
Preservación de la fertilidad

Dr. Eduardo P. Lombardi, Dra. Laura V. Sícara

Introducción

Dentro del gran capítulo de la preservación de la fertilidad debemos comenzar por nombrar algunas de las medidas generales que todo médico debe apropiarse:

- Educación, controles ginecológicos periódicos
- Indicación de método anticonceptivo apropiado
 - Prevención de aborto provocado
- Hábitos higiénico-dietéticos
 - Evitar tabaquismo
- Popularización de la consulta preconcepcional
 - Combatir sobrepeso-obesidad-malnutrición
 - Manejo de diabetes como preparación para prevenir complicaciones durante el embarazo
 - Manejo de hipertensión previa al embarazo
 - Estudio exhaustivo de pacientes con diagnóstico de aborto recurrente
- Manejo apropiado de cuadros infecciosos
 - Papanicolaou inflamatorio

- Flujo vaginal sin tratamiento. Identificación de germen etiológico
- Enfermedad inflamatoria pélvica sin diagnóstico y tratamiento oportuno
- Tratamiento quirúrgico conservador
 - Tratamiento escisional mínimo
 - Preservación de la relación tubo-ovárica
- Diagnóstico precoz de embarazo ectópico, antes de complicaciones
- Manejo metabólico. No desestimar el rol de endocrinopatías
- Seguimiento por profesional competente, especializado.

Por otra parte, debemos considerar aquellas circunstancias en las que las técnicas de fertilización asistida juegan un rol fundamental en la preservación de la fertilidad. Describimos en este sentido dos grandes grupos de pacientes. Aquellas que consultan por diferimiento de la maternidad, y por otra parte, pacientes previo a enfrentar un tratamiento oncológico.

Maternidad diferida

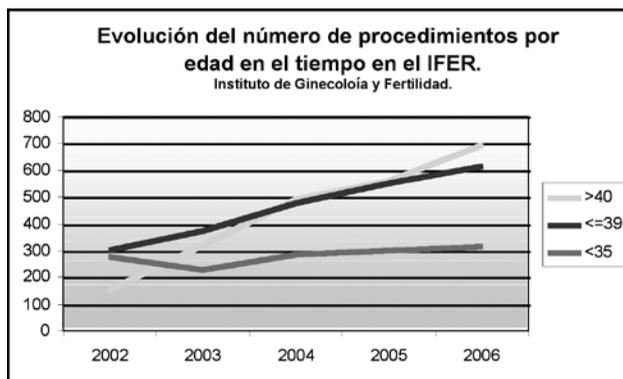
En los últimos años estamos presenciando un fenómeno demográfico secundario a una expectativa económica distinta en las personas, con la necesidad, en muchos casos, de doble ingreso en núcleo familiar, mayor expectativa de vida, el deseo de desarrollo personal, la competitividad laboral. Esto lleva, en los países desarrollados, a la postergación del matrimonio y de la maternidad, con un franco aumento de la edad de la mujer al momento de concebir su primer hijo, y a un aumento sin precedentes del número de parejas que desean embarazo en etapas relativamente tardías de la vida.

Este hecho, combinado con un descenso en la fertilidad y el aumento de las tasas de aborto con el aumento de la edad, representan un nuevo desafío para los tratamientos clínicos de la infertilidad.

A continuación graficamos la evolución del número de consultas a partir de la comparación del número de procedimientos de fertilización in vitro realizados en tres grupos de pacientes por edad. Se marca claramente la diferencia de pendiente entre los tres grupos, siendo el grupo de pacientes de más de 40 años el de mayor crecimiento en el tiempo.

Hasta el momento, las técnicas de fertilización de alta complejidad aportan una muy baja tasa de embarazo en pacientes que superan los 40 años de edad con la utilización de ovocitos autólogos, dando lugar a la indicación de la ovodonación.

Con miras en la prevención de esta situación, el avance de las técnicas de fertilización y criopreservación



nos permiten plantear una alternativa distinta para este grupo de paciente. Se trata de la preservación de gametas en edad reproductiva, transfiriendo el potencial biológico de esos ovocitos a otra etapa de la vida de la mujer.

En nuestra experiencia, el grupo de pacientes comprendida entre los 40 y 50 años, alcanza una tasa de embarazo de entre el 15 y 27% con los tratamientos de fertilidad de alta complejidad. Esto podría verse favorecido por la incorporación de protocolos de preservación de la fertilidad, anticipando la disponibilidad de ovocitos criopreservados a edades más tempranas de la vida y, por ende, con mejor expectativa biológica.

Preservación de la fertilidad en pacientes oncológicos.

