar la familia interesada se complementa de una forma más extensa y detallada en consultas externas del Hospital La FE, habitualmente 24 horas antes de la fecha de CCO, con la intención de que los desplazamientos de la familia sean mínimos. La información se proporciona en la mayoría de casos por la doctoranda o por personal entrenado de la unidad de OP. En ocasiones se ha realizado una información conjunta con los médicos del servicio de reproducción, sobre todo en aquellas pacientes en edad límite pediátrica-adulta.

En las pacientes de otros hospitales se realiza en esa misma mañana, valoración por parte de cirugía pediátrica y anestesia, examen físico y pruebas complementarias (ver 8.4.2.3 y 8.4.2.4).

En estos casos, para poder incluir a una paciente en el programa de PF, previamente el médico responsable ha realizado derivación reglada a nuestro centro con la documentación necesaria dependiendo de si pertenece a la misma comunidad autónoma o no.

7.4.2.2 Examen clínico de los pacientes

Todas las pacientes incluidas en el programa de PF se valoran el equipo médico de OP. Se realiza anamnesis detallada de los antecedentes fisiológicos y patológicos, así como de los familiares. En las niñas que han tenido la menarquia se pregunta por la historia menstrual: edad aparición, regularidad de los ciclos y duración de la menstruación.

Se realiza una exploración física (EF) con especial atención al momento madurativo. Se determina el estadio puberal del paciente de acuerdo con la clasificación de Tanner (ver valoración gonadal en antecedentes) objetivando el desarrollo mamario y vello pubiano. Se considera prepúber aquellas con desarrollo mamario estadio I (S1) y púber a partir de la aparición de botón mamario (S2).

7.4.2.3 Determinaciones analíticas hormonales

Cada paciente del programa se somete a una extracción analítica previa a la realización de CCO con el objetivo de conocer la situación hormonal de la paciente previa a la intervención. En la mayoría de casos se aprovecha la extracción para determinaciones analíticas que podían quedar pendientes (serología vírica, hemograma y pruebas de coagulación, etc.)

Las determinaciones hormonales básicas incluyen: FSH, LH, Estradiol y AMH.

Se detallan a continuación las características de dichas determinaciones en el laboratorio de nuestro hospital (Tabla 8):

Tabla 8: Determinaciones hormonales Hospital La FE

PLATAFORMA	METABOLITO	LÍMITE DE DETECCIÓN	COEFICIENTES VARIACIÓN INTRA-ENSAYO	COEFICIENTES VARIACIÓN INTER-ENSAYO
GenII AMH Assay (Beckman Coulter, CA, USA)	AMH	0.08 ng/mL	<6%	<10%
Architect analyzer (Abbott Diagnostics, Madrid, Spain)	FSH	0.05 IU/L	3%	4%
Architect analyzer (Abbott Diagnostics, Madrid, Spain)	LH	0.07 IU/L	2%	3%
Architect analyzer (Abbott Diagnostics, Madrid, Spain)	E2	≤10 pg/mL	4,6%	5%

7.4.2.4 Ecografía pélvica

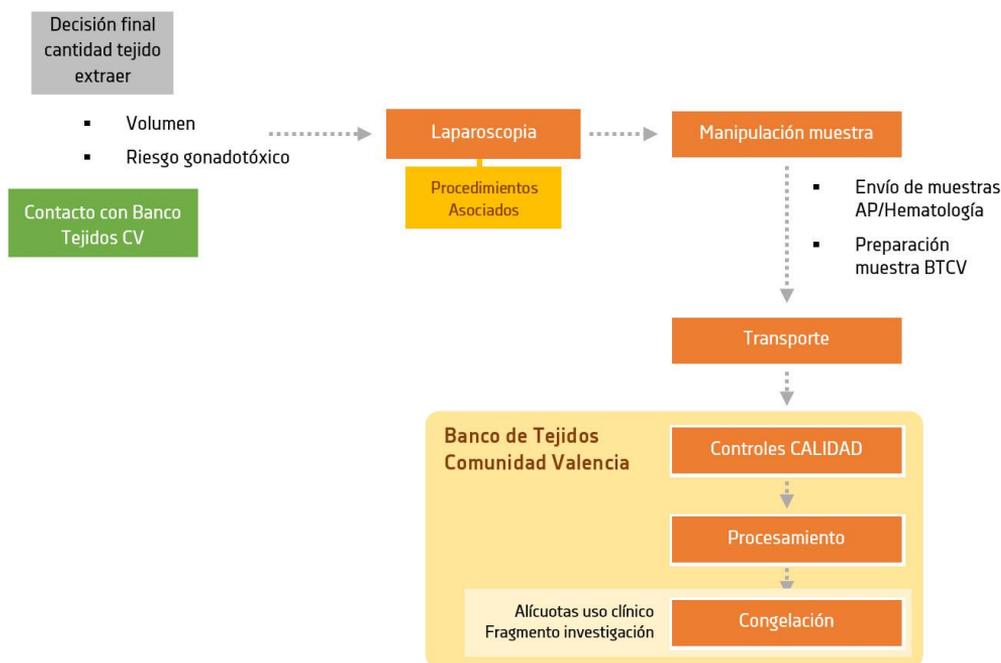
A todas las pacientes se les realiza una ecografía pélvica transabdominal antes del procedimiento, generalmente 24 horas antes del mismo. El ecógrafo utilizado es un equipo SIEMENS ACUSON S 2000 con sondas 9-4 MHz Lineal y 6-2MHz Curved. Se practica medición del volumen de los ovarios, con búsqueda de la presencia de folículos antrales. La ecografía se realiza con la vejiga urinaria llena, indicando a las pacientes bebida de líquidos y retención urinaria voluntaria antes de su realización. El cálculo del volumen de los ovarios lo realiza el software de la máquina de forma automática : $(D1 \times D2 \times D3) \times 0,5233$, en la que D1, D2 y D3 son los diámetros máximos longitudinal, anteroposterior y transversal. Se mide el diámetro máximo de los folículos en ambos anexos en el plano de mayor visibilidad.

Al inicio del programa, la ecografía se realizaba por el equipo de reproducción. Conforme se incluyeron pacientes cada vez más pequeñas, se decidió que la exploración fuera realizada por el equipo de radiología pediátrica en primera instancia y el equipo de reproducción en casos específicos.

7.4.2.5 Circuito multidisciplinar durante el procedimiento de la CCO y tras su realización

(Figura 25 : Circuito multidisciplinar en el día de CCO Figura 25)

Figura 25 : Circuito multidisciplinar en el día de CCO



▪ Primera etapa

En el día de la CCO se contacta de nuevo con el Banco de Tejidos de la Comunidad Valenciana para informar de hora aproximada de llegada de la CCO.

Durante el procedimiento, ante la visualización directa de los ovarios, con la información complementaria de la ecografía y el cálculo de riesgo gonadotóxico de la paciente, se consensua la cantidad de tejido ovárico a extraer.

▪ **Segunda etapa**

La extracción de tejido ovárico se realiza mediante cirugía laparoscópica siguiendo protocolos previamente publicados (Sánchez M 2007), adaptados a pacientes pediátricas (Sanchís G 2011). Se utiliza habitualmente un trócar umbilical de 10 mm y dos trócares de 5 mm colocados en los cuadrantes inferiores derecho e izquierdo. El programa actual pediátrico considera la ooforectomía parcial como técnica quirúrgica de elección. Mediante tijeras de corte frío se secciona un bloque de corteza ovárica, aproximadamente el 50% del total. La hemostasia con electrocoagulación se limita a la zona medular. En todos los casos, el tejido se extrae con una bolsa laparoscópica y se transfiere al especialista en reproducción para su inmediata manipulación.

▪ **Tercera etapa**

El fragmento de CO se deposita en medio de cultivo M199, que contiene seroalbúmina humana 5% y dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% (Sigma, St Louis, Estados Unidos) tal y como se ha publicado previamente (Herraiz S 2014). La manipulación de las muestras se realiza en una campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad y sobre un bloque de hielo, donde se procede a separar la médula ovárica de la corteza. Con la ayuda de un bisturí vol 22 se elimina cualquier resto de tejido necrótico, cuerpo lúteo y sanguíneo y se procede a su raspado hasta conseguir un espesor de 1 mm para su óptima criopreservación y división (fragmentos habituales de 5 x 5 x 1 mm). Dado el pequeño tamaño de los ovarios prepúberes, el tejido extraído es muy escaso, por lo que su manipulación y fraccionamiento es realizado por personal altamente especializado (Figura 26).

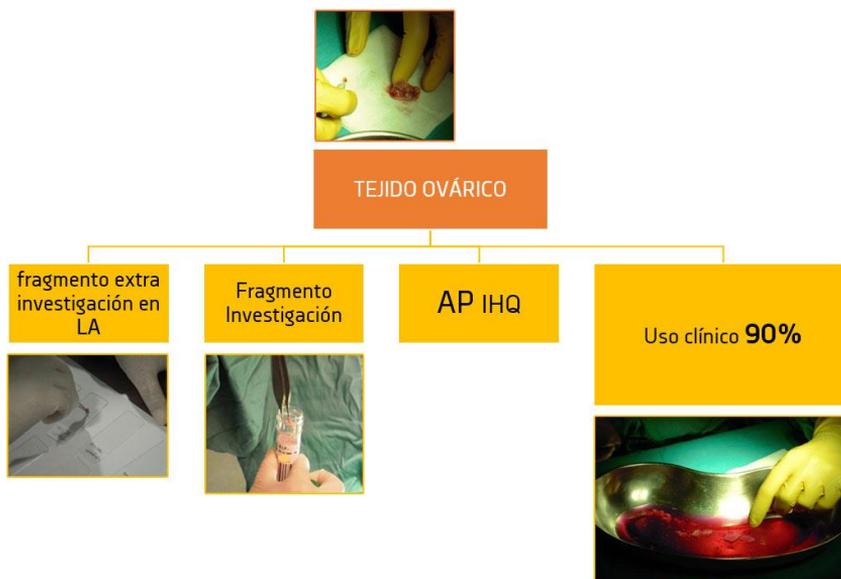
En el caso de los tumores sólidos:

- Uno de los fragmentos de CO se remite al servicio de AP para su estudio histológico. Este fragmento se ha utilizado para el estudio IHQ y de activación folicular en pacientes seleccionadas (ver estudio de casos y controles)
- El resto de la CO extraída se fracciona y coloca en tubos con medio M199 que garantiza su viabilidad durante el periodo de isquemia. En uno de los tubos se indica que contiene un fragmento extra de investigación que se procesará junto con el resto del tejido en el BTCV. En caso de contar con escaso tejido para futuro uso clínico, no se guarda este fragmento.

En el caso de las neoplasias hematológicas:

- Además de lo anteriormente descrito, se añade un fragmento de estudio para laboratorio de biología molecular/hematología.

Figura 26 : Resumen procesamiento muestra tejido ovárico una vez extraída



▪ **Cuarta etapa**

El transporte se verifica en condiciones que garanticen una temperatura de 22° C (si se utilizan unidades refrigerantes no se sitúan en contacto directo con el frasco que contiene el tejido).

▪ **Quinta etapa**

Una vez en el BTCV se procede a su procesamiento con las diferentes solucionadas estandarizadas (medio nutriente con DMSO) para posterior congelación. Se utilizan bolsas de etil vinil acetato (Cryocyte, Baxter Healthcare, Deerfield, IL, USA) que son almacenadas en nitrógeno líquido a -196º. El método actualmente utilizado en el BTCV es de congelación lenta: 0,3ºC/min, conseguido con la utilización de congeladores programables.

Se realizan los pertinente controles de calidad: comprobaciones microbiológicos (bacterias aerobias, anaerobias y hongos) de la solución de trasporte del tejido y de aquélla que va a servir para su criopreservación. Cualquier resultado de cultivo positivo o bien una alteración serológica, se informa al especialista responsable del paciente.

7.4.2.6 Programación seguimiento de las pacientes

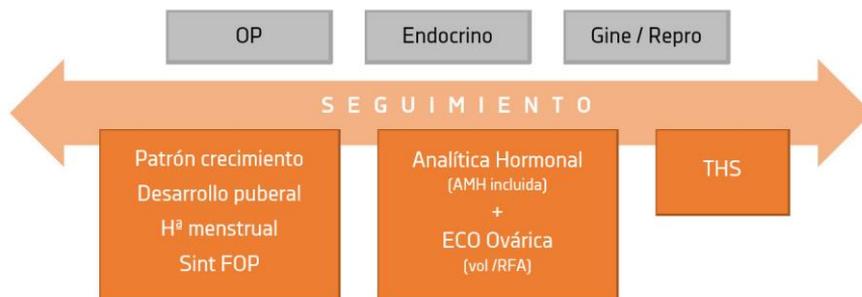
Todas las pacientes son incluidas en programa de seguimiento, que dependiendo de las circunstancias individuales de cada una (especialmente la

edad, situación de enfermedad y riesgo de FOP) puede realizarse inicialmente por parte de oncología pediátrica y posterior derivación a los servicios de endocrino infantil o reproducción, o derivación inmediata tras finalizar el tratamiento oncológico a uno de estos 2 servicios (o a ambos) (Figura 27).

En el seguimiento clínico se presta especial atención al desarrollo puberal y patrón de crecimiento. Se recaba información específica sobre menarquia y características de las menstruaciones en el caso de estar presentes. Se debe preguntar explícitamente por síntomas de FOP

El seguimiento analítico hormonal, habitualmente es pautado por los servicios de endocrino y reproducción (incluyendo FSH/LH y estradiol en todos los casos y AMH en los hospitales disponibles), así como los controles de imagen pertinentes (ecografía pélvica para valoración de volumen uterino-ovárico y RFA). La frecuencia de dichos controles vendrá determinada también por la edad, situación de enfermedad y riesgo de fallo ovárico, ya que se trata de pacientes altamente complejas, con frecuentes visitas al hospital en la mayoría de casos, y con posibilidad de aparición de recaídas (incluso fallecimientos) en los siguientes años a la realización de la CCO.

Figura 27 : Resumen seguimiento pacientes pediátricas y adolescentes sometidas a CCO



Se muestra a continuación la propuesta de seguimiento que se entrega a pacientes adultas en nuestro centro y que puede servir de orientación para pacientes pediátricas (

Figura 28).

Figura 28: Propuesta seguimiento pacientes una vez realizada CCO

- **A los 3, 6, 12 y 24 meses:**
 - ■ Un control de reserva ovárica: determinación hormonal en 2-4 día de regla, si es que la conserva, o en cualquier día en ausencia de ella. Se solicitarán las siguientes determinaciones: FSH, LH, PRL, AMH, estradiol.
 - Una ecografía en la cual se medirá el volumen ovárico y se contará el número de folículos antrales.

7.4.3 Análisis descriptivo-estadístico

Se ha recogido toda la información en base de datos ACCESS 2007. Se han realizado los cálculos estadísticos con programa Excel 2007 y SPSS Statistics versión 20.0.

Se describen la mayoría de variables como mediana y rango intercuartílico (IQR), especificando en algunos casos los valores máximos y mínimos por considerarse de alto valor informativo en el trabajo propuesto dados los escasas series publicadas con inclusión de pacientes pediátricas.

7.5 Efecto de la administración de QT sobre tejido ovárico en pacientes pediátricas con Leucemia Aguda

7.5.1 Pacientes

Los estudios realizados en pacientes humanos y la recogida de muestras se llevó a cabo en conformidad con las normas del código de Nuremberg, declaraciones de Helsinki (1964), Tokio (1975), Venecia (1983), Hongkong (1989), Sydney y complementarias, directiva 91/507/CE, R.D. 561/1993, convenio de Bioética del Consejo de Europa (BOE 20-10-99), y código de Ética y deontología médicas vigente

En la segunda parte de esta tesis se ha pretendido estudiar la situación del tejido ovárico extraído durante la CCO en pacientes con LA y las consecuencias que puede tener la administración de QT previa. La intención es adecuar la cronología de la CCO en estas pacientes en función de dichos resultados.

Se ha realizado un estudio observacional de casos y controles dentro de las pacientes incluidas en el programa. Se distinguen 4 grupos de estudio en

función del desarrollo puberal y si habían recibido o no QT previa a la realización de la CCO

Grupo Prepúberes (GPre): Pacientes prepúberes diagnosticadas de LA con protocolo QT previa al procedimiento de CCO (n=14)

Grupo Control Prepuberes (GCPre): Pacientes prepúberes incluidas en el PPF que no habían recibido ningún tipo de tratamiento gonadotóxico previamente al procedimiento de CCO (n=5).

Grupo Púberes (GP): Pacientes púberes diagnosticadas de LA con protocolo QT previa al procedimiento de CCO (n=8).

Grupo Control Púberes (GCP): Pacientes púberes incluidas en el PPF que no habían recibido ningún tipo de tratamiento gonadotóxico previamente al procedimiento de CCO (n=5).

Los diagnósticos de base, edad en el momento CCO, desarrollo puberal, analítica hormonal previa, así como QT administrada relacionada con gonadotoxicidad, se desglosan en la tabla 8:

Tabla 9: características de las pacientes pertenecientes a los grupos de estudio

		Dg	Edad en la CCO (años)	Desarrollo puberal	AMH Previa ng/mL	FSH/LH previas UI/l	Dosis de CFM previa mg/m ²	Otras QT previos Ara-C mg/m ²
GPre	1	LLA	2,8	Prepúber	3,56	5,3/0,1	2000	12000
	2	LLA	7,4	Prepúber	9,56	2,4/0,1	3000	12000
	3	LLA	3,9	Prepúber	7	1/0,1	3000	12000
	4	LLA	9,4	Prepúber	4	4,2/0,3	4000	12000
	5	LLA	7,3	Prepúber	15,9	2,3/0,1	4000	12000
	6	LLA	6,2	Prepúber	0	0,3/0,1	3000	10750
	7	LLA	10,4	Prepúber	16	2/0,1	4000	16000
	8	LLA	7,5	Prepúber	9	3,2/0,1	4000	16000
	9	LLA	3,3	Prepúber	3	1/0,1	4000	16000
	10	LLA	3,8	Prepúber	5	3,7/0,1	6000	13000
	11	LLA	5,2	Prepúber	7	3,2/0,1	4000	12000
	15	LMA	5,4	Prepúber	0,08	4,1/0,1		15000
	16	LMA	8,1	Prepúber	0,08	2,7/0,2		15000
	17	LMA	8,5	Prepúber	2	0,7/0,1		25000
GP	12	LLA	10,3	Púber	0	2,6/0	8950	5000
	13	LLA	12,6	Púber	7,3	6,2/3,3	4000	16000
	14	LLA	16,1	Púber	1,6	4,7/8,5	5000	12000
	18	LMA	12,7	Púber	0	144,8/46,3		15000
	19	LMA	12,7	Púber	151,2	4,5/8,8		15000
	20	LMA	13,4	Púber	0,08	0,7/0,5		15000
	21	LMA	15,2	Púber	0,6	2,4/0,3		9000
	22	LMA	13,6	Púber	0,6	20/7,4		9000
GCPre	23	MEDULO	8,6	Prepúber	74,1	0,2/0		
	24	EWING	10,2	Prepúber	10,1	4,4/0,4		
	25	SMD	9,6	Prepúber	0	3,6/0,9		
	26	SMD	10,5	Prepúber	23,3	2,3/0,2		
GCP	27	SMD	13,3	Púber	13	1,3/0,7		
	28	SMD	13,4	Púber	40,1	5,2/7,8		
	29	TCG	10,2	Púber	25,9			
	30	EGC	11,8	Púber	15,7	6,6/4,4		
	31	EH	14,7	Púber	5	2,9/1,1		
	32	EWING	13,3	Púber	18,9	6/2,3		

7.5.2 Métodos

7.5.2.1 Protocolo de extracción de tejido ovárico

Ver apartado 4.1.2.5 (segunda y tercera etapa)

El fragmento remitido a AP (fragmento de CO de localización aleatoria y habitualmente de 10x40 mm) ha sido posteriormente cedido para los diferentes estudios de este proyecto

7.5.2.2 Análisis del tejido

7.5.2.2.1 Estudios histológicos

Cada una de las muestras fue analizada mediante microscopía óptica siguiendo el protocolo que se describe a continuación:

- **Fijación**

Este proceso se refiere al tratamiento del tejido con sustancias químicas, de manera que se mantienen las células estructuralmente intactas. Esto se logra al inactivar ciertas enzimas celulares que de otra manera iniciarían la autólisis y llevarían a la degeneración post-mortem. La fijación mantiene las estructuras al estimular la formación de enlaces cruzados entre las proteínas. Las muestras fueron fijadas en formaldehído al 4% (GIBCO, Paisley, Strathclyde, Reino Unido).

- **Lavado**

Es necesaria la eliminación del exceso del fijador para evitar una posterior interferencia química en el proceso de inclusión. Los medios de inclusión utilizados son hidrófobos y precisan de la eliminación del agua del tejido, por ello, se realizó una deshidratación del tejido con etanol. Debido a que una gran parte del tejido está constituido por agua, se aplicó una serie gradual de soluciones acuosas de menor a mayor grado del agente deshidratante. Este paso se realizó de forma gradual ya que si se somete directamente el tejido a soluciones de etanol absoluto, éste se deformaría debido a que el agua tisular saldría muy rápidamente de la muestra.

Por lo tanto, se procedió a la deshidratación de las muestras en alcohol de gradación decreciente (50, 70, 80, 90%) y finalmente se sumergieron en 3 pases de alcohol absoluto (Panreac, Barcelona, España).

- **Aclaramiento o diafanización**

Una vez deshidratado el tejido, se pasa a una solución de una sustancia que es miscible tanto con el alcohol como con el medio de inclusión a utilizar. La sustancia comúnmente utilizada es el xileno o xilol. Este proceso se llama

aclaramiento ya que el tejido se torna transparente o claro en el xileno, esto se debe a que cambia su índice de refracción. Una vez deshidratadas las muestras, se aclararon mediante pasos sucesivos en xilol (Panreac, Barcelona, España) para extraer el agente deshidratante.

▪ **Inclusión**

Por lo general, los tejidos son estructuras blandas y frágiles, incluso después de la fijación. Previo a la obtención de los cortes, es necesario incluirlos en un medio de soporte. En estado líquido, estos medios tienen la capacidad de penetrar y rodear el tejido, de esta forma se puede producir el endurecimiento (por enfriamiento o por polimerización), para formar un bloque sólido que pueda ser cortado fácilmente en el microtomo. Las muestras fueron depositadas individualmente en recipientes con parafina fundida a 60°C y se dejaron en la estufa durante 1 h a 60°C para que el xilol se evaporase y los espacios anteriormente ocupados por éste fuesen ocupados por la parafina. Este paso se repitió una vez más para eliminar la mayor cantidad de xilol posible de cada muestra. Después se colocaron las piezas en parafina fundida en un molde de metal rectangular, orientadas de forma adecuada y se dejaron solidificar a TA.

▪ **Corte**

El bloque de parafina con el tejido se puede cortar en secciones lo suficientemente delgadas como para permitir el paso de la luz. La mayor parte de los preparados para microscopía óptica tienen un grosor de 4 µm. Una vez obtenidos los bloques de parafina con cada una de las muestras, se realizaron cortes de 4 µm de espesor. Para la obtención de estos cortes se utilizó el microtomo (Microm GmbH, tipe HM310, Walldorf, Alemania) con cuchillas de acero. Estos cortes se depositaron en un baño termostatzado a 37°C para eliminar las arrugas y pliegues debidos al corte. A continuación fueron recogidos con portaobjetos SuperFrost® Plus, Menzel-Gläser (Thermo Scientific, Massachusetts, Estados Unidos) para mejorar la adherencia de los mismos. Finalmente los cortes fueron guardados en una estufa a 37°C durante 48-72 horas para mejorar su secado y adhesión final.

▪ **Tinción y Montaje**

La tinción de los elementos estructurales de los tejidos específica y de manera diferencial es indispensable para optimizar su visualización.

Las muestras fueron desparafinadas durante 1 hora en estufa a 60°C, a continuación los portaobjetos se colocaron en cestillas de tinción y fueron sumergidos en xilol durante 5 minutos para terminar de eliminar los restos de parafina, repitiendo este paso 4 veces. Posteriormente las muestras se rehidrataron con concentraciones decrecientes de alcohol (90, 80, 70, 50%)

hasta llegar a agua destilada, procediéndose seguidamente a la tinción: Hematoxilina de Harris (Sigma, St Louis, Estados Unidos) previamente filtrada 15 minutos, lavado en agua corriente 5 minutos, lavado en agua corriente 10 minutos y Eosina alcohólica (Sigma, St Louis, Estados Unidos) previamente filtrada 5 minutos. Tras la tinción, las muestras fueron deshidratadas con concentraciones crecientes de alcohol (50, 70, 80, 90, 100%) hasta llegar a xilol donde permanecieron durante 6 minutos.

Posteriormente las muestras fueron montadas de forma permanente con cubreobjetos con una base de pegamento (Eukitt, Kinder GmbH & Co, Freiburg, Alemania) como soporte para el mismo. Las muestras fueron guardadas a TA hasta su posterior análisis mediante microscopía óptica.

7.5.2.2.2 Estudios inmunohistoquímicos

El método de IHQ consiste en una inmunotinción con el método avidina-biotina. Esta técnica se basa en la determinación de la expresión de una proteína de superficie celular utilizando un anticuerpo específico contra esa proteína. A continuación se utiliza un anticuerpo secundario contra el anticuerpo específico, que bien podrá estar biotinilado o bien estar unido a un fluorocromo que permita su posterior detección. En el caso de utilizar un anticuerpo unido a biotina se añade posteriormente el complejo avidina-peroxidasa, que al reaccionar con su sustrato dará color, más o menos intenso en función de la expresión de la proteína. Como anticuerpos primarios se utilizaron el Anticuerpo FoxO3 (Cell Signaling) para cuantificar la extrusión nuclear de FoxO3 como indicador de la activación folicular (John GB 2008).

Las muestras utilizadas para los estudios inmunohistoquímicos fueron las mismas que las manipuladas en los estudios histopatológicos. Por lo tanto, el procesamiento de las muestras es el mismo que el detallado anteriormente en el apartado de "estudios histopatológicos". Se hicieron cortes de 4 μm que se montaron sobre portas de vidrio tratados (Portaobjeto para adhesión, SuperFrost® Plus, Menzel-Gläser, (Thermo Scientific, Massachusetts, Estados Unidos) para evitar la pérdida de muestra durante el protocolo de inmunohistoquímica. De cada una de las muestras de estudio se obtuvieron 4 cortes seriados de 4 μm con el fin de analizar la expresión proteica de FoxO3.

Los cortes fueron desparafinados mediante incubación a 60°C durante 1h y cuatro baños de xileno de 5 min cada uno. A continuación los cortes fueron rehidratados mediante inversión en etanol a concentraciones decrecientes. Tras un lavado con agua para eliminar los restos de etanol, se llevó a cabo el desenmascaramiento antigénico con un autoclave, sometiendo los cortes durante 3 min a 120°C, 1,5 Atm en Tampón Citrato pH6 para romper los puentes disulfuro que se formaron

al calentar a 60°C las muestras fijadas en formol y facilitar el paso del anticuerpo. Posteriormente, las secciones se incubaron con peróxido de hidrógeno (DAKO Corp., Barcelona, España) al 3% durante 10 minutos a TA para eliminar la actividad peroxidasa endógena. Seguidamente las muestras se incubaron, durante 1 hora y a TA en cámara húmeda, con El anticuerpo FoxO3 a (Cell Signaling Technology, Inc. Danvers, MA, USA), a una dilución de 1:150. Como control negativo se utilizó PBS substituyendo así al anticuerpo primario. Como control positivo se utilizaron cortes de tumor de cáncer de mama. Tras una incubación con el anticuerpo primario, las muestras se incubaron con el kit ENVISION (DAKO Corp., Barcelona, España) durante 30 minutos. Finalmente, se empleó una disolución con un sustrato cromógeno de peroxidasa durante 5 min. Entre cada incubación los tejidos fueron lavados tres veces con PBS. La contra-tinción se realizó con hematoxilina de Mayer y las secciones se montaron con cubreobjetos con una base de pegamento (Eukitt, Kindler GmbH, Freiburg, Alemania) como soporte para el mismo, de este modo las muestras pudieron ser guardadas a TA hasta su posterior fotografiado. Las muestras fueron analizadas bajo microscopio óptico (LEICA DM4000B; Leica, Solms, Alemania) con sistema digital de captación de imágenes (LEICA DFC450C; Leica, Solms, Alemania). La observación de un marcaje específico del anticuerpo a nivel folicular se consideró como positivo para la expresión proteica FoxO3 a nivel de citoplasma o células de la granulosa (extrusión nuclear de FoxO3), mientras que la ausencia de marcaje o marcaje nuclear resultó en un resultado negativo para la extrusión del FoxO3).

7.5.2.2.3 Estudios moleculares

▪ Extracción de ARNm de muestras incluidas en parafina

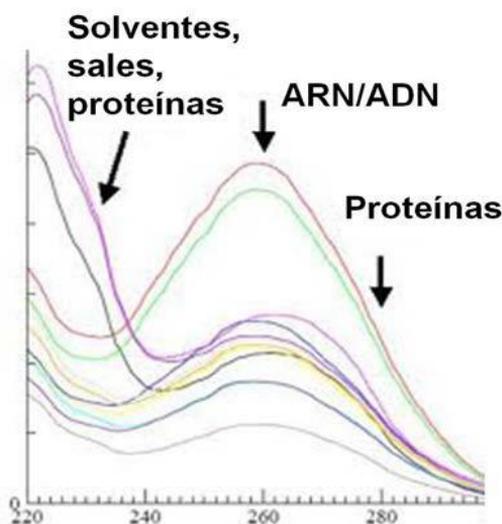
La extracción de ARN de muestras de parafina se llevó a cabo con el uso del kit "Recover allTM total nucleic acid isolation kit for FFPE ("formalin fixed paraffin-embedded" (Life Technologies, Foster City, California, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Se realizaron 3 cortes de 20 µm de cada muestra que se introdujeron en un tubo estéril libre de ARN. Se añadió 1 ml de xilol (Panreac, Barcelona, España) y fue incubado durante 3 min a 50°C en agitación. A continuación se centrifugó durante 3 min a 13.400 r.p.m. y se eliminó el sobrenadante. Este paso fue repetido para asegurarnos la eliminación de cualquier resto de parafina. Posteriormente, se realizaron dos lavados con 1 ml de etanol absoluto y centrifugación a 13.400 r.p.m. durante 3 min. Para la eliminación total del etanol, los tubos se dejaron en una estufa a 37°C durante 30 min con la tapa abierta. Transcurrido este tiempo, se añadió 200 µl de "Digestion Buffer", y se añadió 4 µl de proteasa. Esta mezcla se incubó durante 15 min a 50°C en agitación. Posteriormente, se incubó otros 15 min a 80°C. A

cada tubo se añadió 240 µl de "Isolation Aditive" y 550 µl de etanol (a -20°C) y se centrifugó en una columna durante 1 min a 10.000 r.p.m. a temperatura ambiente (TA). A continuación se añadió 700 µl de "Wash Buffer 1" y se volvió a centrifugar 1 min a 10.000 r.p.m. Tras la eliminación del líquido eluido, se añadió 500 µl de "Wash Buffer 2/3" repitiéndose la centrifugación. Con una nueva centrifugación rápida de 30 segundos se secó el filtro que contenía el ARN. Posteriormente, se preparó una mezcla de "10X DNase Buffer", "DNase" y agua libre de nucleasas. Esta mezcla fue añadida al filtro de la columna incubándose durante 30 min a TA. Trascurrido este tiempo, se añadieron 700 µl de "Wash Buffer 1" y se centrifugó durante 1 min a 10.000 r.p.m. A continuación se añadieron 500 µl de "Wash Buffer 2/3" y se repitió la centrifugación. Se añadieron 35 µl de agua libre de ARN en el centro del filtro incubándose 10 min a TA. Posteriormente se añadieron otros 35 µl de agua, se incubó 5 min y se centrifugó durante 3 min a 10.000 r.p.m., Finalmente a cada muestra se le añadió 20 U de Rnase Inhibitor (Life Technologies, Foster City, California, Estados Unidos) para evitar la degradación del ARN. Las concentraciones de ARN de cada muestra fueron medidas mediante métodos espectrofotométricos y se almacenaron a -80°C hasta el momento de su uso.

