

Alteraciones en la función gonadal en varones pospuberales supervivientes de leucemia linfoblástica aguda y enfermedad de Hodgkin

L. Soriano Guillén, M.T. Muñoz Calvo, J. Pozo Román, T. Contra Gómez, M. Buño Soto y J. Argente Oliver

Secciones de Endocrinología y Oncología Pediátricas. Hospital Universitario Niño Jesús. Universidad Autónoma. Madrid.

(*An Esp Pediatr* 2000; 53: 318-323)

Objetivo

Estudiar la función gonadal en varones supervivientes de leucemia linfoblástica aguda (LLA) y enfermedad de Hodgkin (EH).

Pacientes y métodos

Se estudiaron 13 varones pospuberales (estadio V de Tanner), 9 con LLA y 4 con EH, que habían recibido poliquimioterapia durante el período prepuberal. El grupo control lo constituyeron 13 varones voluntarios de edad similar y de desarrollo puberal completo. Se determinó: tamaño testicular, espermiograma, valores séricos de hormonas foliculoestimulante (FSH) y luteinizante (LH), basales y tras estímulo con GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas), y testosterona basal (T1). Se consideró que existía daño del epitelio germinal cuando se encontró, al menos, uno de los siguientes criterios: a) oligospermia/azoospermia; b) aumento de FSH basal o tras GnRH, o c) reducción del volumen testicular. Se consideró que existía lesión de las células de Leydig cuando los valores plasmáticos de testosterona basal se encontraron disminuidos, o los valores de LH, basales o tras estímulo, aumentados.

Resultados

Los pacientes diagnosticados de EH presentaron una clara alteración de la función germinal y, en menor medida, de la función de las células de Leydig, con diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0,001$) en: pico de FSH ($19,7 \pm 18$ frente a $4,8 \pm 1,8$ mU/ml), pico de LH ($49,2 \pm 31$ frente a $33,4 \pm 10,0$ mU/ml), testosterona ($4,1 \pm 0,6$ ng/ml frente a $5,9 \pm 0,3$ ng/ml) y volumen testicular ($16,6 \pm 2,8$ frente a $22,5 \pm 2,4$ ml). De los 4 pacientes con EH, tres presentaron azoospermia y uno oligospermia. Los pacientes supervivientes de LLA no presentaron

diferencias significativas en ninguno de los parámetros bioquímicos y clínicos con el grupo control, si bien, de los 9 pacientes estudiados, dos presentaron oligospermia.

Conclusiones

Los protocolos quimioterápicos empleados en el tratamiento de la EH y la LLA producen una elevada incidencia de daño germinal y de alteración subclínica de las células de Leydig en los varones con EH; mientras que en los pacientes diagnosticados de LLA se encuentra sólo una afectación leve de la línea germinal. El estado prepuberal no protege los testículos del efecto nocivo de la quimioterapia.

Palabras clave:

Función gonadal. Quimioterapia. Enfermedad de Hodgkin. Leucemia linfoblástica aguda.

ALTERATIONS IN GONADAL FUNCTION IN POST-PUBERTAL MALE SURVIVORS OF ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA AND HODGKIN'S DISEASE

Objective

To study gonadal function in male patients surviving acute lymphoblastic leukemia (ALL) or Hodgkin's disease (HD).

Patients and methods

Thirteen postpubertal males were studied (Tanner stage V), 9 with ALL and 4 with HD, who had received polychemotherapy during the pre-puberal period. The control group was composed of 13 male volunteers of similar ages and with complete pubertal development. Testicular size, spermiogram, serum levels of follicle-sti-

Correspondencia: Dra. M. T. Muñoz Calvo. Sección de Endocrinología Pediátrica. Hospital Universitario Niño Jesús. Avda. Menéndez y Pelayo, 65. 28009 Madrid.

Recibido en junio de 2000.

