

**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Giuliano Marchetti Bedoschi

**Caracterização do impacto dos regimes quimioterápicos na  
reserva ovariana de pacientes com câncer de mama**

**RIBEIRÃO PRETO**

**2018**

Giuliano Marchetti Bedoschi

**Caracterização do impacto dos regimes quimioterápicos na  
reserva ovariana de pacientes com câncer de mama**

**Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na  
Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital  
de Teses e Dissertações da USP (BDTD)**

Tese apresentada ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências Médicas.

Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia

Orientadora: Professora Doutora Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro

Co-orientador: Professor Doutor Kutluk Oktay

**RIBEIRÃO PRETO**

**2018**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Bedoschi, Giuliano Marchetti

“Caracterização do impacto dos regimes quimioterápicos na reserva ovariana de pacientes com câncer de mama”

73 p.

*Tese para título de Doutor apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia.*

Orientadora: Navarro, Paula Andrea de Albuquerque Salles

Co-orientador: Oktay, Kutluk

1. Preservação da fertilidade.
2. Quimioterapia.
3. Câncer de mama.
4. Hormônio Anti-Mulleriano.
5. BRCA.
6. Reserva ovariana.

# FOLHA DE APROVAÇÃO

**Giuliano Marchetti Bedoschi**

**Caracterização do impacto dos regimes quimioterápicos na reserva ovariana de pacientes com câncer de mama.**

Tese apresentada ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências Médicas. Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia.

Aprovado em:

## **Banca examinadora**

Profa. Dra. Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro

Instituição: FMRP – USP Assinatura: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

# *Dedicatória*

*Ao Senhor por todas as bênçãos já recebidas e por me conduzir pelos melhores caminhos.*

*Aos meus pais Luiz Paulo e Rosemary, maiores incentivadores de minha jornada profissional, que dignamente me apresentaram à importância do estudo, da dedicação e da perseverança. Sem o apoio incondicional de vocês, esse trabalho não seria possível.*

*Ao meu irmão Bruno, meu maior parceiro de trabalho e exemplo de profissional, com quem divido as responsabilidades diárias.*

*À minha esposa Amanda, minha maior fonte de motivação, com quem divido meus sonhos, anseios e conquistas.*

# *Agradecimentos*

*À minha orientadora, professora Dra. Paula Navarro, por me introduzir à pesquisa clínica e pelo apoio incondicional prestado ao longo de todo o percurso acadêmico. Para mim, é uma imensa honra tê-la como orientadora.*

*Ao meu co-orientador, professor Dr. Kutluk Oktay, por ter me recebido como pós-graduando em seu laboratório. Agradeço pela confiança em meu trabalho e por me permitir participar de seu grupo de pesquisa.*

*Ao amigo, professor Dr. Volkan Turan, por ter trabalhado arduamente para tornarmos o nosso período de pós-graduação o mais proveitoso possível.*

*Ao amigo, Dr. Matheus Roque, por todas as oportunidades apresentadas, tanto na área da pesquisa, quanto na área profissional. Muito obrigado por tudo meu grande amigo!*

*Ao amigo, professor Dr. Sandro Esteves, por me permitir participar de seu grupo de pesquisa e por todas as oportunidades profissionais apresentadas.*

# *Agradecimentos*

*Aos amigos, professor Dr. Marcelo Rocha e professora Dra. Luciana Dib, por todos os ensinamentos durante a residência médica e vida profissional.*

*Aos amigos, professor Dr. Luiz Cavalcanti e Dr. Thiago Guazzelli, grandes nomes da histeroscopia, por me permitirem participar de seu grupo de pesquisa e dos cursos ministrados.*

*Ao departamento de ginecologia e obstetrícia da FMRP-USP, ao setor de Reprodução Humana da UNIFESP e ao New York Medical College, pelo imprescindível apoio durante o período de formação.*

*À secretária de pós-graduação Suelen e a estatística Suleimy, por todo o suporte durante o período do doutorado.*

*Meus respeitosos agradecimentos pela contribuição dos membros da banca do exame de qualificação e pela participação, interesse e disponibilidade dos membros da banca examinadora.*

*Agradecimento especial a todas as pacientes que aceitaram participar do estudo.*

## *Epígrafe*

*“O tratamento de FIV para mim significa o RENOVO, A CHANCE, o RENASCER.*

*Quando fui diagnosticada com câncer de mama, minha primeira ideia foi: Minha vida e meus sonhos encerram-se por aqui. Quando entendi o que eu realmente tinha e quais minhas chances, minha primeira preocupação foi quanto à engravidar. Sempre me interessei por entender o aparelho reprodutor feminino, pois ele quem me propicia gerar um outro ser, nutri-lo e protegê-lo desde meu ventre. Ingressar no tratamento de quimioterapia sabendo que mesmo com a possibilidade de ficar estéril terei meus embriões ali, esperando pelo momento que meu corpo poderá recebê-los e gerá-los, me faz seguir adiante mais segura e feliz. Agora sei que além de curada (como sei que estou), farei meu tratamento de prevenção e poderei seguir a minha vida com a paz e a felicidade de antes, ou melhor, até maior que antes.”*

*(Renata Quinzan Vierches Torozian)*

## Resumo

BEDOSCHI, GM. **Caracterização do impacto dos regimes quimioterápicos na reserva ovariana de pacientes com câncer de mama.** Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Parte das mulheres com câncer de mama na menacme gostariam de tentar preservar sua fertilidade após o tratamento oncológico. Entretanto, as informações disponíveis sobre a extensão do dano aos ovários após o tratamento quimioterápico são insuficientes para estimar o risco de comprometimento da reserva ovariana. Dessa forma, como objetivo primário deste estudo propusemos caracterizar o impacto dos regimes quimioterápicos mais comumente utilizados no tratamento do câncer de mama em mulheres na menacme sobre a reserva ovariana avaliada por meio da aferição das concentrações séricas de hormônio anti-Mulleriano (HAM) e calendário menstrual, analisados antes e um ano após o término da quimioterapia. Cento e trinta e quatro pacientes foram analisadas para o objetivo primário do estudo. As concentrações séricas de HAM foram dosadas por meio do teste ELISA e foram representadas pela mediana e intervalo interquartil. Os testes não paramétricos de *Mann-Whitney* e de *Kruskal-Wallis* foram utilizados para comparar as medidas de HAM em relação as variáveis categóricas. A idade média foi de 36,67 anos (DP 3,95), sendo que 104 mulheres realizaram quimioterapia com regime antracíclico (AC-T), 13 regime não antracíclico (CMF) e 17 outros regimes quimioterápicos. Os níveis de HAM após 1 ano do término da quimioterapia reduziram de maneira significativa (mediana 0,13 ng/ml, intervalo interquartil 0,02; 0,35 ng/ml) quando comparados aos níveis basais (mediana 2,84 ng/ml, intervalo interquartil 1,26; 4,65 ng/ml;  $p < 0,0001$ ). Apesar da redução significativa dos níveis de HAM, 74,7% das mulheres apresentavam ciclos menstruais um ano após o término da quimioterapia. O tipo de regime quimioterápico influenciou de maneira significativa a redução dos níveis do HAM após 1 ano do término da quimioterapia. O grupo de tratamento que utilizou CMF apresentou maior redução da reserva ovariana quando comparado com o grupo de tratamento que utilizou outros regimes quimioterápicos. O uso adjuvante de tamoxifeno não alterou os níveis de HAM aferidos após 1 ano do término do tratamento quimioterápico. As concentrações séricas de HAM basais ( $p < 0,0001$ ), a idade ( $p = 0,0438$ ) e o regime de tratamento realizado ( $p = 0,0259$ ) foram relacionados com a redução dos níveis de HAM após um ano do término da quimioterapia. Mulheres com mutações *BRCA* apresentam menores concentrações basais de HAM e menores taxas de recuperação ovariana após o

término do tratamento quimioterápico quando comparadas a mulheres sem a mutação e mulheres não testadas por apresentarem baixo risco de mutação. Esse estudo longitudinal demonstrou que o tratamento quimioterápico promoveu redução significativa das concentrações séricas de HAM um ano após o término do tratamento. O fato da maioria das pacientes apresentar ciclos menstruais, apesar dos baixos níveis de HAM, sugere que a presença de menstruação não é um marcador acurado de reserva ovariana. O tipo de regime quimioterápico utilizado no tratamento oncológico demonstrou influenciar o comprometimento da reserva ovariana. O tratamento adjuvante com tamoxifeno parece não exacerbar o comprometimento da reserva ovariana. Demonstramos que a idade, os níveis basais de HAM e o tipo de regime quimioterápico são os fatores de predição mais importantes da reserva ovariana após o tratamento citotóxico. Sendo assim, geramos o primeiro nomograma para prever o impacto da quimioterapia na reserva ovariana. O nomograma descrito deve ser validado prospectivamente em novos estudos. Além disso, a presença de mutações *BRCA* pode colocar as mulheres em desvantagem reprodutiva quando expostas ao estresse genotóxico. Essas informações podem ser utilizadas para aconselhamento individual de mulheres em idade reprodutiva em relação a necessidade de tratamentos para tentativa de preservação da fertilidade.