▪ **Análisis de la concentración e integridad del ARN**

El análisis de la cantidad e integridad del ARN extraído de cada una de las muestras se llevó a cabo mediante métodos espectrofotométricos (Nanodrop™, Thermo Scientific, Massachusetts, Estados Unidos). Este equipo mide la absorbancia de todas las moléculas de la muestra que absorben a la longitud de onda de interés, desde nucleótidos, ARN, ADN monocatenario, y ADN de doble cadena. Todas ellas absorben a 260 nm y contribuirán a la absorbancia total de la muestra. Se utilizó un ratio de absorbancia de 260/280 nm para medir la pureza del ARN y del ADN. La muestra se considera pura si presenta un ratio alrededor de 1,8 si se trata de ADN y de 2,0 si se trata de de ARN. Si el ratio es menor indica la posible presencia de proteínas u otros contaminantes que absorben cercanos a la longitud de onda de 280 nm (Figura 29).

Figura 29 : Gráfica de absorbancias de muestras de ARN o ADN. Se muestra las absorbancias en las que absorben el ARN/ADN y los posibles contaminantes de las muestras, como proteínas, solventes y sales.



▪ Retrotranscripción

La retrotranscripción del ARN de las muestras incluidas en parafina se llevó a cabo con el kit "HIGH Capacity cDNA RT" (Life Technologies, Foster City, California, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron 500 ng de ARN de cada muestra ajustando a un volumen final de 25 μ l con agua libre de nucleasas. La síntesis de ADNc se llevó a cabo con una mezcla de cebadores aleatorios y una enzima retrotranscriptasa (MultiScribe™ Reverse Transcriptase 50U/ μ l). Esta mezcla estaba compuesta de: 5 μ l de 10X RT, 2 μ l de dNTPs, 5 μ l 10X cebadores aleatorios, 2,5 μ l de inhibidor de ARNasa, 2,5 μ l de retrotranscriptasa y 8 μ l de agua libre de ARN. La retrotranscripción se llevó a cabo en un termociclador (T3000 Biometra, Göttingen, Alemania) con el siguiente protocolo: 25°C durante 10min, 37°C durante 120 min, y 85°C 5 min. El producto fue cuantificado mediante espectrofotometría, como se describe en el apartado anterior. La muestra fue diluida con agua libre de nucleasas a una concentración final de 100 ng/ μ l y fue almacenada a -20° C hasta la realización de la RT-qPCR.

▪ PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)

La metodología de RT-qPCR, a diferencia de la PCR competitiva, permite la automatización y además es rápida y no necesita el procesamiento posterior del producto de PCR, lo que reduce el riesgo de contaminación. La RT-qPCR es una variación de la PCR estándar utilizada para la cuantificación de ADN o de ARNm de una muestra. Es posible determinar el número de copias o la cantidad relativa de una determinada secuencia de ADN o ARN utilizando cebadores

específicos de secuencia. Cuando la PCR a tiempo real se combina con una reacción previa de retro-transcripción, puede determinarse la cantidad de ARNm de una muestra mediante una cuantificación relativa. Se dice que es una cuantificación relativa porque se compara entre las diferentes muestras la expresión del gen objeto de estudio respecto a la expresión de un gen constitutivo (control endógeno). Es lo que se denomina como normalización de la expresión del gen específico. Los genes más utilizados como controles endógenos son: ARNr 18S, GAPDH, beta-actina, TBP, HPRT, beta-2-microglobulina, entre otros.

La cuantificación del producto se produce mediante la adición de fluoróforos que se unen al amplicón de forma cuantitativa, a mayor producto se emitirá mayor fluorescencia. Los sistemas de RT-qPCR detectan la cantidad de fluorescencia producida en cada ciclo de RT-qPCR y los softwares de análisis representan dicha fluorescencia gráficamente respecto al número de ciclos. La cantidad de amplicón producido es proporcional al número de moléculas de ARN/ADN iniciales, de forma que en aquellas muestras con mayor expresión del gen, el amplicón fluorescente aparecerá en ciclos anteriores.

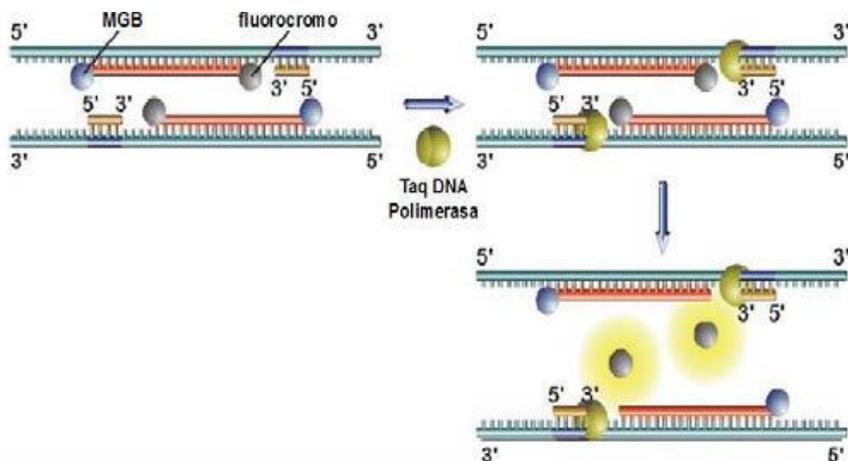
Desde el punto de vista técnico, existen dos principales métodos de análisis de PCR cuantitativa que se basan en técnicas de fluorescencia que se diferencian en la metodología de detección de los productos de RT-qPCR. Estos métodos son:

- Sondas TaqMan: basados en el uso de dos sondas que hibridan en las secuencias específicas.
- SYBR Green I: utiliza este fluorocromo intercalante que se une a la doble cadena de ADN inespecíficamente.

El método más difundido, y el utilizado es nuestro trabajo, es el que emplea sondas TaqMan (Heid CA 1996) que garantiza la obtención de ensayos de PCR altamente específicos, con una eficiencia de amplificación cercana al 100% que además permite evaluar numéricamente con la más alta precisión, la cantidad de moléculas de material genético presente en cada muestra. Estas propiedades específicas permiten la aplicación de RT-qPCR en la cuantificación absoluta y relativa de genes sin necesidad de purificar una muestra de ARN total o requerir de una gran cantidad de la misma. Esta metodología se basa en la actividad 5'-exonucleasa de la Taq polimerasa y en la amplificación mediante RT-qPCR de una determinada secuencia diana en presencia de una sonda fluorescente específica (sonda TaqMan) que hibrida con la secuencia diana que estamos amplificando (

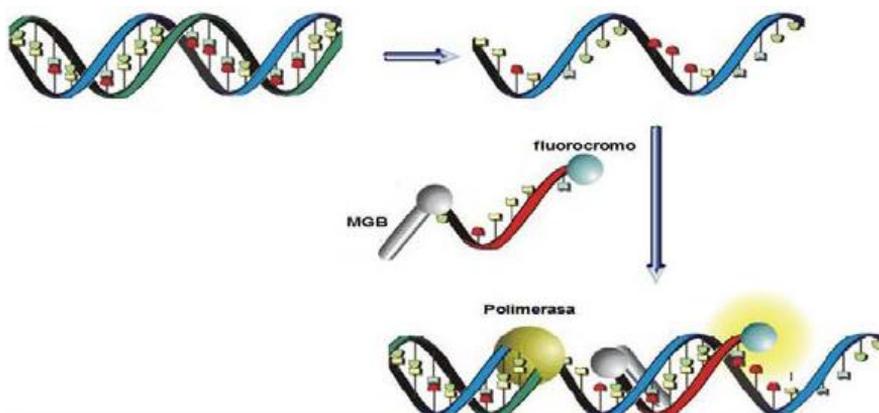
Figura 30).

Figura 30 : RT-qPCR con tecnología TaqMan. Fundamentos de la estrategia empleando sondas TaqMan. Actividad 5'exonucleasa de la Taq polimerasa.



La sonda TaqMan tiene unido un fluorocromo en posición 5' y un amortiguador de fluorescencia en posición 3' (MGB: minor groove binder) que se une al surco menor del ADN protegiendo a la sonda de la actividad exonucleasa de la enzima Taq polimerasa (Figura 31).

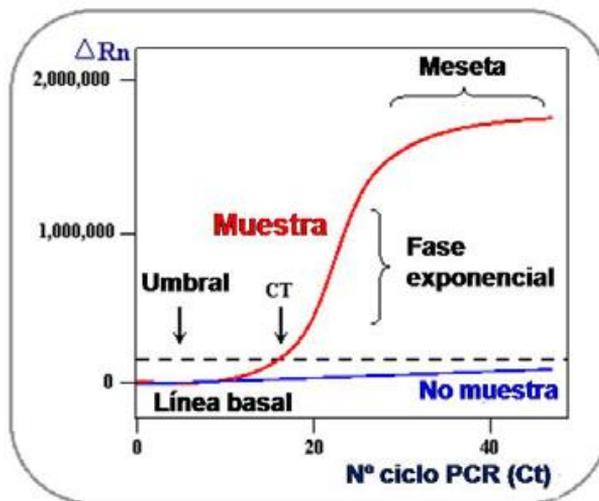
Figura 31 : RT-qPCR con tecnología TaqMan. Mecanismo de acción del amortiguador de fluorescencia (MGB) en las sondas TaqMan.



Además, esta sonda está fosforilada en el extremo 3' para evitar su extensión durante la reacción de PCR. Si la secuencia diana está presente en la muestra, la sonda TaqMan hibridará específicamente con ella, situándose entre los dos cebadores. Cuando se produce la etapa de extensión en la reacción de PCR, la actividad 5'-exonucleasa de la Taq polimerasa degradaría la sonda TaqMan liberando el fluorocromo, que al estar fuera de la influencia del

amortiguador emitirá una señal que puede ser captada por el sistema óptico del equipo. Este proceso de degradación de la sonda tiene lugar en cada ciclo y no interfiere con la acumulación del producto de la RT-qPCR, por lo que se produce un incremento exponencial de la señal de fluorescencia en cada ciclo de la reacción de RT-qPCR (figura XXX). Otra de las ventajas es que la enzima Taq polimerasa no digiere la sonda libre sino únicamente la hibridada, por lo que la cantidad de señal fluorescente emitida es proporcional a la cantidad de producto acumulado. La medición de la intensidad de fluorescencia se realiza de forma continua, lo que nos proporciona una información dinámica en tiempo real (análisis cinético) del proceso. De esta forma podemos establecer el ciclo umbral (Ct-cycle threshold), es decir, el número de ciclos necesarios para que la cantidad de producto producido alcance el nivel de detección que hayamos fijado, lo que a su vez se correlaciona directamente con la cantidad de ADNc de la secuencia diana (Figura 32).

Figura 32 : Modelo de RT-qPCR. Se representa el vol de ciclo de la PCR (Ct) respecto al producto de PCR (ΔRn) de una muestra (línea roja) y de control negativo (línea azul). En la representación de la muestra, se observa el patrón típico esperado, en el que en los primeros ciclos de la PCR no hay producto, posteriormente presenta una fase exponencial llegando a alcanzar una meseta



El método utilizado para calcular la expresión relativa de un gen es el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak KJ 2001). Este método consiste en relativizar la expresión del gen en la muestra problema respecto a la muestra control, normalizando ambas con la expresión de un gen constitutivo. Para ello se sigue el siguiente procedimiento:

▪ **Cálculo del valor de ΔCt .**

Consiste en normalizar el valor de Ct de cada muestra respecto al control endógeno:

$$\Delta Ct = Ct_{gen} - Ct_{control\ endógeno}$$

▪ **Cálculo de $\Delta\Delta Ct$:**

Se normaliza respecto a la muestra control o calibrador:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{muestra\ problema} - \Delta Ct_{muestra\ control}$$

▪ **Cálculo de la expresión relativa (“Fold change”):**

Representa cuántas veces más o cuántas veces menos se expresa el gen problema en la muestra bajo estudio respecto a la muestra control, relativizado a la expresión basal de un gen constitutivo. La muestra control tendrá un valor de 1, mientras que las muestras problema presentarán un valor mayor o menor de 1 dependiendo si la expresión del gen es mayor o menor respectivamente.

$$Expresión\ relativa = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Debido a todas estas características, la metodología de la TaqMan PCR fue utilizada para el análisis de expresión génica de FoxO3 en las muestras de CO de pacientes prepúberes y púberes de PF. Los experimentos de RT-qPCR se realizaron con el sistema ABI PRISMTM 7900 Sequence Detection (Life Technologies, Foster City, California, Estados Unidos). Como fluorocromo de unión a ADN de doble cadena se usó FAM (carboxi-fluoresceína) cuya absorbancia es de 535 a 495 nm. Para cada 10 μ l de reacción TaqMan, se mezclaron 1 μ l de ADNc, 3,5 μ l de agua destilada libre de ARN, 5 μ l de TaqMan Universal PCR Master Mix (PE Life Technologies, Foster City, California, Estados Unidos) and 0,5 μ l 20x “Assay on Demand” que contenían la sonda y los cebadores específicos para el gen FoxO3. Cada ensayo se llevó a cabo por triplicado. Las condiciones de RT-qPCR fueron las siguientes: 2 min a 50°C seguido de 10 min a 95°C para la activación enzimática, posteriormente ocurren 45 ciclos de dos pasos de 15 s a 95°C y 1 min a 60°C. Los productos finales se analizaron con el software específico de sistema de detección de secuencias 7900HT versión 2.4 (PE Life Technologies, Foster City, California, Estados Unidos). Los datos se representaron mediante el valor medio relativo del gen analizado y normalizado con respecto al valor correspondiente del gen de la subunidad 18S del ARN ribosómico utilizando el método 2- $\Delta\Delta Ct$ y el fold change (Fleming JM 2010) (Livak KJ 2001).

7.5.2.2.4 Estudio de daño celular

Cada corte posterior y anterior del corte con mayor número de folículos que hemos utilizado para densidad folicular de la muestra se utilizó para evaluar el daño celular por apoptosis en los folículos y el estroma mediante un ensayo de TUNEL. Esta técnica cuantifica la incorporación de fluorescencia etiquetando el DNA roto con dUTP, utilizando una reacción catalizada por la deoxinucleotidil transferasa terminal.

Los cortes fueron desparafinados mediante incubación a 60°C durante 1h y cuatro baños de xileno de 5 min cada uno. A continuación los cortes fueron rehidratados mediante inversión en etanol a concentraciones decrecientes. Tras un lavado con PBS para eliminar los restos de etanol, se llevó a cabo el desenmascaramiento antigénico con un autoclave, sometiendo los cortes durante 3 min a 120°C, 1,5 Atm en Tampón Citrato 10mM. A continuación las muestras fueron incubadas a 37°C durante 60 min en cámara húmeda en condiciones de oscuridad con 50 µl de la mezcla de reacción de TUNEL(Roche applied science, 2156792); esta mezcla fue omitida en el control negativo. Finalmente las muestras fueron montadas con DAPI (ProLong Gold Antifade Reagent with Dapi; Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, USA) para teñir los núcleos y examinadas bajo microscopio de fluorescencia

La fluorescencia fue observada bajo microscopio de fluorescencia midiendo el estado del DNA de los folículos y de las células del estroma.

La señal apoptótica se consideró positiva cuando la tinción dUTP se incorporó en el núcleo celular tiñéndolo de rojo. El daño celular fue cuantificado por métodos morfométricos y expresado como VOL de células TUNEL+/VOL total de células. La tasa de apoptosis en las pacientes Prepúberes (GPre) y Prepúberes (GP) que habían recibido tratamiento quimioterápico previo a la CCO fue comparada con sus controles (GCPre y GCP respectivamente).

7.5.2.2.5 Estudios morfométricos

Sobre los cortes teñidos con Hematoxilina/ eosina se llevó a cabo la visualización de los folículos primordiales, primarios y secundarios. El cálculo la densidad folicular fue expresado en vol de folículos por milímetro cuadrado de tejido. El cálculo del crecimiento folicular se expresó como el porcentaje de vol de folículos primarios/vol folículos totales. Para realizar la medición del área de las secciones y diámetro de folículos necesario para el cálculo de la densidad folicular se llevó a cabo un estudio cuantitativo morfométrico mediante el sistema de Análisis de Imagen IMAGE PROPLUS 5.1 (Media Cybernetics) que fue utilizado al mismo tiempo para la cuantificación de FoxO3 y TUNEL.

7.5.3 Análisis estadístico

Todas las variables estudiadas fueron comparadas en las pacientes Prepúberes (GPre) y Prepúberes (GP) que habían recibido tratamiento quimioterápico previo a la CCO frente a los grupos control (GCPre y GCP respectivamente).

El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa “SPSS statistics versión 19”. Los datos fueron expresados como media±SD. En función si las muestras presentaron una distribución normal o no, se realizó una comparación de medias mediante el test T para muestras independientes o la prueba de Mann-Whitney, respectivamente. Se consideró diferencias estadísticamente significativas si * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$. Se consideró no diferencias estadísticamente significativas (NS) si $p > 0,05$.

:: RESULTADOS

8 RESULTADOS

8.6 Programa de preservación de fertilidad en niñas y adolescentes con cáncer

8.6.1 Descripción de las características generales de las pacientes incluidas en el programa de PF y diseño de la Clasificación Valencia 2015 para la estimación de riesgo gonadotóxico

8.6.1.1.1 Características demográficas y diagnósticos

- Procedencia, diagnósticos y edad

El programa de PF para niñas y adolescentes del Hospital Universitario y Politécnico La Fe, ha incluido en el periodo estudiado (octubre 2008- agosto 2015) un total de 51 pacientes, realizándose a todas ellas una CCO.

En 29 casos (56,8%) han sido pacientes diagnosticadas y tratadas el Hospital La Fe. En 28 pacientes el servicio que ha derivado a la pacientes ha sido OP y en 1 caso, Hematología Pediátrica. En nuestro centro se ha propuesto la realización de la técnica a 30 pacientes, por lo que aceptación del procedimiento ha sido del 96,6%.

Tabla 10 : Resumen de las CCO realizadas en nuestro centro anualmente, distinguiendo aquellas derivadas de otros centros. Calculo proporción pacientes diagnosticadas/ CCO realizadas en el Hospital La Fe

AÑO	PACIENTES MENORES DE 14 AÑOS DIAGNOSTICADAS EN OP LA FE	CCO PROCEDENTES LA FE	% SOBRE LAS DIAGNOSTICADAS	DERIVADAS DE OTROS CENTROS	TOTAL CCO
2008	No disponible	1		0	1
2009	49	4	8,1 %	0	4
2010	52	5	9,6 %	4	9
2011	31	7	22,5%	2	9
2012	28	3	10,7%	3	6
2013	26	0	0%	2	2
2014	35	5	14,3 %	3	8
2015	No disponible	4		8	12
TOTAL		29		22	51

En el servicio de OP del Hospital La Fe se han diagnosticado a lo largo del periodo estudiado 221 niñas y adolescentes menores de 14 años, por lo que la tasa global de realización de CCO en las pacientes de nuestro hospital ha sido del 10,8 % (excluido año 2008 del cálculo por iniciarse el programa a finales del mismo y 2015 por no haber concluido). Desde la puesta en marcha hasta ahora, el número de pacientes incluidas y el porcentaje respecto de las diagnosticadas, ha variado considerablemente (Tabla 10).

En el 2010 derivaron a nuestro centro pacientes de los hospitales General de Alicante y Clínico de Valencia. En 2012 se incorporaron además el Hospital Virgen del Camino de Pamplona y el Niño Jesús de Madrid. En 2015 se han sumado: Complejo Asistencial de Salamanca, Cruces de Bilbao, Carlos Haya de Málaga y el Hospital General de Albacete (Figura 34).

Figura 33 : Distribución de centros nacionales y vol de pacientes en las que se ha realizado CCO en el Hospital La Fe.

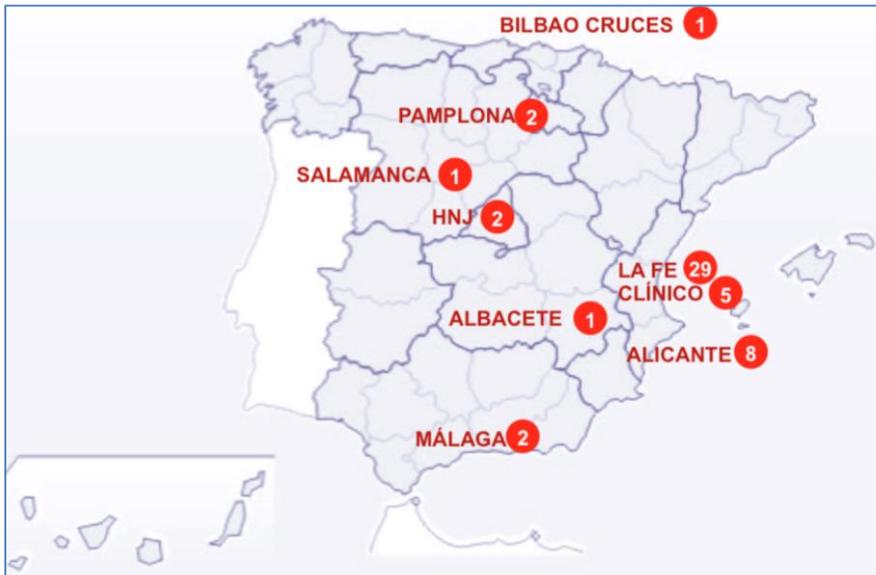
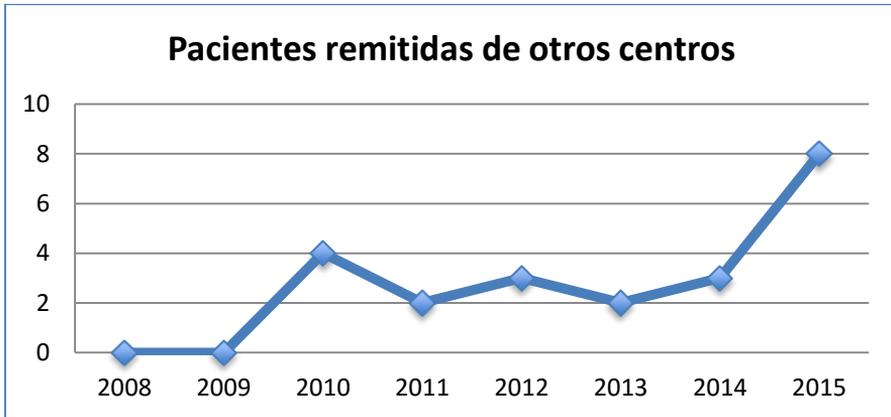


Figura 34: Evolución cronológica en el vol de pacientes derivadas de otros centros para CCO



La mediana de **edad** de todas las pacientes del programa al **debut diagnóstico** es de 10,3 años (IQR 6,5- 13,4) siendo la mínima edad 2,1 y la máxima 14,7 años. La mediana de **edad** de todas las participantes en el momento de la realización de la **CCO** es de 10,5 años (IQR 7,8- 13,6) siendo la mínima 2,8 y la máxima 18,1 años. Si consideramos sólo las derivadas de otros centros dicha mediana es de 12,2 años (3,3-15,3).

Resumimos la distribución de las pacientes por **diagnósticos**, separados por procedencia y con descriptivo de la **edad** (Tabla 11).

Tabla 11 : Diagnósticos de base de las pacientes en las que se ha realizado CCO, distinguiendo procedencia y mediana de edad (edad mínima y edad máxima)

DIAGNÓSTICOS	NÚM	ORIGEN LA FE	OTROS CENTROS	MEDIANA EDAD en CCO (años)
LLA	14	9	5	7,4 (2,8-16,2)
LMA	8	3	5	12,7 (8,1-15,2)
SARCOMA EWING	7	3	4	12,7 (9,2-14,5)
E. HODGKIN	5	3	2	13,6 (12,1-14,7)
SARCOMA PB	4	1	3	14,1 (3,6- 15,3)
SMD	4	3	1	11,9 (9,6- 13,4)
T.CELS GERMINALES	3	3	0	10,5 (10,2-13,5)
T. WILMS	2	2	0	3,6 (2,1-4,1)
T.OVÁRICO	1	1	0	18,1
MEDULOBLASTOMA	1	1	0	8,6
EGC	1	0	1	11,7
OSTEOSARCOMA	1	0	1	14,6

▪ **Desarrollo puberal**

Atendiendo al inicio de **desarrollo puberal** 24 pacientes (47%) eran prepúberes en el momento de CCO, con una mediana de edad de 7,5 años (2,8-10,54) y 27 púberes (53%) con una mediana de edad de 13,6 años (10,2-18,1).

Entre las 27 pacientes púberes: 4 pacientes con Estadio II, 2 pacientes con estadio III, 21 pacientes con estadio IV-V. Entre las púberes 22 habían tenido la menarquia en el momento de CCO.

Los diagnósticos en relación al desarrollo puberal se describen en Figura 35 y Figura 36:

Figura 35 : distribución enfermedad de base entre las pacientes prepúberes sometidas a CCO

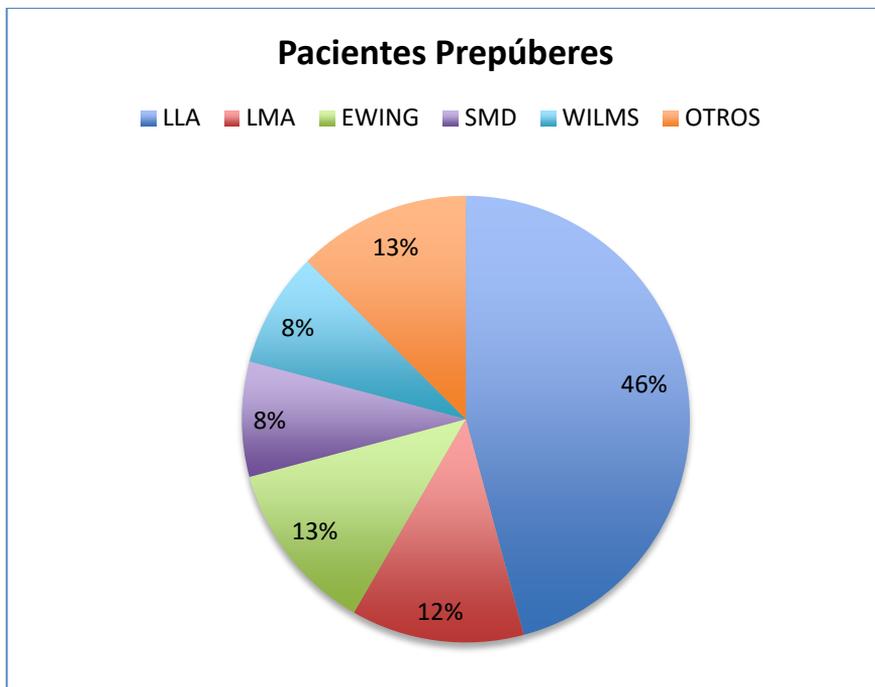
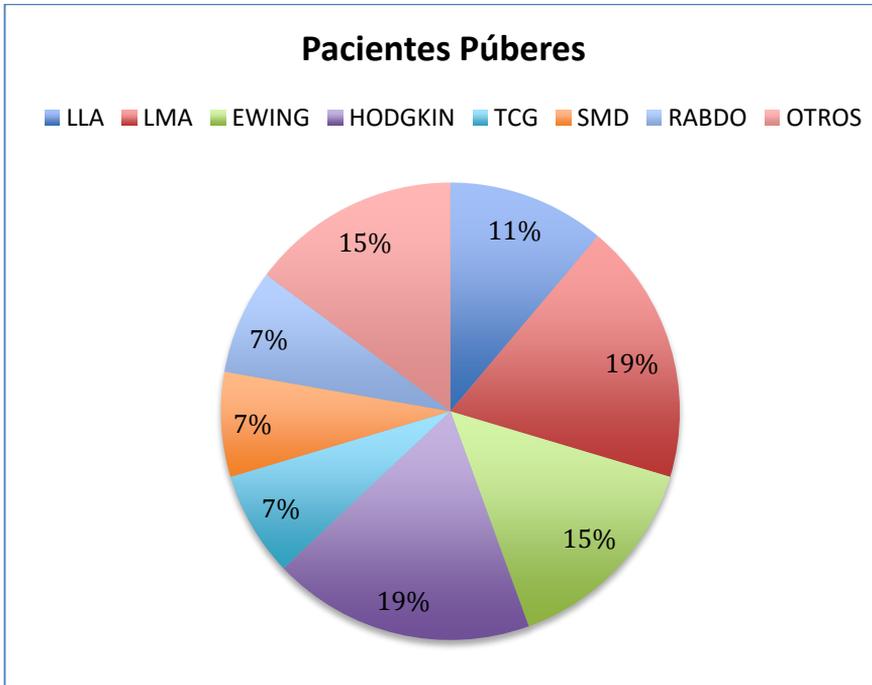


Figura 36 : distribución enfermedad de base entre las pacientes púberes sometidas a CCO



▪ **Firma de CI**

En todas los casos se produjo sin incidencias la firma de CI, incluyendo en ellos la firma de las pacientes mayores de 12 años. El 100% de las familias indicó que en caso de no utilizar el tejido para uso clínico, quería que se destinase a investigación. En ningún caso hubo disparidad de opiniones objetivable entre los padres/responsables legales y las pacientes mayores, y no se ha precisado de asesoramiento psicológico adicional para la toma de ninguna decisión.

▪ **Tiempos entre debut Dg y CCO**

La mediana de días entre la **fecha de diagnóstico y la fecha de la CCO** de todas las pacientes globalmente es de 142 días (IQR 38-299), siendo 2 el mínimo vol de días y 3421 el máximo.

De acuerdo a la cronología del programa, la realización de la CCO en pacientes diagnosticadas de LA se realiza en un momento totalmente distinto al del resto y además la duración de los tratamientos previstos antes de CCO difiere considerablemente según sea LLA o LMA. Por otra parte los SMD o inmunodeficiencias con frecuencia pueden preceder a su tratamiento con TPH en mucho tiempo. Al separar a las pacientes teniendo en cuenta estos factores

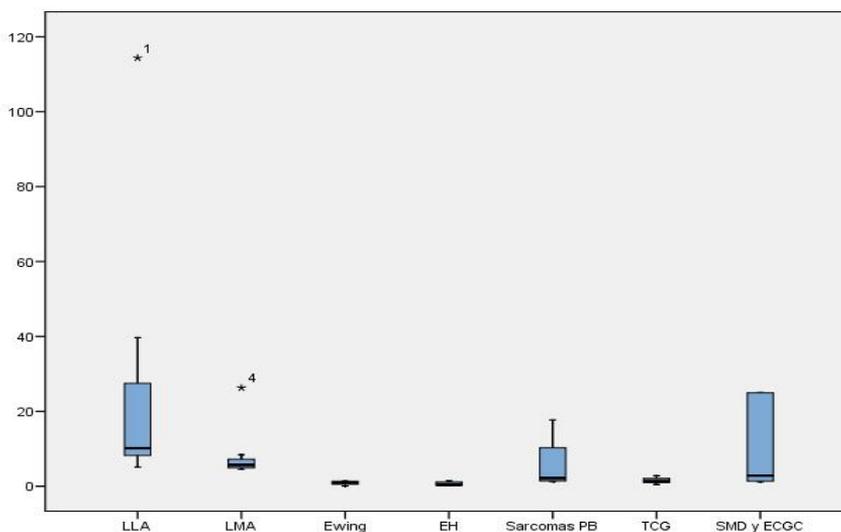
:: RESULTADOS

encontramos cifras muy distintas de la mediana de tiempo entre fecha de diagnóstico y CCO por grupos de enfermedades (Tabla 12) (Figura 37):

Tabla 12: Mediana expresada en días (mínimo y máximo) desde la fecha del Dg y la fecha de CCO según enfermedad de base.

DIAGNOSTICO	Mediana
LLA	304 (142-3431)
LMA	174 (135-789)
S.EWING	26 (2-41)
E.HODGKIN	20 (6-43)
RABDOMIOSARCOMAS	56 (37-84)
TCG	47 (14-84)
SMD + EGC	85 (36-751)

Figura 37: Gráfico de cajas y bigotes comparando meses entre fecha de Dg y fecha de CCO según enfermedad de base



8.6.1.1.2 Diseño de la clasificación Valencia 2015. Cálculo del Riesgo Gonadotóxico y su evolución temporal de acuerdo a los protocolos oncológicos utilizados

▪ Clasificación riesgo gonadotóxico Valencia 2015

Tal y como se ha descrito en el apartado de la metodología, como parte del proyecto de esta tesis doctoral, se ha confeccionado una clasificación de riesgo gonadotóxico en niñas y adolescentes adaptada a los principales diagnósticos y protocolos empleados en nuestro país (Tabla 7). Ver en apartado **discusión** la fundamentación para elaboración de dicha clasificación y los criterios utilizados.