Aceptado para su publicación en julio de 2000.

mulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) before and after stimulus with gonadotropin-releasing hormone (GnRH), and serum testosterone levels were determined. The germinal epithelium was believed to be damaged when at least one of the following criteria was present: 1) oligospermia/azoospermia, 2) increase in serum FSH levels before or after GnRH, or 3) reduction in testicular volume. Lesions in Leydig's cells were thought to exist when serum testosterone levels were reduced or when serum LH levels, before or after stimulus, increased.

Results

Patients with HD presented clear alterations in germinal function and, to a lesser degree, in the function of Leydig's cells. Significant differences compared with the control group ($p < 0.001$) were found in peak FSH (19.7 ± 18 vs 4.8 ± 1.8 μ UI/mL), peak LH (49.2 ± 31 vs 33.4 ± 10.0 μ UI/mL), serum testosterone (4.1 ± 0.6 vs 5.9 ± 0.3 ng/mL) and testicular volume (16.6 ± 2.8 vs 22.5 ± 2.4 mL). Of the four patients with HD, three presented azoospermia and one oligospermia. No significant differences in any of the clinical or biochemical parameters studied were found in patients surviving ALL compared with the control group, but two of the nine patients studied presented oligospermia.

Conclusions

The chemotherapy protocols used in the treatment of HD and ALL produced a high incidence of germinal cell damage and subclinical alterations in the Leydig's cell function in males with HD. In patients with ALL, the germinal line was only mildly affected. Prepubertal state does not protect the testes from the harmful effects of chemotherapy.

Key words:

Gonadal function. Chemotherapy. Hodgkin's disease. Acute lymphoblastic leukemia.

INTRODUCCIÓN

La mayor supervivencia actual de los pacientes con enfermedades malignas hace que las posibles secuelas de la terapia adquieran mayor relevancia. Spitz et al¹ describieron por primera vez el daño testicular en humanos secundario al tratamiento quimioterápico. Las gónadas masculinas parecen ser más sensibles a la quimioterapia que las gónadas femeninas^{2,3}; si bien, estudios recientes indican la existencia de una alta incidencia de disfunción gonadal en niñas con enfermedad de Hodgkin (EH) tratadas con quimioterapia⁴.

Los agentes quimioterápicos que producen con mayor frecuencia y gravedad una disfunción gonadal en los varones son: ciclofosfamida, clorambucilo, mustina, busulfán y procarbina. La ciclofosfamida es el agente que más se ha relacionado con la disfunción gonadal, siendo su efecto nocivo dosis dependiente⁵. Como consecuencia de la mayor sensibilidad del epitelio germinal a los quimioterápicos, las lesiones que provocan éstos afectan preferentemente a estas células y, con menor frecuencia y gravedad, a las de Leydig^{6,7}. Las células ger-

minales son las responsables de la espermatogénesis y de la fertilidad, mientras que las células de Leydig sintetizan testosterona, necesaria no sólo para la inducción y mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios, sino también para permitir la espermatogénesis. Estas células gonadales están sometidas a regulación hormonal, de forma que las germinales son controladas, principalmente, por la hormona FSH y las de Leydig por la LH⁸.

Se ha postulado que la etapa prepuberal sería un factor de protección frente al daño gonadal inducido por la quimioterapia^{9,10}; sin embargo, estudios recientes no parecen confirmar esta hipótesis^{11,12}.

La supervivencia de la EH en pacientes pediátricos es superior al 90% a los 5 años; sin embargo, este buen pronóstico no está exento de secuelas a largo plazo, como es, entre otras, la disfunción gonadal secundaria a la quimioterapia¹³. La supervivencia en la leucemia linfoblástica aguda (LLA) se sitúa en torno al 70% a los 5 años y, como en la EH, se acompaña de efectos secundarios a largo plazo; aunque la incidencia de disfunción gonadal es mucho menor^{5, 14}.

El objetivo de este estudio ha sido investigar la función gonadal en pacientes supervivientes de LLA y EH que finalizaron su tratamiento poliquimioterápico antes del inicio del desarrollo puberal, no sólo para determinar las posibles alteraciones sino también para evaluar el hipotético efecto protector sobre la gónada de la falta de desarrollo puberal.