**Palavras-chave:** Preservação da fertilidade. Quimioterapia, Adjuvante. Câncer de mama. Hormônio Anti-Mulleriano. Genes, *BRCA1*. Genes, *BRCA2*. Reserva ovariana.

## Abstract

BEDOSCHI, GM. **The impact of adjuvant breast cancer chemotherapy on ovarian reserve and menses.** Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Some women of reproductive age diagnosed with breast cancer wish to preserve their fertility and ovarian function after their oncological treatment. However, information available on the likelihood and extent of ovarian damage from chemotherapy is insufficient to predict the risk of ovarian reserve damage for individual women. Thus, the primary goal of this study is to delineate the extent of ovarian damage from chemotherapeutic treatment regimens by using serum AMH and menstrual calendars analyzed before and one year after the end of chemotherapy treatment. A prospective longitudinal IRB-approved study was performed. One hundred and thirty-four patients fulfilled the eligibility criteria and accepted to participate in the study, presenting blood samples with AMH measurement before and after one year of chemotherapy treatment. Serum AMH concentrations were measured by ELISA and were represented by median and interquartile range. The nonparametric tests of Mann-Whitney and Kruskal-Wallis were used to compare AMH concentrations in relation to the categorical variables. The mean age was 36.67 years (SD 3.95), and 104 women underwent chemotherapeutic regimen with anthracycltic regimen (AC-T), 13 non-anthracycltic regimen (CMF) and 17 other chemotherapeutic regimens. In the 134 women analyzed, the AMH levels after 1 year of chemotherapy were significantly reduced (median 0.13 ng/ml, interquartile range 0.02; 0.35 ng/ml) when compared to levels before chemotherapy (median 2.84 ng/ml, interquartile range 1.26; 4.65 ng/ml;  $p < 0.0001$ ). Despite the significant reduction in AMH levels, 74.7% of the women had return of menses by 1-year post treatment. The treatment regimen significantly influenced the reduction of AMH levels after 1-year post chemotherapy treatment. The CMF treatment group demonstrated a greater ovarian reserve reduction when compared to other chemotherapeutic regimens treatment group. Our study did not show statistical difference when other comparisons were made between the treatment groups. In addition, adjuvant tamoxifen use did not alter AMH levels 1-year post chemotherapy. Mixed effect model analysis confirmed that, for all the analyzed women (N=134), baseline serum AMH levels ( $p < 0.0001$ ), age ( $p = 0.0438$ ), and regimen ( $p = 0.0259$ ) were related to the reduction in AMH levels 1-year after chemotherapy treatment. Women treated for breast cancer with BRCA mutations have lower baseline serum AMH levels and lower rates of ovarian recovery after chemotherapy treatment compared to non-mutated

women and untested women with low risk of mutation. This longitudinal study demonstrated that chemotherapy regimens commonly used in the treatment of breast cancer in postmenopausal women significantly reduced serum concentrations of AMH 1-year after the end of treatment, suggesting a significant impairment of the ovarian reserve. The fact that most of the patients present menstrual cycles, despite the low levels of AMH, suggests that the presence of menstruation is not an accurate marker of ovarian reserve. The type of chemotherapy regimen used in oncological treatment has been shown to influence the ovarian reserve impairment. Adjuvant treatment with tamoxifen does not exacerbate the impairment of the chemotherapy-induced damage to ovarian reserve. We have shown that age, baseline AMH levels, and type of chemotherapy regimen are the most important predictors of ovarian reserve after cytotoxic treatment. In addition, we generated the first nomogram to predict the impact of chemotherapy on ovarian reserve in women diagnosed with breast cancer at reproductive age who will undergo chemotherapy. The nomogram described should be prospectively validated in new studies. In addition, the presence of mutations in BRCA may place women at reproductive disadvantage when exposed to genotoxic stress. These findings have significant bearing both on fertility preservation counseling as well as reproductive aging research and treatment.

**Keywords:** Fertility Preservation. Chemotherapy, Adjuvant. Breast cancer. Anti-Mullerian Hormone. Genes, BRCA1. Genes, BRCA2. Ovarian reserve

## Lista de Figuras

- Figura 1 - Regressão linear univariada dos níveis de HAM basais ajustados para a idade, entre as 38 mulheres não testadas para mutações no BRCA que apresentavam história familiar negativa para a mutação.....39
- Figura 2 - Fluxograma do estudo.....42
- Figura 3 - Concentrações de HAM antes e um ano após o término da quimioterapia.....45
- Figura 4 - Concentrações séricas de HAM antes e doze meses após o término do tratamento quimioterápico com AC-T (RT1), CMF (RT2) e outros regimes de tratamento (RT3).....48
- Figura 5 - Gráfico de dispersão para verificar a relação entre a variável HAM aferida antes do início do tratamento quimioterápico em relação a variável idade.....49
- Figura 6 - Modelo de nomograma desenvolvido para prever os níveis séricos de HAM após 1 ano do final da quimioterapia em pacientes na pré-menopausa com câncer de mama.....50
- Figura 7 - Concentrações séricas de HAM basais ajustadas pelos níveis esperados de HAM de acordo com a idade em 117 mulheres com câncer de mama, sendo 38 não testadas para as mutações (baixo risco), 65 negativas e 14 portadoras de mutação patogênica no *BRCA*.....51
- Figura 8 - Recuperação ovariana um ano após o término da quimioterapia para o tratamento do câncer de mama, avaliada pelas concentrações sérias de HAM, em pacientes não testadas (com baixo risco de mutação), *BRCA* negativo e *BRCA* positivo.....52

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1 - Critérios diagnósticos para baixa reserva ovariana e insuficiência ovariana.....	34
Tabela 2 - Estimativa média dos níveis basais ( $\pm$ DP) de HAM.....	37
Tabela 3 - Caracterização das pacientes analisadas no estudo.....	43
Tabela 4 - Comparação das concentrações séricas de HAM (ng/ml) basal e presença de menstruação após 12 meses do término do tratamento quimioterápico.....	46
Tabela 5 - Comparação das concentrações séricas de HAM (ng/ml) um ano após o término da quimioterapia e presença de menstruação após 12 meses do término do tratamento quimioterápico.....	47