▪ Protocolos utilizados

Los protocolos utilizados o con previsión de utilizar en todas las pacientes del programa, han sido homogéneos y habitualmente suponen el tratamiento estándar de primera o segunda línea según la SEHOP.

Atendiendo a los diagnósticos han sido: LLA (SHOP 2005); LMA (SHOP 2007); Sarcoma de Ewing (SEOP 2001); Enfermedad de Hodgkin (EURONET); Sarcomas de PB rhabdomyosarcomas y no rhabdomyosarcomas (EpSSG RMS 2005-NRST 2005); Tumor de células germinales (SIOP CNS GTC II).

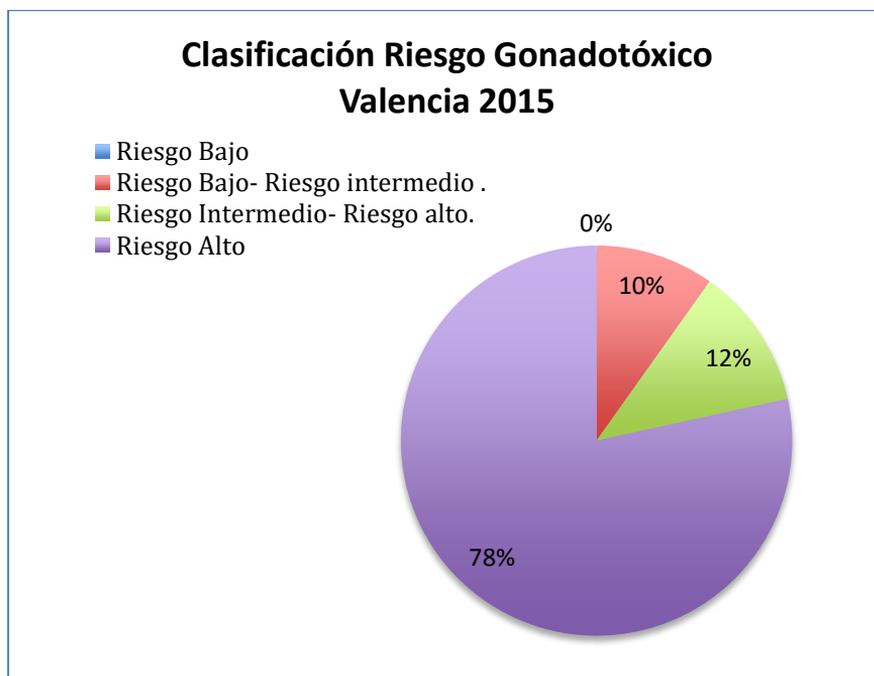
En un caso (TCG mediastínico) se individualizó un esquema al no contar con protocolo nacional, contemplando la posibilidad de administrar al final del mismo megaterapia con TPH autólogo. En caso de la paciente diagnosticada de meduloblastoma metastásico se utilizó el protocolo HART de Milán, adoptado por muchos centros nacionales e internacionales.

▪ Cálculo de la estimación riesgo gonadotóxico

La indicación o no de la realización de CCO se ha establecido globalmente en base a la clasificación Valencia 2015 propuesta en la metodología para nuestro país (Tabla 7) y en alguna ocasión a situaciones particulares de las pacientes y de la cronología del programa.

La distribución de las pacientes, de acuerdo al riesgo gonadotóxico atribuible al tratamiento teórico previsto es la siguiente (Figura 38): 40 pacientes Alto Riesgo, 6 pacientes Riesgo Intermedio-Riesgo alto, 5 pacientes Riesgo Bajo-Riesgo Intermedio.

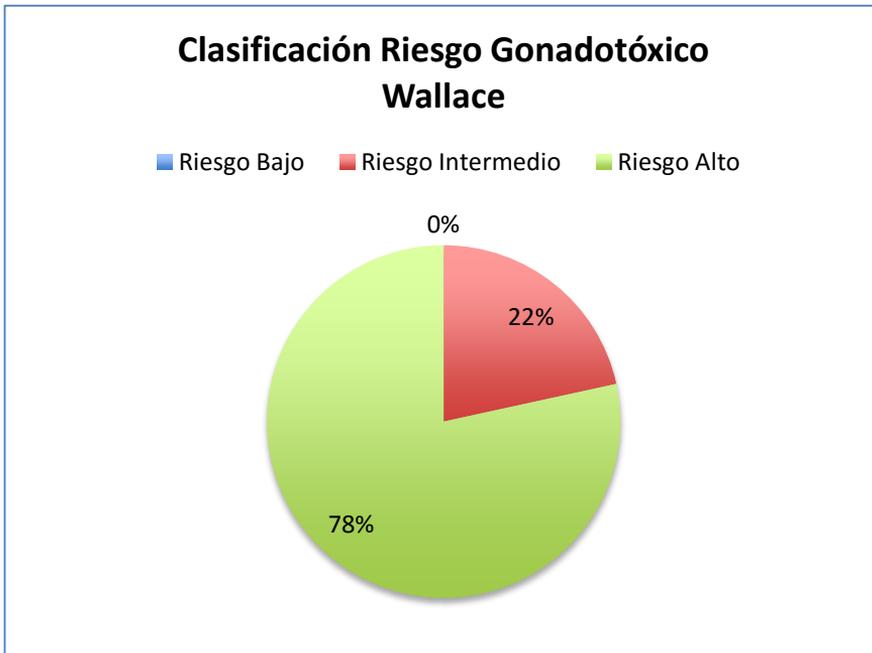
Figura 38 : distribución pacientes según Riesgo Gonadotóxico de la clasificación Valencia 2015



▪ **Grado de concordancia con la clasificación de riesgo gonadotóxico Wallace 2005**

Si consideramos el grado de concordancia con los criterios de la clasificación propuesta por Wallace en 2005 (Figura 20), todas las pacientes de alto riesgo corresponderían al grupo propuesto por ellos también como alto riesgo. Nuestras pacientes con riesgo bajo-riesgo intermedio o riesgo intermedio-riesgo alto, corresponderían todas al grupo de riesgo intermedio según su clasificación.

Figura 39 : distribución pacientes según Riesgo Gonadotóxico de la clasificación Wallace 2005



▪ **Descripción de las pacientes que no eran de alto riesgo inicial**

Entre las otras 11 pacientes que no cumplían criterios de alto riesgo encontramos:

- Tres casos eran pacientes diagnosticadas de sarcoma de Ewing localizado sin necesidad de auto TPH de acuerdo al protocolo nacional y según nuestra clasificación Riesgo Intermedio-Riesgo alto.
- Dos eran TCG intracraneales, con posibilidad de llevar RT a dosis > de 24 Gy dependiendo de la respuesta y por tanto Riesgo Intermedio-Riesgo alto.
- Una paciente con SMD que previsiblemente iba llevar TBI pero a dosis inferiores a las habituales y CFM como acondicionamiento y que se clasificó como Riesgo Intermedio-Riesgo alto.
- Cuatro pacientes con diagnóstico de EH en grupos de tratamiento 2 y 3 con posibilidad de recibir procarbacin según randomización del protocolo Euronet y por tanto con riesgo según clasificación actual (muy reciente) bajo-intermedio, pero

según clasificación previas riesgo intermedio (Ver cronología de EH en apartado DISCUSIÓN).

- Una paciente de 14 años diagnosticada de osteosarcoma localizado considerado riesgo bajo-riesgo intermedio, pero con una familia y paciente especialmente interesada en el tema de PF.

▪ **Evolución temporal del riesgo gonadotóxico calculado**

Tras comprobar el tratamiento finalmente recibido por todas las pacientes, se observa que en varias ocasiones las pacientes han cambiado el riesgo gonadotóxico inicialmente calculado. El cambio de riesgo ha ocurrido en las 2 direcciones.

Incremento del riesgo gonadotóxico previsto

- Una de las pacientes diagnosticadas de EH y según clasificación inicial nuestra de riesgo bajo-intermedio (grupo 3 de tratamiento finalmente tratada con dacarbacina tras randomización y sin RT), presentó posteriormente 2 recaídas rescatándose en primer lugar con RT y QT de segunda línea y posteriormente con QT de tercera línea (altas dosis de AA) y megaterapia con TPH autólogo. Ahora mismo se considera de alto riesgo gonadotóxico, pendiente de iniciar seguimiento endocrinológico.

Reducción del riesgo gonadotóxico previsto

- Una paciente con TCG mediastínico con posibilidad de necesitar megaterapia con TPH autólogo (por eso catalogada inicialmente como de alto riesgo), finalmente no lo recibió, desescalando el riesgo gonadotóxico hasta considerarse actualmente bajo. El mismo cambio de riesgo ocurrió con otra paciente diagnosticada de sarcoma PB uterino que al alcanzar RC con cirugía y QT, la RT pélvica posible en primera línea fue desestimada.
- Las 2 pacientes con TCG intracraneal finalmente entraron en RC tras QT y cirugía por lo que la dosis de RT craneal finalmente administrada fue de 24 Gy (Cambiando de Riesgo Intermedio – Riesgo Alto a Riesgo Bajo-Riesgo intermedio).
- Dos pacientes con EH grupos 2-3 de tratamiento y catalogadas de Riesgo Bajo-Riesgo Intermedio (según clasificación actual) por la posibilidad de recibir procarbacina, finalmente tras randomización recibieron dacarbacina pasando a considerarse de bajo riesgo.

- Una paciente con SMD finalmente solo llevo una dosis de ICT (300 cGy) y CFM a dosis bajas (1200 mg/m²) por lo que su riesgo finalmente pasaría a considerarse intermedio-bajo.

La diferencia entre riesgo gonadotóxico calculado pre y post tratamiento se resume a continuación (Tabla 13) :

Tabla 13 : Evolución Riesgo gonadotóxico atendiendo al tratamiento previsto y finalmente administrado

RIESGO GONADOTÓXICO	TTº PREVISTO	TTº ADMINISTRADO
RIESGO ALTO	40	39
RIESGO ALTO-RIESGO INTERMEDIO	6	3
RIESGO INTERMEDIO-RIESGO BAJO	5	5
RIESGO BAJO	0	4

▪ **Valoración de Indicación CCO según momento cronológico de la enfermedad (debut/recaída)**

La indicación de CCO se realizó en primera línea de tratamiento en 39 pacientes (76,5%). En las restantes 12 pacientes (23,5%) no había indicación inicial pero sí tras evolución de la enfermedad.

Dentro de este último subgrupo encontramos:

- Ocho recaídas de LA (7 LLA y 1 LMA) y en todas ellas tras la recaída había indicación de TPH.
- Dos pacientes con tumor de Wilms sufrieron ruptura del tumor durante la cirugía, implicando cambio de estrategia de RT. En lugar de administrarse exclusivamente en flanco, debía ser abdominal total.
- Una paciente con Sarcoma de PB no rabdomiosarcoma en zona glútea necesitó RT que incluía zona pélvica tras recaída a los pocos meses del fin de tratamiento de primera línea (sólo incluía QT y Cirugía).
- Una paciente diagnosticada a los 14 años de teratoma inmaduro de ovario con extirpación quirúrgica inicial y tratamiento QT, presentó un segundo tumor ovárico contralateral asincrónico (4 años más tarde) subsidiario de extirpación completa de la otra gónada (finalmente teratoma maduro en AP).

8.6.1.1.3 Descripción del tratamiento antineoplásico previo a CCO

Globalmente en nuestra serie 15 pacientes (29,4%) no habían recibido QT previa y sí la habían recibido 36 (70,6%).

Desglosando estos datos según enfermedad de base se constata que todas las pacientes con LA (22 casos) habían llevado QT previa (en primera línea ± recaída) por la cronología propuesta por el programa para este diagnóstico y en el caso de recaídas de tumores sólidos (4 casos) y con indicación entonces de CCO, todas habían llevado QT en el tratamiento de primera línea.

Fuera de estas dos circunstancias encontramos 10 pacientes con tumores sólidos (19,6%) que habían recibido algún citostático previo a la CCO realizada en primera línea de tratamiento. El 40% pacientes del hospital La Fe y 60% derivadas de otros centros. Las causas en nuestro centro fueron: motivo clínico por inestabilidad de la paciente (1), motivo familiar (1), motivo técnico laboratorio (1), y reajuste de estadio en paciente (1).

▪ Cronología QT previa y CCO

Entre todas las pacientes que llevaron QT previa, en 25 de 36 casos se disponía de la fecha exacta de QT previa a la realización de CCO. Siendo la mediana de tiempo de 23 días (IQR 21,3- 44,3) con un mínimo de 5 y un máximo de 1663 días.

▪ Agentes citostáticos utilizados previamente a CCO

Entre la QT administrada previamente a la CCO y relacionada con gonadotoxicidad encontramos:

Tumores sólidos (14 casos): En 8 pacientes se había utilizado Ifosfamida combinada con otros agentes QT no considerados gonadotóxicos con una mediana de dosis de 9000 mg/m² (6000-36.000). Una paciente había recibido una tanda de 14 días de procarbina oral (dosis total 1400 mg/m²) y otra paciente CFM a dosis bajas (1350 mg/m²). En 4 casos no se había recibido ningún agente QT considerado gonadotóxico.

Dentro del grupo de las neoplasias hematológicas (22 casos) : 14 pacientes con diagnóstico de LLA, habían recibido entre los combinados poliquimioterápicos previos al TPH, una mediana de dosis de CFM de 4200 mg/m² (2000-8950) y de ARA-C de 12600 mg/m² (5000-16.000). En el caso de las 8 pacientes con LMA habían recibido una mediana de dosis de ARA-C de 14750 mg/m² (9000-25.000).

8.6.1.1.4 Descripción del tratamiento antineoplásico posterior a CCO

▪ **Trasplante de Precusores Hematopoyéticos**

Entre las 51 pacientes incluidas en el programa, 33 (64,7%) tenían previsto en su esquema de tratamiento megaterapia con TPH. Finalmente en 1 de ellas no se realizó por buena respuesta a QT convencional (TCG) y en otra paciente progresó la enfermedad falleciendo antes de llegar al TPH (diagnosticada de sarcoma Ewing metastásico). Por otra parte una paciente en la que inicialmente no se contemplaba su utilización, sí se realizó tras una segunda recaída de EH. En total por tanto entre las pacientes de nuestra serie se han realizado 32 TPH (62,7%).

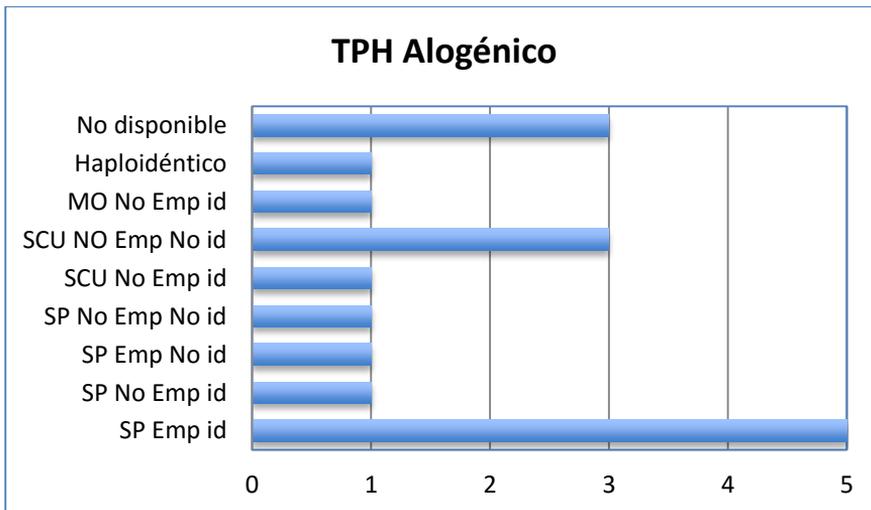
- Tipo de TPH recibido

En 15 ocasiones (46,8%) se ha realizado TPH autólogo: 10 pacientes diagnosticadas de LA (6 LLA y 4 LMA) y 6 de un tumor sólido (3 sarcoma Ewing, 1 meduloblastoma diseminado, 1 EH).

En 17 casos (53,2%) se ha realizado TPH alogénico: 10 pacientes con LLA, 4 con LMA, 4 con SMD y 1 con EGC.

Descripción de los TPH alogénicos realizados atendiendo a la fuente de precursores, parentesco e identidad HLA (Figura 40).

Figura 40 : Características de los TPH alogénicos realizados según fuente de progenitores, parentesco e identidad HLA



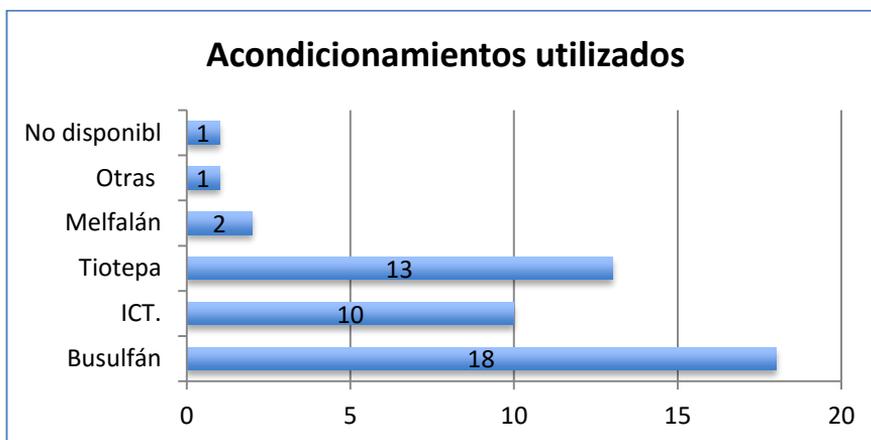
MO: médula ósea, SP: sangre periférica, SCU: sangre de cordón umbilical. Emp: emparentado, No Emp: No emparentado. id: idéntico, No id: no idéntico.

- Cronología entre fecha Diagnóstico, fecha CCO y fecha TPH

La mediana de tiempo entre el diagnóstico y la realización del TPH es de 304 días (IQR 186-522). La mediana de tiempo entre la realización del CCO y el TPH es de 13 días (IQR 12-25,8) con un mínimo de 5 y un máximo de 215.

Distribución de los acondicionamientos utilizados en el global de los TPH (Figura 41):

Figura 41: distribución acondicionamientos empleados en las 32 pacientes que recibieron TPH

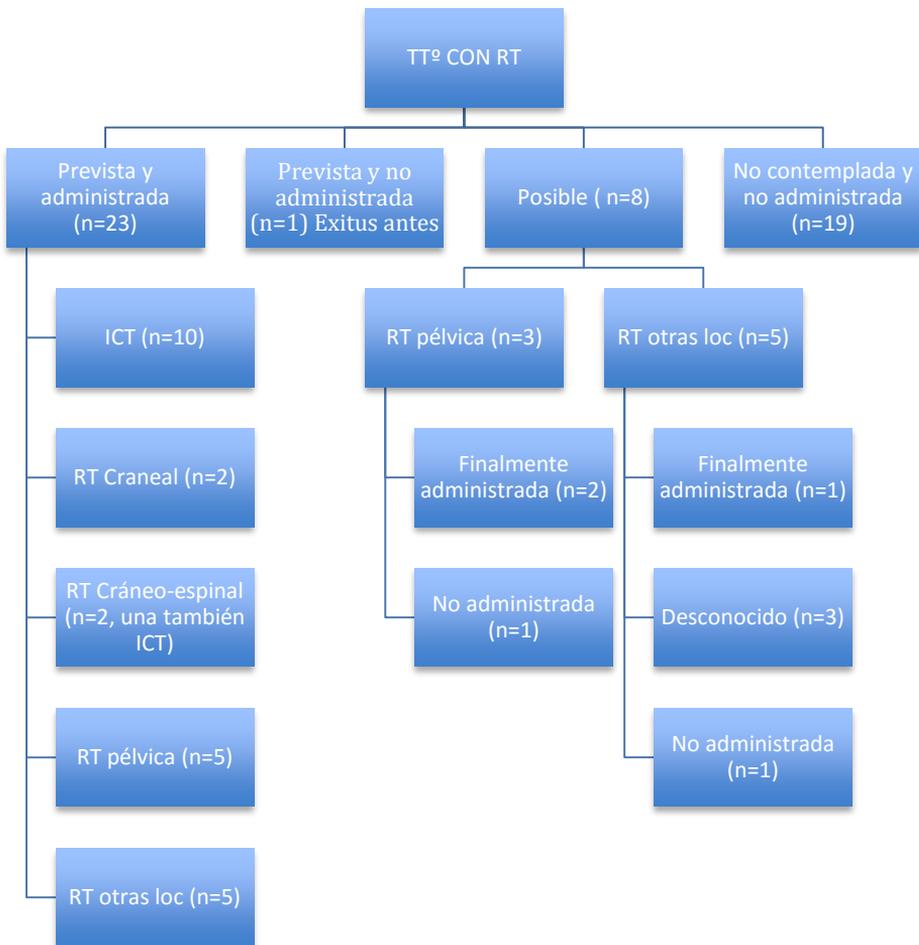


En el 85% de los casos se han utilizado acondicionamientos basados en TBI o Busulfán. En 12 pacientes se asoció busulfán y tiotepa en el acondicionamiento. En 1 paciente diagnosticada de meduloblastoma diseminado se realizó TPH en tándem (2 TPH consecutivos acondicionados con Tiotepa).

▪ **Radioterapia**

La RT como parte del protocolo de tratamiento estaba prevista en 24 pacientes (47%), podía ser **posible** su administración en 8 pacientes (15,8%) y **no** estaba contemplada en 19 (37,2%) (Figura 42).

Figura 42 : Esquema de la previsión de utilización de RT en las pacientes de la serie y RT finalmente administrada



Entre las pacientes que sí tenían programada RT, todas menos una (que falleció antes de su administración por progresión de la enfermedad) la recibieron.

- Recibieron ICT 10 pacientes, 9 de ellas con una dosis de 12 Gy y 1 afecta de SMD finalmente con 0.3 Gy. La RT craneal se administró en 2 pacientes con TCG intracraneal, pero finalmente a dosis de 24 Gy por RC tras cirugía y QT. Dos pacientes recibieron RT cráneo espinal (una paciente con meduloblastoma diseminado con una dosis total de 59,7 Gy y una paciente con LLA con infiltración del SNC con una dosis de 18 Gy, y que además se acondicionó con ICT).

:: RESULTADOS

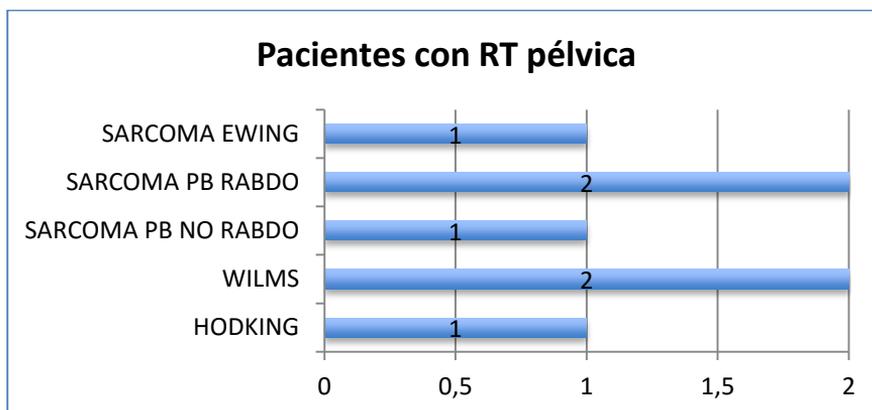
- En 5 pacientes la RT se administró en región pélvica con una mediana de dosis de 36,7 Gy (21-50,4). Los diagnósticos de estas pacientes fueron: Sarcoma de Partes blandas rabdomyosarcoma pélvico (1), sarcoma de Partes blandas rabdomyosarcoma paravesical (1), sarcoma de Ewing iliaco (1) y tumor de Wilms con ruptura del tumor intraoperatoria (2)
- Finalmente otras 5 pacientes recibieron RT según protocolo en diferentes localizaciones supradiaphragmáticas.

Entre las 8 pacientes con RT posible, en 3 casos era sobre región pélvica y en 5 en otras localizaciones supradiaphragmáticas. Entre las posibles sobre región pélvica: En 2 casos finalmente sí se administró (dosis de 41 Gy en paciente con rabdomyosarcoma glúteo y de 19,8 Gy en paciente con EH con afectación iliaca) y en un caso finalmente no se utilizó al encontrarse la paciente en RC tras Cirugía y QT (diagnóstico de rabdomyosarcoma uterino).

- Radioterapia pélvica

El número total de pacientes que ha recibido RT pélvica es de 7, con una mediana de dosis de 34,9 Gy (19,8-50,4). Sus diagnósticos se desglosan en la Figura 43:

Figura 43: distribución de diagnósticos en pacientes que recibieron RT pélvica

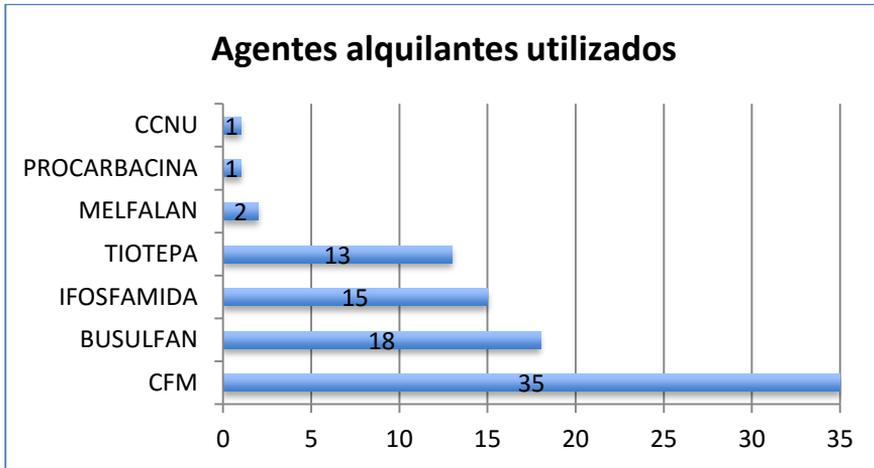


La mediana en días desde la realización de CCO y la administración de ICT es de 19,5 días (IQR 7-29) y en el caso de los tumores sólidos con RT en zona pélvica de 109 días (IQR 46,8- 170,5).

▪ Agentes alquilantes

En 49 pacientes de 51 (96%), estaba previsto la administración de algún AA a lo largo del tratamiento y a cualquier dosis (Figura 44).

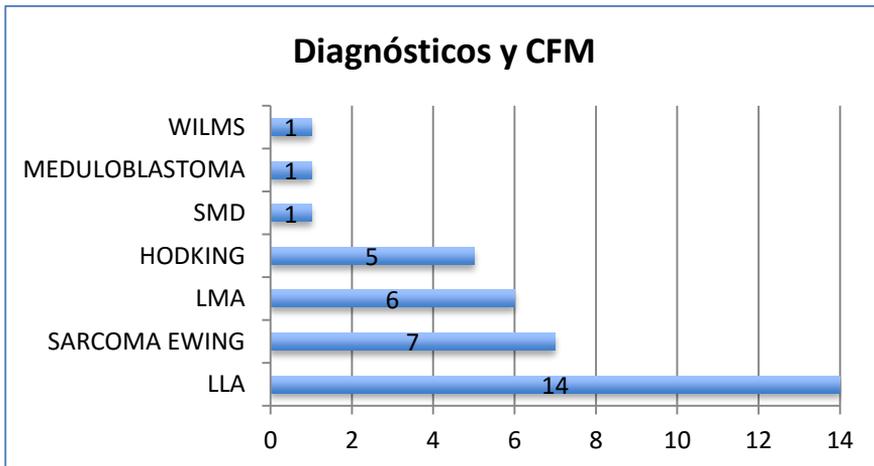
Figura 44 : distribución de los diferentes AA previstos en el tratamiento de las pacientes de la serie



▪ **CFM**

La CFM ha sido el AA más utilizado. En el 68,6% de las pacientes (35 casos) se ha utilizado en algún momento del tratamiento, aunque en 6 pacientes con LMA y en una con SMD exclusivamente como acondicionamiento previo a TPH (Figura 45).

Figura 45 : Distribución de los diferentes diagnósticos en los se ha utilizado CFM



La dosis de CFM utilizada como acondicionamiento fue en todos los casos de 3600 mg/m² para las pacientes con LA y de 1200 mg/m² en el caso de la paciente con SMD.

:: RESULTADOS

La mediana de dosis de CFM en pacientes con LLA pre-TPH fue de 4000 mg/m² (IQR 3250-4000). La mediana de dosis en las pacientes con sarcoma de Ewing fue de 1500 mg/m² (IQR 1500-12000). En las pacientes con EH la mediana de dosis fue de 2000 mg/m² (IQR 2000-4000). La paciente diagnosticada de meduloblastoma diseminado recibió una dosis de 4000 mg/m² y el caso del tumor de Wilms de 1350 mg/m².

▪ **IFOSFAMIDA**

Un total de 15 pacientes (29.4%) recibieron Ifosfamida a lo largo de su tratamiento oncológico, la mediana de dosis fue 54000 mg/m² (IQR 54.000-54000). La distribución por diagnósticos: 7 pacientes con sarcomas de Ewing, 3 pacientes con rhabdomyosarcomas, 1 paciente con sarcoma de PB no rabdo, 1 paciente con osteosarcoma y 3 pacientes con TCG

▪ **PROCARBACINA**

Sólo una paciente con diagnóstico de EH finalmente recibió procarbicina a una dosis de 5600 mg/m². Dos pacientes más podían haberla llevado, pero finalmente tras aleatorización les correspondió dacarbacina.

▪ **CCNU**

Sólo una paciente con diagnóstico de meduloblastoma recibió CCNU a una dosis de 400 mg/m².

▪ **BUSULFÁN – TIOTEPA- MELFALÁN**

Un total de 18 pacientes se acondicionaron con busulfán a las dosis estándar establecidas en función del peso: En 2 casos, a este acondicionamiento se le añadió Melfalán (140 mg/m²) y en 12 ocasiones se asoció Tiotepa a dosis habituales (300mg/m²). En la paciente con un meduloblastoma se realizó TPH en tándem acondicionado en las 2 ocasiones con Tiotepa exclusivamente (900 mg/m² por procedimiento).

8.6.2 Proceso preparación y ejecución de la CCO

8.6.2.1 Realización de estudio preoperatorio

8.6.2.1.1 Resultados analítica hormonal previa

En las 51 pacientes del programa, se realizó analítica hormonal previa al procedimiento.

Dadas las circunstancias específicas de estas pacientes en ninguna ocasión se tuvo en cuenta el día del ciclo menstrual a la hora de la planificación

del análisis. En el 94% de las pacientes se realizó en el mismo día de la intervención (previamente a CCO).

Se detalla la mediana y IQR de las principales categorías hormonales estudiadas en el programa, diferenciando entre aquellas pacientes que llevaron QT previa a la CCO (y por tanto a la extracción de la analítica) y las que no y distinguiendo también los resultados en función de su desarrollo puberal (Tabla 14) (Tabla 15):

Tabla 14 : Resultados de las principales variables analíticas hormonales estudiadas en aquellas pacientes sin QT previa a la extracción de la analítica

	AMH (ng/ml)	FSH (IU/l)	LH (IU/l)	ESTRADIOL (pg/ml)
Prepúber (n=5)	10,1 (IQR 6-23,4)	2,9 (IQR 2,3-3,6)	0,4 (IQR 0,2-0,9)	6 (IQR 0-19,3)
Púber (n=10)	17,3 (IQR 13,1-28,2)	5,6 (IQR 3,2-6,2)	2,2 (IQR 0,8-6,4)	45,5 (IQR 43-56)

Tabla 15: Resultados de las principales variables analíticas hormonales estudiadas en aquellas pacientes con QT previa a la extracción de la analítica

	AMH (pM/ml)	FSH (mU/ml)	LH(mU/ml)	ESTRADIOL (pg/ml)
Prepúber (n=19)	3,6 (IQR 0,1-8)	2,7 (IQR 1,4-3,7)	0,1 (IQR 0,1-0,1)	0 (IQR 0-10,8)
Púber (n=17)	1,1 (IQR 0,1-7,2)	4,7 (IQR 2,8-25,1)	6,2 (IQR 1,3-9,5)	18 (IQR 8,3-30,8)

La mediana de tiempo entre la **última dosis de QT y la extracción de analítica** es de 23 días (IQR 21,3- 44,3) con un mínimo de 5 días y un máximo de 1663 (dato disponible en 25 pacientes)

8.6.2.1.2 Ecografía ovárica

En las 51 pacientes se realizó ecografía previa a la realización de la CCO. En todas, excepto en la del tumor ovárico, se descartaba por imagen ecográfica que existieran lesiones ováricas sugestivas de malignidad. En 44 casos (86,3 %) fue realizada por radiólogas pediátricas especializadas en ecografía infantil. En las otras 7 pacientes (13,7%), fue realizada por el equipo de ginecólogos de reproducción. En este último grupo la mediana de edad de las pacientes fue de 13,5 años (8,6-16,1). El motivo para ser realizada por diferentes equipos, fue exclusivamente la cronología del programa, ya que se trataron de las primeras 7 pacientes tras el inicio del mismo tal y como se describe en el apartado 4.1.2.5

:: RESULTADOS

Disponemos de los datos ecográficos de las 44 pacientes realizadas por el servicio de radiología, aunque por diferentes motivos no de todas, ni de ambos ovarios es posible describir los volúmenes y/o RFA. Entre los motivos, la edad de las pacientes ha sido determinante, ya que en 8 casos (7 prepúber y 1 púber), no se conseguían visualizar los ovarios debido a su pequeño tamaño o vejiga a máxima repleción. La mediana de edad en este subgrupo grupo es de 4,3 años(2,8-15,3). En algunas ocasiones el informe hacía referencia a múltiples folículos, sin poder contabilizar el número exacto en varias pacientes y la información sobre el tamaño de los folículos también no ha sido homogénea.