PACIENTES Y MÉTODOS

Pacientes

Se incluyeron en el estudio sólo aquellos que habían completado el tratamiento poliquimioterápico en el período prepuberal (estadio I de Tanner), que carecían de cualquier antecedente de enfermedad testicular y que habían completado su desarrollo puberal (estadio V de Tanner) en el momento de la realización del estudio¹⁵. Tras la obtención del correspondiente consentimiento informado, tanto de los padres como de los propios sujetos, se incluyeron en el estudio un total de 13 pacientes, 9 con LLA y 4 con EH. El grupo control lo constituyeron 13 varones voluntarios de edad similar y con desarrollo puberal completo.

Los pacientes con EH tenían una edad media en el momento de la realización del estudio de $16,3 \pm 2,6$ años (rango: 12-21 años), con un intervalo de tiempo transcurrido entre la finalización del tratamiento y la realización del estudio de $4,4 \pm 2,7$ años (rango: 2-9 años). De los 4 pacientes, uno había recibido 12 ciclos de MOPP (mostaza nitrogenada, vincristina, prednisona y procarbina) asociados a radioterapia "en Manthel" con protección gonadal (34 Gy). Los otros 3 pacientes habían recibido dos ciclos de OPPA (vincristina, procarbina, prednisona y doxorubicina) asociados a radioterapia

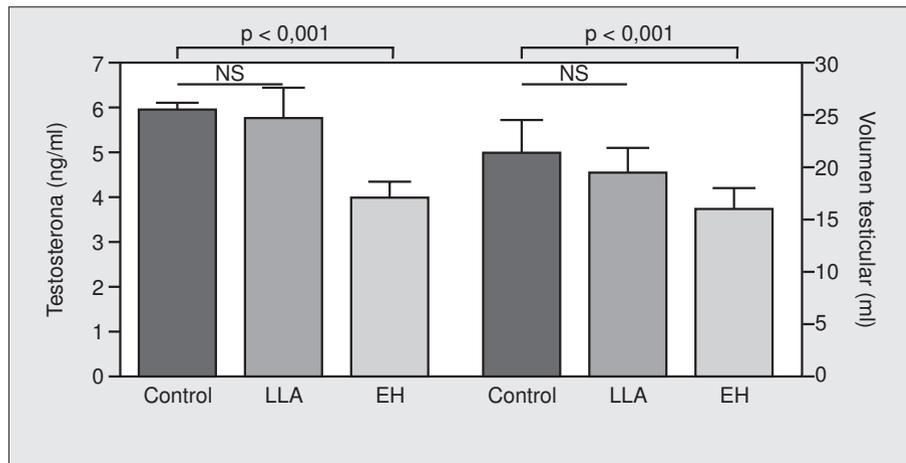


Figura 1. Volumen testicular y valores plasmáticos de testosterona total en pacientes con enfermedad de Hodgkin (EH) y leucemia linfoblástica aguda (LLA), así como en sujetos control.

pia "en Manthel" acompañados de protección gonadal (12-19 Gy).

Los pacientes diagnosticados de LLA tenían una edad media al inicio del estudio de $16,9 \pm 1,7$ años (rango: 14-20 años), con un tiempo transcurrido entre la finalización del tratamiento y la realización del estudio de $8,0 \pm 3,3$ años (rango: 4-12 años). Todos los pacientes diagnosticados de LLA habían recibido irradiación craneal profiláctica (18-24 Gy). De los 9 pacientes, 3 habían sido tratados según el protocolo de St. Jude¹⁶, que incluía: vincristina, asparaginasa, daunoblastina y prednisona, asociado a metotrexato intratecal. Los 6 restantes habían seguido el protocolo BFM (Berlin-Frankfurt-Münster)¹⁷ con diferentes ciclos poliquimioterápicos secuenciales, que incluían: vincristina, asparaginasa, daunorubicina, ciclofosfamida, citarabina, prednisona, metotrexato, 6-mercaptopurina, dexametasona, adriamicina, arabinósido de citosina y tioguanina, así como metotrexato intratecal.