## Lista de Siglas

AC-T: Antraciclina + ciclofosfamida + taxano sequencial  
ACT: Antraciclina + ciclofosfamida + taxano concomitante  
AC: Antraciclina + ciclofosfamida  
ADN: Ácido desoxirribonucleico  
ANOVA: Análise de variância  
ASCO: Sociedade Americana de Oncologia Clínica  
ASRM: Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva  
ATM: Ataxia telangiectasia mutado  
BRCA: *Breast cancer gene*  
CMF: Ciclofosfamida + metotrexato + 5- fluorouracil  
CV: Coeficiente de variação  
DP: Desvio padrão  
E2: Estradiol  
EC: Epirubicina + ciclofosfamida  
ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*  
ELISA: Ensaio de imunoabsorção enzimático  
FIV: Fertilização *in vitro*  
FSH: Hormônio folículo estimulante  
HAM: Hormônio Anti-Mulleriano  
HER2: Receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano  
IC: Intervalo de confiança  
IIQ: Intervalo interquartil  
IMC: Índice de massa corporal  
NCCN: *National Comprehensive Cancer Network*  
NCI: *National Cancer Institute*  
NIH: *National Institutes of Health*  
SAS: Sistema de análise estatística  
T: Taxano  
TC: Taxano + ciclofosfamida  
TGF-B: Fator de crescimento transformador beta

# Sumário

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA .....	18
1.2 TRANSIÇÃO DEMOGRÁFICA NOS ESTADOS UNIDOS.....	19
1.3 GONADOTOXICIDADE DOS TRATAMENTOS ONCOLÓGICOS.....	19
1.4 AMENORREIA INDUZIDA PELA QUIMIOTERAPIA .....	21
1.5 HORMÔNIO ANTI-MULLERIANO .....	22
1.6 MUTAÇÕES DOS GENES <i>BRCA1</i> E <i>BRCA2</i> .....	23
1.7 FERTILIDADE COMO UMA PREOCUPAÇÃO PARA SOBREVIVENTES DE CÂNCER DE MAMA .....	24
1.8 CRIAÇÃO DE OPÇÕES INDIVIDUALIZADAS PARA TENTATIVA DE PRESERVAÇÃO DA FERTILIDADE EM PACIENTES COM CÂNCER.....	25
1.9 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO .....	26
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
2.1 OBJETIVO PRIMÁRIO .....	29
2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS .....	29
<b>CASUÍSTICA E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
3.1 DESENHO DO ESTUDO, CONTEXTO E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	32
3.2 PACIENTES .....	32
3.3 PROCEDIMENTOS DO ESTUDO.....	33
3.3.1 <i>Coleta das amostras e avaliação dos marcadores bioquímicos pré e pós-quimioterapia...</i>	34
3.3.2 <i>Seguimento após a quimioterapia .....</i>	34
3.4 VARIÁVEIS ANALISADAS .....	35
3.4.1 <i>Variáveis dependentes .....</i>	35
3.4.2 <i>Variáveis independentes .....</i>	35
3.5 FONTES DE DADOS E METODOLOGIAS .....	35
3.5.1 <i>Mensuração das concentrações séricas de HAM .....</i>	37
3.6. MEDIDAS PARA EVITAR POTENCIAIS VIESES .....	37
3.7 CASUÍSTICA.....	37
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	38
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>41</b>
4.1 FLUXOGRAMA DO ESTUDO .....	42
4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS PACIENTES ANALISADAS NO ESTUDO .....	43
4.3 CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE HORMÔNIO ANTI-MULLERIANO E PADRÃO MENSTRUAL .....	45

4.4 OUTRAS ANÁLISES .....	47
4.4.1 <i>Concentrações séricas de hormônio anti-Mulleriano nos diferentes regimes de quimioterapia</i> .....	47
4.4.2 <i>Concentrações séricas de hormônio anti-Mulleriano e terapia com tamoxifeno</i> .....	48
4.4.3 <i>Determinação de quais variáveis qualitativas ou quantitativas possuem a melhor capacidade de predizer o comprometimento da reserva ovariana</i> .....	48
4.4.4 <i>Desenvolvimento de um modelo de predição de comprometimento de reserva ovariana</i> .	49
4.4.5 <i>Mutações BRCA1 ou BRCA2 e comprometimento da reserva ovariana</i> .....	50
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>62</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>65</b>

## *Introdução*

---

## INTRODUÇÃO

### 1.1 Epidemiologia do câncer de mama

O câncer é um problema de saúde pública mundial e é a segunda principal causa de morte nos Estados Unidos (Xu *et al.*, 2016). O câncer de mama é o tipo de câncer mais comum entre mulheres nos Estados Unidos. Em 2018, estimativas apontam que 266.120 novos casos de câncer de mama serão diagnosticados entre mulheres americanas, correspondendo a 30% de todos os novos casos de câncer diagnosticados em mulheres, sendo que uma a cada oito mulheres será diagnosticada com câncer de mama durante a sua vida (Siegel *et al.*, 2018). O padrão de incidência do câncer reflete tendências em comportamentos associados com aumento do risco de câncer e mudanças na prática clínica, tal como a melhoria dos métodos de rastreamento do câncer, que resultou em leve aumento (0,4%) do número de diagnósticos de câncer de mama em mulheres nos últimos anos (Siegel *et al.*, 2018). Nos Estados Unidos, estimativas apontam que 1,9% das mulheres saudáveis em idade reprodutiva (do nascimento até os 49 anos de idade) serão diagnosticadas com câncer de mama (Siegel *et al.*, 2018).

Concomitantemente, a detecção do câncer em estágios precoces e o avanço das modalidades de tratamento contribuíram para o declínio das taxas de mortalidade (Siegel *et al.*, 2018). A taxa de mortalidade para câncer de mama reduziu em 39% de 1989 até 2015, com atual taxa de sobrevivência em cinco anos de 90% (Siegel *et al.*, 2018). Em 2012, aproximadamente 14 milhões de pessoas nos Estados Unidos eram sobreviventes ao câncer, o que corresponde a um aumento de aproximadamente 3,5 vezes quando comparado com 1975. Mulheres com câncer de mama respondem por 22% dos sobreviventes, com aproximadamente 3 milhões de mulheres, constituindo o maior grupo de mulheres sobreviventes do câncer (de Moor *et al.*, 2013). Estimativas apontam que até 2022, o número de sobreviventes ao câncer aumentará em 31% para quase 18 milhões, o que corresponde a um aumento de mais de 4 milhões de sobreviventes em 10 anos (de Moor *et al.*, 2013). Este aumento das taxas de sobrevivência reflete em um maior interesse na manutenção da qualidade de vida dessas mulheres após o tratamento oncológico.

## 1.2 Transição demográfica nos Estados Unidos

A importância da fertilidade para jovens sobreviventes do câncer de mama é agravado pela mudança nos padrões demográficos da sociedade contemporânea. As mulheres norte americanas estão cada vez mais adiando a maternidade. As taxas de gravidez para mulheres com menos de 30 anos caíram durante 1990-2009, enquanto as taxas para mulheres com 30 anos ou mais aumentaram (Curtin *et al.*, 2013). Um número crescente de casais contará com técnicas de reprodução assistida para alcançar a gravidez puramente devido ao declínio da fertilidade com o avançar da idade (Broekmans *et al.*, 2007). Essa mudança social resultará em mais mulheres em tratamento para câncer de mama em um momento em que não possuem prole constituída.

## 1.3 Gonadotoxicidade dos tratamentos oncológicos

A quimioterapia resulta em uma melhora tanto na sobrevida livre de doença quanto na sobrevida global, especialmente em pacientes com câncer de mama, com um risco aumentado de recorrência (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 2005). A maioria dos *guidelines* recomenda rotineiramente o tratamento quimioterápico para mulheres com câncer de mama em estágios iniciais, com exceção daquelas com tumores endócrino-sensíveis e com características prognósticas favoráveis (Goldhirsch *et al.*, 2007). Entretanto, por razões ainda desconhecidas, o câncer de mama em mulheres jovens é associado com características prognósticas desfavoráveis e maiores taxas de recorrência quando comparado com mulheres diagnosticadas em idade avançada (Anders *et al.*, 2008). Por essas razões a maioria das mulheres diagnosticadas com câncer de mama em idade reprodutiva será tratada com tratamento quimioterápico (Villarreal-Garza *et al.*, 2016).