Resultados obtenidos sobre el volumen ovárico y el número de RFA de las pacientes de la serie, diferenciando desarrollo puberal (Tabla 16):

Tabla 16 : Resultados de los volúmenes ovaricos (cc) Y RFA (mediana y IQR) de las pacientes del programa

DESARROLLO PUBERAL LUGAR ECOGRAFÍA	VOLUMEN OVÁRICO (cc)	RFA
PREPUBER (24) Realizadas en RX (23) Realizadas por Repro (1)	Datos disponibles 15 pacientes (30 ovarios) Mediana Vol 1,1 cc (IQR 0,5-1,6)	Datos disponibles 16 pacientes (18 ovarios) Mediana VOL FA 3 (IQR 1-8)
PUBER (27) Realizadas en RX (21) Realizadas por Repro (6)	Datos disponibles 15 pacientes (30 ovarios) Mediana Vol 5,8 cc (IQR 1,5-9,8)	Datos disponibles 20 pacientes (24 ovarios) Mediana VOL FA 6,5 (IQR 2,8-8)

Se muestran a continuación algunas imágenes obtenidas durante la realización de las ecografías ovárica transabdominal con la medición del volumen ovárico y del tamaño de folículos antrales (Figura 46,43,44,45):

Figura 46

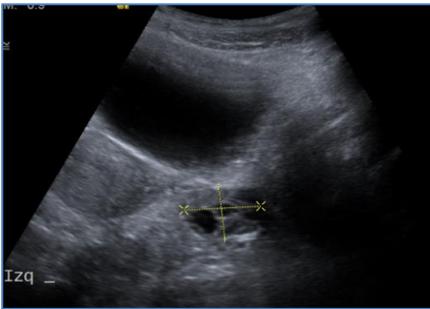


Figura 47



Figura 48



Figura 49



8.6.2.2 Caracterización del procedimiento quirúrgico.

En 38 pacientes (74,5%) la técnica quirúrgica realizada consistió en una ooforectomía parcial y en 13 casos (25,5%) ooforectomía total. En el grupo de ooforectomía parcial la mediana de edad de las pacientes es de 12,7 años (IQR 10,3 -13,7) siendo la mínima 3,8 y la máxima 16,1 años. En el grupo de ooforectomía total la mediana de edad de las pacientes es de 6,3 años (IQR 3,7 - 9,3) siendo la mínima 2,8 y la máxima 18,1 años.

En 36 casos (70,5%) el ovario intervenido fue el derecho y 15 (29,5%) el izquierdo.

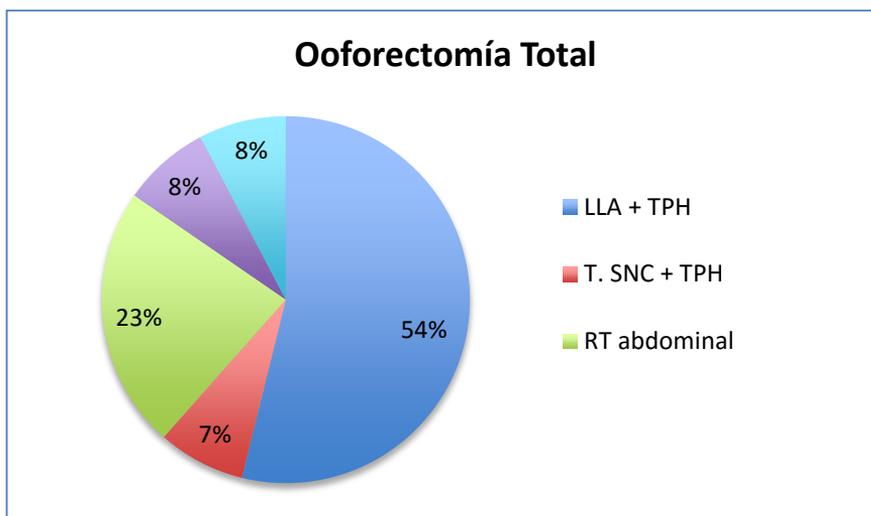
En 6 casos se asoció pexia del ovario contralateral al procedimiento estándar de CCO. Todas ellas iban a recibir RT en zona pélvica además de poliquimioterapia. Dos de ellas con diagnóstico de sarcoma de Ewing, 4 sarcomas de partes blandas (3 rhabdomiosarcomas y 1 sarcoma PB no rabdo). La mediana de edad de estas pacientes es de 14,1 años (IQR 13,5-14,5), siendo la edad mínima de 3,7 y la edad máxima de 15,3 años.

▪ **Detalles de las pacientes sometidas a ooforectomía total**

Todas las pacientes a las que se practicó ooforectomía total pertenecían al grupo de alto riesgo gonadotóxico, excepto 1 que correspondía al grupo de riesgo intermedio-riesgo alto.

Se detallan sus diagnósticos y/o tratamiento previsto (Figura 50):

Figura 50 : Diagnósticos y/o tratamientos de las pacientes sometidas a ooforectomía total (13 casos)



Solo en un caso el volumen ovárico no fue el motivo de realizar una ooforectomía total. Se trata de una paciente de 18 años afecta de teratoma ovárico (con antecedente de teratoma inmaduro en ovario contralateral hacía 4 años manejado entonces con QT + Cirugía). Se procedió a la extirpación completa del tumor y durante la anexiotomía se consiguió procesar tejido de corteza ovárica no afecto macroscópicamente por el tumor.

En los restantes 12 casos, el motivo de realizarla fue la suma de 2 factores: alto riesgo gonadotóxico y volumen ovárico muy pequeño.

En los informes ecográficos de estas pacientes en 7 ocasiones no se consigue visualizar ovarios y entre los ovarios de las 6 pacientes en las que se dispone el tamaño la mediana del volumen es de 1 cc (IQR 0,2-2).

▪ **Equipo quirúrgico responsable de la CCO**

El equipo quirúrgico encargado de realizar la intervención fue: cirugía pediátrica (CP) en 46 casos (90,1 %), reproducción 2 casos y ambos equipos en 3 pacientes.

La mediana de edad de las 46 pacientes realizadas por el equipo de CP es de 10,4 años (IQR 7,4-13,4), siendo la mínima edad 2,8 años. En las otras 5 pacientes (Reproducción o ambos) es de 14,5 años (IQR 13,6-16,2), siendo la máxima edad 18,1 años. Los motivos para que no fueran realizadas exclusivamente por CP han sido: momento cronológico del programa, pacientes que debutaron en edad pediátrica pero con recaídas en etapa adolescente-adulta, cambio de punto de corte del hospital de edad pediátrica (inicialmente < 14 años, posteriormente < 15 años).

Se muestran algunas imágenes obtenidas durante la intervención (Figura 51, 52, 53):

Figura 51



Figura 52



Figura 53



▪ **Complicaciones quirúrgicas relacionadas con la CCO**

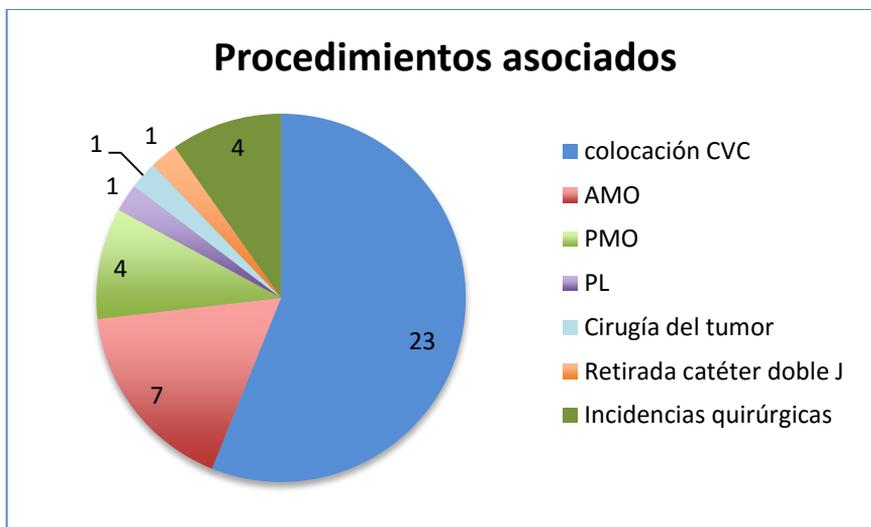
No se han producido complicaciones relacionadas con la cirugía en ningún caso, independientemente de si se ha asociado pexia o no a la CCO. No ha habido ningún caso con necesidad de ingreso en UCIP. Se ha procedido al alta hospitalaria 24 horas tras la intervención en todos los casos, excepto aquellas pacientes que debían prolongar su estancia por otros motivos ajenos a la intervención (inicio del tratamiento QT, procedimiento aféresis, completar estudios diagnósticos). No se ha producido en ningún caso retraso en el inicio del tratamiento previsto por los médicos responsables independientemente de que fueran de nuestro centro o derivadas de otros hospitales.

▪ **Descripción de los procedimientos asociados a la CCO**

En 30 pacientes (58,8%) se ha procedido a realizar durante el mismo acto anestésico requerido para la CCO, otros procedimientos necesarios para la paciente que precisaban sedación. El total de procedimientos asociados ha sido 41, de los cuales 37 habían sido planificados previamente y 4 fueron incidencias quirúrgicas que se resolvieron en ese momento (2 casos de resección de un quiste ovárico y 2 casos de cierre de orificio de hernia inguinal).

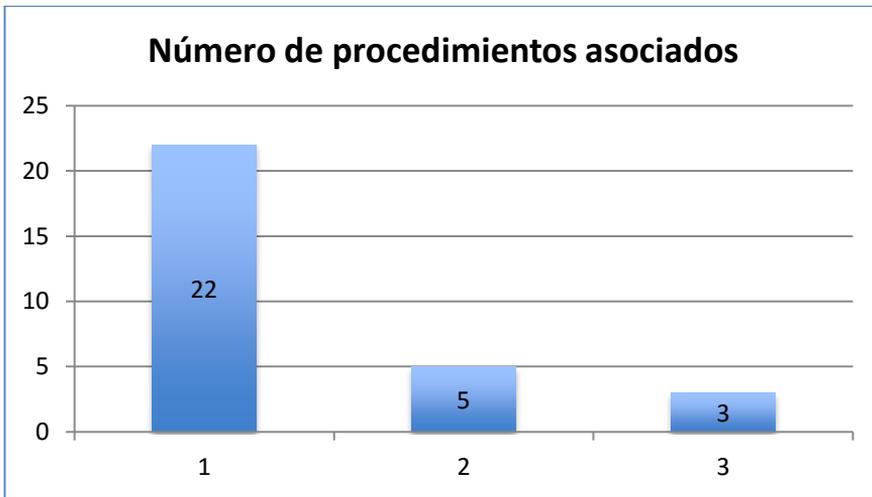
Se detallan los procedimientos asociados realizados (Figura 54) y el vol de ellos por paciente (Figura 55) :

Figura 54 : Descriptivo de los procedimientos asociados a la CCO



En 8 pacientes se realizó más de un procedimiento asociado tal y como se detalla en la siguiente gráfica:

Figura 55: Número de procedimientos asociados por paciente



8.6.3 Estudio descriptivo de la corteza ovárica criopreservada

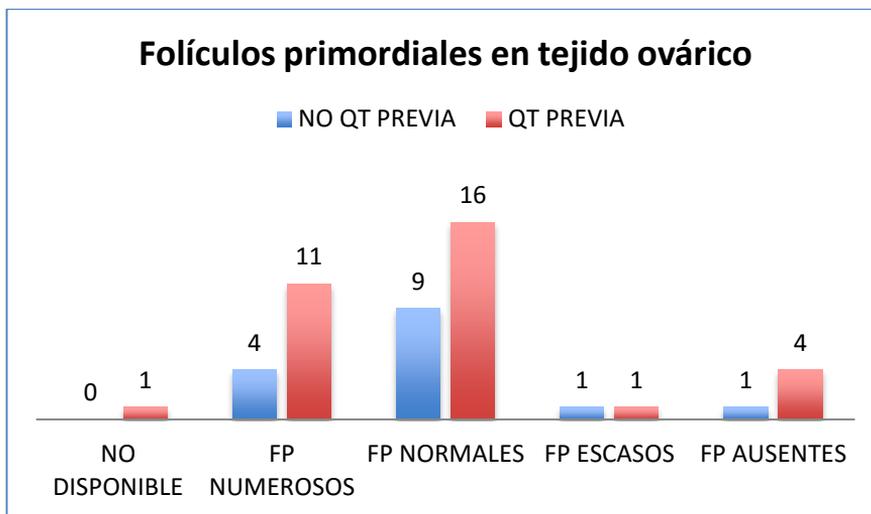
8.6.3.1.1 Análisis de la población folicular y relación con las características clínicas y analíticas de las pacientes

En las 51 pacientes se envió muestra de la corteza ovárica extraída al servicio de AP.

No se ha detectado ningún signo de malignidad en las muestras enviadas, exceptuando el caso de la paciente diagnosticada de tumor ovárico, cuyo informe final fue de teratoma maduro. No se dispone en esta paciente de un informe adicional de AP sobre la corteza criopreservada, aunque en el banco de tejidos de la CV, se dispone de 2 alícuotas con diferentes fragmentos de tejido ovárico, que podrían utilizarse en un futuro para confirmar su normalidad previo a un reimplante.

En todas las pacientes se ha solicitado valoración de FP, además del estudio histológico para descartar malignidad. Se detallan a continuación los resultados de las muestras respecto al vol de FP diferenciando entre las pacientes que habían llevado QT previa a la CCO de las que no (Figura 56):

Figura 56: Descripción del tejido ovárico en relación al vol de FP



En 7 casos el resultado histológico describía tejido ovárico con escasos o ausentes FP. Se detallan a continuación algunas características clínicas y analíticas de dichas pacientes (Tabla 17):

Tabla 17: descripción pacientes con escasos o ausentes FP en la muestra enviada a AP

	EDAD CCO DESARROLLO	DIAGNÓSTICO	QT PREVIA	VOL OVÁRICO	AMH PREVIA CCO (ng/ml)	AP Y COMENTARIOS
1	13,9 PÚBER	HODGKIN	NO	ND	28,9	Escasos FP
2	16,1 PÚBER	LLA RECAÍDA	SI	ND	1,6	Escasos FP
3	3,8 PREPÚBER	LLA RECAÍDA	SI	0,3 y 0,5	5	Ausentes FP Muestra muy pequeña
4	6,2 PREPÚBER	LLA RECAÍDA	SI	No se visualizan	0	Ausentes FP Muestra muy pequeña
5	4,4 PREPÚBER	T.WILMS	SI	0,2 y 0,2	0	Ausentes FP Muestra muy pequeña
6	14,7 PÚBER	OSTEOSARCOMA	SI	14 y 3 cc	0	Ausentes FP
7	11,7 PÚBER	EGC	NO	5,7 y 6,9	15,7	Ausentes FP Muestra muy pequeña

8.6.3.1.2 Derivación de muestras para estudio por servicio de biología molecular/Hematología

En 22 pacientes se obtuvo un fragmento extra para ser analizado/conservado por los laboratorios de biología molecular/hematología. Los diagnósticos subyacentes de estas pacientes son: 11 casos de LLA, 8 casos de LMA y 3 casos de SMD.

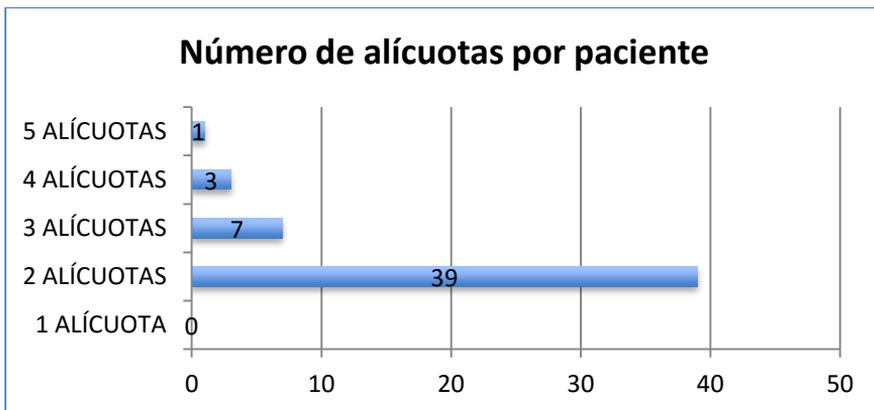
8.6.3.1.3 Derivación de muestras al Banco de Tejidos de la Comunidad Valenciana

De todas las pacientes se ha enviado el tejido ovárico al BTCV para su procesamiento, posterior almacenamiento y futuro uso clínico. En todos los casos se conservan en la actualidad dichas muestras almacenadas, salvo en 1 caso, en el que tras el fallecimiento de la paciente se ha utilizado para investigación todo el tejido.

En 31 casos (60,7%), se dispone de un fragmento adicional para investigación en el BTCV. En 3 casos se ha utilizado ya ese fragmento con esta finalidad. La incorporación de ese fragmento al circuito ha sido progresiva conforme se han incluido más pacientes en el programa, aunque desde el inicio ya se contempló para todas las pacientes con neoplasias hematológicas.

Se detalla el resumen de alícuotas destinadas para uso clínico disponibles en el BTCV (Figura 57):

Figura 57: descripción del vol de alícuotas disponibles para uso clínico



Se dispone de información sobre el número de fragmentos guardados por alícuota en 34 pacientes (66,6%). Atendiendo al número de alícuotas guardadas en estas pacientes (81) y el número de fragmentos en cada alícuota (suma total 226), la mediana de fragmentos por alícuota es de 2,8 (2-5).

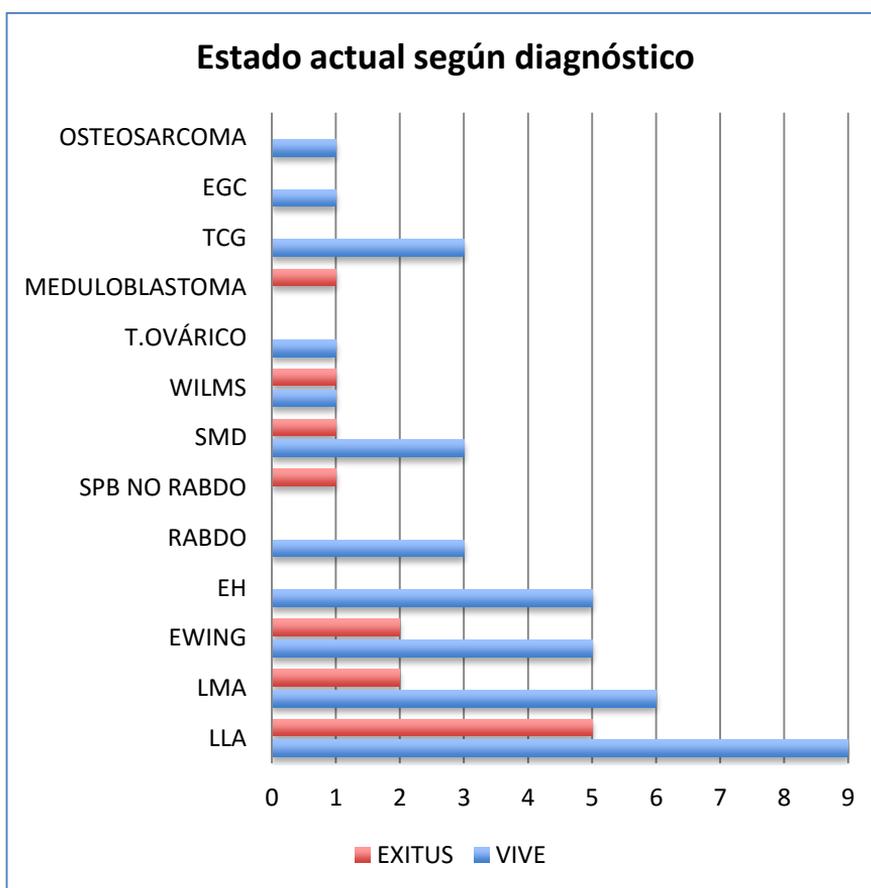
8.6.4 Análisis descriptivo del seguimiento de las pacientes incluidas en el programa de PF

8.6.4.1.1 Resumen situación actual de las pacientes

De las 51 pacientes incluidas en el programa de PF, actualmente 38 viven (74,5%) y 13 (25,5%) han fallecido.

Detallamos la situación actual atendiendo al diagnóstico de base (Figura 58):

Figura 58 : Descripción del estado actual de todas las pacientes según diagnósticos



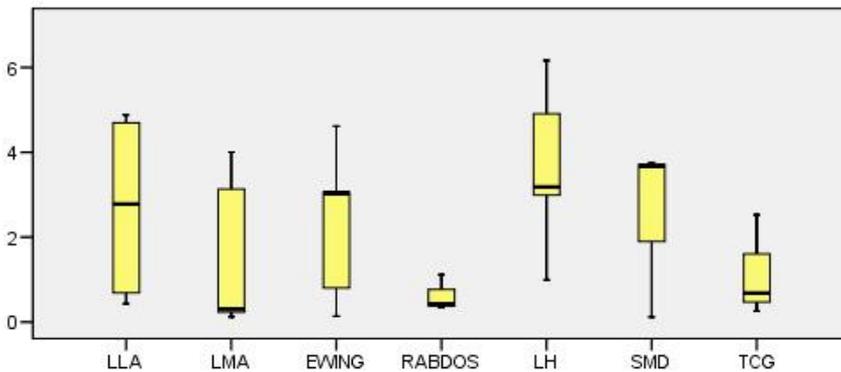
▪ Datos generales de las pacientes vivas

Entre las 38 pacientes que viven en el momento actual, 1 de ellas presenta enfermedad refractaria en este momento y las otras 37 (72,5% sobre el total) se encuentran en RC de su enfermedad con una mediana de seguimiento de 1,9 años (IQR 0,5-3,9), con un mínimo de 0.1 y un máximo de 6,2 años.

La mediana de edad de estas pacientes en el momento de la CCO es de 12 años (IQR 8,7-13,6), siendo la mínima 2,8 y la mayor 18,1 años. La mediana de la edad en la última visita es de 13,04 años (IQR 11,4-15,6), siendo la máxima 23,1 años.

Se describen a continuación las distintas medianas de tiempo de seguimiento atendiendo a las enfermedades de base (Figura 59):

Figura 59: Diagrama de cajas y bigotes comparando tiempo de seguimiento según enfermedad de base (expresado en años)



▪ **Datos generales de las pacientes que han fallecido**

La mediana de edad de las pacientes que han fallecido cuando se realizó la CCO es de 10,3 años (IQR 6,3 -12,7) y la mediana de edad en el momento del éxitus de 10,6 años (IQR 6,1-13,5). La mediana de tiempo entre la realización de CCO y el fallecimiento es de 7,7 meses (IQR 3,8- 11), siendo el tiempo mínimo 23 días y el máximo 5,6 años.

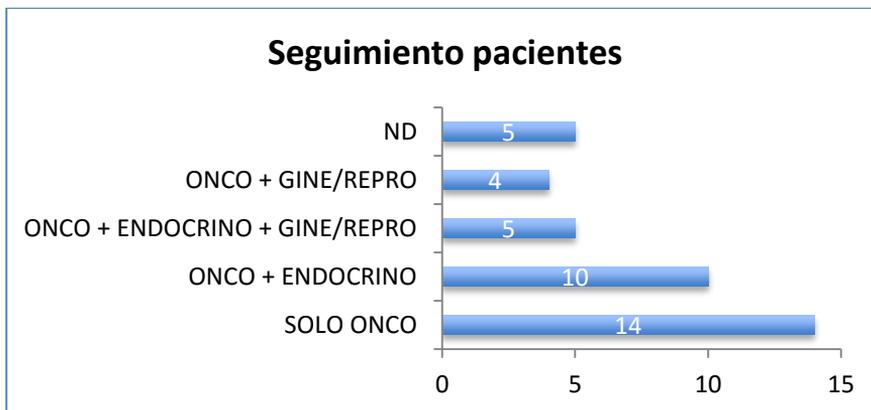
Las causas del fallecimiento fueron en 5 casos (38,4 %) complicaciones derivadas del tratamiento administrado (1 caso de Sd linfoproliferativo post-TPH, 2 casos de sepsis bacteriana, 1 caso de fallo del implante, 1 casos complicaciones secundarias a EICH), en 8 casos (61,6 %) relacionada directamente con la progresión de la enfermedad.

8.6.4.1.2 Inicio del seguimiento función ovárica y controles analíticos realizados

▪ **Opciones de seguimiento**

Las diferentes situaciones posibles de seguimiento de las pacientes vivas incluidas en el programa de PF se desglosan a continuación (Figura 60):

Figura 60: Consultas de seguimiento actual de las pacientes incluidas en el programa



En el grupo de pacientes que solo son seguidas en consulta de OP se incluyen 7 pacientes prepúberes con una mediana de edad en la última visita de 5,4 años (IQR 4,9-6,6), con un mínimo de 3,5 y un máximo de 8,1 años. También están incluidas en este grupo otros 7 casos que han terminado hace menos de 6 meses su tratamiento oncológico.

En el caso de las 5 pacientes seguidas por OP+ endocrino + gine/repro pueden describirse 2 situaciones: pacientes que estén controladas por los 3 servicios simultáneamente por ser altamente complejas con patología muy específica (2 casos de pacientes postrasplantadas con EICH vaginal), o bien que secuencialmente la consulta de endocrino pediátrico les haya dado de alta remitiéndolas posteriormente al servicio de Ginecología /Reproducción (3 casos).

Cuatro pacientes han sido controladas por oncología y directamente por Ginecología /Reproducción dada su edad en el momento de CCO con una mediana de 14,3 años (IQR 13,8 -15,6). Ninguna de estas pacientes se ha sometido a un TPH.

Todas las pacientes en las que se desconoce si han iniciado o no seguimiento diferente al oncológico son pacientes derivadas de otros hospitales en las que no se ha conseguido la situación concreta a este respecto.

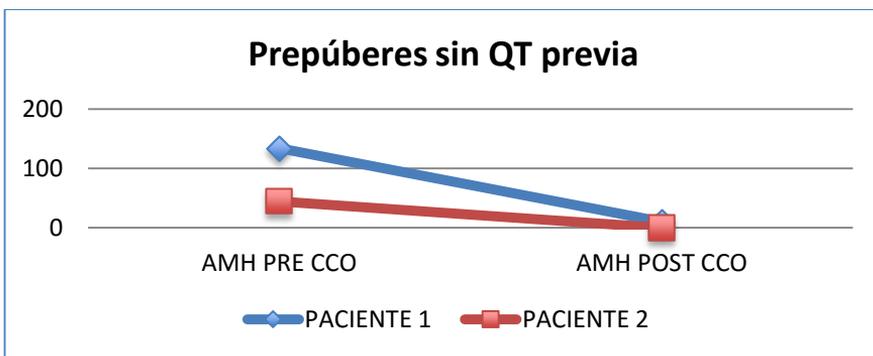
▪ **Controles analíticos realizados**

En 16 pacientes (42,1%) no se dispone de los datos analíticos hormonales posteriores a la realización de la CCO debido a diferentes circunstancias: En 7 pacientes la CCO se ha realizado recientemente y las demás pacientes proceden de otros hospitales, quedando pendiente la actualización de estos datos.

En las restantes 22 pacientes, se dispone de ≥ 1 control hormonal posterior al procedimiento. En el caso de las 3 pacientes que continúan estando en edad prepúber durante el seguimiento es un control exclusivo de AMH, mientras que en el resto habitualmente es un perfil hormonal completo.