Generalidades

La incidencia de cáncer en la infancia es de aproximadamente 1 a 2,5 por cada 1000 niños nacidos¹.

Con los avances en el campo de la oncología, es lógico pensar que en los próximos años la población de adultos sobrevivientes a un cáncer tratado durante la infancia, va a ser muy importante. Diversos autores se valen de las herramientas estadísticas para confirmar estos hechos. Se ha establecido que para el año 2010, 1 de cada 250 adultos serán sobrevivientes de un cáncer diagnosticado y tratado durante su infancia¹⁻².

El aumento de la sobrevida luego de un tratamiento oncológico en pacientes en edad reproductiva, convierte a la fertilidad posterior en una inquietud pausable de ser respondida antes de iniciar el tratamiento gonadotóxico.

Los padres que se enfrentan al diagnóstico de cáncer en su hijo, tienen que lidiar con una cantidad de información poco tolerable, con la necesidad de tomar decisiones dentro de las que la inquietud de supervivencia, las consecuencias físicas y morbi-mortalidad del tratamiento o inherentes a la patología, desplazan el cuestionamiento de la preservación de la fertilidad a un muy frecuentemente olvidado, segundo plano³.

El diagnóstico de cáncer se traduce en una crisis en la vida de cualquier persona. Su impacto varía con el tipo

de cáncer, la expectativa terapéutica y los recursos sociales, físicos y emocionales con los que cuenta el paciente.

En la actualidad se ha logrado una mirada crítica hacia la preservación de la fertilidad, mediante no sólo la tendencia a tratamientos menos agresivos, sino también a la adquisición e investigación en las técnicas de tratamiento de la fertilidad.

Una de las más importantes repercusiones del cáncer, la vamos a observar en el campo de la fertilidad. Aunque se tiende a buscar terapéuticas menos agresivas, más conservadoras, para el tratamiento de las enfermedades en este grupo de pacientes, la fertilidad se ve gravemente comprometida en los sobrevivientes de quimo y radioterapia.

En el mismo momento en el que el paciente o sus padres, en caso de menores, reciben el diagnóstico de cáncer, deberían además, recibir información sobre su repercusión en fertilidad y posibles tratamientos pertinentes³.

El médico receptor del paciente oncológico posee un rol fundamental en este proceso, donde la oportunidad, la celeridad y la información son los ejes fundamentales. Los profesionales deben: ⁴

- Ser los encargados del planteo y desarrollo de estrategias para la preservación de la fertilidad, en forma oportuna
- Asistir a los sobrevivientes del cáncer
- No limitar la oportunidad de criopreservación por consideración de condiciones postratamiento oncológico y mortalidad

Información completa para los pacientes

- Contemplar técnicas en estudio
- Correcta dimensión de la posibilidad de embarazo
- Realizar un actualización constante
- Mantener una postura ética apropiada
- Instrucción sobre disponibilidad de gametas, embriones o tejido criopreservados
- Caso de muerte, incapacidad, etc.

En numerosas oportunidades la posibilidad de preservación de la fertilidad, no se incluye en la discusión sobre el tratamiento del cáncer.

Los oncólogos deben elegir el tratamiento teniendo en cuenta su riesgo en fertilidad sin poner en peligro la calidad de vida del paciente, su pronóstico de supervivencia, posibles riesgos por retraso del tratamiento, el impacto de futuros embarazos en el desarrollo de una recurrencia, o del uso de tratamiento hormonal necesario para algunas técnicas de preservación de la fertilidad.

Si la utilización de agentes gonadotóxicos es inevitable, el médico debe conocer las alternativas para la preservación de la fertilidad y derivarlo a un especialista⁴⁻¹³.

Durante el tratamiento con radio y quimioterapia, tanto hombres como mujeres, y especialmente los pacientes pediátricos, se encuentran expuestos a principios activos que reconocen y destruyen células con alto índice de división celular, característica que comparten todos los cánceres, como las células germinales. En el caso de la quimioterapia, son los agentes alquilantes los más agresivos del grupo. Entre ellos los siguientes son los más importantes: ^{9,11,13}

- Ciclofosfamida
- Ifosfamida
- Nitrosoureas
- Clorambucil
- Busulfan
- Procarbace

Agentes citotóxicos según riesgo de gonadotoxicidad	
Alto Riesgo	
	Ciclofosfamida
	Clorambucil
	Busulfan
	Procarbace
Riesgo Intermedio	
	Cisplatino
	Adriamicina
Bajo o Sin Riesgo	
	Metrotrexate
	5-Fluorouracilo
	Vincristina
	Bleomicina
	Adriamicina D

Tabla 1

Fuente: Meirou D, Nugent D. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. Hum Reprod Update 2001;7:535-43

El efecto de la quimioterapia y radioterapia depende de: ¹⁰

- la droga utilizada,
- tamaño y localización del campo de la radiación,
- dosis e intensidad/dosis,
- método de administración (oral versus intravenoso),
- enfermedad,
- edad,
- sexo.