As diretrizes da *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) (NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology, 2015) para o tratamento do câncer de mama recomendam diversos esquemas de quimioterapia (neo)adjuvantes, incluindo antraciclina-ciclofosfamida e taxano (AC-T) sequencial; antraciclina-ciclofosfamida e taxano (ACT) concomitantes; antraciclina-ciclofosfamida sem taxano (AC); ciclofosfamida, metotrexato e 5-fluorouracil (CMF); taxano e ciclofosfamida (TC); epirubicina e ciclofosfamida (EC); e taxano (T). Entre eles, o AC-T sequencial é o regime padrão mais comumente aceito (De Laurentiis *et al.*, 2008; Gandhi *et al.*, 2015).

No entanto, o tratamento quimioterápico está associado a complicações agudas e de

longo prazo para a sobrevivente do câncer de mama. A quimioterapia têm um impacto negativo significativo na função endócrina e reprodutiva do ovário. Além disso, a insuficiência ovariana pode aumentar o risco de osteoporose, doenças cardiovasculares e perda de libido em um número relevante de mulheres. Baseado em modelos de estudos experimentais, acredita-se que agentes alquilantes, tais como a ciclofosfamida, causam a morte dos folículos primordiais por meio de um mecanismo apoptótico (Plowchalk *et al.*, 1991). Da mesma maneira, demonstrou-se que a doxorubicina induz a apoptose dos óvulos (Morita *et al.*, 2000; Perez *et al.*, 1997; Jurisicova *et al.*, 2006). Entretanto, o mecanismo e a extensão dos danos aos folículos primordiais em resposta aos regimes quimioterápicos atualmente relevantes não foi completamente elucidada. Por exemplo, lesões ao endotélio vascular foram descritas em biópsias ovarianas de pacientes que foram previamente expostas à quimioterapia (Meirow *et al.*, 2006). Além disso, outro mecanismo proposto recentemente sugere que a quimioterapia *in vivo* provoque a ativação e crescimento folicular, causando um *burnout* e depleção da reserva ovariana (Kalich-Philosoph *et al.*, 2013).

Enquanto a reserva ovariana consiste em aproximadamente dois milhões de folículos primordiais ao nascimento (Gosden *et al.*, 1994), durante a puberdade o número de folículos primordiais é reduzido para aproximadamente 500.000, e ao atingir a menopausa esse número se reduz a cerca de mil folículos. Considerando que apenas cerca de 450 óvulos serão ovulados durante a vida de uma mulher, 99,9% dos óvulos restantes serão desperdiçados devido à morte celular por apoptose durante a vida reprodutiva (Gosden *et al.*, 1994). Os agentes quimioterápicos gonadotóxicos facilitam o processo de envelhecimento dos ovários, causando a morte prematura e acelerada de folículos (Kalich-Philosoph *et al.*, 2013; Meirow *et al.*, 2001; Tilly *et al.*, 2002; Carroll *et al.*, 2013). O risco de insuficiência ovariana aumenta em pacientes submetidas a quimioterapia em idade mais avançada, pois o número de folículos primordiais remanescentes diminui com a idade. Entretanto, a idade por si só não pode ser a única variável utilizada para orientar estas pacientes sobre a probabilidade de insuficiência ovariana e infertilidade após a quimioterapia (Licciardi *et al.*, 1995; Nikolaou *et al.*, 2003).

Os principais determinantes da magnitude do impacto do tratamento quimioterápico na reserva ovariana das mulheres diagnosticadas com câncer de mama estão relacionados à idade da paciente, à reserva ovariana prévia ao tratamento e à dose e tipo dos agentes quimioterápicos utilizados, particularmente à dose dos agentes alquilantes, tais como a ciclofosfamida (Lee *et al.*, 2006), pois esses são reconhecidamente os agentes mais agressivos para a reserva ovariana. Em consequência disso, e dependendo da idade da paciente, a insuficiência ovariana pode ocorrer imediatamente ou prematuramente após a

quimioterapia (Byrne *et al.*, 1992). O dano pode ser agravado pelo atraso após o tratamento oncológico para liberação das tentativas de gravidez.

#### 1.4 Amenorreia induzida pela quimioterapia

Grande parte dos estudos realizados para avaliação do impacto dos tratamentos quimioterápicos na função reprodutiva das pacientes com câncer de mama utilizaram principalmente o padrão menstrual como parâmetro de fertilidade (Bines *et al.*, 1996; Hortobagyi *et al.*, 1986; Fornier *et al.*, 2002). A maioria desses estudos realizou seguimento a curto prazo das pacientes, o que subestima o grau de comprometimento da reserva ovariana, já que se espera um maior número de pacientes diagnosticadas com insuficiência ovariana quando realizado um seguimento a longo prazo (Byrne *et al.*, 1992). A menstruação pode cessar temporariamente após quimioterapia para o tratamento do câncer de mama, geralmente por até 6 meses após a conclusão da quimioterapia (Tilly *et al.*, 2002). Isto ocorre devido a ação da maioria dos agentes quimioterápicos, que danificam os folículos pré-antrais e antrais, independente do fato de apresentarem qualquer efeito sobre os folículos primordiais. Fisiologicamente, os folículos primordiais sofrem recrutamento inicial para entrar no *pool* crescente de folículos primários, porém a duração necessária para esta etapa é desconhecida. No ovário humano, são necessários mais de 120 dias para que os folículos primários atinjam o estágio de folículos secundários, enquanto aproximadamente 70 dias são necessários para que os folículos secundários atinjam o estágio antral inicial (McGee *et al.*, 2000). Sendo assim, como um folículo primordial pode demorar mais de 6 meses para alcançar os estágios finais de desenvolvimento, nas mulheres que não perderam inteiramente sua reserva ovariana, o retorno da menstruação pode demorar esse tempo para acontecer. Devido a isso, a presença de amenorreia durante os primeiros 6 meses após a quimioterapia não é considerada como sinal de comprometimento da reserva ovariana (Tilly *et al.*, 2002). A menopausa é o último sinal do quadro de insuficiência ovariana (e consequente infertilidade), seja devido ao envelhecimento ovariano natural ou secundário a tratamentos médicos. No momento em que amenorreia ocorre, a infertilidade é irreversível, a não ser pela opção de fertilização *in vitro* (FIV) utilizando óvulos de doadora. Além disso, mesmo que as mulheres continuem a menstruar até aproximadamente 50 anos de idade, as taxas de fertilidade diminuem significativamente após os 40 anos, com taxas de fecundidade bastante limitadas após os 45 anos de idade (te Velde *et al.*, 2002).

Do ponto de vista de saúde reprodutiva, a estimativa das taxas de amenorreia induzida

pela quimioterapia não é suficiente para avaliar a reserva ovariana. Isto é importante não só para detecção de riscos a fertilidade, mas também para escolher corretamente o tratamento endocrinológico adjuvante. Uma revisão sistemática de ensaios clínicos randomizados avaliando a incidência de amenorreia após tratamento quimioterápico revelou que 55 a 67% das pacientes apresentavam amenorreia após a quimioterapia (Zavos *et al.*, 2016). A taxa de amenorreia foi maior em mulheres com idade reprodutiva avançada, com estimativa de 25% (IC 95%, 12-43%), 39% (IC 95%, 31-58%), e 77% (IC 95%, 71-83%) para mulheres <35, 35-40, >40 anos de idade, respectivamente (Zavos *et al.*, 2016). O maior risco de amenorreia após quimioterapia ocorreu em mulheres com idade >40 anos que receberam esquema quimioterápico contendo ciclofosfamida, metotrexato e 5-fluorouracil (CMF) ou esquema com antraciclina (com exceção AC x 4) (Zavos *et al.*, 2016). Entretanto, o mesmo estudo apontou uma limitação importante na literatura atual, que é a falta de definição uniforme de amenorreia após quimioterapia. Dezenove diferentes definições foram encontradas pelos autores do estudo, o que poderia resultar em uma diferença de 32% entre a menor e maior taxa de amenorreia de acordo com a definição utilizada (Zavos *et al.*, 2016). Outro aspecto que deve ser considerado ao interpretar os resultados dos estudos sobre amenorreia após quimioterapia, é o valor do termo amenorreia *per se*. Independente da definição utilizada para amenorreia após quimioterapia, a cessação da menstruação é apenas um marcador subjetivo para a função ovariana e não deve ser considerado sinónimo de insuficiência ovariana verdadeira. De fato, verificou-se que os níveis de estrogênio podem permanecer elevados apesar da presença de amenorreia após quimioterapia por mais de 12 meses (Smith *et al.*, 2006).