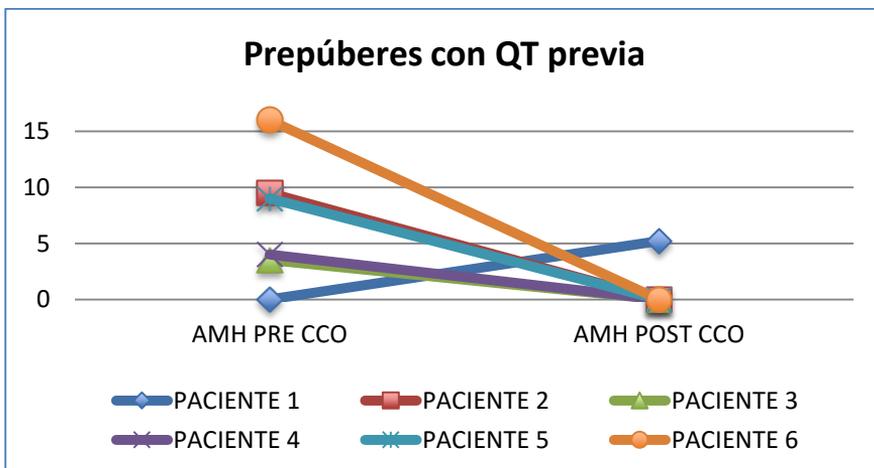
Se dispone de valores de AMH antes y después del tratamiento en 16 pacientes siendo al diagnóstico 8 prepúberes y 8 púberes. La comparativa de los valores previos a la CCO y posteriores al final del tratamiento quedan detallados a continuación, distinguiendo además entre las que habían llevado QT previa a la CCO (Figura 61) (Figura 62) (Figura 64) (Figura 64):

Figura 61: Evolución valores AMH en pacientes prepúberes sin QT previa



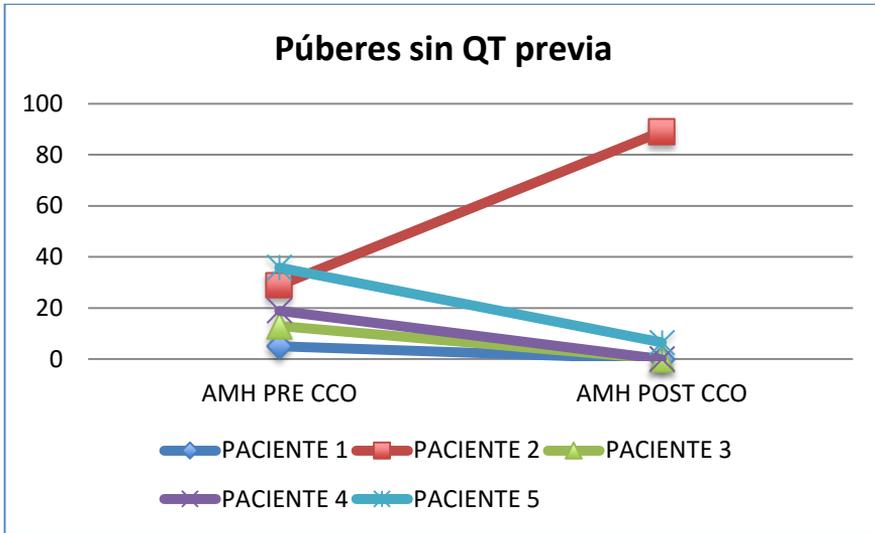
Mediana de tiempo entre ambas determinaciones 19,4 meses (2,2-36,5)

Figura 62 : Evolución valores AMH en pacientes prepúberes CON QT previa



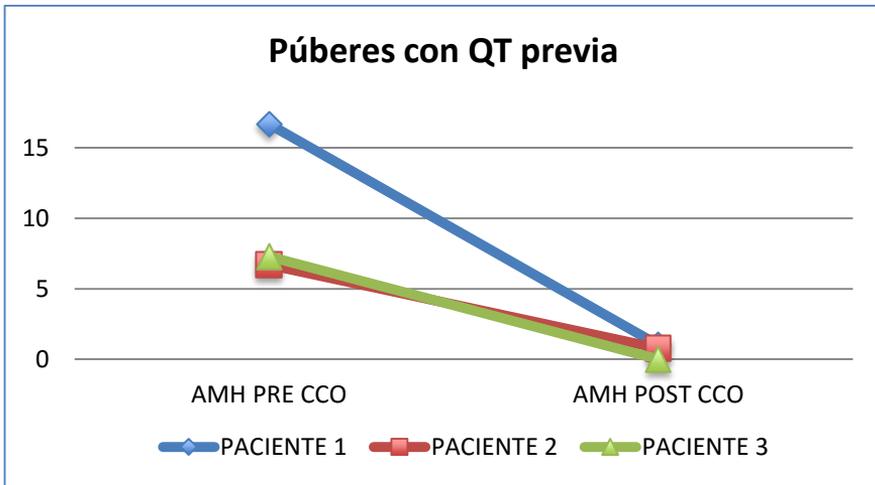
Mediana de tiempo entre ambas determinaciones 24,9 meses (IQR 14,2-49,3)

Figura 63 : Evolución valores AMH en pacientes púberes sin QT previa



Mediana de tiempo entre ambas determinaciones 10,1 meses (IQR 8,6-45,5)

Figura 64 : Evolución valores AMH en pacientes púberes CON QT previa



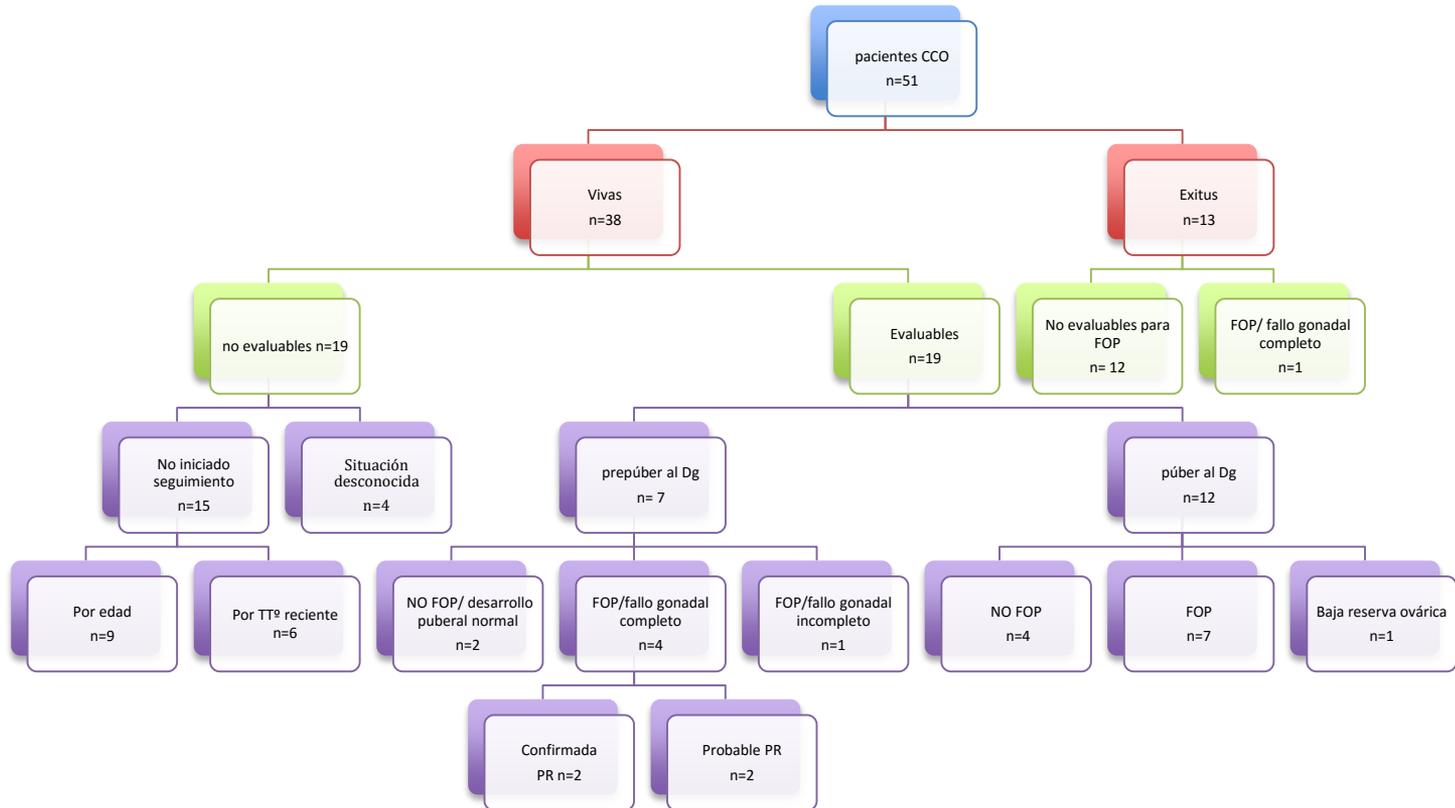
Mediana de tiempo entre ambas determinaciones 24,9 meses (IQR 14,2-49,3)

8.6.4.1.3 Evaluación general de la función ovárica. Prevalencia de FOP en la serie estudiada

Se esquematiza a continuación la situación de función ovárica de las pacientes incluidas en el programa de PF (Figura 65). Agrupamos como pacientes con función ovárica NO evaluable las siguientes situaciones:

- Aquellas pacientes que han fallecido sin disponer de datos sobre su función ovárica
- Pacientes vivas que no han iniciado seguimiento (muy jóvenes o tratamiento muy reciente)
- Pacientes con seguimiento desconocido

Figura 65: Representación esquemática de la función ovárica de las pacientes incluidas en el programa de PF

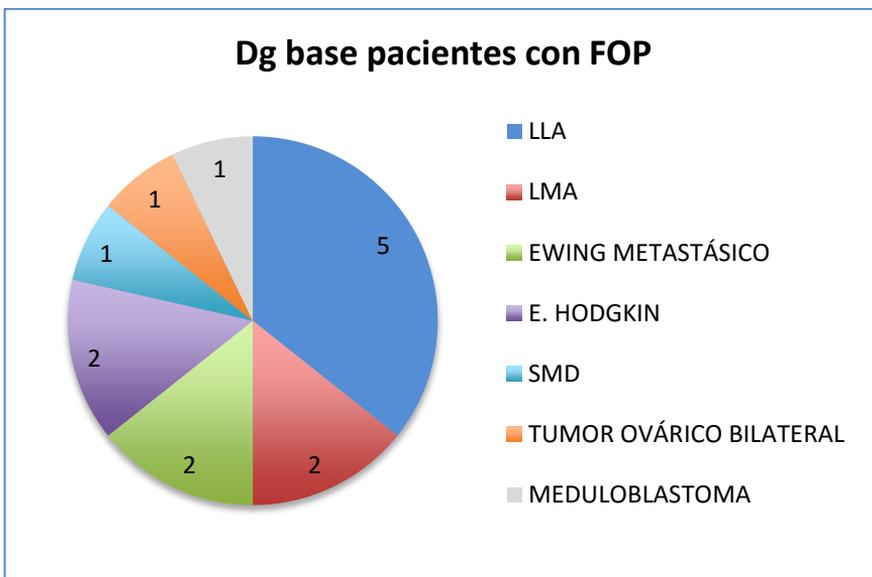


En un 60 7% de las pacientes (31 casos) la situación ovárica no es evaluable. No han iniciado seguimiento 15 pacientes, los datos no están disponibles en 4 y de 12 pacientes fallecidas no se dispone ningún dato de función ovárica previo al éxitus.

Globalmente la tasa de fallo ovárico precoz entre las pacientes evaluables de nuestra serie es del 65 % (13 pacientes sobre un total de 20).

Los diagnósticos las pacientes diagnosticadas de FOP se resumen gráficamente (Figura 66):

Figura 66 : Distribución de pacientes con FOP según enfermedad de base



La mediana de tiempo de seguimiento entre las 19 pacientes evaluables que actualmente viven es de 3,7 años (IQR 2,7-4,7). Si diferenciamos estos datos entre las pacientes según diagnóstico o no de FOP encontramos:

Mediana de seguimiento entre todas las pacientes con FOP 3,8 (IQR 3-4,7), siendo el mínimo 0,4 y el máximo de 6,2 años.

Mediana de seguimiento entre las evaluables no diagnosticadas de FOP es de 2,5 años (IQR 0,8-4,1), siendo el mínimo 0,3 y el máximo de 4,9 años. Si agrupamos a las pacientes sin FOP, junto aquellas más jóvenes, aquellas con tratamiento muy reciente o falta de actualización de su situación ovárica, encontramos en este grupo una mediana de seguimiento de 0,7 años (IQR 0,4-3,1).

De las pacientes fallecidas la información sobre su función ovárica no está disponible por la corta evolución desde CCO hasta el fallecimiento, excepto en una paciente prepúber (meduloblastoma diseminado) con fallo gonadal completo (descripción más adelante).

8.6.4.1.4 Análisis descriptivo de las 8 pacientes evaluables prepúberes al diagnóstico:

▪ Normalidad función ovárica

Una paciente con diagnóstico de base de Sarcoma de Ewing localizado (tratamiento recibido AA a dosis altas, sin RT y sin auto-TPH) y una paciente diagnosticada SMD (tratamiento recibido Alo TPH acondicionado con TBI y CFM a dosis bajas), han realizado un desarrollo puberal normal, actualmente presentan menstruaciones regulares y analíticas hormonales dentro de la normalidad.

▪ Daño gonadal completo

Encontramos en este grupo a 5 pacientes diagnosticadas de FOP/daño gonadal completo asociando alteraciones del desarrollo puberal (PR confirmada o probable) (Tabla 18). Cuatro de ellas viven en RC, con una mediana de seguimiento de 4,2 años (IQR 3,7-4,4).

Las pacientes 2 y 4, no cumplen estrictamente los criterios de PR porque todavía no han cumplido los 13 años, pero dada su evolución en estos años y los datos analíticos hormonales se han considerado como patológicas.

En las 2 pacientes en las que se ha iniciado tratamiento este ha consistido en administración progresiva de estrógenos, con intención de asociarlos a progestágenos cuando completen desarrollo puberal. En lo referente a la respuesta al tratamiento una de ellas inició su desarrollo puberal a los pocos meses de comenzar y la otra paciente acaba de empezar por lo que no se disponen datos de la evolución.

A estas 4 pacientes también añadimos el caso de una paciente fallecida, prepúber en el momento de CCO, que a lo largo de su evolución llegó a diagnosticarse de FOP /fallo gonadal completo, aunque no inició THS (5,5 años de seguimiento). Sus datos se han añadido a la Tabla 18.

Tabla 18 : Descripción de las pacientes prepúberes con FOP

Dg	Edad CCO (años)	QT previa CCO	AMH previa (ng/ml) FSH previa (UI/l)	TT recibido gonadotóxico	Edad UV Status (años)	Tº seguimiento (años)	AMH última (ng/ml) FSH máxima (UI/l)	THS Edad Inicio (años)	
1	Meduloblastoma diseminado	8,7	NO	74,1 0,2	RT-ICE Tiotepa tándem	14,2 EXITUS	5,5	- 29,7	-
2	LLA MAR	7,5	SÍ	9 3,2	ICT	12,3 Vive RC	4,8	<0,08 99,5	NO Pendiente e inicio
3	LLA MAR	10,4	SÍ	16 2	ICT	14,3 Vive RC	4,3	<0,08 50	SÍ 13, 4
4	LLA Recaída	9,4	SÍ	4 4,2	ICT	12,4 Vive RC	2,7	<0,08 46	SÍ 12,4
5	LMA Recaída	8,5	SÍ	2 0,7	Busulfán	13,1 Vive RC	4	- 37,3	NO

- **Daño gonadal incompleto**

Confirmado en una paciente que se diagnosticó de Sarcoma de Ewing grupo 3 de tratamiento a los 10,3 años, y que ha iniciado desarrollo puberal durante su seguimiento endocrinológico tras finalizar el tratamiento que motivó la CCO (AA altas dosis, auto-TPH acondicionado con Melfalán). Edad en la última visita de 13,8 años, con hallazgos analíticos repetidos de FOP (FSH máxima 64,9 mU/ml). De momento no ha iniciado THS. ES la única paciente de la serie con enfermedad activa en estos momentos.

8.6.4.1.5 Análisis descriptivo de las 12 pacientes evaluables púberes al diagnóstico:

- **Normalidad función ovárica**

Cuatro pacientes (33,3 %) actualmente presentan una adecuada función ovárica. La mediana de edad en el momento de la CCO es de 13,7 años (IQR 12,6-14,1). La mediana de edad en la última visita es de 14,8 años (IQR 13,7-16,4). La mediana de tiempo de seguimiento es de 1,7 años (IQR 0,9-3,1). Sus diagnósticos son: EH (1), TCG (2), osteosarcoma (1). Actualmente todas tienen menstruaciones regulares, con analíticas hormonales dentro de la normalidad. En la paciente con EH (tratada finalmente con dacarbacina) se dispone de valor de AMH post tratamiento siendo de 89 ng/ml (4,8 años tras finalizar el tratamiento) y en la paciente con TCG mediastínico (finalmente no consolidado con auto-TPH) la AMH post tratamiento es de 6,5 ng/ml (8,2 meses tras finalizar terapia).

- **Baja reserva ovárica**

Una paciente tratada de EH con 13,5 años y actualmente con 19,8 años se ha catalogado como baja reserva ovárica por valores permanentemente indetectables de hormona AMH, siendo sus ciclos menstruales regulares y el resto de analítica hormonal normal por el momento, ver apartado 5.1.4.1.6.

- **FOP**

Siete pacientes (58,8%) cumplen criterios de FOP establecido. Ver detalles clínicos y analíticos (Tabla 19). La mediana de edad de estas pacientes en el momento de realización de la CCO es de 13,6 años (IQR 13,4-15,5), con una edad mínima de 12,6 y una edad máxima de 18,1 años. La mediana de edad en la última visita es de 16,7 años (IQR 16,1-19).

Tabla 19 : Descripción de las pacientes púberes con FOP

	Dg	Edad CCO (años)	QT previa CCO	AMH previa CCO (ng/ml) FSH previa CCO (UI/l)	TT recibido gonadotóxico	Edad UV Status (años)	Tº seguimiento (años)	AMH última (ng) FSH máxima (UI/l)	THS Edad Inicio (años)
1	Ewing pélvico + metas pulmonares	13,4	NO	10,1 4,4	Melfalán RT pélvica	18,1 Vive RC	3,1	<0.08 130	SÍ 15,1
2	LMA	13,6	SÍ	0,6 20,1	Busulfán Tiotepa	16,7 Vive RC	3,1	1 115	SÍ 14,6
3	SMD	13,3	NO	13 1,3	Busulfán Tiotepa	17,1 Vive RC	3,7	<1 102	SÍ 15,1
4	LLA	16,1	SÍ	1,6 4,7	ICT	20,8 Vive RC	4,7	<1 87,7	SÍ 16,9
5	Tumor Ovárico bilateral	18,1	SÍ	13 3,2	DOBLE ANEXIOT OMIA	23,1 Vive RC	4,9	-	SÍ 19
6	LLA	12,6	SÍ	7,3 6,2	ICT Tiotepa	13,1 Vive RC	0,4	<0.08 59	NO
7	EH	14,7	NO	5 2,9	RT pélvica	15,7 Vive RC	0,9	0.08 238	SÍ 15,7

En este grupo de pacientes 6 de ellas llevan THS. La mediana de edad al inicio del mismo es de 15,1 años (IQR 14,7-15,6). La mediana del tiempo medio transcurrido entre el final del tratamiento y el inicio de THS es de 12,2 meses (IQR 9,3-28,4).

En todos los casos el THS en las pacientes puberales ha consistido en tratamiento combinado de estrógenos con progestágenos. En todas ellas, salvo en una, los valores se han normalizado una vez instaurado.

En 6 de las 7 pacientes diagnosticadas de FOP, se disponen datos de AMH previa a CCO y AMH posterior a la finalización del tratamiento. La mediana de tiempo entre ambas determinaciones es de 10,1 meses (IQR 8,6-45,9) y en el 100 % los casos los valores últimos se encuentran por debajo del nivel de detección de la técnica.

8.6.4.1.6 Técnicas PF post-tratamiento

Se ha ofrecido técnicas de PF post- tratamiento a una paciente en todo el programa. Su edad actual es de 19,8 años fue diagnosticada de EH a los 13,5 años y tratado con procarbina (5600 mg/m^2), CFM (2000 mg/m^2) y RT supradiafragmática a una edad de 13,6 años. Por hallazgo reiterado de AMH por debajo de los límites de detección (con normalidad en FSH y estradiol) se le ha ofrecido realizar ahora una vitrificación de ovocitos y está pendiente de su ejecución.

8.7 Efecto de la administración de QT sobre tejido ovárico en pacientes pediátricas con Leucemia Aguda

En el grupo de estudio se han incluido 22 pacientes con diagnósticos de LLA (n=14) y LMA (n=8). En 14 casos se trataba de pacientes prepúberes con una mediana de edad de 6,8 años (IQR 4,3-8) y en 8 casos de pacientes púberes con una mediana de edad de 13,1 años (IQR 12,7-14).

En el grupo control se han incluido 10 pacientes con los siguientes diagnósticos de base: SMD (n=4), Ewing (n=2), Meduloblastoma (n=1), TCG (n=1), EGC (n=1), EH (n=1). En 4 casos se trataba de pacientes prepúberes con una mediana de edad de 9,9 años (IQR 9,4-10,3) y en 6 casos de pacientes púberes con una mediana de edad de 13,4 años (IQR 12,2-13,4).

El resumen de sus principales características, así como las determinaciones hormonales previas a la CCO se detallan en la siguiente tabla (Tabla 20):

Tabla 20 : Edad CCO, AMH y FSH previas a la CCO (expresado como mediana y rango Intercuartílico)

	Grupo QT global (n=22)	GPre (n=14)	GP (n=8)	Grupo sin QT global (n=10)	GCPre (n=4)	GCP (n=6)
edad CCO	8,3 (5,6-12,7)	6,8 (4,3-8)	13,1 (12,7-14)	11,2 (10,3-13,4)	9,9 (9,4-10,3)	13,4 (12,2-13,4)
AMH previa CCO (ng/ml)	17,3 (10,8-25,3)	16,7 (7,6-36)	17,3 (13,7-24,2)	3,3 (0,2-7,3)	4,5 (2,3-8,5)	0,6 (0,1-3)
FSH previa CCO (IU/l)	3,3 (1,6-5)	3 (1,8-3,8)	4,1 (1,7-5,8)	3 (2,1-4,4)	2,6 (1,3-3,6)	4,6 (2,6-9,7)

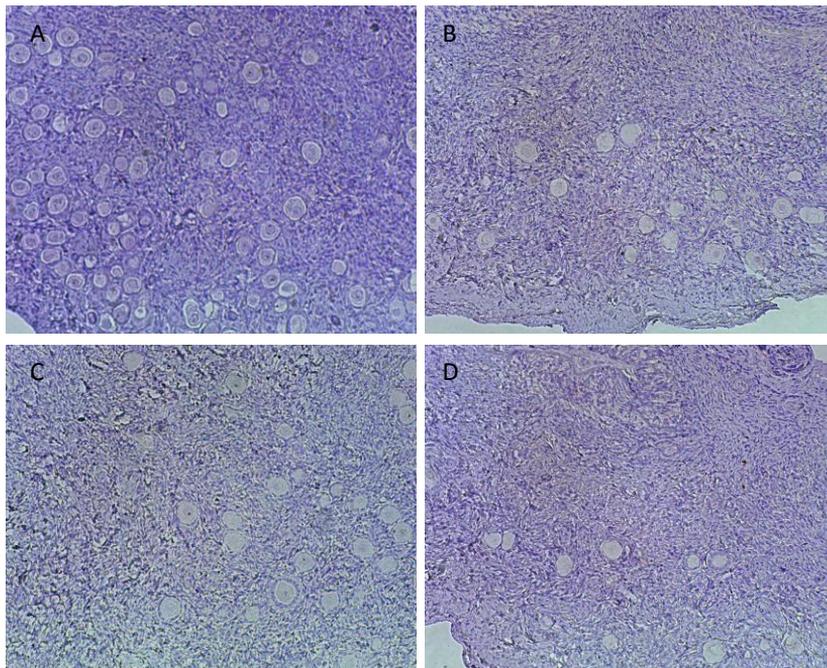
La diferencia más destacable la encontramos en la mediana de edad de los grupos de pacientes prepúberes de estudio y control ya que en este último sólo agrupa a 4 casos.

En el grupo de estudio la mediana de tiempo entre la última dosis de QT y la realización de la CCO es de 29 días (IQR 21,5-46,5), que explica las diferencias en las determinaciones hormonales de AMH, realizadas en el mismo día o el día previo a la CCO.

8.7.1 Estudio estructural del tejido ovárico

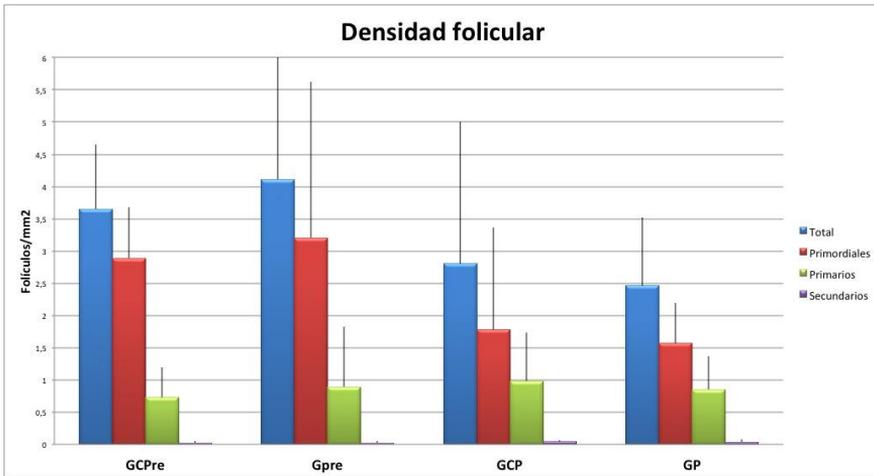
A pesar de que uno de los mecanismos sugeridos por el que la QT puede dañar el ovario es mediante mecanismos indirectos, es decir, a través del daño a nivel del estroma ovárico, no encontramos alteraciones estructurales en el estroma y estructuras foliculares de las muestras de CO en ninguno de los grupos estudiados. En la mayoría de las muestras la población prioritaria estaba compuesta por folículos primordiales (Figura 67)

Figura 67 : Muestras histológicas de CO de pacientes pediátricas prepúberes y púberes sin tratamiento previo (A, B) y con tratamiento previo a la CCO (C, D) en las que se observa una población folicular predominante de folículos primordiales.



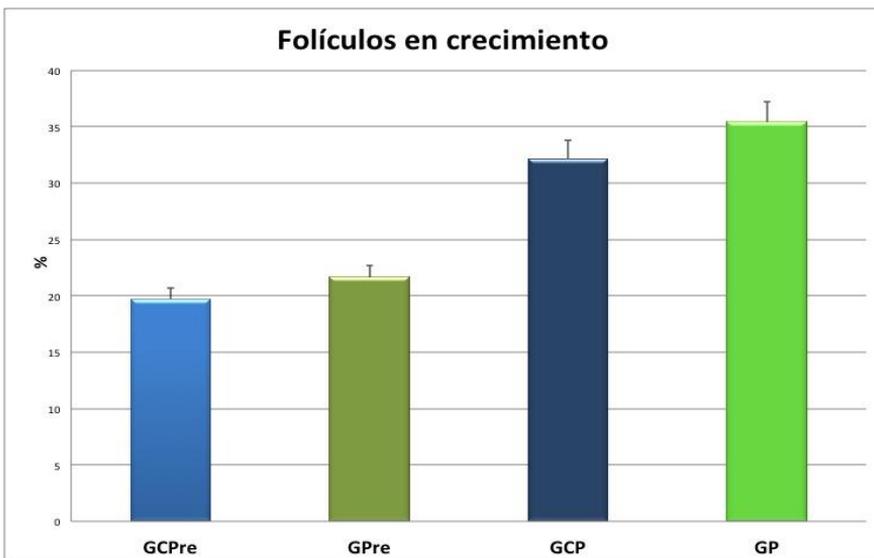
Cuando la población folicular fue cuantificada, en el GPre observamos que no existían diferencias significativas en la densidad de folículos totales, primordiales, primarios o secundarios ($4,11 \pm 2,62$; $3,2 \pm 2,42$; $0,89 \pm 0,94$; $0,02 \pm 0,03$) respecto al grupo control ($3,65 \pm 1,00$; $2,89 \pm 0,79$; $0,73 \pm 0,47$; $0,02 \pm 0,03$). En cuanto a las pacientes púberes tampoco observamos diferencias significativas en la densidad de los folículos primordiales, primarios o secundarios del GP ($2,46 \pm 1,06$; $1,57 \pm 0,63$; $0,85 \pm 0,52$; $0,03 \pm 0,03$) en comparación con GCP ($2,81 \pm 2,21$; $1,79$; $0,99 \pm 0,75$; $0,04 \pm 0,02$) (Figura 68)

Figura 68 : Densidad folicular de los folículos primordiales, primarios y secundarios de los diferentes grupos de estudio (media±SD, p= NS).



A continuación analizamos el porcentaje de folículos en crecimiento en cada uno de los grupos de estudio expresado como el % de vol de folículos primarios/ vol de folículos totales. No se observaron diferencias significativas entre las pacientes prepúberes (21,65%) y púberes (35,41%) que habían recibido tratamiento previo a la CCO respecto a sus controles (19,72%; 32,14%). Sin embargo se observó una tendencia al aumento del % de folículos en crecimiento en las pacientes tratadas con QT previamente (Figura 69).

Figura 69 : Porcentaje de folículos en crecimiento según los grupos de estudio (p= NS).

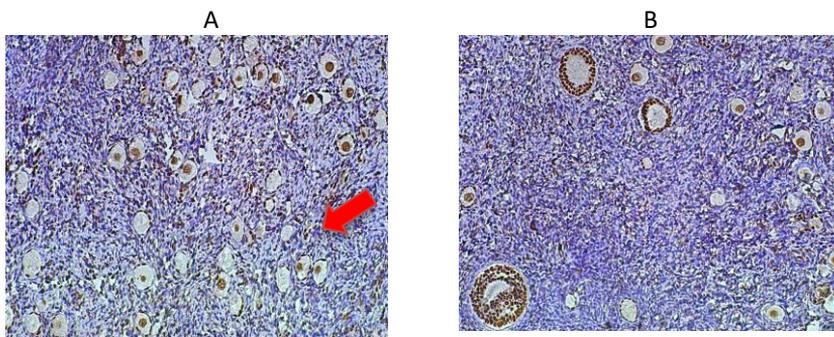


8.7.2 Estudio de la activación folicular

Con el propósito de analizar el efecto de la quimioterapia sobre la activación o “burn out” folicular se analizó la extrusión del FoxO3 a nivel proteico mediante técnicas inmunohistoquímicas.

Observamos inmunotinción a nivel del citoplasma del ovocito como en las células de la granulosa en los cuatro grupos de estudio indicando así la extrusión del FoxO3 y por lo tanto la activación folicular (Figura 70).

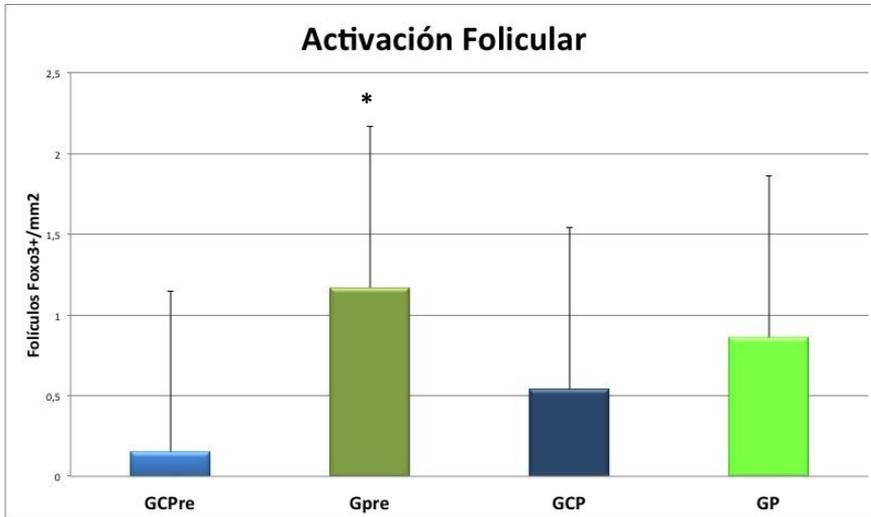
Figura 70 : Muestras de CO de paciente prepúber (A) y púber (B) tratadas con QT previamente al CCO. Se observa inmunotinción positiva a nivel del citoplasma folicular y células de la granulosa en ambos grupos indicando así la extrusión nuclear de FoxO3 y por lo tanto la activación del folículo. También se observaron folículos primordiales quiescentes (flecha).



Con el fin de analizar de forma cuantitativa la activación folicular se llevó a cabo la cuantificación en todos los grupos de los folículos primordiales que presentaban inmunotinción positiva a nivel citoplasmático, indicativo de la extrusión del FoxO3 y por lo tanto de la activación.

El grado de activación folicular en el GPre ($1,17 \pm 0,53$) era significativamente mayor que en las pacientes del GCPre ($0,15 \pm 0,11$). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos GP ($0,86 \pm 0,31$) y GCP ($0,55 \pm 0,15$) (Figura 71).

Figura 71 : Cuantificación de la extrusión nuclear del FoxO3 en folículos primordiales en los distintos grupos de estudio (C) (media±SD, *p<0,05).



8.7.3 Estudio del daño celular

Con el propósito de estudiar el grado de apoptosis se llevó a cabo un ensayo mediante la técnica de Tunel y una cuantificación por métodos morfométricos (Figura 72). El número de células apoptóticas encontradas en las muestras de CO de todos los grupos de estudio fué muy reducido sin encontrar diferencias significativas entre GPre (0,002±0,001) y GP (0,002±0,001) y sus respectivos controles (GCPre: 0,001±0,001; GCP: 0,002±0,001) (Figura 73).

Figura 72 : En las imágenes superiores se observa un escaso número de células apoptóticas (rojo) en los diferentes grupos estudiados. Las imágenes inferiores muestran el número total de células de cada muestra teñidas con DAPI.