No solamente los cánceres poseen indicación de tratamientos gonadotóxicos, algunas enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoidea o el lupus eritematoso sistémico, poseen estas indicaciones.

Dentro de las estrategias descritas para el hombre se encuentran: ^{1,2,11}

- Protección gonadal hormonal
- Escudo gonadal durante radioterapia
- Criopreservación de semen
 - Obtenida por masturbación
 - Obtenida por aspiración testicular en menores
- Criopreservación de tejido testicular
- Criopreservación de espermatogonias
- Stem cells

En el caso de la mujer contamos con las siguientes estrategias: ^{1,2,5,14-17}

- Transposición del ovario (ooforopexia)
- Supresión ovárica
- Criopreservación de ovocitos
- Criopreservación de tejido ovárico
- Criopreservación de embriones.

Éstas y otras tantas medidas para la preservación de la fertilidad se encuentran en constante desarrollo, abriendo una expectativa concreta en la preservación de la fertilidad.

El paciente oncológico masculino

En el hombre, la infertilidad puede ser resultado de las comorbilidades de la patología en sí misma, como en el cáncer de testículo; por problemas anatómicos como la eyacuación retrógrada o aneyacuación; por insuficiencia hormonal primaria o secundaria, o más comúnmente por depleción de células germinales. La radio o quimioterapia comprometen el número, la motilidad, la morfología y la integridad del ADN de los espermatozoides ^{1,2,11}.

Gracias a los avances en las técnicas de criopreservación y recuperación espermática, aun aquellos pacientes con una cuantificación y motilidad espermáticas muy comprometidas, debe plantearse la criopreservación de semen.

En forma ideal, se debe recolectar una serie de muestras previo a la iniciación del tratamiento oncológico.

Existen otras técnicas que conservan hasta el momento carácter de experimentales y sólo pueden comprenderse dentro de protocolos controlados de investigación. Entre ellos contamos la criopreservación de tejido testicular, la preservación de espermatogonias, el xenotransplante de tejido testicular.

El testículo es altamente sensible a la radioterapia y quimioterapia en todas las etapas de la vida. Produce daño prolongado o permanente de las stem cells primordiales. Se traduce en casos variados de oligo y azoospermia ¹¹.

Para niños prepúberes con diagnóstico de cáncer no contamos con una estrategia definida para la preservación de la potencialidad reproductiva, en contraste con los adolescentes y adultos, para quienes la criopreservación de semen antes del inicio del tratamiento es una verdadera opción.

En pediatría, la limitación de la preservación de la fertilidad esta dada por la capacidad del paciente de obtener una muestra por eyaculado. Es tema de debate la utilidad de la biopsia de testículo por no conocerse su seguridad y encontrarse en período experimental.

Sin embargo, investigaciones en modelos animales (ratón, rata, bovino y primate) indican la posibilidad de aislar células precursoras de espermatogonias, cultivarlas in vitro, y luego utilizarlas en transplante autólogo para restituir la espermatogénesis, luego de finalizado el tratamiento oncológico ¹⁸⁻¹⁹.

En los túbulos testiculares inmaduros, el epitelio seminífero contiene solamente células de Sertoli y diferentes tipos de espermatogonias, entre las que se encuentran las stem cells ²⁴⁻²⁹. Dada la ausencia de gametas maduras, la criopreservación de tejido inmaduro, constituye la única forma de preservación de la fertilidad en niños ¹⁸⁻²⁰.

El caso del xenotransplante se plantea en pacientes con cáncer de testículo, en los que la preservación del tejido implicaría una alta posibilidad de recuperación de tejido cancerígeno y, por lo tanto, re implantación tumoral al momento de intentar restituir el tejido luego de finalizado el tratamiento oncológico. Se ha observado en ratas con xenotransplante de pacientes con linfomas y cáncer de testículo, el desarrollo de la enfermedad luego del transplante ²⁰⁻²⁴.

El complemento para el resultado definitivo en el caso del hombre, es la técnica de ICSI, mediante la inyección ovocitaria permite la utilización de muestras con muy pobre recuperación, inmóviles, logrando una alta tasa de fertilización.

El paciente oncológico femenino

Para la mujer, la edad es el factor aislado más importante dentro de los que determinan el impacto del tratamiento del cáncer en la función ovárica ¹⁴⁻¹⁶.