Evaluación de la función gonadal

La función gonadal se evaluó mediante el análisis de los siguientes parámetros: *a*) medida del volumen testicular con el orquidómetro de Prader; *b*) cuantificación de los valores plasmáticos de T1; *c*) determinación de los valores basales y pico de respuesta máxima tras estímulo con GnRH (100 µg i.v.) de LH y FSH, realizándose extracciones en los tiempos -30, 0, 30, 60, 90 y 120 min, y *d*) realización de una espermiograma. Tras la recogida de 2-5 ml de semen, mediante masturbación y previa abstinencia de, al menos, 3 días, se valoró el número de espermatozoides por ml. Se consideró como normal un número superior a 20 millones/ml, como oligospermia valores por debajo de 10 millones/ml y como azoospermia la ausencia completa de espermatozoides.

Se consideró que existía daño del epitelio germinal cuando se encontró, al menos, uno de los tres criterios siguientes: *a*) número de espermatozoides inferior a 10 millones/ml de semen; *b*) aumento de los valores plasmáticos basales o tras estímulo de FSH, o *c*) reducción

del volumen testicular. Se consideró que existía lesión de las células de Leydig cuando los valores plasmáticos de testosterona basal se encontraron disminuidos o los valores de LH, basales o tras estímulo, aumentados¹¹.

Determinaciones analíticas

Los valores séricos de testosterona se cuantificaron mediante radioinmunoanálisis (Diagnostic Products Corporation, Los Ángeles, California). Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron del 5,0 y del 10,8%, respectivamente.

Los valores séricos de LH y FSH se determinaron mediante radioinmunoanálisis (Sorin®, Biomedica, Vercelli, Italia). Los coeficientes de variación intra e interensayo para la FSH fueron del 2,7 y del 3,5%, respectivamente, y para la LH del 2,75 y del 3,17%.

Análisis estadístico

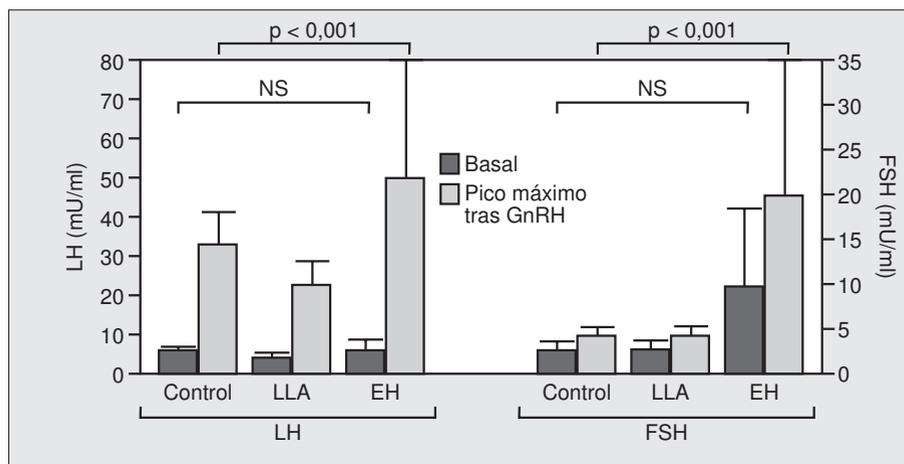
Los datos fueron analizados utilizando el programa de estadística StatViewTM en un ordenador Macintosh®. La distribución normal de las variables se comprobó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Los datos se expresaron como media \pm desviación estándar (DE). Las comparaciones entre las medias de variables paramétricas de dos grupos se realizaron mediante la prueba de *t* de Student para muestras independientes. Cuando las comparaciones se hicieron entre las medias de más de dos grupos, el método estadístico aplicado fue el análisis de la variancia (ANOVA) para un factor y posterior aplicación de la F de Scheffé, para determinar la existencia de diferencias significativas entre dichos grupos. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

En todos los pacientes el desarrollo puberal se había producido de manera normal, encontrándose todos ellos en un estadio V de Tanner.