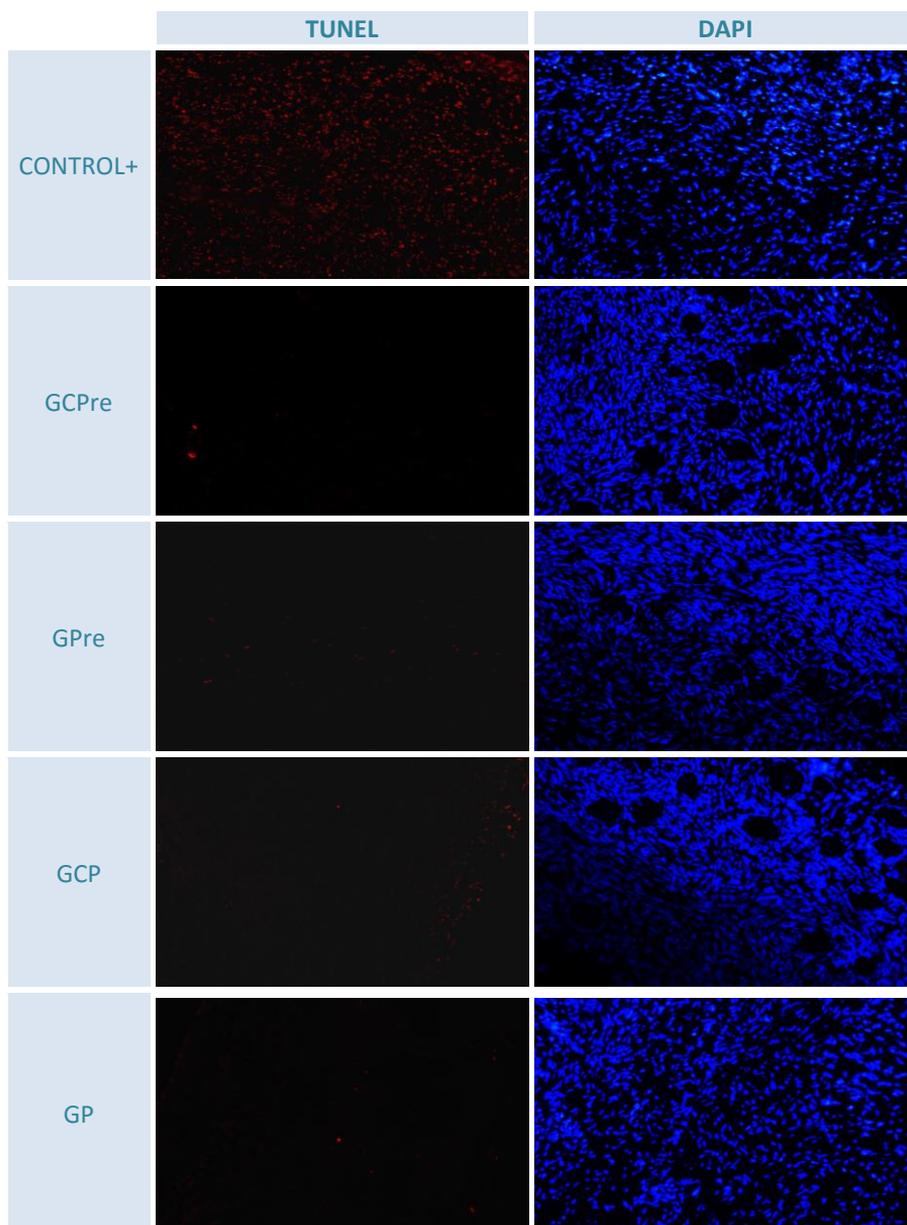
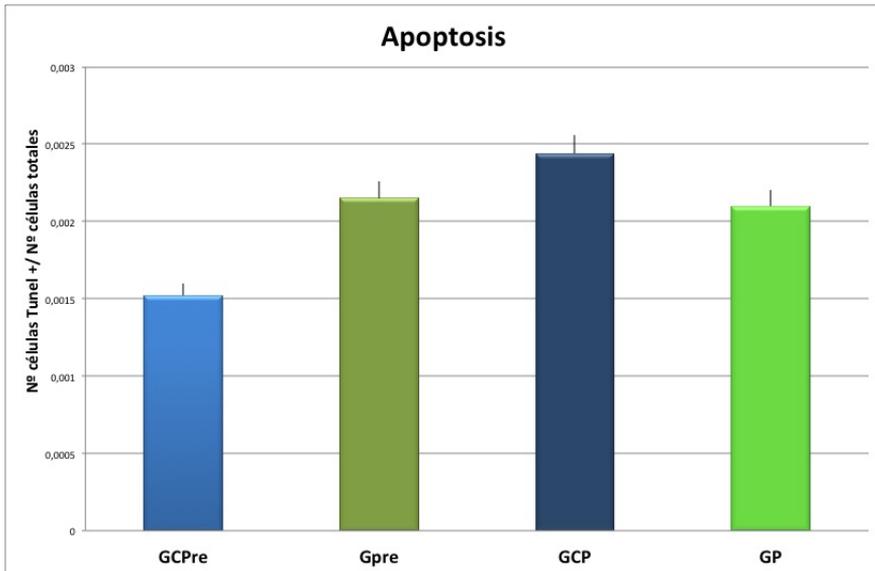


Figura 73 : Cuantificación de grado de apoptosis. No se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos (media±SD, p= NS).



:: DESARROLLO ARGUMENTAL

9 DISCUSIÓN

El campo de la Oncología Pediátrica, no debe quedar al margen de los avances experimentados por otras especialidades, cuando de ellos se deriven potenciales beneficios para los pacientes. Ahora bien, cuando se trata de técnicas enmarcadas en el terreno experimental, se deben tener en cuenta algunas consideraciones por tratarse de una población especialmente vulnerable.

Este trabajo, es el primero en España, en describir específicamente todos los detalles de un programa de PF en pacientes pediátricas y adolescentes. Los logros y dificultades encontradas en el camino pueden sentar las bases para un proyecto más amplio a nivel nacional e internacional que permita que todas las pacientes puedan beneficiarse de las técnicas de PF actualmente disponibles, cuando asocien un riesgo gonadotóxico considerable.

La puesta en marcha del proyecto ha sido fácil, en el sentido de que nos hemos dejado arrastrar por el fuerte y contagioso impulso por preservar la fertilidad en pacientes con cáncer que existe en Valencia desde hace más de una década (Sánchez M 2008), pero a su vez muy compleja porque nadie ha asentado unos criterios claros nacionales para pacientes pediátricas ni una cronología óptima en algunos casos determinados (Andres MM 2009).

El programa globalmente ha sido restrictivo en cuanto a su ofrecimiento. En nuestro hospital el porcentaje medio anual de realización de CCO sobre pacientes pediátricas diagnosticadas es del 10,8 % en estos años (0-22,5), que va en la línea de otros equipos liderados por oncólogos pediátricos (Anderson RA 2008) (Wallace WHB 2014) y menor al de otros grupos con criterios de inclusión más amplios (Jadoul P 2010). La reciente difusión de este tema en reuniones y congresos de OP, junto con una mayor inquietud por parte de los profesionales y las familias, han contribuido a que cada vez se hayan sumado más centros nacionales que deriven a pacientes de alto riesgo gonadotóxico a nuestro hospital tal y como se describe en los resultados. La corta edad de alguna de ellas no ha sido un inconveniente si existía una clara indicación del procedimiento. El índice de aceptación de la técnica por parte de las familias ha sido muy elevado (96,6%), comparado con otras series (61 % en el equipo de Wallace). Una explicación detallada, el ofrecimiento en pacientes muy seleccionadas, la no implicación de un retraso en el inicio del tratamiento oncológico previsto y el elevado porcentaje de procedimientos asociados durante el mismo acto anestésico, han sido clave en la elevada participación en nuestra serie.

La inclusión de las mayores de 12 años en la toma de decisión según la legislación vigente, y la información adecuada a la edad del procedimiento en pacientes todavía menores, ha sido gratamente positiva. Todas las participantes

han realizado preguntas pertinentes según su desarrollo madurativo, sin existir disparidad de criterios de decisión final entre ellas y sus responsables legales, despertando en muchos casos una sensación de esperanza respecto a su enfermedad, que en el momento del diagnóstico inicial muchas familias no contemplaban. La conversación con padres y niñas (en algunos casos muy pequeñas) sobre la posible descendencia futura ha sido muy enriquecedora y confirma las peculiaridades de este programa en la etapa pediátrica (Grundy R 2001) (Wallace WH 2005).

El punto de corte inferior de edad para incluir a una paciente en un programa de estas características es debatible. Fisiológicamente es posible desde el nacimiento, ya que además cuanto más pequeña es una mujer/niña más posibilidades hay de encontrar una corteza ovárica con abundantes FP (Faddy MJ 1995). En la práctica clínica las pacientes muy pequeñas, fundamentalmente las menores de 2 años, presentan algunas desventajas que puntualizar. El riesgo anestésico por debajo del año de edad se considera superior a otras franjas de edad y por eso algún centro han considerado los 12 meses como punto de corte (Shapira M 2014), aunque otros sin embargo reflejan en sus series alguna paciente de edad inferior (0,8 años en 3 grupos) (Jadoul P 2012) (Imbert R 2014) (Poirot CJ 2007). Nuestro equipo propuso un mínimo 2 años como criterio de inclusión por varios motivos: el inicio de un programa debe ser cauteloso especialmente con las pacientes más pequeñas, globalmente la frecuencia de diagnósticos oncológicos por debajo de esa edad es menor y algunas veces asocian resultados bastante más pobres en lo referente al pronóstico a largo plazo (como puede ser el caso de las LLA en lactantes). La paciente más pequeña incluida en nuestro programa tiene 2,8 años, habiendo recibido posteriormente a la CCO un tratamiento altamente gonadotóxico (TPH acondicionado con Busulfán) por tratarse de una LLA de muy alto riesgo. Nuestros resultados en las pacientes más jóvenes han sido igual de satisfactorios que en las más mayores. No ha habido ninguna complicación quirúrgica asociada y el tejido, a pesar de que se trataba de ovarios con volúmenes muy pequeños, ha sido procesado por personal especializado para poder optimizar al máximo su uso. Tres de las pacientes más pequeñas (2,8, 3,7 y 4.4 años) se han sometido a CCO porque iban a recibir dosis muy elevadas de RT (>40 Gy) sobre región pélvica. En estas pacientes la información a las familias deben incluir además el riesgo de la toxicidad de la RT sobre el útero en edades tan precoces, ya que se ha descrito riesgo aumentado de abortos, prematuridad y bajo peso para la edad gestacional (Larsen EC 2004) (Green DM 2009) (Wallace WH 2005). Tras la elaboración de esta trabajo nos parece adecuado nuestro punto de corte, aunque en pacientes seleccionadas de muy alto riesgo gonadal, podría reconsiderarse viendo la experiencia positiva en otros centros. Por otra parte nuestra serie incluye a 24 pacientes prepúberes (47 % sobre el total) con una mediana de edad de 7,1 años (2,8-10,5) corroborando que se trata de una técnica totalmente aplicable en esta etapa de crecimiento. La reciente publicación del primer recién nacido gracias al autotrasplante de tejido ovárico

recogido en edad prepúber, estimula aún más a considerar esta técnica en edad pediátrica en los casos seleccionados (Demeestere I 2015).

Como se ha comentado en los antecedentes, algunas de las opciones que van asociadas a la CCO están actualmente en pleno proceso de investigación como es el caso de la maduración in vitro de los FP. Esta técnica, junto con la maduración in vitro de los ovocitos inmaduros extraídos durante la CCO, son actualmente la clave para que las pacientes con algún riesgo descrito de reintroducir células malignas tras el implante del tejido ovárico como las LA, puedan disponer de opciones de descendencia biológica en el futuro (Novella-Maestre E 2015) (Dolmans MM 2010). El tiempo necesario para que culminen esas investigaciones y sus resultados sean aplicables a la práctica clínica es indeterminado. Viendo la evolución de la CCO, así como la de la vitrificación de ovocitos en los últimos años (Donnez J 2015), no es ninguna utopía pensar que estas pacientes puedan llegar a utilizar de alguna manera ese tejido (en estos casos en concreto sólo sus ovocitos maduros) cuando alcancen la vida adulta, así lo deseen y hayan experimentado un FOP (Schmidt KT 2013). La edad media de las pacientes de nuestra serie es de 10 años y es poco probable que vayan a requerir su uso clínico antes de 15-20 años más. Una información a las familias realista pero actualizada, así como un planteamiento basado en “el mejor interés para el niño” ampara a los profesionales a la hora de plantear estas opciones a pacientes de riesgo muy elevado, a pesar de todas las incertidumbre que se plantean (Andres M 2009).

La indicación o no de esta técnica según diagnóstico y protocolo en pediatría, supone uno de los temas más complejos. Existen muchas variables a tener en cuenta a la hora de predecir un riesgo global de FOP como hemos visto ampliamente en los antecedentes: edad, desarrollo puberal, sexo, RT y dosis, QT y dosis, combinaciones de fármacos y enfermedad de base. Muchos grupos, incluido el nuestro, han considerado la clasificación de Wallace y el panel de Edimburgo descrito anteriormente, como una base de gran utilidad donde asentar programas pediátricos de PF (Jadoul P 2010) (Poirot CJ 2007), pero hay que remarcar que existen algunos puntos controvertidos.

Tras la revisión exhaustiva de la bibliografía y las diferentes experiencias descritas con niñas a nivel internacional, se propone en esta tesis una nueva clasificación de riesgo gonadotóxico para niñas y adolescentes con cáncer (Valencia 2015), con ámbito de uso preferentemente nacional, pero también extensible a otros países. Nuestra clasificación propone 4 grupos, en lugar de los 3 planteados por Wallace (Wallace WH 2005). Se diferencian 2 subgrupos diferentes dentro de el que su equipo consideró como intermedio (ver apartado 4.1.1.2). Considerar riesgo intermedio los porcentajes incluidos entre el 20 y 80 % de riesgo de gonadotoxicidad como describe el equipo escocés, tiene el inconveniente de que engloba a una gran cantidad de pacientes con muy diferentes patologías y tratamientos, donde asentar las indicaciones de técnicas de PF resulta con frecuencia complicado.

En esta clásica clasificación además, no se distingue entre niños y niñas, siendo el riesgo en algunos casos diferente. Por otra parte muchos protocolos utilizados en la actualidad son de ámbito internacional, pero no todos, por lo que su adaptación española es necesaria (Andres MM 2009). Desde la publicación inicial de esta clasificación en el Lancet en 2005, son diversos los trabajos que han aportado algún dato sobre el seguimiento de la función ovárica en pacientes pediátricos con esos diagnósticos y que podrían hacer considerar alguna modificación.

La enfermedad de Hodgkin particularmente, ha dado un vuelco importante (Brämsswig JH 2015). La mayoría de centros europeos, siguen actualmente el protocolo EURONET para niños y adolescentes y desde hace pocos años, la procarbina ha sido sustituida por dacarbina en la primera línea del tratamiento, disminuyéndose así el riesgo gonadotóxico considerablemente (Anderson RA 2015). La administración de la RT también depende de la respuesta al tratamiento pudiendo obviarse en algunos casos con respuestas completas precoces. Ahora mismo y según los tratamientos de primera línea del LH, sólo estarían indicadas técnicas de PF en primera línea en aquellas pacientes pediátricas que tuvieran posibilidad de recibir RT pélvica (Wallace 2015). En el caso de utilizarse otros AA el riesgo debería volver a redefinirse. En la misma línea otros autores defienden el ofrecimiento de dichas técnicas sólo en pacientes con EH mayores de 25 años (exceptuando las candidatas a RT pélvica) (Shapira M 2014).

Las mayoría de pacientes diagnosticadas de LMA que no precisan TPH parecen tener una función ovárica a largo plazo conservada (Molgaard-Hansen L 2013) (Leung W 2000) (Shapira M 2014) por lo que su riesgo pasaría a ser catalogado como de bajo (<20%) según nuestra clasificación.

El melfalán según diferentes publicaciones parece menos lesivo a nivel gonadal que otros acondicionamientos (Busulfán/ICT) por lo que podría desescalar su riesgo a intermedio-alto (Singhal S 1996) (Panasiuk A 2015) (Even-Or E 2015).

En algunos casos de tumores sólidos, la megaterapia con rescate de progenitores puede estar más o menos indicada según los esquemas utilizados por cada país/centro. En el caso del sarcoma de Ewing, según nuestro protocolo actual, todos los grupos de tratamiento (2-5) excepto el 1 lo contemplarían en la primera línea, por lo que hay que considerarlas en el grupo de alto riesgo. Las pacientes del grupo 1 quedarían incluidas en el de riesgo intermedio-riesgo alto, por la suma de dosis de AA (Ifosfamida + CFM). Sobre la suma de dosis de AA existen disparidad de opiniones. Los estudios derivados del CCSS defienden que un score elevado de AA aumenta considerablemente el riesgo de FOP (Green DM 2009), mientras que otras muchas publicaciones no encuentran tasas elevadas (o sólo ligeramente), en aquellas pacientes que habían llevado QT con

AA (no acondicionamientos) sin otros tratamientos gonadotóxicos (Raciborska A 2014) (Chiarelli AM 1999) (Thomas-Teinturier C 2015).

Las combinaciones de AA a dosis medias (por ejemplo CFM + Ifosfamida), o AA más derivados del platino también a dosis medias (Ifosfamida + cisplatino), así como la presencia de un único AA (no acondicionamiento) a dosis más elevadas (por ejemplo CFM mayor de 8-10 gr/m² o Ifosfamida > 54 gr/m²) son las situaciones que con frecuencia motivan mayor número de dudas a la hora de plantear técnicas de PF. En estas circunstancias pueden pesar algo más otros factores a la hora de su ofrecimiento como la edad del paciente, situación clínica, accesibilidad de las técnicas, urgencia en el inicio del tratamiento e interés manifiesto del paciente. Esta última circunstancia se constata en el caso de una paciente de nuestra serie de 14 años diagnosticada de osteosarcoma localizado y con riesgo gonadotóxico intermedio-bajo, pero que presentaba un alto interés personal y familiar por el procedimiento. Estas diferentes circunstancias son las que se han descrito como factores extrínsecos o intrínsecos por parte del equipo de Wallace-Anderson (Anderson RA 2015) y que con frecuencia pueden matizar la toma de decisiones.

Desde nuestra experiencia, que es compartida por otros autores, cuando se calcula el riesgo gonadotóxico, se debe contemplar el escenario más complejo posible que pueda presentarse en esa paciente (Wallace WHB 2014). Por ejemplo la indicación y dosificación de RT en la región pélvica o sobre SNC, puede venir vinculada a la respuesta conseguida previamente por la cirugía y la QT. En caso de obtenerse una RC puede evitarse la RT (como en el caso de los rhabdomiomas o EH) o puede considerarse una dosis inferior como en el caso de los tumores intracraneales de CG. Esto conlleva a cambios de riesgo gonadotóxico una vez iniciado o finalizado el tratamiento. En nuestra serie estas circunstancias han ocurrido en varios casos: una paciente con rhabdomioma uterino en RC tras cirugía y QT que finalmente no ha llevado la RT pélvica posible en primera línea, y otras dos pacientes con TCG intracraneales que finalmente por estar en RC han recibido una dosis de RT craneal de 24 Gy, en lugar de los 40 Gy posibles. Esperar al resultado de la evaluación para plantearse la CCO, sólo sería viable si la QT que fueran a recibir previamente fuera muy poco gonadotóxica con intención de asegurar un tejido ovárico extraído y conservado con adecuado número de FP.

Otra situación clínica posible, es el cambio de riesgo de FOP en el otro sentido. Se trataría de pacientes que en primera línea no tendrían indicación de CCO pero que tras ver la evolución de la enfermedad (progresión o recaída), sí que lo tienen posteriormente. En nuestra serie encontramos en esa situación a 12 pacientes (8 LA tras recaída, 2 tumores de Wilms con ruptura intraoperatoria, 1 sarcoma partes blandas no rhabdomioma recidivado y un tumor ovárico bilateral asincrónico). En todos los casos la QT previa administrada se ha considerado poco gonadotóxica y por tanto factible la CCO. Algunos equipos ante esta posibilidad tienden a ser más laxos en sus criterios de inclusión inicial

(Jadoul P 2010). La opción de CCO “de rescate” en la gran mayoría de pacientes tras haber recibido QT poco tóxica a nivel gonadal, nos afianza en nuestra decisión de ofrecerla sólo en casos de alto riesgo o riesgo intermedio-riesgo alto.

Determinar un punto de corte de riesgo gonadotóxico sobre el cual ya se considere indicado el ofrecimiento de técnicas de PF no es sencillo. Wallace propone un riesgo mayor al 50 %, sin especificar dentro de su grupo intermedio, quién cumpliría esa cifra (Wallace 2015). Nosotros a través de la clasificación Valencia 2015, hemos mantenido esa cifra, pero desglosando las patologías en 2 diferentes subgrupos de riesgo: entre 50-80 % y >80 %. Globalmente para todas las mujeres, el panel de expertos en FP en su más reciente publicación, defiende puntos de corte más bajos, con la posibilidad de ofrecerlas si el riesgo es superior al 30% (ISFP Practice Committee 2012). No hay que olvidar que la edad de cada paciente puede hacer variar ese riesgo considerablemente aun teniendo el mismo diagnóstico y tratamiento.

Todo lo anteriormente descrito sobre la clasificación, así como el cambio de riesgo en ambas direcciones pone de manifiesto la dificultad en el consejo a los pacientes y sus familias sobre el riesgo de FOP. Esta dificultad es magnífica, si tenemos en cuenta la dispersión geográfica de las pacientes candidatas. Con la intención de poner facilidades a estas familias y evitar desplazamientos (en un momento tan especial como es el de debut de una enfermedad oncológica en pediatría), en muchos casos se ha realizado un asesoramiento telefónico/email a los médicos responsables para que de una manera directa pudieran realizar una primera información. En el caso de estar la familia interesada, se ha ampliado esa información en la visita previa a la intervención. En ningún caso se ha producido cambio de opinión posterior.

La dispersión geográfica no ha supuesto una dificultad a la hora de remitir pacientes de corta edad, pero un 60% de las pacientes de otros centros con tumores sólidos en tratamiento de primera línea, habían recibido 1 ciclo de QT previamente a la CCO. En la mayoría de casos el motivo ha sido la necesidad de iniciar el tratamiento lo más precozmente posible o un reajuste del estadio y del riesgo tras haber iniciado el tratamiento. La disponibilidad de quirófano en nuestro hospital, no ha supuesto retraso en el procedimiento ni el inicio de tratamiento posterior. En lo referente a las pacientes de nuestro propio centro y gracias a la experiencia adquirida conforme ha ido avanzando el programa, las posibilidades de que un tumor sólido en tratamiento de primera línea haya recibido QT previa a la CCO, han sido menores con el paso del tiempo.

La especialización requerida para el procesamiento de la muestra, así como la obtención de permisos legales y de comités éticos para la extracción, manipulación y almacenamiento de tejido ovárico, dificultan ahora mismo en nuestro país que sea una técnica que pueda extenderse a muchos hospitales, a pesar de que las intervenciones por laparoscopia estén disponibles en la mayoría de ellos. Se ha descrito viabilidad del tejido, conservado a 4º tras 20-24 horas de

su extracción con los adecuados sistemas de procesamiento y transporte (Dittrich R 2012) (Jadoul P 2012), por lo que en un futuro podría plantearse el diseño de una infraestructura que evitara el desplazamiento de la paciente para la intervención y sólo se centralizara el almacenamiento del tejido como ocurre en Dinamarca (Schmidt KT 2013). A día de hoy, dada la recortada experiencia en nuestro país y la necesidad de una manipulación muy cuidadosa del escaso volumen ovárico extraído, consideramos más seguro remitir a las pacientes a hospitales concretos y que preferiblemente cuenten con proyectos de investigación relacionados.

El criterio de inclusión propuesto por Wallace en 2005 y que se ha mantenido a lo largo de estos años de: “esperanza realista de supervivencia a los 5 años”, requiere una mención especial (Wallace WH 2005). Los avances en los tratamientos antineoplásicos han conseguido que globalmente y para todos los tumores en edad pediátrica la supervivencia a los 5 años sea del 77% en nuestro país (Peris Bonet R 2015). Ahora bien, desde la máxima supervivencia conseguida (retinoblastoma y EH entre otros, superiores al 95%) hasta la mínima según diagnósticos, existe una gran diferencia. Este hecho es especialmente relevante cuando hablamos de entidades metastásicas (tumores SNC, sarcomas) donde las probabilidades reales en muchas ocasiones oscilan entre el 20-50 % (Isakoff MS 2015) (Gaspar N 2015). En pediatría muy pocas veces se inicia un tratamiento con intención paliativa inicial, incluso a veces “contra todo pronóstico” se inician tratamientos curativos y con frecuencia de alta intensidad, por la posibilidad relativamente pequeña pero cierta, de supervivencia a largo plazo. En esas circunstancias y en ese momento de inicio de tratamiento intensivo en primera línea con intención curativa, nuestro equipo considera que sí puede haber indicación de técnicas de FP siempre que se cumplan todos los demás criterios de inclusión. Poner un punto de corte de supervivencia determinado **no** resulta útil en este sentido y hay que tener en cuenta muchos otros factores (situación clínica, edad, familia, urgencia del inicio de tratamiento): En nuestra serie el 25,5 % de las pacientes han fallecido tras realizarse la CCO. La mayoría de casos se trataba de pacientes con enfermedades en recidiva (5 LLA, 2 LMA, 1 T. Wilms, 1 sarcoma PB) con una probabilidad de curación en el momento de CCO todavía considerable. En 3 casos particulares que también han fallecido (2 sarcomas de Ewing metastásicos y 1 meduloblastoma diseminado) se realizó la CCO en primera línea de tratamiento aun siendo conscientes de que el pronóstico global no era bueno, cumpliéndose siempre el resto de criterios y estando la familia informada al respecto. Paralelamente contamos en nuestra serie con el ejemplo de otra paciente que diagnosticándose de sarcoma de Ewing pélvico con metástasis pulmonares a la edad de 13 años, se le realizó una CCO con pexia ovárica asociada y tras más de 6 años de seguimiento continua en RC asociando FOP desde el final del tratamiento. A pesar de las limitaciones de la serie por ser globalmente pequeña, son este prototipo de pacientes, las que nos han reafirmado en no ser excesivamente restrictivos en lo referente al pronóstico. En otras series, como la del grupo de Poirot en Paris, llama la atención la inclusión,

entre sus 47 pacientes pediátricas, 20 casos de neuroblastoma metastásico, quedando patente que para ellos el pronóstico no es un factor limitante (Poirot CJ 2007).

En la misma línea de remarcar aspectos peculiares pediátricos, en nuestra serie ha sido imposible la visualización de los ovarios en la ecografía abdominal previa a la CCO en 7 pacientes prepúberes y 1 púber, bien por el pequeño tamaño, la dificultad para retener la vejiga llena o la escasa colaboración en algún caso. Esto confirma la necesidad de contar con especialistas en pediatría (incluyendo radiólogos) para este tipo de pruebas previas al CCO así como en el seguimiento.

La posibilidad de utilizar el mismo acto anestésico-quirúrgico para otros procedimientos que requieren sedación, es desde nuestro punto de vista, un factor clave en la aceptación de la técnica por parte de las familias. En un momento muy vulnerable como es el debut de un proceso oncológico en un niño, este hecho cobra especial relevancia sobre todo cuando el principal objetivo en esos momentos para todos siempre es la curación de la enfermedad. Aunque la importancia del tema ya había sido descrita anteriormente (Anderson RA 2008), no hay prácticamente publicaciones que informen de estos detalles en sus series (Revel A 2009). Conseguir que se realicen estos procedimientos, requiere por otra parte, de una coordinación máxima entre diferentes especialistas (oncólogos, cirujanos, anestesistas y biólogos entre otros) (Andres MM 2009).

La técnica quirúrgica elegida por nuestro equipo con realización de ooforectomía parcial en la mayoría de pacientes (con planteamiento de total en el caso de volúmenes muy pequeños y elevado riesgo gonadotóxico) es compartida por otros grupos pero no todos (Hourvitz A 2015). El equipo de Wallace, Donnez y Demesteree, abogan por biopsias múltiples de la cortical ovárica (aunque también con planteamiento de ooforectomía total en los mismos supuestos) (Demeestere I 2015) (Anderson RA 2008) (Jadoul P 2010). Contrariamente y bajo la premisa de riesgo FOP muy elevado, los equipos de Poirot y Revel describen en sus series la realización de ooforectomía unilateral en todas las pacientes (Revel A 2009) (Poirot CJ 2007). La afectación de la capacidad reproductiva por el hecho de haber quitado un ovario o parte de él, es una inquietud común en muchas familias a las que se les ha informado en nuestro programa. Un trabajo danés reciente estudia la fertilidad tras ovariectomía, realizada hace varios años como técnica de PF en pacientes adultas diagnosticadas de cáncer de mama entre otros tumores. Refieren que con la información disponible actual, el riesgo gonadotóxico ya no se consideraría tan elevado y por tanto la fertilidad normal encontrada en la gran mayoría de estas mujeres tras la cirugía de CCO y tras recibir su tratamiento oncológico, traduce su escaso potencial efecto sobre la función ovárica (Schmidt KT 2013). A una conclusión similar llega el trabajo publicado por Lass sobre fertilidad global en pacientes con un solo ovario sin antecedentes de cáncer. Por

otra parte ambos autores coinciden en la dificultad para determinar con exactitud si estas pacientes podrían experimentar una menopausia algo adelantada (Lass 1999). Por este hecho y si el volumen ovárico es aceptable, desde nuestro programa mantenemos la técnica de la ooforectomía parcial propuesta siempre que se realice por personal experimentado.

Como se ha describe en los resultados, en nuestra serie no se ha producido ninguna complicación quirúrgica y ello ha permitido el inicio del tratamiento oncológico según lo previsto. Este hecho ha supuesto también otra pregunta/preocupación frecuente por parte de las familias en el momento de la información. Aunque las series publicadas, muestran con contundencia la seguridad de la técnica, recientemente se ha descrito el caso de una paciente adulta afecta de lupus eritematoso sistémico que falleció poco después del procedimiento anestésico quirúrgico de la CCO (hemorragia pulmonar tras extubación) (Imbert R 2014). Una anestesia general y cirugía laparoscópica para la realización de una técnica de FP en el contexto de una enfermedad grave, confirma la necesidad de seleccionar adecuadamente las pacientes, sobre todo en el caso de menores de edad (Wallace WH 2005) (Grundy R 2001).

El fragmento enviado a AP, ha permitido por una parte descartar a nivel histológico la presencia de células malignas en todas las pacientes menos en una (no se dispone del informe) y adicionalmente la valoración de los FP. Como ya se ha comentado la negatividad en el estudio histológico no descarta malignidad en las neoplasias hematológicas. En estas pacientes hace falta estudiar el tejido con mayor profundidad y utilizar técnicas que midan EMR. En este punto pueden ser debatibles algunos aspectos. Por una parte en lo referente a la indicación o no del autotrasplante en neoplasias hematológicas, la mayoría de publicaciones van a favor de contraindicar directamente el autotrasplante de tejido (Dolmans MM 2010), aunque es destacable que un trabajo reciente contempla la posibilidad de hacerlo si la paciente se encuentra en RC y si todos los estudios de EMR son negativos (Greve T 2012). Por otro lado, elegir en qué momento se debe estudiar en profundidad ese fragmento podría ser también cuestionable. Hacerlo inmediatamente tras la CCO puede tener la ventaja de saber el resultado con rapidez y poder dar una información con celeridad a la familia. Por otra parte es muy posible que las técnicas de laboratorio para rastrear LA y diferentes células malignas de tumores sólidos cambien en gran medida en los próximos años. Ya que la cantidad de tejido extraída es muy pequeña y que la necesidad de su utilización en el caso de pediatría no se plantea hasta dentro de mucho tiempo, puede ser razonable conservar esos fragmentos para futuras investigaciones más completas y realizarlas en el momento en que pueda estar cercana la utilización de dicho tejido.

Idealmente la CCO se debería realizar previamente al inicio de cualquier tratamiento antineoplásico, pero esta opción no siempre es posible e incluso en algún caso, no la más conveniente. El hecho de recibir QT previa podría mermar la reserva ovárica, pero en casos concretos como ya hemos

comentado de forma amplia en antecedentes y metodología, su administración no contraindica realización de CCO, sobre todo en pacientes con alto riesgo gonadotóxico. En el fragmento de AP se solicita valorar la presencia de FP y este dato en nuestra serie se ha especificado en 47 de 51 pacientes. En el 85,1 % de los casos valorables, se describía presencia de normales o numerosos FP (67,5% no habían recibido QT previa y en 32,5 % sí). En 7 pacientes por el contrario se especificaba escasos o ausentes FP, 5 casos con QT previa y 2 sin ella. De estos dos últimos casos destacar que se trata de 2 pacientes púberes (1 EH y de 1 EGC) con historias menstruales normales y con AMH en rangos normales previamente a la CCO. Se especificaba que la muestra remitida de una de ellas era muy pequeña, pudiendo no ser por tanto representativa del resto de tejido crioconservado. En el caso de las 5 que sí recibieron QT, 3 de ellas eran pacientes muy pequeñas y la muestra enviada para AP muy reducida, pudiendo contribuir este hecho al resultado. Globalmente por tanto a nivel histológico podríamos decir que la QT previa no ha tenido una repercusión llamativa si consideramos además que en varios casos el pequeño tamaño de la muestra ha podido estar relacionado. En la misma línea el grupo danés no encuentra diferencias en su serie respecto a la densidad folicular entre aquellas niñas que habían recibido QT poco gonadotóxica previa a la CCO y las que no (Imbert R 2014). En la serie del grupo de Poirot todas las pacientes (47) habían llevado QT previa no esterilizante, encontrando una densidad folicular adecuada en la mayoría de pacientes y describiendo una fuerte correlación inversa entre la densidad y la edad de las pacientes durante la CCO (Poirot CJ 2007). Una preocupación posible por parte de algunos profesionales es conocer si el hecho de haber recibido QT previa reciente puede afectar a la calidad de las folículos en términos de problemas o malformaciones de futuros recién nacidos tras el reimplante de ese tejido. El tema ha sido abordado por varios trabajos y la clave de la respuesta está en el momento de madurez/crecimiento de las células crioconservadas. Como ya se ha apuntado previamente no se recomienda QT previa reciente cuando se va a realizar una vitrificación de ovocitos tras estimulación o IVM de ovocitos inmaduros aspirados en el momento de la CCO, porque además de peores resultados en lo que en las técnicas de fertilización se refiere, potencialmente sí podría suponer algún problema en la descendencia directa derivada de estas células (Jadoul P 2012) (Dolmans MM 2005). La sensibilidad en este sentido de los FP es distinta, ya que no son células en crecimiento y el posible efecto de la QT hace referencia fundamentalmente a la “cantidad” de reserva ovárica que puede estar disponible tras su administración (Shapira M 2014) (Poirot CJ 2007).