La fertilidad femenina se ve francamente afectada con los tratamientos que disminuyen el número de folículos primordiales, alteran el eje hormonal o interfieren en la función de ovarios, trompas de Falopio, útero o cuello del útero.

Estudios *in vitro* sobre el efecto de los agentes citotóxicos, muestran un efecto inmediato en la reserva ovárica, mediante su acción sobre los folículos primordiales, aunque su actividad celular no sea alta, y produciendo injuria microvascular en el ovario y fibrosis cortical⁵.

Se debe estudiar cada caso en forma exhaustiva para encontrar cuál es la estrategia de prevención de la fertilidad apropiada para cada paciente. Teniendo en cuenta el tipo de enfermedad, el tipo y duración del tratamiento, el momento de inicio del mismo, como dijéramos anteriormente, la edad de la paciente, y si la paciente posee una pareja.

Las alternativas contemplan la posibilidad de criopreservar embriones, ovocitos o tejido ovárico; la transposición del ovario y la supresión hormonal.

De éstas, la única alternativa francamente aceptada en la comunidad científica, con una alta e indiscutible tasa de embarazo, es la criopreservación de embriones. Pero para esta instancia debemos contar con una pareja, ausente en la totalidad de casos pediátricos y numerosos adultos; y, por otra parte, requiere un tiempo determinado para su realización, con el que muchas veces no se cuenta antes de iniciar el tratamiento oncológico.

Hasta principios del año pasado la The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine² consideraba la criopreservación de ovocitos como una alternativa experimental, que sólo se podía practicar dentro del marco de un protocolo de investigación. Con el advenimiento de la criopreservación con método rápido o vitrificación, este concepto se ha puesto en revisión. A medida que los centros de fertilidad incorporan experiencia en este campo, la técnica de vitrificación de ovocitos toma fuerza³⁰⁻³³.

La posibilidad de embarazo depende directamente del número de ovocitos obtenidos, entendiéndose que por debajo de un número de 10 óvulos, la tasa de embarazo desciende drásticamente³³.

Cuando el tiempo disponible antes de iniciar el tratamiento oncológico no permite realizar un estímulo clásico, se propone la criopreservación de ovocitos inmaduros con la posterior maduración *in vitro*, o la criopreservación de ovocitos madurados *in vitro*; aunque éstas sean técnicas experimentales³⁴.

El principio de criopreservar ovocitos inmaduros se basa en que impediría la despolimerización del huso mitótico al actuar en el ovocito en profase I, con la cromatina difusa. Sin embargo, no se encontró mejor tasa de recuperación que en Metafase II respecto a la otra técnica³⁴.

En los casos de pacientes con cánceres estrógeno dependientes, como el de mama y endometrio, se ha

intentado la inhibición con aromatasas en conjunto con el estímulo de la ovulación, reduciendo la exposición estrogénica y su potencial riesgo del pico de estrógenos. La práctica de esta estrategia ha mostrado resultados contradictorios en numerosos estudios controlados¹¹⁻¹⁶.

La criopreservación de tejido ovárico es también, una técnica experimental.

Se ofrece en el marco de la experimentación, teniendo en cuenta no sólo la edad de la paciente, sino el posible riesgo de compromiso tisular, por el riesgo de reimplantación de células tumorales. (TABLA 2)³⁵⁻³⁹.

Se trata de la criopreservación de una lámina de corteza ovárica, en fragmentos pequeños. Es considerada una técnica rápida, fácil y no cara.

Las láminas de tejido se transplantarían luego de finalizado el tratamiento oncológico, de tres formas posibles: ortotópico, heterotópico y xenotransplante.

Podría considerarse la única técnica aceptable para pacientes adolescentes o en premenarca. Como ventajas encontramos el tratarse de tejido con metabolismo casi inactivo, sin tener que considerar el huso de la metafase, membrana pelúcida y gránulos corticales. Los folículos primordiales serían más resistentes a la crioinjuria que los ovocitos

La transposición del ovario trata de retirar de la pelvis a los ovarios, mediante la técnica laparoscópica; fuera del campo de irradiación pelviana. Esta técnica se ofrece a pacientes que no van ser expuestas a dosis altas de quimioterápicos sistémicos. La intervención es efectiva para proteger a los ovarios de la acción de la radiación pelviana, pero no debemos dejar de contemplar el posible compromiso uterino o cervical, a nivel vascular y de fibrosis que se puede encontrar y limitar la fertilidad. Por otra parte, la técnica en sí misma posee limitaciones anatómicas, como ser la flexibilidad y longitud de los pedículos ováricos para permitir la transposición, o el posible daño vascular del mismo⁴⁰.