En todos los grupos, el volumen testicular medio fue superior a 12 ml (volumen mínimo considerado normal

Figura 2. Valores plasmáticos basales y tras estímulo de FSH y LH en pacientes con enfermedad de Hodgkin (EH) y leucemia linfoblástica aguda (LLA), así como en sujetos control.



en un adulto); no obstante (fig. 1), los pacientes supervivientes de EH presentaban un volumen testicular medio ($16,6 \pm 2,8$ ml) significativamente menor ($p < 0,001$) que el del grupo control ($22,5 \pm 2,5$ ml) y también inferior, aunque de forma no significativa al de los pacientes con LLA ($20 \pm 2,6$ ml).

Los valores plasmáticos basales y tras estímulo de FSH (fig. 2) fueron significativamente mayores ($p < 0,001$) en los pacientes con EH ($8,8 \pm 8,4$ y $19,7 \pm 18$ mU/ml, respectivamente) que en los otros dos grupos, control ($2,3 \pm 1,2$ y $4,8 \pm 1,8$ mU/ml) y pacientes con LLA ($2,3 \pm 1,1$ y $4,3 \pm 2,0$ mU/ml). En cuanto a los valores plasmáticos de LH (fig. 2), sólo los valores de LH tras estímulo con GnRH fueron significativamente mayores ($p < 0,001$) en los pacientes con EH ($49,2 \pm 31,0$ mU/ml) que los observados en pacientes con LLA ($22,0 \pm 6,9$ mU/ml) y sujetos control ($33,4 \pm 10,0$ mU/ml). No se observaron diferencias significativas respecto a los valores séricos basales y tras estímulo de LH y FSH entre los pacientes con LLA y el grupo control (fig. 2).

Los valores de T1 fueron significativamente menores ($p < 0,001$) en los pacientes con EH ($4,1 \pm 0,6$ ng/ml) que en el grupo control ($5,9 \pm 0,3$ ng/ml) y que en el grupo con LLA ($5,7 \pm 0,9$ ng/ml), si bien, en este último caso, de forma no significativa (fig. 1).

El espermograma sólo se encontró afectado (oligospermia) en 2 de los 9 pacientes del grupo con LLA. Por el contrario, todos los pacientes con EH presentaron alteraciones, en forma de azoospermia en un caso y de oligospermia en el resto.

Los pacientes con oligospermia y azoospermia presentaban cifras de FSH basal y tras estímulo elevadas, mientras que los pacientes con espermograma normal presentaban cifras de FSH normales.

DISCUSIÓN

Los agentes quimioterápicos, y en particular los agentes alquilantes, han demostrado tener efectos nocivos sobre la función gonadal⁵; si bien, la mayoría de estu-

dios realizados en este sentido se han llevado a cabo en adultos. Como los agentes quimioterápicos lesionan preferencialmente las líneas celulares metabólicamente más activas, se postuló que el daño gonadal inducido por la quimioterapia sería proporcional al grado de actividad gonadal; según ello, cabría esperar una menor repercusión sobre la función gonadal en los pacientes tratados en edad prepuberal, dado que la actividad gonadal antes del desarrollo puberal está muy atenuada y la gametogénesis no es plenamente activa¹⁸. Por otro lado, los efectos secundarios de las distintas opciones terapéuticas dependerán no sólo del tipo de tratamiento y grado de desarrollo puberal, sino también del sexo y del tiempo de evolución desde su administración. En este estudio evaluamos la función gonadal de adolescentes varones que han completado su desarrollo puberal y que fueron tratados con poliquimioterapia antes del inicio de la pubertad por padecer LLA o EH.