En lo referente al seguimiento de estas pacientes, no existe un protocolo estandarizado, aunque sí unas recomendaciones. Globalmente se asume la necesidad de hacerlo, pero desde cuándo, quién y con qué periodicidad suele quedar a criterio de cada centro. A la hora de planificarlo hay que considerar varios aspectos en este perfil de pacientes. El primero de ellos es que en algunos casos se trata de niñas muy pequeñas, por lo que la colaboración con endocrinología pediátrica es fundamental para valorar además el desarrollo

puberal. Es poco frecuente que antes de los 8 años las pacientes sean remitidas para valoración de la función ovárica, ya que habitualmente es el propio oncólogo pediatra el que realiza un seguimiento clínico global. Plantear el seguimiento a estas edades en los servicios de reproducción es complicado ya que la dinámica de las consultas es muy diferente y el prototipo de pacientes también, quedando habitualmente reservado para aquellas más mayores, o en el relevo de las que son dadas de alta de endocrinología pediátrica una vez alcanzan determinada edad (16 años en nuestro centro). Globalmente este ha sido el abordaje en nuestro programa, donde de la gran mayoría han iniciado seguimiento adicional por endocrinología al llegar a los 8 años, o directamente en reproducción en el caso de las más mayores. El segundo aspecto es que se trata de pacientes habitualmente muy complejas (especialmente las sometidas a un TPH) en ocasiones con complicaciones severas y numerosos tratamientos por lo que hay que tener en cuenta que, sin dejar de hacer un seguimiento adecuado, hay que evitar en lo posible la sobrecarga de visitas hospitalarias y optimizando las que ya realizan. En tercer lugar destacar que con frecuencia, un riesgo gonadotóxico severo, lleva asociado un mayor riesgo oncológico, por lo que las posibilidades de recaída y éxitus durante el seguimiento a corto-medio plazo no son excepcionales, como se demuestra en nuestra serie. De todos estos aspectos se deduce que la programación del seguimiento debe ser individualizada y que la comunicación con el oncólogo responsable de la paciente es fundamental. Cuando se trata de pacientes de otros hospitales la monitorización del seguimiento se hace algo más compleja, aunque en nuestro caso todos los especialistas que han derivado pacientes se han mostrado muy receptivos a nuestras recomendaciones y se mantiene contacto directo con ellos en la actualidad.

Como ya se ha reflejado en los antecedentes una buena anamnesis con preguntas explícitas sobre síntomas de menopausia, una adecuada exploración física con valoración desarrollo puberal y patrón de crecimiento, así como una analítica hormonal con AMH incluida y un RFA en ecografía pélvica, darían una información completa y valiosa para ir asesorando sobre la reserva folicular con el paso del tiempo a las pacientes y valorando la necesidad de instaurar un THS o incluso plantear opciones de PF posteriores (Johnston RJ 2009).

Muchos de los trabajos revisados, hacen referencia a que parte de esta población sólo tendrán como manifestación de daño ovárico unas cifras de AMH inferiores a los de la población general, sugiriendo que cuentan con una reserva ovárica disminuida, pero sin tener por que implicar una infertilidad asociada (Williams D 2008) (Thomas-Teinturier C 2015). Una detección temprana de niveles AMH bajos o en descenso en varias determinaciones, puede tener también implicaciones terapéuticas. En los últimos años se está considerando la posibilidad de ofrecer técnicas de PF post-tratamiento a mujeres jóvenes en RC duradera con una reserva ovárica baja, no ausente, pero que previsiblemente será nula cuando alcancen los 31 años, edad media de maternidad en España y otros países europeos (Anderson RA 2015). En nuestra serie se ha propuesto en

una ocasión una vitrificación de ovocitos a una paciente de 18 años diagnosticada de EH tras más de 5 años en RC de. El planteamiento se ha fundamentado en cifras reiteradas de AMH por debajo del umbral detectable de la técnica en paciente con administración años antes de más de 5 gr de procarbina.

Un aspecto que nos ha planteado dificultad en este trabajo, ha sido la definición de FOP en edades pediátricas. Una cifra de FSH superior a 40 mU/ml es definitoria de fallo ovárico de forma global, pero muchos trabajos que contemplan seguimiento de pacientes pediátricas hacen referencia a otras cifras, asociando además otros parámetros como la presencia o no de menstruaciones, cifra de estradiol concomitante, progresión puberal normal, etc. (DeWire M 2014) (Raciborska A 2014) (Wallace WHB 2014). Finalmente en este proyecto se decidió adoptar una definición repetida en estas publicaciones y útil en la práctica clínica diaria como se ha comentado en el apartado 1.2.2.1.

Según algunos autores en las pacientes menores de 12 años no se puede evaluar la función ovárica, salvo la progresión puberal, ya que la medición de gonadotrofinas y el estradiol no son fiables antes de esa (Wallace WHB 2014). Este aspecto puede ser controvertido ya que existen valores específicos de acuerdo al desarrollo puberal que pueden corroborar su normalidad o no según unos resultados dados (Sehested A 2000), siempre y cuando se trate de controles hormonales seriados (no determinaciones aisladas) y estén descartadas otras causas de aumento de gonadotrofinas (como podría ser un tumor secretor de las mismas, entidad muy infrecuente en pediatría). En nuestro programa finalmente hemos incluido a pacientes prepúberes dentro del diagnóstico de FOP cuando tras valoración repetida se ha detectado un hipogonadismo hipergonadotropo franco.

La definición de retraso puberal también puede presentar matices. Oficialmente no puede diagnosticarse antes de los 13 años en niñas y además habitualmente no se inicia tratamiento hasta ese momento. Sin embargo pacientes cercanas a esa edad, con alteraciones analíticas francas y que con una probabilidad muy alta cumplirán los criterios en unos meses, pueden beneficiarse de iniciar THS más precozmente, sobre todo en términos de prevención de osteoporosis como refleja la situación de 2 pacientes diagnosticadas de FOP en nuestra serie con edades cercanas al límite (Martul 2000).

Globalmente nuestra prevalencia de FOP entre las pacientes evaluables es del 65 % (13 pacientes sobre un total de 20). A este dato habría que añadir una paciente con hallazgo único pero reiterado de AMH indetectable, considerándose una paciente con reserva ovárica baja. Como se ha comentado en los resultados la mediana de seguimiento de las pacientes diagnosticadas de FOP es de 3,8 años (IQR 3-4,7), mientras que la situación global del resto de

pacientes vivas es de 0,7 años (IQR 0,4-3,1), con lo que esta cifra todavía puede incrementarse a lo largo de los próximos años.

El dato de FOP en series pediátricas sometidas a CCO apenas está disponible y el más comparable sería el del equipo de Wallace en sus 20 pacientes evaluables (en las que a 14 se le practicó CCO y en 6 se les ofreció no siendo aceptada), encontrando un tasa de FOP del 35% en aquellas pacientes a las que se les había ofrecido la técnica. Aunque específicamente no describe el tratamiento oncológico de las pacientes con FOP frente a aquellas que no lo presentan, tan sólo hay un caso de neoplasia hematológica y llamativamente el porcentaje de diagnósticos de EH y rhabdomyosarcomas es casi de un 30% para cada uno de ellos. De artículos anteriores pude deducirse que tan solo 3 (14,2%) habían sido sometidas a TPH, presentando 2 de ellas FOP y curiosamente una de ellas sin fallo ovárico tras acondicionamiento con ICT. La mediana de seguimiento de esta cohorte es de 16,9 años (IQR 15·5–21·8) (Wallace WHB 2014).

Una de las principales razones que podría explicar nuestras cifras, es el gran número de pacientes sometidas a un TPH dentro nuestra serie. Diez de las 12 pacientes (83,3 %) diagnosticadas de FOP han sido sometidas a un TPH, con acondicionamientos basados en Busulfan e ICT su práctica totalidad. En los otros 2 casos, a una paciente se le practicó doble anexiotomía (en 2 momentos diferentes con una diferencia de 4 años) por tratarse de un tumor ovárico bilateral asincrónico y una paciente púber diagnosticada de EH con afectación pélvica recibió RT ovárica a una dosis de 19,8 Gy. Todas ellas han sido por tanto pacientes consideradas de muy alto riesgo gonadotóxico previo a la CCO.

Dentro del grupo de pacientes afectas por FOP, cinco de ellas (41,6%) eran prepúberes en el momento de la CCO, confirmando la NO protección ovárica de estas pacientes frente a tratamientos altamente gonadotóxicos (Rodríguez-Wallberg KA 2014) (Borgmann-Staudt A 2012). Cuatro de estas pacientes han presentado además alteraciones en el desarrollo puberal (2 estrictamente por definición y 2 más en edades cercanas al límite). Debido a los volúmenes ováricos tan pequeños de todas ellas, no se dispone de una gran cantidad de tejido crioconservado y dado que en los cuatro casos el diagnóstico de base es LA, no está contemplado en ningún caso desde el programa su reimplante para inducir la pubertad, decisión que va en la misma línea que la publicada por otros autores (Anderson RA 2015).

En relación al estudio del efecto de la QT sobre el tejido ovárico, uno de los problemas que nos encontramos en estas pacientes es que desconocemos si la enfermedad por si misma, es capaz de afectar a la dotación folicular del ovario y al funcionamiento del mismo, tal y como ocurre en el sexo masculino. Se ha descrito que en varones afectos por patologías oncológicas, antes de empezar la terapia, la oligozoospermia y las anomalías espermáticas son más frecuentes que en hombres sanos (Trottmann M 2007) (Chung K 2005). El mecanismo

responsable de la disminución de la calidad del semen no está bien establecido. Factores locales producidos por los tumores, sistémicos como consecuencia de la enfermedad sobre el organismo, o ambos, podrían estar implicados (Hallak J 1999).

En cuanto al impacto de los tratamientos oncológicos sobre el ovario, la mayor parte de la información de que disponemos está basada en la primitiva medición de la función menstrual, que no es un buen marcador de la fertilidad (Lutchman Singh K 2005). Como ya se ha comentado la afectación de la QT puede a diferentes mecanismos (especialmente los AA, aunque no de forma exclusiva) actuando directamente sobre la reserva de FP o bien sobre el estroma ovárico.

En los antecedentes se describen estudios recientes, que han demostrado la implicación del sistema PTEN/PI3K/Akt en la activación y maduración de los folículos ováricos y la afectación que sobre esa vía pueden tener algunos agentes quimioterápicos como la CFM, agotando anticipadamente la reserva de FP, al producir una activación masiva de los mismos (Adhikari D 2009) (Kalich-Philosoph L 2013).

Este estudio analiza por primera vez el daño a nivel ovárico en pacientes pediátricas púberes y prepúberes con LA tratadas con QT poco gonadotóxica mediante el análisis de la expresión de FoxO3. Los resultados obtenidos demuestran en las pacientes prepúberes con LA tratadas con QT previa a la CCO, una activación significativa de la expresión génica de FoxO3 y un aumento de la extrusión nuclear de esta molécula a nivel de los FP de las pacientes prepúberes. En el caso de las pacientes púberes aunque no se encontraron diferencias significativas respecto a sus controles sí se observó una tendencia a la sobreexpresión del FoxO3 tanto a nivel génico como proteico en las pacientes tratadas con QT.

A pesar de que no se encontraron diferencias significativas entre pacientes prepúberes y púberes respecto a sus controles en relación a densidad o crecimiento folicular sí se observó una tendencia al desarrollo folicular en las pacientes con QT frente a controles.

En las pacientes prepúberes (donde por otra parte observamos una mediana de edad menor que en el grupo control) esta tendencia al desarrollo folicular y su valoración conjunta con los datos de expresión génica y extrusión nuclear a nivel proteico del FoxO3, sí que podrían indicar en este subgrupo un inicio del del "burn out" folicular. A pesar de que la QT recibida por este grupo clásicamente no se haya relacionado con un daño ovárico considerable, a raíz de los resultados sí que su administración puede significar de alguna forma una lesión sobre la reserva ovárica. Consideramos por tanto que la cronología elegida para la realización de la CCO en este grupo de pacientes con LA es adecuada, pero realizada en un momento "límite". Una mayor dosis de QT administrada

previamente o un perfil diferente de pacientes podría ocasionar ya un daño sobre el tejido ovárico con potenciales consecuencias clínicas para las pacientes.

En cuanto a las pacientes púberes tratadas con QT, este incremento de crecimiento folicular, así como los datos de expresión génica son menos llamativos quizás porque son pacientes que ya tienen activado su desarrollo hormonal y sería necesario el reclutamiento de un mayor número para poder obtener diferencias significativas.

No hay que olvidar que la ruta de señalización del PTEN/PI3K/Akt, juega un papel fundamental en el metabolismo del cáncer (Vivanco I 2002), bien contribuyendo a la progresión del ciclo celular, bien disminuyendo la apoptosis e incrementando las capacidades metastásicas de las células tumorales (Paez J 2003). El Akt es un efector clave de la PI3K y parte esencial de la cascada de señales que regula múltiples procesos celulares tales como el crecimiento, la transformación, la diferenciación y la supervivencia (Scheid MP 2003). La activación descontrolada de la ruta de PI3K/Akt contribuye a la transformación celular y a la progresión tumoral en varios tipos de tumores como la leucemia. En estos pacientes, así como en el estudio de distintas líneas celulares de leucemia, se ha demostrado que esta vía de señalización se activa junto con una disminución en la expresión de gen PTEN (Okumura N 2012).

Debido a esto, es importante señalar que la sobreexpresión del FoxO3 obtenida en nuestros resultados puede ser debida no sólo al efecto de la QT sino también a la propia patología oncológica ya que la inhibición del PTEN induce una activación folicular mediante la sobreexpresión del FoxO3 (Gavish Z 2014). El hecho de no contar con pacientes con LA sin QT como controles se justifica porque desde el inicio del programa la cronología de los casos con LA se planteó de una manera diferente. Estas pacientes con frecuencia al debut están clínicamente inestables, requieren iniciar el tratamiento muy precozmente y además en muchos casos no se dispone durante los primeros días de la indicación al TPH (por falta de datos específicos de la enfermedad o porque una indicación frecuente al TPH se basa en una mala o lenta respuesta al tratamiento).

No obstante, el hecho de que la inducción de la activación y consecuente pérdida folicular sea debida a la QT, a la patología oncológica o a las dos, no cambia el objetivo fundamental de este estudio que ha sido valorar por primera vez el momento más adecuado para la extracción de corteza ovárica en pacientes pediátricas con LA.

Un dato no disponible en el trabajo pero que motiva a un estudio en profundidad, sería conocer la situación a nivel de tejido ovárico de las pacientes no diagnosticadas de LA que sí recibieron QT previa (habitualmente 1 sólo ciclo,

en lugar de varios como las pacientes con leucemia) y valorar si los resultados son extrapolables. Los datos podrían orientar a si este inicio de activación folicular puede originarse con pequeñas cantidades de QT o por el contrario es necesario una mayor dosis acumulada para su puesta en marcha, información que resultaría muy útil tanto en las pacientes diagnosticadas de LA como tumores sólidos.

Se ha demostrado recientemente en un modelo animal y contrariamente a las teorías más clásicas, que tras el tratamiento de los animales con diferentes dosis de QT no se encontraron signos de apoptosis a nivel ovárico sugiriendo que la inducción de la pérdida de FP por QT no sea debida a mecanismos apoptóticos (Meirow D 2010). Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con los hallazgos descritos por Meirow y su equipo, sin embargo en este caso se trata de pacientes pediátricas sin grandes dosis de agentes gonadotóxicos y tal y como hemos observado, a pesar de activarse el mecanismo de “burn out” a nivel de FP no se observó ninguna disminución significativa de los mismos lo que nuevamente corrobora que en estas pacientes estamos llevando a cabo la extracción de la CO en el momento justo antes de que empiece a evidenciarse una disminución de la reserva folicular.

Es importante valorar todos estos resultados con el hecho de que en la última década han surgido numerosos estudios que demuestran la implicación de la cascada de señalización PI3K/Akt en diversos tipos de cáncer humano (Yuan ZQ 2000), lo que ha conllevado la búsqueda de inhibidores de Akt mediante la evaluación de muy diferentes agentes o mediante el diseño racional de los mismos. La ruta PTEN/PI3K/Akt constituye, sin duda alguna, una diana terapéutica prometedora para el desarrollo de nuevos fármacos antitumorales basados en productos de estructura sencilla y accesibles sintéticamente. Por ello y tras los resultados obtenidos en este estudio, el uso e indicación de estos nuevos fármacos podría aplicarse no solo como tratamiento oncológico sino como agentes protectores de la función gonadal.

Como reflexiones finales consideramos que los resultados obtenidos en el estudio del efecto de la QT sobre el tejido ovárico tienen una gran relevancia a nivel científico, ya que por una parte no existen datos publicados hasta la fecha sobre tejido ovárico y activación folicular en una población como la presentada y fundamentalmente por su potencial aplicación clínica. La activación temprana de los FP en las pacientes prepúberes que han recibido QT con normalidad en el resto de parámetros analizados, por una parte reafirma nuestra propuesta de cronología debida a las ventajas clínicas y logísticas que suponen para las pacientes, pero también puede hacernos replantear el momento elegido. Adelantar parcialmente la CCO, con el objetivo de reducir la carga de QT administrada y siempre que el balance beneficio-riesgo sea claro, puede ser una posibilidad en algunos casos particulares.

La puesta en marcha de un programa específico de PF para niñas y adolescentes con cáncer, ha resultado compleja, pero consistente en indicaciones y procedimientos y ante todo muy segura. El grado de satisfacción de pacientes, familias y todos los profesionales sanitarios implicados ha sido muy elevado a lo largo de estos años, promoviendo constantemente el perfeccionamiento del programa e intentando buscar soluciones y respuestas a los interrogantes encontrados en el camino.

:: CONCLUSIONES

10 CONCLUSIONES

1. La CCO en niñas y adolescentes con cáncer es una opción real de PF en pacientes con alto riesgo gonadotóxico. La utilización futura del tejido gonadal extraído y conservado en condiciones óptimas, puede permitir a muchas de las pacientes incluidas en el programa recuperar la función hormonal y reproductiva ovárica, mejorando significativamente su calidad de vida.
2. La adecuada ejecución de la CCO en pacientes pediátricas y adolescentes con cáncer requiere de una adaptación específica de los protocolos utilizados en pacientes adultas a través de la intervención activa de: oncólogos pediatras, cirujanos pediátricos, radiólogos infantiles, psicólogos y equipo de reproducción especializado en manipulación de ovarios prepúberes.
3. El circuito multidisciplinar previo a la CCO propuesto en este trabajo permite una adecuada: selección de pacientes, información y firma de CI, así como la realización de pruebas complementarias, posibilitando todo ello una óptima ejecución del procedimiento.
4. La clasificación Valencia 2015 de riesgo gonadotóxico para niñas y adolescentes con cáncer a nivel nacional, permite una correcta selección de pacientes candidatas al ofrecimiento de técnicas de PF. Un riesgo calculado de FOP superior al 50 % es un punto de corte adecuado como criterio de inclusión. Una edad superior a 2 años y una intención curativa de tratamiento completarían los criterios de selección. La QT previa poco gonadotóxica no contraindica el procedimiento.
5. La ooforectomía parcial es una técnica quirúrgica adecuada y segura en nuestro programa. La realización simultánea de ooforopexia es muy aconsejable en pacientes que vayan a recibir RT en zona pélvica. Asociar procedimientos que precisen anestesia en el mismo acto, es posible y altamente deseable en estas pacientes.
6. La manipulación de la muestra de tejido ovárico una vez extraído requiere de personal especializado. El envío de una muestra a AP es obligatorio y la destinación de un pequeño fragmento para estudios futuros que garanticen la ausencia de células malignas, muy aconsejable. El 90% del tejido extraído debe conservarse para uso clínico de la paciente en el futuro.
7. El seguimiento de la función ovárica de las pacientes pediátricas y adolescentes sometidas a CCO es necesario y debe individualizarse teniendo en cuenta: edad más conveniente de inicio, elección del especialista responsable, duración del mismo y pruebas complementarias

:: CONCLUSIONES

asociadas. La realización de una ecografía ovárica con RFA, así como determinación de AMH en momentos programados a lo largo del seguimiento, permite un adecuado asesoramiento de reserva folicular.

8. La prevalencia de FOP en el seguimiento de las pacientes evaluables de nuestro programa es del 65 %, confirmando el alto riesgo gonadotóxico de los casos incluidos.
9. El tejido ovárico de pacientes pediátricas y adolescentes diagnosticadas de LA, extraído durante la CCO tras haber recibido QT considerada poco gonadotóxica y antes de someterse a un TPH, presenta:
 - una estructura tisular normal en relación al estroma y población folicular, así como una adecuada densidad de FP, primarios o secundarios independientemente del desarrollo puberal.
 - un aumento de la expresión génica de FoxO3a y de su extrusión nuclear a nivel proteico que se traduce en una mayor activación folicular respecto al grupo control de pacientes que no habían llevado QT previamente.
 - Ausencia de muerte celular por apoptosis inducida por los tratamientos QT previos.
10. Tras los resultados descritos podemos considerar que la cronología propuesta para realizar la CCO a pacientes diagnosticadas de LA tras haber recibido QT considerada poco gonadotóxica y antes de someterse a un TPH es adecuada ya que la extracción de CO se lleva a cabo en el momento justo de la activación folicular deteniendo el desarrollo de dicho proceso mediante la criopreservación del tejido.
11. A pesar de que hemos demostrado llevar a cabo una cronología adecuada, en este subgrupo de pacientes podría plantearse adelantar parcialmente el procedimiento siempre que la relación beneficio riesgo fuera clara.

:: BIBLIOGRAFÍA

11 BIBLIOGRAFÍA

Alberts B, Bray D. En *Biología Molecular de la célula*, de Bray D Alberts B, editado por Omega. Barcelona, 2004.

Anderson RA, McLaughlin M, Wallace WH, Albertini DF, Telfer EE. «The immature human ovary shows loss of abnormal follicles and increasing follicle developmental competence through childhood and adolescence.» *Hum Reprod* 29, vol 1 (2014): 97-106.

Anderson RA, Mitchell RT, Kelsey TW, Spears N, Telfer EE, Wallace WH. «Cancer treatment and gonadal function: experimental and established strategies for fertility preservation in children and young adults.» *Lancet Diabetes Endocrinol* 3, vol 7 (2015): 556-67.

Anderson RA, Wallace WHB, Baird DT. «Ovarian cryopreservation for fertility preservation: indications and outcomes.» *Reproduction* 136, vol 6 (2008): 681-9.

Andres M, Wallace WHB. «Practical an ethical issues for fertility preservation for children and young people with cancer.» *Paediatrics and Child Health* 20, vol 3 (2009): 135-42.

Andres MM, Castel V. «Preservation of fertility in children and adolescents with cancer: current situation and future perspectives» *An Pediatr* 71, vol 5 (2009): 440-6.

Baert Y, Van Saen D, Haentjens P, In't Veld P, Tournaye H, Goossens E. «What is the best cryopreservation protocol for human testicular tissue banking?» *Hum Reprod.* 28, vol 7 (2013): 1816-26.

Balachandar S, Dunkel IJ, Khakoo Y, Wolden S, Allen J, Sklar CA. «Ovarian function in survivors of childhood medulloblastoma: Impact of reduced dose craniospinal irradiation and high-dose chemotherapy with autologous stem cell rescue.» *Pediatr Blood Cancer.* 24 (2014): Epub ahead of print.

Bathia S, Blatt J, Meadows A. «Late effects of Childhood Cancer and its treatment.» En *Principles and Practice of Pediatric Oncology*, de Poplack D Pizzo P, 1490-1514. Philadelphia: Lippincot Williams and Wilkins, 2006.

Kliegman R, Jenson H. Behrman R «Principios del tratamiento. Cancer y tumores benignos.» En *Nelson. Tratado de Pediatría*, Madrid: Elsevier, 2004.

Bisharah M, Tulandi T. «Laparoscopic preservation of ovarian function: an underused procedure.» *Am J Obstet Gynecol* 188, vol 2 (2003): 367-70.

Bleyer A. «Principios del tratamiento. Cáncer y tumores benignos.» En *Nelson. Tratado de Pediatría*, de Kliegman R, Jenson H. Behrman R. Madrid: Elsevier, 2004.

Borgmann-Staudt A, Rendtorff R, Reinmuth S, Hohmann C, Keil T, Chuster FR, Holter W, Ehlert K, Keslova P, Lawitschka A, Jarisch A, Strauss G. «Fertility after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in childhood and adolescence.» *Bone Marrow Transplant* 47, vol 2 (2012): 271-6.

Brämswig JH, Riepenhausen M, Schellong G. «Parenthood in adult female survivors treated for Hodgkin's lymphoma during childhood and adolescence: a prospective, longitudinal study.» *Lancet Oncol* 16, vol 6 (2015): 667-75.

Brougham MF, Crofton PM, Johnson EJ, Evans N, Anderson RA, Wallace WH. «Anti-Müllerian hormone is a marker of gonadotoxicity in pre- and postpubertal girls treated for cancer: a prospective study.» *J Clin Endocrinol Metab* 97, vol 6 (2012): 2059-67.

Brougham MF, Kelnar CJ, Sharpe RM, Wallace WH. «Male fertility following childhood cancer: current concepts and future therapies.» *Asian J Androl* 5, vol 4 (2003): 325-37.

Cañete R, Mata C, Aguilar M. «Retraso puberal. Hipogonadismos. Protocolo diagnóstico pediátrico.» En *Protocolos Endocrinología*, de Chueca M, Gomez AL, Quinteiro S, García B. Lechuga A Lopez JP, 205-17. Exlibris, 2011.

Chapple A, Salinas M, Ziebland S, McPherson A, MacFarlane A. «Fertility issues: the perceptions and experiences of young men recently diagnosed and treated for cancer.» *J Adolesc Health* 40, vol 1 (2007): 69-75.

Charpentier AM, Chong AL, Gingras-Hill G, Ahmed S, Cigsar C, Gupta AA, Greenblatt E, Hodgson DC. «Anti-Müllerian hormone screening to assess ovarian reserve among female survivors of childhood cancer.» *J Cancer Surviv* 8, vol 4 (2014): 548-54.

Chemaitilly W, Mertens AC, Mitby P, Whitton J, Stovall M, Yasui Y, Robison LL, Sklar CA. «Acute ovarian failure in the childhood cancer survivor study.» *J Clin Endocrinol Metab* 91, vol 5 (2006): 1723-8.

Chiarelli AM, Marrett LD, Darlington G. «Early menopause and infertility in females after treatment for childhood cancer diagnosed in 1964-1988 in Ontario, Canada.» *Am J Epidemiol.* 150, vol 3 (1999): 245-54.

Chieng PU, Huang TS, Chang CC, Chong PN, Tien RD, Su CT. «Reduced hypothalamic blood flow after radiation treatment of nasopharyngeal cancer: SPECT studies in 34 patients.» *Am J Neuroradiol* 12 (1991): 661-665.

Chueca M, Berrade S, Oyarzábal M. «Secuelas endocrinológicas del niño con cáncer: seguimiento.» *Rev Esp Endocrinol Pediatr* 5 (Suppl) (2014): 69-77.

Cobo A, Domingo J, Pérez S, Crespo J, Remohí J, Pellicer A. «Vitrification: an effective new approach to oocyte banking and preserving fertility in cancer patients.» *Clin Transl Oncol* 10, vol 5 (2008): 268-73.

Crofton PM, Evans AE, Groome NP, Taylor MR, Holland CV, Kelnar CJ. «Dimeric inhibins in girls from birth to adulthood: relationship with age, pubertal stage, FSH and oestradiol.» *Clin Endocrinol (Oxf)* 56, vol 2 (2002): 223-30.

Darzy KH, Shalet SM. «Hypopituitarism following Radiotherapy Revisited.» *Endocr Dev* 15 (2009): 1.24.

De Bruin M, Broeder E, van den Berg M, Lambalk C. *Fertility in Female Childhood Cancer Survivors*. Vol. 15, de *Endocrinopathy after Childhood Cancer Treatment.*, de CJH Kelnar WHB Wallace, 135-158. London: Mullis, 2009.

Demeestere I, Simon P, Dedeken L, Moffa F, Tsépélidis S, Brachet C, Delbaere A, Devreker F, Ferster A. «Live birth after autograft of ovarian tissue cryopreserved during childhood.» *Hum Reprod* 30, vol 9 (2015): 2107-9.

DeWire M, Green DM, Sklar CA, Merchant TE, Wallace D, Lin T, Vern-Gross T, Kun LE, Krasin MJ, Boyett JM, Wright KD, Wetmore C, Broniscer A, Gajjar A. «Pubertal development and primary ovarian insufficiency in female survivors of embryonal brain tumors following risk-adapted craniospinal irradiation and adjuvant chemotherapy.» *Pediatr Blood Cancer*. 18 (2014): Epub ahead of print.

Dittrich R, Lotz L, Keck G, Hoffmann I, Mueller A, Beckmann MW, van der Ven H, Montag M. «Live birth after ovarian tissue autotransplantation following overnight transportation before cryopreservation.» *Fertil Steril*. 97, vol 2 (2012): 387-90.

Dolmans MM, Demyle D, Martinez-Madrid B, Donnez J. «Efficacy of in vitro fertilization after chemotherapy.» *Fertil Steril* 83, vol 4 (2005): 897-901.

Dolmans MM, Marinescu C, Saussoy P, Van Langendonck A, Amorim C, Donnez J. «Reimplantation of cryopreserved ovarian tissue from patients with acute lymphoblastic leukemia is potentially unsafe.» *Blood* 116, vol 16 (2010): 2908-14.

Domingo J, Ayllón Y, Domingo S, Cobo A, Crespo J, Pellicer A. «New approaches to female fertility preservation.» *Domingo J1, Ayllón Y, Domingo S, Cobo A, Crespo J, Pellicer A.* 11, vol 3 (2009): 154-9.

Donnez J, Dolmans MM, Diaz C, Pellicer A. «Ovarian cortex transplantation: time to move on from experimental studies to open clinical application.» *Fertil Steril*, septiembre 2015: Epub ahead of print.

Donnez J, Dolmans MM, Pellicer A, Diaz-Garcia C, Sanchez Serrano M, Schmidt KT, Ernst E, Luyckx V, Andersen CY. «Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation.» *Fertil Steril* 99, vol 6 (2013): 1503-13.

Donnez J, Dolmans MM. «Ovarian cortex transplantation: 60 reported live births brings the success and worldwide expansion of the technique towards routine clinical practice.» *J Assist Reprod Genet* 32, vol 8 (2015): 1167-70.

Edge B, Holmes D, Makin G. «Sperm banking in adolescent cancer patients.» *Arch Dis Child.* 91, vol 2 (2006): 149-52.

Egdar A, Wallace WHB. «Reproductive possibilities for the child with cancer.» *Obstetrics, Gynecology and Reproductive Medicine* 19 (2008): 48-52.

Escribá MJ, Grau N, Escrich L, Novella-Maestre E, Sánchez-Serrano M. «Spontaneous in vitro maturation of oocytes prior to ovarian tissue cryopreservation in natural cycles of oncologic patients.» *J Assist Reprod Genet.* 29, vol 11 (2012): 1261-5.

Even-Or E, Ben-Haroush A, Yahel A, Yaniv I, Stein J. «Fertility After Treatment With High Dose Melphalan in Women With Acute Myelogenous Leukemia» *Pediatr Blood Cancer*, 2015: Sep 16. doi: 10.1002/pbc.25765. [Epub ahead of print].

Faddy MJ, Gosden RG. «A mathematical model of follicle dynamics in the human ovary.» *Hum Reprod* 10, vol 4 (1995): 770-75.