Ante la evidencia de una menor sensibilidad de las gónadas de la premenarca a los efectos de los quimioterápicos, se intentó lograr un efecto similar de quiescencia del epitelio germinal, con agonistas GnRH. Numerosos trabajos se han realizado, con resultados poco concluyentes y hasta contradictorios. Las píldoras anticonceptivas fueron investigadas en este sentido, como supresoras del ovario por la declinación de gonadotropinas para inhibir el desarrollo folicular. El grupo alemán de estudio del linfoma Hodgkin encontró un efecto protector en su uso en pacientes jóvenes sometidas a quimioterapia, e inició un estudio en fase II para definir un cotratamiento standard para reducir los efectos nocivos en la fertilidad.

Comentario final

Dentro de las estrategias que hemos descrito, se destaca el carácter de experimental de la mayor parte de ellas y las limitaciones de cada una. No obstante, este es un campo de desarrollo constante en el que cada día la ciencia nos asombra un poco más.

Se han realizado numerosas revisiones sobre la administración de estrategias de preservación de la fertilidad en pacientes oncológicas, en manos de las más importantes sociedades de oncología, ginecología y fertilidad del mundo. Varios esquemas generales de indicación se han propuesto; a continuación propondremos un esquema básico. A pesar de ello, el mundo de variables intrínsecas a cada patología, su medio socio-familiar, el plano emocional o psíquico, remarcan más que nunca, la necesidad de estudiar cada caso en su contexto de único.

Bibliografía:

1. Lee S, Schover LR, Partridge AH, Patrizio P, Wallace WH, Hagerty K, Beck LN, Brennan LV, Oktay K; American Society of Clinical Oncology. American

Society of Clinical Oncology Recommendations of fertility preservation in cancer patients. *J Clin Oncol* 2006;24(18):2917-31

2. Hamish Wallace W. Fertility preservation for young people treated with cancer: What are the attitudes and knowledge of clinicians? *Highlights. Ped Blood Cancer* 2007;48(1):2-3

3. van den Berg H, Repping S, Van der Veen F. Parental desire and acceptability of spermatogonial stem cell cryopreservation in boys with cancer. *Amsterdam. Hum Rep* 2007;22(2):594-7

4. Goodwin T, Oosterhuis E, Kiernan M, Hudson MM, Dah GV. Attitudes and Practices of Pediatric Oncology Providers Regarding Fertility Issues. *Pediatr Blood Cancer* 2007;48:80-5

5. Maltaris T, Seufert R, Fischl F, Schaffrath M, Pollow K, Koelbl H, Dittrich R. The effect of cancer treatment on female fertility and strategies for preserving fertility. Germany. Review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006;130(1):148-55

6. Dann EJ, Epelbaum R, Avivi I, Shahar MB, Haim N, Rowe JM, Blumenfeld Z. Fertility and ovarian function are preserved in women treated with an intensified regimen of cyclophosphamide, adriamycin, vincristine and prednisone (Mega-CHOP) for non-Hodgkin lymphoma. *SHORT COMMUNICATION. Hum Reprod* 2005;20(8):2247-9

7. Basille C, Olivennes F, Le Calvez J, Beron-Gaillard N, Meduri G, Lhommé C, Duvillard P, Benard J, Morice P. Impact of gonadotrophins and steroid hormones on tumour cells derived from borderline ovarian tumours. *Hum Reprod* 2006;21(12):3241-5

8. Familiari G, Caggiati A, Nottola A, Ermini M, Di Benedetto MR, Motta PM. Ultrastructure of human ovarian primordial follicles after combined chemotherapy for Hodgkin's disease. *Hum Rep* 1993;8:2080-7