Nuestros resultados indican que existe una marcada alteración de la función gonadal, especialmente en los pacientes que padecieron una EH. En ellos se observan alteraciones, tanto de la función germinal como de la producción hormonal. La reducción del volumen testicular, la oligospermia/azoospermia y la elevación de los valores plasmáticos de FSH, indican la existencia de daño en el epitelio germinal; mientras que el aumento de los valores plasmáticos de LH y la disminución de las cifras de testosterona reflejan la afectación de las células de Leydig. Por el contrario, en los pacientes supervivientes de LLA no se observa afectación de los parámetros que evalúan la función de las células de Leydig y sólo en dos de ellos se encuentra una reducción significativa del número de espermatozoides (oligospermia), sin otros signos de daño de epitelio germinal.

La lesión del epitelio germinal es un efecto secundario bien conocido de la quimioterapia, especialmente de los denominados agentes alquilantes (ciclofosfamida, clorambucilo, mostaza nitrogenada); no obstante, hay datos que indican un posible efecto aditivo por el uso

de múltiples quimioterápicos, así como efectos dependientes de la dosis por la administración repetida de un determinado agente. Los agentes citotóxicos destruyen el epitelio germinal que se asienta sobre los túbulos seminíferos. Dado que éstos representan un porcentaje importante de la masa testicular, su destrucción supone la atrofia o disminución del volumen testicular, la alteración en el número y funcionalidad de los espermatozoides y el incremento de FSH⁵. Algunos estudios sugieren también la posibilidad de que la propia enfermedad y no la terapia, pueda ser responsable de algunas alteraciones de la función gonadal^{19,20}. Los 4 pacientes estudiados diagnosticados de EH presentaban claros signos de daño del epitelio germinal, que eran independientes del protocolo quimioterápico empleado (MOPP u OPPA). La disfunción gonadal asociada a estos protocolos está ampliamente descrita y en relación con la administración de mostaza nitrogenada y procarbina en el caso del MOOP²¹⁻²³ y de procarbina^{5,24} en el caso del OPPA. Al igual que lo observado en nuestros pacientes, se han descrito porcentajes muy elevados de azoospermia, alrededor del 90%, en pacientes supervivientes de EH^{6,19,25}, probablemente debido a la asociación en los protocolos terapéuticos empleados de más de un quimioterápico con efectos nocivos sobre la función gonadal.

La afectación de la línea germinal en los pacientes supervivientes de LLA fue menor, con alteraciones (oligoespermia) en sólo 2 de los 9 pacientes estudiados. Estos 2 pacientes habían recibido tratamiento con ciclofosfamida, el agente alquilante que ha sido relacionado con daño en la línea germinal^{5,18}. La disfunción gonadal producida por la ciclofosfamida es dependiente de la dosis, y se considera que se produciría daño gonadal cuando la dosis total supera los 5 g/m² de superficie corporal⁵.

Pese a que en todos pacientes la pubertad se desarrolló y completó espontáneamente, alcanzando un grado de desarrollo puberal completo (estadio V de Tanner), el incremento de LH y la disminución de los valores de testosterona en el grupo con EH puso de manifiesto la existencia de un cierto grado de lesión de las células de Leydig. Un hallazgo que también ha sido descrito por otros autores, con porcentajes muy variables de afectación, entre un 10 y un 75%^{4,11-13,23}, dependiendo del protocolo quimioterápico utilizado. El mecanismo de alteración de las células de Leydig después de la quimioterapia es poco conocido y no hay evidencia de que se produzca lesión histológica en las biopsias posquimioterapia. Aunque no se puede descartar un efecto tóxico directo de la quimioterapia sobre estas células, algunos estudios sugieren que sería el daño germinal el que indirectamente afectaría la función de las células de Leydig²⁶. Los posibles mecanismos postulados han sido varios: reducción del flujo sanguíneo testicular, cambios estructurales testiculares o modificaciones en el control paracrino de las células de Leydig.