Fallat ME, Hutter J. «Preservation of fertility in pediatric and adolescent patients with cancer.» *Pediatrics* 121, vol 5 (2008): 1461-9.

Fasano G, Moffa F, Dechène J, Englert Y, Demeestere I. «Vitrification of in vitro matured oocytes collected from antral follicles at the time of ovarian tissue cryopreservation.» *Reprod Biol Endocrinol* 9 (2011): 150.

Feigin E, Abir R, Fisch B, Kravarusic D, Steinberg R, Nitke S, Avrahami G, Ben-Haroush A, Freud E. «Laparoscopic ovarian tissue preservation in young

patients at risk for ovarian failure as a result of chemotherapy/irradiation for primary malignancy.» *J Pediatr Surg* 42, vol 5 (2007): 862-4.

Ferragut J, García EJ, Moreno MF, Tembourny C. «Secuelas Endocrinas de la Quimio/Radioterapia.» En *Guías diagnóstico- terapéuticas en endocrinología pediátrica*, de Sociedad Española de Endocrinología pediátrica. Madrid: SEEP, 2004.

Fleming JM, Miller TC, Meyer MJ, Ginsburg E, Vonderhaar BK. «Local regulation of human breast xenograft models.» *J Cell Physiol* 224, vol 3 (2010): 795-806.

Güemes M, Muñoz MT, Fuente L, Villalba C, Martos GA, Argente J. «Endocrinological outcome in children and adolescents survivors of central nervous system tumours after a 5 year follow-up.» *An Pediatr (Barc)* 80, vol 6 (2014): 357-64.

Gaspar N, Hawkins DS, Dirksen U, Lewis IJ, Ferrari S, Le Deley MC, Kovar H, Grimer R, Whelan J, Claude L, Delattre O, Paulussen M, Picci P, Sundby Hall K, van den Berg H, Ladenstein R, Michon J, Hjorth L, Judson I, Luksch R, Bernstei. «Ewing Sarcoma: Current Management and Future Approaches Through Collaboration.» *J Clin Onco* 33, vol 27 (2015): 3036-46.

Geens M, Goossens E, De Block G, Ning L, Van Saen D, Tournaye H. «Autologous spermatogonial stem cell transplantation in man: current obstacles for a future clinical application.» *Hum Reprod Update* 14, vol 2 (2008): 121-30.

Gleeson HK, Shalet SM. «The impact of cancer therapy on the endocrine system in survivors of childhood brain tumours.» *Endocr Relat Cancer* 11, vol 4 (2004): 589-602.

Gonzalez. Protocolos de vigilancia sanitaria específica: Agentes citostáticos. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo, 2003.

Goossens E, Van Saen D, Tournaye H. «Spermatogonial stem cell preservation and transplantation: from research to clinic.» *Hum Reprod.* 28, vol 4 (2013): 897-907.

Gosden RG, Baird DT, Wade JC, Webb R. «Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196 degrees C.» *Hum Reprod.* 9, vol 4 (1994): 597-603.

Goud A, Goud P, Qian C, Van der Elst J, Van Maele G, Dhont M. «Cryopreservation of human germinal vesicle stage and in vitro matured M II oocytes: influence of cryopreservation media on the survival, fertilization, and early cleavage divisions.» *Fertil Steril* 74, vol 3 (2000): 487-94.

Green DM, Kawashima T, Stovall M, Leisenring W, Sklar CA, Mertens AC, Donaldson SS, Byrne J, Robison LL. «Fertility of female survivors of childhood cancer: a report from the childhood cancer survivor study.» *J Clin Oncol* 27, vol 16 (2009): 2677-85.

Green DM, Nolan VG, Goodman PJ, Whitton JA, Srivastava D, Leisenring WM, Neglia JP, Sklar CA, Kaste SC, Hudson MM, Diller LR, Stovall M, Donaldson SS, Robison LL. «The cyclophosphamide equivalent dose as an approach for quantifying alkylating agent exposure: a report from the Childhood Cancer Survivor Study.» *Pediatr Blood Cancer* 61, vol 1 (2014): 53-67.

Green DM, Sklar CA, Boice JB, Mulvihill JJ, Whitton JA, Stovall M, Yasui Y. «Ovarian failure and reproductive outcomes after childhood cancer treatment: results from the Childhood Cancer Survivor Study.» *J Clin Oncol* 27, vol 14 (2009): 2374-81.

Greve T, Clasen-Linde E, Andersen MT, Andersen MK, Sørensen SD, Rosendahl M, Ralfkiaer E, Andersen CY. «Cryopreserved ovarian cortex from patients with leukemia in complete remission contains no apparent viable malignant cells.» *Blood* 120, vol 22 (2012): 4311-16.

Greve T, Wielenga VT, Grauslund M, Sørensen N, Christiansen DB, Rosendahl M, Yding Andersen C. «Ovarian tissue cryopreserved for fertility preservation from patients with Ewing or other sarcomas appear to have no tumour cell contamination.» *Eur J Cancer* 49, vol 8 (2013): 1932-8.

Grundy R, Gosden RG, Hewitt M, Larcher V, Leiper A, Spoudeas HA, Walker D, Wallace WH. «Fertility preservation for children treated for cancer (1): scientific advances and research dilemmas.» *Arch Dis Child* 84, vol 4 (2001): 355-9.

Grundy R, Larcher V, Gosden RG, Hewitt M, Leiper A, Spoudeas HA, Walker D, Wallace WH. «Fertility preservation for children treated for cancer (2): ethics of consent for gamete storage and experimentation.» *Arch Dis Child*. 84, vol 4 (2001): 360-2.

Gurney J, Bondy M. «Epidemiología del cáncer en niños y adolescentes. Cáncer y tumores benignos.» En *Nelson. Tratado de Pediatría.*, de Kliegman R, Jenson H. Behrman R, 1679-1681. Madrid: Elsevier, 2004.

Hermann BP, Sukhwani M, Winkler F, Pascarella JN, Peters KA, Sheng Y, Valli H, Rodriguez M, Ezzelarab M, Dargo G, Peterson K, Masterson K, Ramsey C, Ward T, Lienesch M, Volk A, Cooper DK, Thomson AW, Kiss JE, Penedo MC, Schatten GP, Mitalipov S, Orwig KE. «Spermatogonial stem cell transplantation into rhesus testes regenerates spermatogenesis producing functional sperm.» *Cell Stem Cell* 11, vol 5 (2012): 715-726.

Herraiz S, Novella-Maestre E, Rodríguez B, Díaz C, Sánchez-Serrano M, Mirabet V, Pellicer A. «Improving ovarian tissue cryopreservation for oncologic patients: slow freezing versus vitrification, effect of different procedures and devices.» *Fertil Steril* 101, vol 3 (2014): 775-84.

Hewitt M, SWeiner S, Simone J,. Childhood Cancer Survivorship: Improving Care and Quality of Life. National Research Council, 2003.

Holm K, Laursen EM, Brocks V, Müller J. «Pubertal maturation of the internal genitalia: an ultrasound evaluation of 166 healthy girls.» *Ultrasound Obstet Gynecol* 6, vol 3 (1995): 175-81.

Hourvitz A, Yerushalmi GM, Maman E, Raanani H, Elizur S, Brengauz M, Orvieto R, Dor J, Meirow D. «Combination of ovarian tissue harvesting and immature oocyte collection for fertility preservation increases preservation yield.» *Reprod Biomed Online*. 31, vol 4 (2015): 497-505.

Hovatta. «Methods for cryopreservation of human ovarian tissue.» *Reprod Biomed Online* 10, vol 6 (2005): 729-34.

Hovatta O, Silye R, Krausz T, Abir R, Margara R, Trew G, Lass A, Winston RM. «Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol-sucrose as cryoprotectants.» *Hum Reprod*. 11, vol 6 (1996): 1268-72.

Hudson MM, Mertens AC, Yasui Y. «Health Status of adult long-term survivors of childhood cancer. A report from the Childhood Cancer Survivor Study.» *JAMA* 290, vol 12 (2003): 1583-92.

Hyman JH, Tulandi T. «Fertility preservation options after gonadotoxic chemotherapy.» *Clin Med Insights Reprod Health* 25, vol 7 (2013): 61-9.

Imbert R, Moffa F, Tsepelidis S, Simon P, Delbaere A, Devreker F, Dechene J, Ferster A, Veys I, Fastrez M, Englert Y, Demeestere I. «Safety and usefulness of cryopreservation of ovarian tissue to preserve fertility: a 12-year retrospective analysis.» *Hum Reprod* 29, vol 9 (2014): 1931-40.

Indiano JM, Muñoz A. «Efectos secundarios tardíos y segundas neoplasias.» En *Hematología y Oncología Pediátricas*, de Muñoz A Madero L, 731-46. Madrid: Ergon, 2005.

Isakoff MS, Bielack SS, Meltzer P, Gorlick R. «Osteosarcoma: Current Treatment and a Collaborative Pathway to Success.» *J Clin Oncol* 33, vol 27 (2015): 3029-35.

:: BIBLIOGRAFÍA

ISFP Practice Committee, Kim SS, Donnez J, Barri P, Pellicer A, Patrizio P, Rosenwaks Z, Nagy P, Falcone T, Andersen C, Hovatta O, Wallace H, Meirou D, Gook D, Kim SH, Tzeng CR, Suzuki S, Ishizuka B, Dolmans MM. «Recommendations for fertility preservation in patients with lymphoma, leukemia, and breast cancer.» *J Assist Reprod Genet* 29, vol 6 (2012): 465-8.

Jadoul P, Dolmans MM, Donnez J. «Fertility preservation in girls during childhood: is it feasible, efficient and safe and to whom should it be proposed?» *Hum Reprod Update*. 16, vol 6 (2010): 617-30.

Jadoul P, Kim SS, Committee ISFP Practice. «Fertility considerations in young women with hematological malignancies.» *J Assist Reprod Genet*. 29, vol 6 (2012): 479-87.

Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. «Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary.» *Nature* 428, vol 6979 (2004): 145-50.

Johnston RJ, Wallace WH. «Normal ovarian function and assessment of ovarian reserve in the survivor of childhood cancer.» *Pediatr Blood Cancer* 53, vol 2 (2009): 296-302.

«Evaluation, investigations, and management of late effects of childhood cancer.» En *Manual of Pediatric Hematology and Oncology*, de Philip Lanzkowsky, 749-774. Oxford: Elsevier, 2005.

Larsen EC, Müller J, Schmiegelow K, Rechnitzer C, Andersen AN. «Reduced ovarian function in long-term survivors of radiation- and chemotherapy-treated childhood cancer.» *J Clin Endocrinol Metab* 88, vol 11 (2003): 5307-14.

Larsen EC, Schmiegelow K, Rechnitzer C, Loft A, Müller J, Andersen AN. «Radiotherapy at a young age reduces uterine volume of childhood cancer survivors.» *Acta Obstet Gynecol Scand* 83, vol 1 (2004): 96-102.

Lass. «The fertility potential of women with a single ovary.» *Hum Reprod Update*. 5, vol 5 (1999): 546-50.

Leahey AM, Teunissen H, Friedman DL, Moshang T, Lange BJ, Meadows AT. «Late effects of chemotherapy compared to bone marrow transplantation in the treatment of pediatric acute myeloid leukemia and myelodysplasia.» *Med Pediatr Oncol*. 32, vol 3 (1999): 163-9.

Lee SJ, Schover LR, Partridge AH, Patrizio P, Wallace WH, Hagerty K, Beck LN, Brennan LV, Oktay K. «American Society of Clinical Oncology

Recommendations on Fertility Preservation in Cancer Patients.» *J Clin Oncol*, 2006: 2917-2931.

Leung W, Hudson MM, Strickland DK, Phipps S, Srivastava DK, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Sandlund JT, Kun LE, Bowman LC, Razzouk BI, Mathew P, Shearer P, Evans WE, Pui CH. «Late effects of treatment in survivors of childhood acute myeloid leukemia.» *J Clin Oncol* 18, vol 18 (2000): 3279-79.

Linnet MS, Wacholder S, Zahm SH. «Interpreting epidemiologic research: lessons from studies of childhood cancer.» *Pediatrics* 112 (2003): 218-32.

Longhi A, Porcu E, Petracchi S, Versari M, Conticini L, Bacci G. «Reproductive functions in female patients treated with adjuvant and neoadjuvant chemotherapy for localized osteosarcoma of the extremity.» *Cancer* 89, vol 9 (2000): 1961-5.

Loren AW, Mangu PB, Beck LN, Brennan L, Magdalinski AJ, Partridge AH, Quinn G, Wallace WH, Oktay K. «Fertility preservation for patients with cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update.» *J Clin Oncol*, 2013: 2500-10.

Low JJ, Perrin LC, Crandon AJ, Hacker NF. «Conservative surgery to preserve ovarian function in patients with malignant ovarian germ cell tumors. A review of 74 cases.» *Cancer* 89, vol 2 (2000): 391-8.

Madanat LM, Malila N, Dyba T, Hakulinen T, Sankila R, Boice JD Jr, Lähteenmäki PM. «Probability of parenthood after early onset cancer: a population-based study.» *Int J Cancer* 123, vol 12 (2008): 2891-8.

Martin JR, Kodaman P, Oktay K, Taylor HS. «Ovarian cryopreservation with transposition of a contralateral ovary: a combined approach for fertility preservation in women receiving pelvic radiation.» *Fertil Steril* 87, vol 1 (2007): 189.e5-7.

Martul. «Hipogonadismo: diagnóstico y tratamiento.» *An Esp Pediatr* 52, vol Supl 1 (2000): 59-62.

Meirow D, Baum M, Yaron R, Levron J, Hardan I, Schiff E, et al. «Ovarian tissue cryopreservation in hematologic malignancy: ten years' experience.» *Leuk Lymphoma* 48, vol 8 (2007): 1569-76.

Meirow D, Biederman H, Anderson RA, Wallace WH. «Toxicity of chemotherapy and radiation on female reproduction.» *Clin Obstet Gynecol* 53, vol 4 (2010): 727-39.

Meirow D, Dor J, Kaufman B, Shrim A, Rabinovici J, Schiff E, Raanani H, Levron J, Fridman E. «Cortical fibrosis and blood-vessels damage in human ovaries exposed to chemotherapy. Potential mechanisms of ovarian injury.» *Hum Reprod.* 22, vol 6 (2007): 1626-33.

Meirow D, Hardan I, Dor J, Fridman E, Elizur S, Ra'anani H, Slyusarevsky E, Amariglio N, Schiff E, Rechavi G, Nagler A, Ben Yehuda D. «Searching for evidence of disease and malignant cell contamination in ovarian tissue stored from hematologic cancer patients.» *Hum Reprod.* 23, vol 5 (2008): 1007-13.

Meirow D, Lewis H, Nugent D, Epstein M. «Subclinical depletion of primordial follicular reserve in mice treated with cyclophosphamide: clinical importance and proposed accurate investigative tool.» *Hum Reprod* 14, vol 7 (1999): 1903-7.

Meirow D, Nugent D,. «The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction.» *Hum Reprod Update.* 7, vol 6 (2001): 535-43.

Meirow. «Reproduction post-chemotherapy in young cancer patients.» *Mol Cell Endocrinol.* 169, vol 1-2 (2000): 123-31.

Meistrich ML, Shetty G. «Hormonal suppression for fertility preservation in males and females.» *Reproduction* 136, vol 6 (2008): 691-701.

Mertens AC, Yasui Y, Neglia JP, Potter JD, Nesbit ME Jr, Ruccione K, Smithson WA, Robison LL. «Health Status of adult long-term survivors of childhood cancer. A report from the Childhood Cancer Survivor Study.» *J Clin Oncol* 19, vol 13 (2001): 163-72.

Molgaard-Hansen L, Skou AS, Juul A, Glosli H, Jahnukainen K, Jarfelt M, Jónmundsson GK, Malmros J, Nysom K, Hasle H, Nordic Society of Pediatric Hematology and Oncology. «Pubertal development and fertility in survivors of childhood acute myeloid leukemia treated with chemotherapy only: a NOPHO-AML study.» *Pediatr Blood Cancer* 60, vol 12 (2013): 1988-95.

Moore HC, Unger JM, Phillips KA, Boyle F, Hitre E, Porter D, et al. «Goserelin for 193 ovarian protection during breast-cancer adjuvant chemotherapy.» *N Engl J Med* 372 (2015): 923-32.

Moyano D, Valls C, Pavía C, Ramón F. « Valores de referencia de diversas magnitudes hormonales en niños clasificados según estadios puberales.» *Quím Clin* 15 (1996): 72-76.

Nielsen SN, Andersen AN, Schmidt KT, Rechnitzer C, Schmiegelow K, Bentzen JG, Larsen EC. «A 10-year follow up of reproductive function in women treated for childhood cancer.» *Reprod Biomed Online.* 27, vol 2 (2013): 192-200.

Novella-Maestre E, Herraiz S, Rodríguez-Iglesias B, Díaz-García C, Pellicer A. «Short-Term PTEN Inhibition Improves In Vitro Activation of Primordial Follicles, Preserves Follicular Viability, and Restores AMH Levels in Cryopreserved Ovarian Tissue From Cancer Patients.» *Fertil Steril*, 2015: S0015-0282(15)01763-X.

Oktaý K, Bedoschi G. «Oocyte cryopreservation for fertility preservation in postpubertal female children at risk for premature ovarian failure due to accelerated follicle loss in Turner syndrome or cancer treatments.» *J Pediatr Adolesc Gynecol* 27, vol 6 (2014): 342-6.

Oktaý K, Kan MT, Rosenwaks Z. «Recent progress in oocyte and ovarian tissue cryopreservation and transplantation.» *Curr Opin Obstet Gynecol* 13, vol 3 (2001): 263-8.

Oktaý K, Nugent D, Newton H, Salha O, Chatterjee P, Gosden RG. «Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue.» *Fertil Steril* 67, vol 3 (1997): 481-6.

Oktaý K, Rodriguez-Wallberg K, Munster P. «Ovarian protection during adjuvant chemotherapy.» *N Engl J Med* 372 (2015): 2268-9.

Oktem O, Oktaý K. «A novel ovarian xenografting model to characterize the impact of chemotherapy agents on human primordial follicle reserve.» *Cancer Res* 67, vol 21 (2007): 10159-62.

Palmert MR, Alexander SW, Goorin AM. «Ovarian toxicity after chemotherapy: possible association with ifosfamide administration.» *Pediatr Blood Cancer* 42, vol 3 (2004): 216-9.

Panasiuk A, Nussey S, Veys P, Amrolia P, Rao K, Krawczuk-Rybak M, Leiper A. «Gonadal function and fertility after stem cell transplantation in childhood: comparison of a reduced intensity conditioning regimen containing melphalan with a myeloablative regimen containing busulfan.» *Br J Haematol* 170, vol 5 (2015): 719-26.

Patrizio P, Butts S, Caplan A. «Ovarian tissue preservation and future fertility: emerging technologies and ethical considerations.» *J Natl Cancer Inst Monogr* 34 (2005): 107-10.

Peris Bonet R, Felipe garcia S, Valero Poveda S, Pardo Romaguera E. *Cáncer infantil en España. Estadísticas 1980-2014. Registro Español de Tumores Infantiles (RETI-SEHOP)*. Editado por Universitat de Valencia. Valencia, 2015.

:: BIBLIOGRAFÍA

Peris R, Giner B. «Epidemiología del cáncer en la infancia.» En *Hematología y Oncología Pediátricas*, de Muñoz A Madero L, 225-38. Madrid: Ergon, 2005.

Pizzo PA, Poplack DG. «Acute Lymphoblastic Leukemia.» En *Principles and Practice of Pediatric Oncology*, de Robin K.R, Steuber CP, Poplack DG. Margolin JF, 518-67. Philadelphia: Lippincott-Williams and Wilkins, 2011.

Pizzo PA, Poplack DG. «Principles of Radiation Oncology.» En *Principles and Practice of Pediatric Oncology*, de Yock T, Kooy H Tarbell N, 421-432. Philadelphia: Lippincott-Williams and Wilkins, 2006.

Poirot C, Abirached F, Prades M, Coussieu C, Bernaudin F, Piver P. «Induction of puberty by autograft of cryopreserved ovarian tissue.» *Lancet* 379, vol 9815 (2012): 588.

Poirot CJ, Martelli H, Genestie C, Golmard JL, Valteau-Couanet D, Helardot P, Pacquement H, Sauvat F, Tabone MD, Philippe-Chomette P, Esperou H, Baruchel A, Brugieres L. «Feasibility of ovarian tissue cryopreservation for prepubertal females with cancer.» *Pediatr Blood Cancer* 49, vol 1 (2007): 74-8.

Postovsky S, Lightman A, Aminpour D, Elhasid R, Peretz M, Arush MW. «Sperm cryopreservation in adolescents with newly diagnosed cancer.» *Med Pediatr Oncol* 40, vol 6 (2003): 355-9.

Raciborska A, Biliska K, Filipp E, Drabko K, Rogowska E, Chaber R, Pogorzała M, Połczyńska K, Adrianowska N, Rodriguez-Galindo C, Maciejewski T. «Ovarian function in female survivors after multimodal Ewing sarcoma therapy.» *Pediatr Blood Cancer* 15 (2014): [Epub ahead of print].

Reddy P, Liu L, Adhikari D, Jagarlamudi K, Rajareddy S, Shen Y, Du C, Tang W, Hämmäläinen T, Peng SL, Lan ZJ, Cooney AJ, Huhtaniemi I, Liu K. «Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool.» *Science* 319, vol 5863 (2008): 611-3.

Reulen RC, Zeegers MP, Wallace WH, Frobisher C, Taylor AJ, Lancashire ER, Winter DL, Hawkins MM. «Pregnancy outcomes among adult survivors of childhood cancer in the British Childhood Cancer Survivor Study.» *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18, vol 8 (2009): 2239-47.

Revel A, Revel-Vilk S, Aizenman E, Porat-Katz A, Safran A, Ben-Meir A, Weintraub M, Shapira M, Achache H, Laufer N. «At what age can human oocytes be obtained?» *Fertil Steril*. 92, vol 2 (2009): 458-63.

Robertson. «Cancer and fertility: ethical and legal challenges.» *J Natl Cancer Inst Monogr* 34 (2005): 104-106.

Rodriguez-Wallberg KA, Oktay K. «Fertility preservation during cancer treatment: clinical guidelines.» *Rodriguez-Wallberg KA, Oktay K* 4, vol 6 (2014): 105-17.

Rosendahl M, Andersen MT, Ralfkiaer E, Kjeldsen L, Andersen MK, Andersen CY. «Evidence of residual disease in cryopreserved ovarian cortex from female patients with leukemia.» *Fertil Steril*. 94, vol 6 (2010): 2186-90.

Rosendahl M, Greve T, Andersen CY. «The safety of transplanting cryopreserved ovarian tissue in cancer patients: a review of the literature.» *J Assist Reprod Genet*. 30, vol 1 (2013): 11-24.

Söderström-Anttila V, Mäkinen S, Tuuri T, Suikkari AM. «Favourable pregnancy results with insemination of in vitro matured oocytes from unstimulated patients.» *Hum Reprod* 20, vol 6 (2005): 1534-40.

Sánchez M, Alamá P, Gadea B, Soares SR, Simón C, Pellicer A. «Fresh human orthotopic ovarian cortex transplantation: long-term results.» *Hum Reprod*. 22, vol 3 (2007): 786-91.

Sánchez M, Novella-Maestre E, Teruel J, Ortiz E, Pellicer A. «The Valencia Programme for Fertility Preservation.» *Clin Transl Oncol*. 10, vol 7 (2008): 433-8.

Sanchís G, Andrés M, Gregoraci AF, Cortés J, Marco A, Rubio JM, Novella E, Castel V, García-Sala C. «Ovarian cryopreservation in girls with cancer: new challenges.» *Cir Pediatr* 24, vol 4 (2011): 196-200.

Sanders JE, Buckner CD, Amos D, Levy W, Appelbaum FR, Doney K, Storb R, Sullivan KM, Witherspoon RP, Thomas ED. «Ovarian function following marrow transplantation for aplastic anemia or leukemia.» *J Clin Oncol* 6, vol 5 (1988): 813-8.

Scheffer GJ, Broekmans FJ, Looman CW, Blankenstein M, Fauser BC, teJong FH, teVelde ER. «The number of antral follicles in normal women with proven fertility is the best reflection of reproductive age.» *Hum Reprod* 18, vol 4 (2003): 600-7.

Schmidt KT, Andersen CY, ISFP Practice Committee. «Recommendations for fertility preservation in patients with lymphomas.» *J Assist Reprod Genet*. 29, vol 6 (2012): 473-7.

Schmidt KT, Nyboe Andersen A, Greve T, Ernst E, Loft A, Yding Andersen C. «Fertility in cancer patients after cryopreservation of one ovary.» *Reprod Biomed Online* 26, vol 3 (2013): 272-279.

Schover LR, Brey K, Lichtin A, Lipshultz LI, Jeha S. «Oncologists' attitudes and practices regarding banking sperm before cancer treatment.» *J Clin Oncol*. 20, vol 7 (2002): 1890-7.

Sehested A, Juul AA, Andersson AM, Petersen JH, Jensen TK, Müller J, Skakkebaek NE. «Serum inhibin A and inhibin B in healthy prepubertal, pubertal, and adolescent girls and adult women: relation to age, stage of puberty, menstrual cycle, follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, and estradiol levels.» *J Clin Endocrinol Metab* 85, vol 4 (2000): 1634-40.

Sehested A, Juul AA, Andersson AM, Petersen JH, Jensen TK, Müller J, Skakkebaek NE. «Serum inhibin A and inhibin B in healthy prepubertal, pubertal, and adolescent girls and adult women: relation to age, stage of puberty, menstrual cycle, follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, and estradiol levels.» *J Clin Endocrinol Metab* 85, vol 4 (2000): 1634-40.

Shapira M, Raanani H, Cohen Y, Meirou D. «Fertility preservation in young females with hematological malignancies.» *Acta Haematol*. 132, vol 3-4 (2014): 400-13.

Singhal S, Powles R, Treleaven J, Horton C, Swansbury GJ, Mehta J. «Melphalan alone prior to allogeneic bone marrow transplantation from HLA-identical sibling donors for hematologic malignancies: alloengraftment with potential preservation of fertility in women.» *Bone Marrow Transplant* 18, vol 6 (1996): 1049-55.

Sklar CA, Mertens AC, Mitby P, Whitton J, Stovall M, Kasper C, Mulder J, Green D, Nicholson HS, Yasui Y, Robison LL. «Premature menopause in survivors of childhood cancer: a report from the childhood cancer survivor study.» *J Natl Cancer Inst* 98, vol 13 (2006): 890-6.

Spector LG, Pankratz N, Marcotte EL. «Genetic and nongenetic risk factors for childhood cancer.» *Pediatr Clin North Am*. 62, vol 1 (2015): 11-25.

Stillman RJ, Schinfeld JS, Schiff I, Gelber RD, Greenberger J, Larson M, Jaffe N, Li FP. «Ovarian failure in long-term survivors of childhood malignancy.» *Am J Obstet Gynecol*. 139, vol 1 (1981): 62-6.

Tanner JM, Whitehouse RH. «Clinical longitudinal standards for height, weight, height velocity, weight velocity, and stages of puberty.» *Arch Dis Child* 51 (1976): 170-9.

Telfer EE, Zelinski MB. «Ovarian follicle culture: advances and challenges for human and nonhuman primat.» *Fertil Steril* 99, vol 6 (2013): 1523-33.

Telfer EE1, McLaughlin M, Ding C, Thong KJ. «A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin.» *Hum Reprod.* 23, vol 5 (2008): 1151-8.

Temboury. «Desarrollo puberal normal. Pubertad precoz.» *Rev Pediatr Aten Primaria* 11, vol 16 (2009): 127-42.

Terenziani M, Piva L, Meazza C, Gandola L, Cefalo G, Merola M. «Oophoropexy: a relevant role in preservation of ovarian function after pelvic irradiation.» *Fertil Steril.* 91, vol 3 (2009): 935.e15-6.

Thomas-Teinturier C, Allodji RS, Svetlova E, Frey MA, Oberlin O, Millischer AE, Epelboin S, Decanter C, Pacquement H, Tabone MD, Sudour-Bonnange H, Baruchel A, Lahlou N, De Vathaire F. «Ovarian reserve after treatment with alkylating agents during childhood.» *Hum Reprod* 30, vol 6 (2015): 1437-46.

Tilly, J L. «Pharmacological protection of female fertility.» En *Preservation of fertility*, de Taylos and Francis. London: Tulandi T, Godesn R, 2004.

Tonorezos ES, Hudson MM, Edgar AB, Kremer LC, Sklar CA, Wallace WH, Oeffinger KC,. «Screening and management of adverse endocrine outcomes in adult survivors of childhood and adolescent cancer.» *Lancet Diabetes Endocrinol* 3, vol 7 (2015): 545-55.

Tournaye H, Goossens E, Verheyen G, Frederickx V, De Block G, Devroey P, Van Steirteghem A. «Preserving the reproductive potential of men and boys with cancer: current concepts and future prospects.» *Hum Reprod Update* 10, vol 6 (2004): 525-32.

Vargas F, Fuentes MA, Lorenzo L, Marco MV, Martínez-Aedo MJ, Ruiz R. *Pubertad precoz. Protoc diagn ter pediatr.* Vol. 1, de *Protocolos Endocrinología*, de Chueca M, Gomez AL, Quinteiro S, García B. Lechuga A Lopez JP, 193-204. Exlibris, 2011.

Vatanen A, Wilhelmsson M, Borgström B, Gustafsson B, Taskinen M, Saarinen-Pihkala UM, Winiarski J, Jahnukainen K. «Ovarian function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in childhood and adolescence.» *Eur J Endocrinol* 170, vol 2 (2013): 211-8.

von Wolff M, Donnez J, Hovatta O, Keros V, Maltaris T, Montag M, Salle B, Sonmezer M, Andersen CY. «Cryopreservation and autotransplantation of human ovarian tissue prior to cytotoxic therapy--a technique in its infancy but already successful in fertility preservation.» *Eur J Cancer* 45, vol 9 (2009): 1547-53.

Wallace WH, Anderson RA, Irvine DS. «Fertility preservation for young patients with cancer: who is at risk and what can be offered?» *Lancet oncol* 6 (2005): 209 - 218.

Wallace WH, Kelsey TW. «Human ovarian reserve from conception to the menopause.» *PLoS One* 5, vol 1 (2010): e8772.

Wallace WH, Shalet SM, Crowne EC, Morris-Jones PH, Gattamaneni HR, Price DA. «Gonadal dysfunction due to cis-platinum.» *Med Pediatr Oncol* 17, vol 5 (1989): 409-13.

Wallace WH, Thomson AB, Kelsey TW. «The radiosensitivity of the human oocyte.» *Hum Reprod* 18, vol 1 (2003): 117-21.

Wallace WH, Thomson AB, Saran F, Kelsey TW. «Predicting age of ovarian failure after radiation to a field that includes the ovaries.» *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 62, vol 3 (2005): 738-44.

Wallace WHB, Smith A, Kelsey, T Edgar A, Anderson R. «Fertility preservation for girls and young women with cancer: population-based validation of criteria for ovarian tissue cryopreservation.» *Lancet Oncol* 15 (2014): 1129-36.

Wallace, Professor William Hamish B. «Oncofertility: State of the art for young people with cancer.» *CONFERENCE PAPER*. Bruselas, 2015.

Wikström AM, Hovi L, Dunkel L, Saarinen-Pihkala UM. «Restoration of ovarian function after chemotherapy for osteosarcoma.» *Arch Dis Child* 88, vol 5 (2003): 428-31.

Williams D, Crofton PM, Levitt G. «Does ifosfamide affect gonadal function?» *Pediatr Blood Cancer* 50, vol 2 (2008): 347-51.

Wyns C, Curaba M, Vanabelle B, Van Langendonck A, Donnez J. «Options for fertility preservation in prepubertal boys.» *Hum Reprod Update*. 16, vol 3 (2010): 312-28.

Wyns C, Van Langendonck A, Wese FX, Donnez J, Curaba M. «Long-term spermatogonial survival in cryopreserved and xenografted immature human testicular tissue.» *Hum Reprod* 23, vol 11 (2008): 2402-14.

Yoo SC, Kim WY, Yoon JH, Chang SJ, Chang KH, Ryu HS. «Young girls with malignant ovarian germ cell tumors can undergo normal menarche and menstruation after fertility-preserving surgery and adjuvant chemotherapy.» *Acta Obstet Gynecol Scand*. 89, vol 1 (2010): 126-30.