### 1.5 Hormônio Anti-Mulleriano

O hormônio anti-Mulleriano (HAM) é membro da família de fatores de crescimento transformador beta (TGF-B). Nos últimos anos, os níveis de HAM têm sido sugerido, em um número crescente de estudos, como o marcador mais confiável da reserva ovariana, provavelmente porque esse hormônio é produzido por células da granulosa de folículos pré-antrais e antrais em desenvolvimento, refletindo o tamanho do *pool* de folículos primordiais (Fanchin *et al.*, 2003; Durlinger *et al.*, 2002; Fanchin *et al.*, 2003; van Rooij *et al.*, 2002). Em mulheres adultas, os níveis séricos de HAM apresentam uma redução progressiva com o avanço da idade, semelhante ao que ocorre com o *pool* de folículos primordiais (Seifer *et al.*, 2011), tornando-se indetectáveis na menopausa (de Vet *et al.*, 2002).

O nível de HAM parece ser um indicador direto e precoce de declínio da função ovariana e pode ser o melhor marcador bioquímico da função ovariana em uma série de situações clínicas (Dewailly *et al.*, 2014). Um número crescente de evidências científicas apoiam o uso dos níveis séricos do HAM como marcador de reserva ovariana em pacientes diagnosticadas com câncer de mama submetidas a tratamentos oncológicos e pacientes que tiveram lesão ovariana significativa por radiação ou cirurgia (Anders *et al.*, 2008; Anderson *et al.*, 2011; Anderson *et al.*, 2006; Dillon *et al.*, 2013; Lutchman *et al.*, 2007; Salter *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2010).

Em pacientes que planejam realizar tratamento de fertilização *in vitro*, as concentrações séricas de HAM se correlacionam com o número de óvulos recuperados após a estimulação ovariana e o HAM é o melhor biomarcador para prever extremos de resposta ovariana, tais como resposta ovariana excessiva e baixa resposta (Broekmans *et al.*, 2006; Anckaert *et al.*, 2012; Broer *et al.*, 2011; Nardo *et al.*, 2009). As concentrações séricas de HAM têm sido aferidas em diferentes estágios do ciclo menstrual, sugerindo-se flutuação mínima dessas aferições ao longo do ciclo (Cook *et al.*, 2000). Além disso, o HAM também apresentou a menor variação ciclo-a-ciclo, quando comparado com o hormônio folículo estimulante (FSH), estradiol (E2), inibina-B e contagem de folículos antrais (Broekmans *et al.*, 2006). Portanto o HAM parece ser um marcador da reserva ovariana conveniente, reprodutível e confiável. Acredita-se que este marcador irá fornecer a melhor correlação com a reserva ovariana remanescente após a quimioterapia.

### 1.6 Mutações dos genes *BRCA1* e *BRCA2*

Os genes *Breast cancer gene (BRCA)*, *BRCA1* e *BRCA2*, localizados no cromossomo 17 (*BRCA1*) e no cromossomo 13 (*BRCA2*), são membros-chave da via de reparação da quebra da cadeia dupla do ácido desoxirribonucleico (ADN) mediada por ataxia-telangiectasia mutado (ATM). Mutações nesses genes estão associadas a um risco aumentado de câncer de mama, ovário e outros tipos de câncer (Economopoulou *et al.*, 2015).

O dano ao ADN tem um impacto negativo significativo nos desfechos reprodutivos. Em células que se dividem rapidamente, o dano não reparado ao ADN, que não é iminentemente letal para a célula, pode causar erros de replicação e, portanto, mutações. Quase todas as mutações são tipicamente deletérias à sobrevivência celular e, portanto, não são passadas para a próxima geração de células. Em células que permanecem em repouso, como oócitos folículos primordiais, o dano ao ADN é particularmente importante, porque se

acumula ao longo do tempo devido à ausência de mecanismos para eliminar as células defeituosas durante a replicação (Titus *et al.*, 2013).

Existem vários tipos de danos no ADN, incluindo ligações cruzadas e alterações de base. No entanto, um dos tipos mais perigosos de danos no ADN é a quebra da dupla fita. A quebra da dupla fita de ADN não reparada ou incorretamente reparada pode causar uma variedade de rearranjos genômicos e alterações estruturais, incluindo quebras cromossômicas, translocações, deleções e mutações pontuais, levando à apoptose de oócitos, comprometimento do crescimento ou da maturação do oócito, infertilidade, aborto espontâneo ou defeitos genéticos na prole (Oktay *et al.*, 2015). Alguns agentes quimioterapêuticos, como cisplatina, ciclofosfamida e doxorrubicina, são conhecidos por induzir quebra da dupla fita de ADN através de uma variedade de mecanismos diferentes.

Um estudo avaliando mulheres diagnosticadas com câncer de mama, que foram submetidas a um protocolo de estimulação ovariana combinando gonadotrofinas com inibidor de aromatase para tentativa de preservação da fertilidade via criopreservação de embriões, demonstrou que mulheres com mutações BRCA1 tiveram menos óvulos quando comparadas com mulheres sem a mutação (Oktay *et al.*, 2010). Além disso, estudos subsequentes demonstraram que mulheres com mutações no gene BRCA1 apresentam menores níveis séricos de HAM basais (Wang *et al.*, 2014) e podem apresentar menopausa mais precoce quando comparadas com controles (Lin *et al.*, 2013).

A integridade do mecanismo de reparo do ADN é essencial para manter a saúde dos óvulos e a possível razão pela qual as mulheres com mutações nos genes BRCA têm menor reserva ovariana é o envelhecimento acelerado devido ao reparo deficiente do ADN dos óvulos (Titus *et al.*, 2013; Oktay *et al.*, 2015). Pesquisadores demonstraram que a quimioterapia gonadotóxica induz quebras de fitas duplas de ADN em óvulos humanos, que por sua vez ativam as vias apoptóticas e, portanto, causam perda da reserva ovariana (Li *et al.*, 2014). Os mecanismos de reparo do ADN também podem ser importantes na proteção dos óvulos contra danos no ADN induzidos pela quimioterapia (Li, *et al.*, 2014).

### 1.7 Fertilidade como uma preocupação para sobreviventes de câncer de mama

Uma preocupação especial das mulheres diagnosticadas com câncer de mama em idade reprodutiva é o seu potencial reprodutivo após a quimioterapia. Muitas temem que o diagnóstico de câncer ou seu tratamento comprometa adversamente a fertilidade. O impacto psicológico da infertilidade relacionada aos tratamentos oncológicos é profundo, com muitas

sobreviventes sofrendo de estresse, luto e depressão (Carter *et al.*, 2005). Apesar dessas preocupações, muitas relatam que receberam pouca informação de seus médicos sobre técnicas para tentativa de preservação da fertilidade (Schover *et al.*, 1999). Como resultado, a Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) e o Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (ASRM) publicaram diretrizes para encorajar os médicos a encaminharem seus pacientes com câncer a especialistas em reprodução humana para discutir estratégias visando a tentativa de preservação da fertilidade e as chances futuras de concepção (Loren *et al.*, 2013; Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine, 2013).

Visto que aproximadamente 25% de todos os casos de câncer de mama são diagnosticados em idade fértil (Ferlay *et al.*, 2015), a preocupação com o impacto da quimioterapia na reserva ovariana pode afetar a decisão em relação à escolha do tratamento do câncer de mama (Partridge *et al.*, 2004). Em uma pesquisa on-line que incluiu 657 mulheres sobreviventes do câncer de mama, 57% mostraram-se preocupadas em se tornar inférteis após o tratamento quimioterápico e 29% afirmaram que o risco de acometimento da reserva ovariana afetou a decisão pelo tipo de tratamento escolhido (Partridge *et al.*, 2004). Apesar dos estudos que investigam os efeitos colaterais dos regimes tradicionais de tratamento do câncer de mama, os dados são extremamente limitados em relação aos desfechos de fertilidade após a quimioterapia (Walshe *et al.*, 2006). Portanto, mulheres com câncer de mama claramente merecem atenção especial e orientações sobre os potenciais efeitos da quimioterapia sobre a reserva ovariana.