Los efectos a largo plazo de una deficiencia relativa de la funcionalidad de las células de Leydig pueden no ser fáciles de establecer, si bien habría que considerar, entre otros factores, la reducción de la vitalidad, de la función sexual, el desarrollo de ansiedad y/o los fenómenos depresivos y modificaciones en la composición corporal; en este sentido, estudios recientes sugieren una posible relación de la alteración de las células de Leydig con la reducción de la densidad mineral ósea observada en varones adultos que recibieron quimioterapia por EH²⁷. En cualquier caso, hay que ser muy cauteloso en los pronósticos a largo plazo, dado que la función de las células de Leydig¹⁹, así como la espermatogénesis²⁸, pueden experimentar una recuperación espontánea, al menos parcial, muchos años después de la administración de los fármacos citotóxicos, y hay que esperar años para catalogar esta anomalía como definitiva. La mayoría de autores consideran un período crítico de recuperación de la espermatogénesis entre 2 y 4 años, pero se han descrito casos de recuperación incluso a los 7 años.

Todos los pacientes estudiados habían recibido la quimioterapia en la época prepuberal, pese a lo cual se desarrolló la disfunción gonadal. Estos resultados, en consonancia con los observados por otros autores^{11,12}, indican que la época prepuberal no protege ni la funcionalidad de las células de Leydig ni la función germinal gonadal de los efectos deletéreos de la poliquimioterapia.

En resumen, con los protocolos quimioterápicos empleados en el tratamiento de la EH y de la LLA se produce una elevada incidencia de daño germinal y de alteración subclínica de las células de Leydig en los varones con EH, mientras que en los pacientes diagnosticados de LLA se encuentra sólo una afectación leve de la línea germinal. Estas alteraciones, provocadas por los agentes quimioterápicos, no se previenen porque éstos sean administrados antes del inicio de la pubertad, cuando la actividad espontánea y funcionalidad gonadal están, teóricamente, atenuadas. Por consiguiente, es necesario desarrollar nuevos protocolos o alternativas terapéuticas que eviten o reduzcan las secuelas a largo plazo del tratamiento del cáncer y, en concreto, los efectos negativos sobre la función gonadal.

BIBLIOGRAFÍA

1. Spitz S. The histological effects of nitrogen mustard on human tumours and tissues. *Cancer* 1948; 1: 383-398.
2. Lentz RD, Berstein J, Steffens MW, Brown DR, Prem K, Michael AF et al. Postpuberal evaluation of gonadal function following cyclophosphamide therapy before and during puberty. *J Pediatr* 1977; 91: 385-394.
3. Watson AR, Rance CP, Bun J. Gonadal function in women treated with cyclophosphamide for childhood nephrotic syndrome: a long-term follow-up study. *Fertil Steril* 1986; 46: 331-333.
4. Mackie EJ, Radford M, Shalet SM. Gonadal function following chemotherapy for childhood Hodgkin's disease. *Med Pediatr Oncol* 1996; 27: 74-78.