9. Meirow D, Nugent D. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. *Hum Reprod Update* 2001;7:535-43

10. Constine LS, Woolf PD, Cann D, Mick G, McCormick K, Raubertas RF, Rubin P. Hypothalamic-pituitary

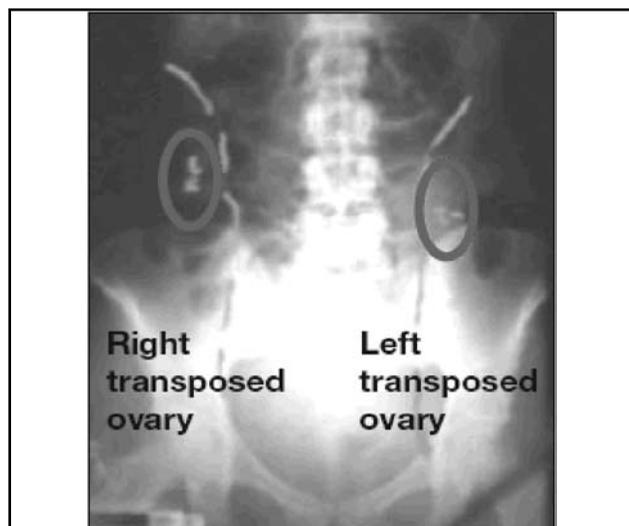
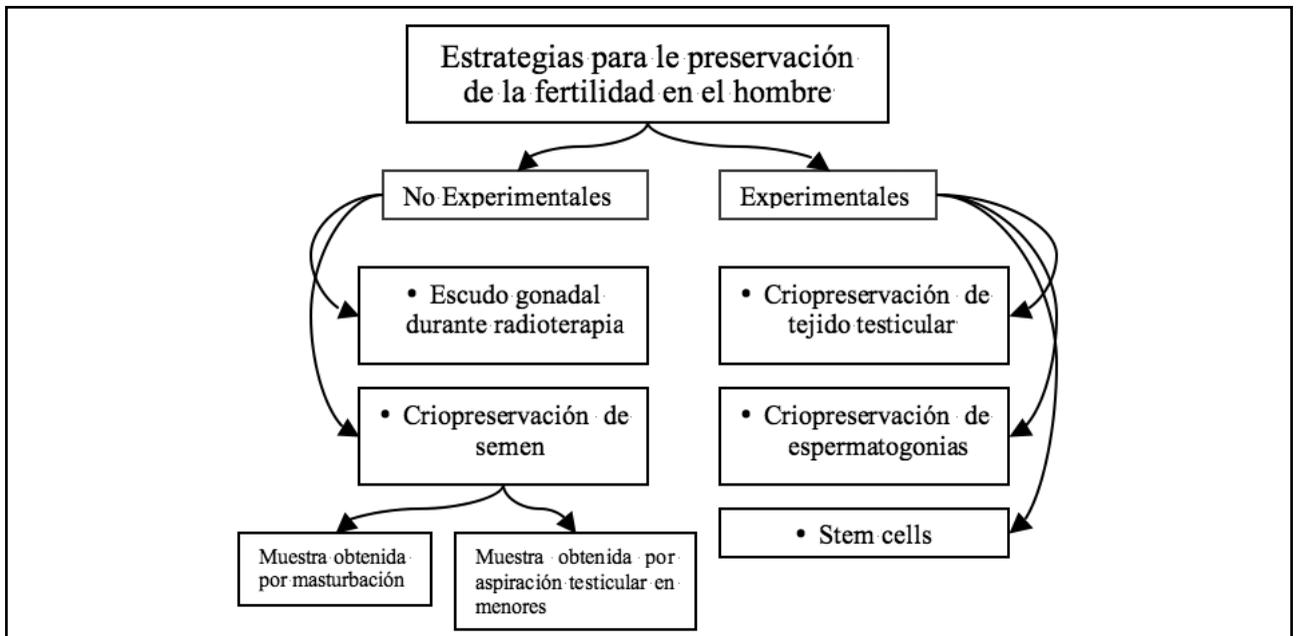
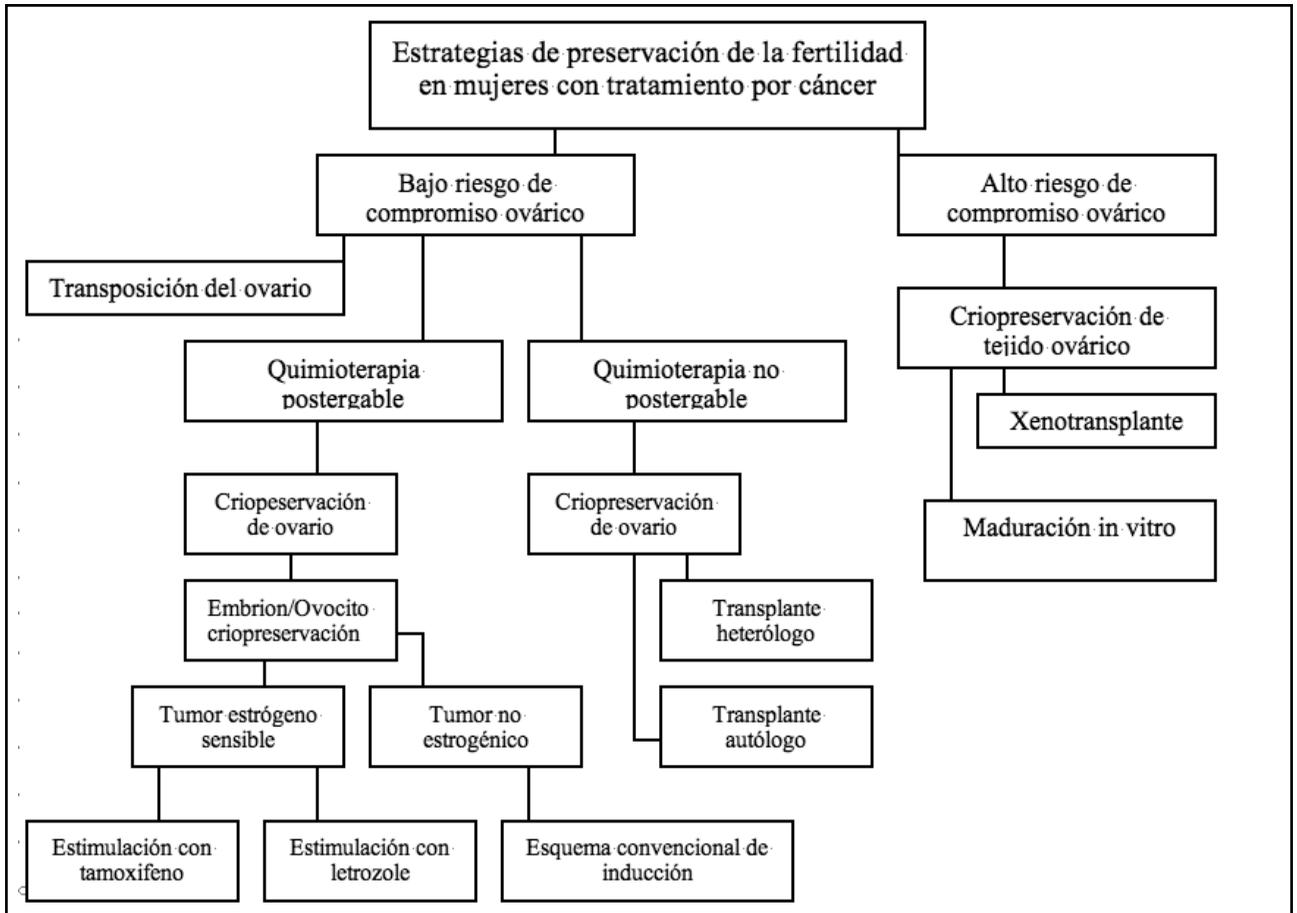