Este projeto foi elaborado como resposta direta ao relatório do *National Cancer Institute (NCI) Breast Cancer Progress Review Group 2005*, bem como às recomendações do *President's Cancer Panel*, que definiram como prioridade os projetos de pesquisa que abordarem a qualidade de vida dos sobreviventes de tratamentos oncológicos, assim como os possíveis efeitos colaterais de tais tratamentos. Como citado na declaração do Diretor do NCI "... nós precisamos ajudar pacientes com câncer a viver após o câncer". Apesar dos riscos de insuficiência ovariana e infertilidade em mulheres submetidas à tratamentos oncológicos terem grande impacto na qualidade de vida das mulheres com câncer, este assunto atraiu pouca atenção até muito recentemente. Atualmente o *President's Cancer Panel* vem incentivando até mesmo estudos preliminares e descritivos, pois existe pouca informação científica sobre o impacto dos tratamentos oncológicos sobre a reserva ovariana e fertilidade (National Cancer Institute U.S. Department of Health and Human Services, 2006 ).

1.8 Criação de opções individualizadas para tentativa de preservação da fertilidade em pacientes com câncer

A criação de ferramentas para uma melhor estimativa da probabilidade de comprometimento da reserva ovariana após o tratamento quimioterápico é altamente desejável para o aconselhamento de mulheres na menacme com câncer de mama em relação ao seu futuro reprodutivo e a tomada de decisão sobre a utilização de estratégias visando a tentativa de preservação de fertilidade. Para isso, métodos eficazes para a tentativa de preservação de fertilidade devem existir. Nos últimos 10 anos, fluxogramas foram desenvolvidos no intuito de promover uma abordagem individualizada de estratégias visando a tentativa de preservação de fertilidade para mulheres diagnosticadas com câncer (Sonmezer *et al.*, 2004). De acordo com estes fluxogramas, as pacientes deveriam ter acesso a opções personalizadas de estratégias para tentativa de preservação de fertilidade com base em sua idade, presença ou ausência de acometimento oncológico dos ovários, tipo de câncer, o tempo disponível para o tratamento, e da presença ou ausência de um parceiro. Entretanto, os procedimentos para tentativa de preservação de fertilidade podem ser financeiramente dispendiosos, podem apresentar riscos cirúrgicos e podem retardar o início da quimioterapia, além de não, necessariamente, garantirem o sucesso reprodutivo. Portanto, com base em informações mais confiáveis sobre os reais riscos de comprometimento da reserva ovariana após o tratamento quimioterápico, as pacientes poderão decidir a respeito da utilização ou não de estratégias para a tentativa de preservação de fertilidade.

### 1.9 Justificativa do estudo

Os dados disponíveis sobre a probabilidade de comprometimento da reserva ovariana e infertilidade após o tratamento quimioterápico para o câncer de mama em mulheres na menacme são muitas vezes baseados em trabalhos retrospectivos, com pequena casuística e com análise de variáveis pouco específicas para determinação da extensão do dano à reserva ovariana (taxa de amenorreia após o tratamento, por exemplo).

A determinação da toxicidade de cada um dos regimes quimioterápicos mais utilizados para o tratamento do câncer de mama ajudará no aconselhamento dessas pacientes. Mais importante, se a toxicidade destes fármacos for conhecida, regimes quimioterápicos menos gonadotóxicos poderão ser escolhidos (ou desenvolvidos) para mulheres que desejam maximizar suas chances futuras de gravidez.

No momento, não existem modelos de predição precisos para determinar quais mulheres apresentam maior risco de comprometimento da reserva ovariana após a

quimioterapia. Portanto, a decisão sobre a realização de procedimentos para tentativa de preservação da fertilidade pode apresentar-se como um dilema para muitas mulheres em idade reprodutiva que enfrentam o tratamento oncológico.

A caracterização do dano a reserva ovariana apresentado por mulheres com câncer de mama tratadas com quimioterapia é essencial para acessar o risco individual de comprometimento da reserva ovariana e em última instância do desenvolvimento da insuficiência ovariana. O desenvolvimento de um modelo de predição, incluindo o uso dos níveis de HAM basais, bem como outros fatores, tais como a idade da paciente no início do tratamento e tipo de regime quimioterápico, pode permitir uma melhor individualização de aconselhamento sobre o uso de estratégias para tentativa de preservação de fertilidade antes de iniciar tratamento oncológico.

Além disso, supomos que a quimioterapia causaria uma perda mais significativa de reserva ovariana, conforme determinado pelos níveis séricos de HAM, nas mulheres com mutações *BRCA* em comparação àquelas que não possuem essas mutações ou com baixo risco de portar tais mutações (história familiar negativa). Essas diferenças podem ocorrer devido ao reparo deficiente do ADN em seus óvulos, resultando na redução dos níveis de HAM além do que seria esperado com base na idade de cada mulher. Se comprovada, essa hipótese tem fortes implicações clínicas tanto nos tratamentos oncológicos quanto nos desfechos reprodutivos. Se as mulheres com mutações no gene *BRCA* tiverem maior probabilidade de comprometimento da reserva ovariana e, portanto, tornarem-se inférteis e/ou apresentarem baixo prognóstico gestacional se submetidas a estimulação ovariana para fertilização *in vitro* após a quimioterapia, elas podem ser preferencialmente aconselhadas sobre os métodos para tentativa de preservação da fertilidade.

## ***Objetivos***

---

## OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo primário

1. Caracterizar o impacto dos regimes quimioterápicos comumente utilizados no tratamento do câncer de mama em mulheres na menopausa sobre a reserva ovariana avaliada por meio da aferição das concentrações séricas de HAM e calendário menstrual, analisados antes do início do tratamento e um ano após o término do tratamento quimioterápico.

### 2.2 Objetivos secundários

1. Caracterizar o impacto dos diferentes tipos de regimes quimioterápicos (AC-T, CMF e outros regimes quimioterápicos) sobre a reserva ovariana avaliada por meio da aferição das concentrações séricas de HAM, analisados antes do início do tratamento e um ano após o término do tratamento quimioterápico.
2. Caracterizar o impacto do tratamento hormonal adjuvante com tamoxifeno sobre a reserva ovariana avaliada por meio da aferição das concentrações séricas de HAM, analisadas antes do início do tratamento e um ano após o término da quimioterapia, comparando mulheres que realizaram adjuvância com tamoxifeno e mulheres que não realizaram uso do tamoxifeno.
3. Determinar quais variáveis qualitativas (tabagismo, raça, estágio do câncer, mutação BRCA, tipo de regime quimioterápico e uso de tamoxifeno) ou quantitativas (idade, índice de massa corpórea e níveis de HAM basais), isoladamente ou em conjunto, possuem a melhor capacidade de prever a probabilidade de comprometimento da reserva ovariana após um ano do término da quimioterapia avaliada por meio da aferição das concentrações séricas de HAM e calendário menstrual,, analisados antes do início do tratamento e um ano após o término do tratamento quimioterápico. Elaborar um modelo de predição de comprometimento de reserva ovariana utilizando as variáveis identificadas como relevantes.
4. Caracterizar o impacto da mutação dos genes *BRCA* sobre a reserva ovariana avaliada por meio da aferição das concentrações séricas de HAM, analisadas antes do início do tratamento e um ano após o término da quimioterapia, em

mulheres com mutações *BRCA1* ou *BRCA2*, mulheres que não possuem a mutação e mulheres com baixo risco de portar tais mutações.