5. Goldman S, Johnson L. Effects of chemotherapy and irradiation on the gonads. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1993; 22: 617-629.
6. Charak BS, Gupta R, Mandrekos P, Sheth NA, Banavali SD, Saikia TK et al. Testicular dysfunction after cyclophosphamide-vincristine-procarbazine-prednisolone chemotherapy for advanced Hodgkin's disease. A long-term follow-up study. *Cancer* 1990; 65: 1903-1906.
7. Chatterjee R, Millis W, Katz M, McGarrigle HH, Goldstone AH. Germ cell failure and Leydig cell insufficiency in post-puberal males after autologous bone marrow transplantation with BEAM for lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 1994; 13: 519-522.
8. Heikens J, Behrendt H, Adriaanse R, Berghout A. Irreversible gonadal damage in male survivors of pediatric Hodgkin's disease. *Cancer* 1996; 78: 2020-2024.
9. Meistrich ML, Chawla SP, Da Cunha MF, Johnson SL, Plager C, Papadopoulos NE et al. Recovery of sperm production after chemotherapy for osteosarcoma. *Cancer* 1989; 63: 2115-2123.
10. Matus-Ridley M, Nicosia SV, Path MS, Meadows AT. Gonadal effects of cancer therapy in boys. *Cancer* 1985; 55: 2353-2363.
11. Mustieles C, Muñoz A, Alonso M, Ros P, Yturriaga R, Maldonado S et al. Male gonadal function after chemotherapy in survivors of childhood malignancy. *Med Pediatr Oncol* 1995; 24: 347-351.
12. Shafford EA, Kingston JE, Malpas JS, Plowman PN, Pritchard J, Savage MO et al. Testicular function following treatment of Hodgkin's disease in childhood. *Br J Cancer* 1993; 68: 1199-1204.
13. Papadakis V, Vlachopapadopoulou E, Van Syckle K, Ganshaw L, Kalmanti M, Tan C et al. Gonadal function in young patients successfully treated for Hodgkin's disease. *Med Pediatr Oncol* 1999; 32: 366-372.
14. Howell S, Shalet S. Gonadal damage from chemotherapy and radiotherapy. *Endocrinol Metab North Am* 1998; 27: 927-943.
15. Tanner JM. *Growth and adolescence* (2.^a ed.). Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1962.
16. Ribeiro RC, Marina N, Crist WM. St Jude Children's Research Hospital's International Outreach Program. *Leukemia* 1996; 10: 570-584.
17. Reiter A, Schrappe M, Ludwig WD. Chemotherapy in 998 unselected childhood acute lymphoblastic leukemia patients. Results and conclusions of the multicenter trial ALL-BFM 86. *Blood* 1994; 84: 3122-3133.
18. Blatt J, Poplack DG, Sherins KJ. Testicular function in boys after chemotherapy for acute lymphoblastic leukaemia. *N Engl J Med* 1981; 304: 1121-1126.
19. Vigersky RA, Chapman RM, Berenberg J, Glass AR. Testicular dysfunction in untreated Hodgkin's disease. *Am J Med* 1982; 73: 482-486.
20. Viviani S, Ragni G, Santoro A, Perotti L, Caccamo E, Negretti E et al. Testicular dysfunction in Hodgkin's disease before and after treatment. *Eur J Cancer* 1991; 27: 1389-1392.
21. Whitehead E, Shalet SM, Blackledge G, Todd I, Crowther DC, Beardwell G. The effects of Hodgkin's disease and combination chemotherapy on gonadal function in the adult male. *Cancer* 1982; 49: 418-422.
22. Heikens J, Behrendt H, Adriaanse R, Berghout A. Irreversible gonadal damage in male survivors of pediatric Hodgkin's disease. *Cancer* 1996; 78: 2020-2024.
23. Viviani S, Santoro A, Ragini G, Bonfante V, Bestetti O, Bonadonna G. Gonadal toxicity after combination chemotherapy for Hodgkin's disease: comparative results of MOPP versus ABVD. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1985; 21: 601-605.
24. Bramswig LH, Heimes U, Heiermann E, Schlegel W, Nieschlag E, Schellang G. The effects of different cumulative doses of chemotherapy on testicular function. *Cancer* 1990; 65: 1298-1302.
25. Chapman RM, Sutcliffe SB, Rees LH, Rees LH, Edwards CRW. Cyclical combination chemotherapy and gonadal function: Retrospective study in males. *Lancet* 1979; 1: 285-289.
26. Howell SJ, Radford JA, Ryder WDJ, Shalet SM. Testicular function after cytotoxic chemotherapy: evidence of Leydig cell insufficiency. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1493-1498.
27. Holmes SJ, Whitehouse RW, Clark ST, Crowther DC, Adams JE, Shalet SM. Reduced bone mineral density in men following chemotherapy for Hodgkin's disease. *Br J Cancer* 1994; 70: 371-375.
28. Lampe H, Horwich A, Norman A, Nicholls J, Dearnaley DP. Fertility after chemotherapy for testicular germ cells cancers. *J Clin Oncol* 1997; 15: 239-245.