Fig 1. Transposición de ovarios.

Paciente con enfermedad de Hodgkin. Fuente: Kutluk Oktay, Dror Meirow. "Planning for fertility preservation before cancer treatment" *Fert Ster; SRM; vol5, No 1; April 2007*

Riego de compromiso oncológico del ovario en relación a la naturaleza del cáncer primario		
Riesgo bajo	Riesgo Medio	Riesgo Alto
-Tumor de Wilms -Cáncer de mama en estadios tempranos -Rabdomiosarcoma no genital -Sarcoma de Edwing	-Cáncer de mama estadio IV -adenocarcinoma de cervix -cáncer colorectal	-leucemia -neuroblastoma -ovario contralateral en cáncer de ovario -cáncer lobular de mama estadio IV

Tabla 2



- dysfunction after radiation for brain tumors. *N Engl J Med* 1993;328:87–94
11. Lushbaugh CC, Casarett GW. The effects of gonadal irradiation in clinical radiation therapy: a review. *Cancer* 1976;37:1111–25
 12. 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* 1999;150:245–54
 - 13- Higdon RE, Marchetti F, Mailhes JB, Phillips GL. The effects of cisplatin on murine metaphase II oocytes. *Gynecol Oncol* 1992;47:348–52
 14. Liou WS, Yap OW, Chan JK, Westphal LM. Innovations in fertility preservation for patients with gynecologic cancers. Taiwan. *Fertil Steril* 2005;84(6):1561-73
 15. Kim SS. Fertility preservation in female cancer patients: current developments and future directions. California. *Fertil Steril* 2006;8(5):1–11
 16. Posada MN, Kolp L, García JE. Fertility options for female cancer patients: facts and fiction. Maryland. *Fertil Steril* 2001;75:647–53
 17. Marhhom E, Cohen I. Fertility preservation options for women with malignancies. Israel. *CME review art. Obst Gynecol Survey* 2007;62(1):23-9
 18. Wyns C, Curaba M, Martinez-Madrid B, Van Langendonck A, François-Xavier W, Donnez J. Spermatogonial survival after cryopreservation and short-term orthotopic immature human cryptorchid testicular tissue grafting to immunodeficient mice. *Hum Reprod* 2007;22(6):1603-11
 19. Jahnukainen K, Ehmcke J, Hergenrother SD, Schlatt S. Effect of cold storage and cryopreservation of immature non-human primate testicular tissue on spermatogonial stem cell potential in xenografts. Finland. *Hum Reprod* 2007;22(4):1060–7
 20. Izadyar F, Matthijs-Rijsenbilt JJ, den Ouden K, Creemers LB, Woelders H, de Rooij DG. Development of a cryopreservation protocol for type A spermatogonia. *J Androl* 2002;23:537–45
 21. Schlatt S, Kim SS, Gosden R. Spermatogenesis and steroidogenesis in mouse, hamster and monkey testicular tissue after cryopreservation and heterotopic grafting to castrated hosts. *Reproduction* 2002;124:339–46
 22. Schlatt S, Honaramooz A, Ehmcke J, Goebell PJ, Rubben H, Dhir R, Dobrinski I, Patrizio P. Limited survival of adult human testicular tissue as ectopic xenograft. *Hum Reprod* 2006;21:384–9
 23. Kvist K, Thorup J, Byskov AG, Hoyer PE, Mollgard K, Yding Andersen C. Cryopreservation of intact testicular tissue from boys with cryptorchidism. *Hum Reprod* 2006;21:484–91
 24. Keros V, Rosenlund B, Hultenby K, Aghajanova L, Levkov L, Hovatta O. Optimizing cryopreservation of human testicular tissue: comparison of protocols with glycerol, propanediol and dimethylsulphoxide as cryoprotectants. *Hum Reprod* 2005;20:1676–87
 25. Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Ogura A, Toyokuni S, Shinohara T. Restoration of fertility in infertile mice by transplantation of cryopreserved male germline stem cells. *Hum Reprod* 2003;18(12):2660-7
 - 26- Master Z. Embryonic stem-cell gametes: the new frontier in human reproduction. Canada *OPINION. Hum Reprod* 2006;21(4):857–63
 27. Ogawa T, Ohmura M, Ohbo K. The niche for spermatogonial stem cells in the mammalian testis. *Int J Hematol* 2005;82:381–8
 28. Brook PF, Radford JA, Shalet SM, Joyce AD, Gosden RG. Isolation of germ cells from human testicular tissue for low temperature storage and autotransplantation. *Fertil Steril* 2001;75:269-74
 29. Nagano M, Patrizio P, Brinster RL. Long-term survival of human spermatogonial stem cells in mouse testes. *Fertil Steril* 2002;78:1225-33
 30. Edgar D. How should the clinical efficiency of oocyte cryopreservation be measured? *online - Vol 14. No 4. 2007 430-435 Reproductive BioMedicine Online; www.rbmonline.com /Article/2747 on web 28 February 2007. Melbourne.*
 31. Meryman H. Cryopreservation of living cells: principles and practice. *Transfusión* 2007;47(2);1-17
 32. de Melo-Martin I, Cholst IN. Researching human oocyte cryopreservation: ethical issues. New York. *Fertil Steril* 2008;89:523-8
 33. Jain J, Paulson R. Oocyte cryopreservation. Review article. California. *Fertil Steril* 2006;86(Suppl 3):1037–46
 34. Oktay K, Demirtas E, Son WY, Lostritto K, Chian C, Tan SL. In vitro maturation of germinal vesicle oocytes recovered after premature luteinizing hormone surge: description of a novel approach to fertility preservation. *CASE REPORT. Canada. Fertil Steril* 2008;89:228.e19-22
 35. Donnez J, Godin PA, Qu J, Nisolle M. Gonadal cryopreservation in the young patient with gynaecological malignancy. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2000;12:1–9
 36. Martin JR, Kodaman P, Oktay K, Hugh S. Ovarian cryopreservation with transposition of a contralateral ovary: a combined approach for fertility preservation in women receiving pelvic radiation. Taylor, New York. *Fertil Steril* 2007;87:189.e5–7
 37. Martinez-Madrid B, Camboni A, Dolmans MM, Nottola S, Van Langendonck A, Donnez J. Apoptosis and ultrastructural assessment after cryopreservation of whole human ovaries with their vascular pedicle. Rome, Italy. *Fertil Steril* 2007;87:1153–65
 38. Kim SS, Soules MR, Battaglia DE. Follicular de-

velopment, ovulation, and corpus luteum formation in cryopreserved human ovarian tissue after xenotransplantation. Washington. *Fert Steril* 2002;78(1):77-82

39. Rudas M, Hofstetter G, Huber J. Orthotopic microvascular reanastomosis of whole cryopreserved ovine ovaries resulting in pregnancy and live birth. Austria.

Fertil Steril 2006;85, Suppl 1:1208-15

40. Morice P, Juncker L, Rey A, El-Hassan J, Haie-Meder C, Castaigne D. Ovarian transposition for patients with cervical carcinoma treated by radiosurgical combination. *Fert Steril* 2000;74:743-8