## *Casuística e Métodos*

---

## CASUÍSTICA E MÉTODOS

### 3.1 Desenho do estudo, contexto e considerações éticas

Este estudo observacional prospectivo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina do *New York Medical College* e do *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* (identificador [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov) NCT00823654). Mulheres na pré-menopausa com diagnóstico de câncer de mama precoce foram abordadas, receberam informações sobre o estudo e, posteriormente, forneceram consentimento informado por escrito para participar.

Todas as pacientes foram recrutadas no *Memorial Sloan Kettering Cancer Center*, em Nova York. As inscrições começaram em janeiro de 2009 e terminaram em Julho de 2016, como parte de um estudo maior financiado pelo NIH (NICHD e NCI; RO1 HD 053112) para avaliar o impacto da quimioterapia do câncer de mama na reserva ovariana.

Baseado na distribuição de pacientes atendidas no *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* no biênio 2007-2008, estimou-se que 74% das participantes receberiam AC-T, 12,5% CMF, e 13,5% outros regimes quimioterápicos. Desta forma, para investigar o impacto dos regimes quimioterápicos mais comumente utilizados no tratamento do câncer de mama em mulheres na menacme sobre a reserva ovariana avaliada por meio da aferição das concentrações séricas de HAM antes e um ano após o término do tratamento quimioterápico, os regimes avaliados foram os acima apresentados.

Foram incluídas no projeto tanto pacientes com tumores receptores de estrogênio positivo como negativo, no entanto, o uso do tamoxifeno como fator de confusão foi investigado durante a análise estatística, pois este fármaco poderia alterar os valores de HAM, devido aos seus efeitos estimulantes no ovário (Oktay *et al.*, 2005). Baseado em dados prévios do *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* no biênio 2007-2008, estimou-se que aproximadamente 80% das pacientes utilizariam tamoxifeno.

### 3.2 Pacientes

Todas as pacientes incluídas no estudo apresentaram os seguintes critérios de elegibilidade:

- a) Idade entre 18-42 anos;
- b) Ciclos menstruais regulares (fluxo menstrual com duração de 2-7 dias e intervalos

de 21-35 dias, pelo menos durante os últimos 12 meses) (Committee on Practice Bulletins-Gynecology, 2012);

c) Ausência de histórico pessoal de doenças/cirurgias ovarianas;

d) Confirmação histológica do câncer de mama;

e) Utilização de um dos regimes quimioterápicos neoadjuvante e/ou adjuvante abaixo especificados:

- 6 ciclos de regime quimioterápico contendo antraciclina, ciclofosfamida e taxano sequencial (AC-T, normalmente com 16 semanas de duração);

- 4 a 8 ciclos de regime quimioterápico não-antracíclico, contendo ciclofosfamida, metotrexato e 5-fluorouracil (CMF, normalmente com 24 semanas de duração);

- 4 a 6 ciclos de regime quimioterápico contendo agentes diversos (AC, EC ou T normalmente com 12 semanas de duração, por exemplo);

f) Presença de boa *performance status* (ECOG 0 ou 1) no momento da inclusão no estudo. Essa escala descreve o nível de performance de um paciente em termos de sua capacidade de cuidar de si mesmo, atividades diárias e capacidade física (caminhar, trabalhar, entre outros).

g) Ausência de história de quimioterapia, cirurgia ovariana ou irradiação pélvica;

h) Ausência de diagnóstico de infertilidade;

i) Ausência de história familiar de falência ovariana prematura;

j) Ausência de uso de contraceptivos hormonais ou indutores da ovulação nos últimos 2 meses.

### 3.3 Procedimentos do estudo

No projeto maior, onde o presente plano de pesquisa está inserido, após o término da quimioterapia, as pacientes seriam acompanhadas com coletas de amostras sanguíneas para dosagem das concentrações séricas de HAM, além de análise do calendário menstrual até o término do estudo previsto para quatro anos de acompanhamento. O acompanhamento foi realizado a cada quatro meses durante o primeiro ano de inclusão no estudo. No segundo ano de inclusão do estudo, o acompanhamento está sendo realizado a cada seis meses. A partir do terceiro ano de seguimento, avaliações anuais estão sendo realizadas, até o máximo de 4 anos após o término da quimioterapia. Apresentamos no presente estudo apenas as análises realizadas antes do início da quimioterapia e um ano após o seu término. Os dados relativos

ao período maior de acompanhamento serão divulgados futuramente, assim que todas as pacientes tiverem concluído o período de acompanhamento definido e houver verba para custear as dosagens de HAM.

As mulheres que se inscreveram forneceram amostras de sangue antes do tratamento e após término do tratamento, nos momentos acima descritos e permitiram o acesso a informações em seus prontuários médicos, tais como idade, tipo de tratamento quimioterápico, calendário menstrual, tabagismo e índice de massa corporal. Todas as mulheres foram entrevistadas por um médico oncologista e forneceram sua história familiar de câncer de mama/ovário e outras informações relevantes para avaliar seu risco de ter uma mutação do gene *BRCA* (ancestralidade judaica ou familiar com uma mutação *BRCA* deletéria conhecida, por exemplo). A história familiar foi coletada na primeira consulta e as diretrizes da NCCN (versão 1.2018) foram seguidas para a decisão da realização do teste de mutação *BRCA* (NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology, 2017).

### 3.3.1 Coleta das amostras e avaliação dos marcadores bioquímicos pré e pós-quimioterapia

Amostras de 20 ml de sangue foram coletadas em tubo de gel (*marble*) no momento da inclusão no estudo, antes de iniciar o tratamento quimioterápico, e um ano após o término do tratamento, independente do dia do ciclo menstrual. Após a coleta, realizava-se a inversão do tubo por 5 vezes, deixando a amostra coagular durante 20 minutos na posição vertical, centrifugando por 10 minutos, a 2.000 g. A seguir, o soro resultante foi alíquotado e armazenado a -80°C até momento da análise. As alíquotas foram enviadas em gelo seco para testes na *Ansh Labs* (Webster, TX) onde foram armazenadas a -80°C.

### 3.3.2 Seguimento após a quimioterapia

Após um ano do término da quimioterapia, as pacientes realizaram coleta de amostra sanguínea para dosagem das concentrações séricas de HAM, além da análise do calendário menstrual. Para as pacientes que apresentavam sangramento genital, eram analisados o intervalo, a duração e o volume de sangramento.

O diagnóstico de comprometimento da reserva ovariana foi realizado por meio da aferição das concentrações séricas de HAM, considerando-se insuficiência ovariana a presença de concentrações séricas de HAM indetectáveis um ano após o término da

quimioterapia (Tabela 1), associada a amenorreia. Concentrações séricas de HAM inferiores a 1.1 ng/ml podem indicar baixa reserva ovariana e redução de fertilidade (Ferraretti *et al.*, 2011).

**Tabela 1** - Critérios diagnósticos para baixa reserva ovariana e insuficiência ovariana

Níveis hormonais	Diagnóstico
HAM $\geq$ 1.1 ng/ml	Reserva ovariana normal
HAM < 1.1 ng/ml	Baixa reserva ovariana
HAM indetectável	Insuficiência ovariana

Fonte: Bedoschi (2018, p. 34)

### 3.4 Variáveis analisadas

#### 3.4.1 Variáveis dependentes

Concentrações séricas de HAM aferidas 12 meses após o término da quimioterapia e calendário menstrual.

#### 3.4.2 Variáveis independentes

Variáveis qualitativas: raça, tabagismo, tipo de regime quimioterápico utilizado, uso de tamoxifeno e mutação *BRCA*.

Variáveis quantitativas: idade, índice de massa corpórea (IMC) e as concentrações séricas de HAM aferidas antes do início da quimioterapia.

### 3.5 Fontes de dados e metodologias

As variáveis idade, raça, índice de massa corpórea, tipo de regime quimioterápico utilizado, tabagismo, uso de tamoxifeno e mutação *BRCA* foram obtidas dos prontuários médicos das pacientes.

A idade foi analisada em anos antes do início do tratamento quimioterápico; o IMC foi calculado pela divisão do peso do indivíduo em quilogramas pelo quadrado de sua altura em metros e categorizado em normal (18,5 a <25), sobrepeso (25 a <30) ou obesidade ( $\geq$ 30); as concentrações séricas de HAM foram expressas em nanogramas por mililitros (ng/ml) e aferidas conforme descrito a seguir. A raça foi analisada conforme informado pelas pacientes

(asiática, negra, branca, entre outras); o tipo de regime quimioterápico utilizado foi categorizado em AC-T (6 ciclos de regime quimioterápico contendo antracíclicos, ciclofosfamida e taxanos), CMF (4-8 ciclos de regime quimioterápico não-antracíclico contendo ciclofosfamida, metotrexato e 5-fluorouracil) ou outros regimes quimioterápicos (4-6 ciclos de regime quimioterápico contendo agentes diversos); o tabagismo foi analisado conforme informado pelas pacientes (sim ou não); o uso de tamoxifeno adjuvante foi analisado conforme descrito em prontuário médico (sim ou não); a mutação do *BRCA* foi analisada conforme descrito em prontuário médico (positivo, negativo ou não testada por baixo risco de mutação) e categorizado em *BRCA1* ou *BRCA2* quando mutação positiva.

A maioria das mulheres forneceram sua história familiar de câncer de mama/ovário e outras informações relevantes para avaliar seu risco de ter uma mutação do gene *BRCA*. A história familiar foi coletada na primeira consulta com um médico oncologista e as diretrizes da NCCN (versão 1.2018) (NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology, 2017)) foram seguidas para a decisão da realização do teste de mutação *BRCA*. As seguintes situações extraídas dos prontuários médicos das pacientes indicavam a realização do teste de mutação *BRCA*:

- a) Histórico familiar positivo para mutação deletéria do gene *BRCA1/BRCA2*;
- b) Histórico pessoal de câncer de mama e um ou mais dos seguintes itens:
  - diagnostico  $\leq 50$  anos de idade com: câncer de mama primário adicional;  $\geq 1$  parente próximo com câncer de mama diagnosticado em qualquer idade;  $\geq 1$  parente próximo com câncer de pâncreas;  $\geq 1$  parente com câncer de próstata escore de *Gleason*  $\geq 7$  ou metastático; histórico familiar desconhecida ou limitada.
  - diagnostico  $\leq 60$  anos com câncer de mama triplo negativo;
  - diagnostico em qualquer idade com:  $\geq 2$  parentes próximos diagnosticados com câncer de mama, câncer de pâncreas ou câncer de próstata escore de *Gleason*  $\geq 7$  ou metastático, em qualquer idade;  $\geq 1$  parente próximo de sangue com câncer de mama  $\leq 50$  anos;  $\geq 1$  parente próximo de sangue com carcinoma ovariano; parente próximo do sexo masculino com câncer de mama; em mulheres com etnia associada a maior frequência de mutação (ancestralidade judaica, por exemplo), o histórico familiar adicional pode não ser necessário;
- c) Mutação patogênica de *BRCA1/BRCA2* detectada por perfis de tumor em qualquer tipo de tumor na ausência de mutação germinativa.

### 3.5.1 Mensuração das concentrações séricas de HAM

O HAM no soro foi dosado utilizando um método enzimático de imunoluminescência quantitativo altamente específico (*picoAMH ELISA*, Ansh Labs, Webster, TX) seguindo as instruções do fabricante. Os níveis de HAM foram expressos em ng/ml e todos os ensaios foram realizados em três dias em meados de agosto de 2017 com um único lote de reagentes. O alcance dinâmico do teste foi de 0,007 ng/ml (0,0038 a 1,091 ng/ml). As amostras foram inicialmente diluídas 1:10 para permanecer dentro do alcance dinâmico do teste. Os valores iniciais quantificados abaixo de 0,03 ng/ml foram novamente testados e quaisquer amostras com valores iniciais >11,5 ng/ml foram novamente testadas em uma diluição de 1:20. O limite de detecção para o HAM foi de 0,002 ng/ml. Todas as densidades ópticas caíram dentro da curva padrão. Ambos os coeficientes de variação (CV) intra e inter-ensaio foram de <7%. Todas as pacientes do estudo foram orientadas a realizar um calendário menstrual durante o acompanhamento.

### 3.6. Medidas para evitar potenciais vieses

O viés de seleção foi evitado convidando todos as mulheres diagnosticadas com câncer de mama com idade  $\leq 42$  anos que foram submetidas à tratamento quimioterápico e preencheram os critérios de elegibilidade para participar do estudo. Desequilíbrios entre grupos em covariáveis relacionadas ao comprometimento da reserva ovariana foram evitados adotando-se critérios de elegibilidade altamente seletivos para inclusão de pacientes. Como a dosagem das concentrações séricas de HAM com diferentes lotes de reagentes pode alterar os resultados obtidos, todos os ensaios foram realizados em três dias consecutivos em meados de agosto de 2017 com um único lote de reagentes. Para evitar viés de detecção, todas as dosagens de HAM foram realizadas por um único técnico com experiência na metodologia e que não tinha acesso a informações clínicas das pacientes. O viés de relato foi evitado apresentando e analisando todos os resultados obtidos.

### 3.7 Casuística

Para responder o objetivo primário do estudo (caracterizar o impacto dos regimes quimioterápicos mais comumente utilizados no tratamento do câncer de mama em mulheres na menopausa sobre a reserva ovariana avaliada por meio da aferição das concentrações séricas

de HAM antes e um ano após o término do tratamento quimioterápico), uma amostra de 100 pacientes seria suficiente para proporcionar  $\geq 80\%$  de poder estatístico para detectar uma redução  $\geq 25\%$  nas concentrações séricas de HAM a partir da linha de base (concentração pré-tratamento), utilizando o teste de Wilcoxon Signed-Rank, com um nível de significância de 0,05. Uma amostra de 135 pacientes seria suficiente para proporcionar  $\geq 90\%$  de poder estatístico para detectar uma redução  $\geq 25\%$  nas concentrações séricas de HAM a partir da linha de base (concentração pré-tratamento), utilizando o teste de Wilcoxon Signed-Rank, com um nível de significância de 0,05. O poder estatístico foi calculado utilizando uma estimativa média dos níveis basais ( $\pm$  DP) dos marcadores da reserva ovariana baseada em dados publicados anteriormente (Tabela 2).

**Tabela 2** - Estimativa média dos níveis basais ( $\pm$  DP) de HAM.

<b>Marcador</b>	<b>Estimativa média (<math>\pm</math> DP)</b>	<b>Referências</b>
HAM (ng/ml)	1,4 $\pm$ 0,3	(de Vet, <i>et al.</i> , 2002; Fanchin <i>et al.</i> , 2003; Scheffer <i>et al.</i> , 2003; van Rooij <i>et al.</i> , 2002)

Fonte: Bedoschi (2018, p. 37)

### 3.8 Análise estatística

Para caracterizar o impacto dos regimes quimioterápicos comumente utilizados no tratamento do câncer de mama em mulheres na menacme sobre a reserva ovariana avaliada por meio da aferição das concentrações séricas de HAM e calendário menstrual, analisados antes do início do tratamento e um ano após o término do tratamento quimioterápico, inicialmente foi realizada uma análise exploratória dos dados, considerando as medidas de posição central: média ou mediana; e as medidas de dispersão: desvio padrão ou intervalo interquartil; dependendo da distribuição da mesma. As variáveis qualitativas foram apresentadas como frequências absolutas e relativas.

Foram construídos gráficos de *boxplot* para verificar a distribuição da variável HAM ao longo do tempo. Gráficos de dispersão foram realizados para verificar a relação da variável HAM aferida antes do início da quimioterapia em relação a idade. O coeficiente de Pearson foi utilizado para estimar a correlação entre as variáveis HAM aferida antes do início do tratamento e idade. As concentrações séricas de HAM foram representadas pela mediana e intervalo interquartil. Os testes não-paramétricos de *Mann-Whitney* (grupos de variáveis com

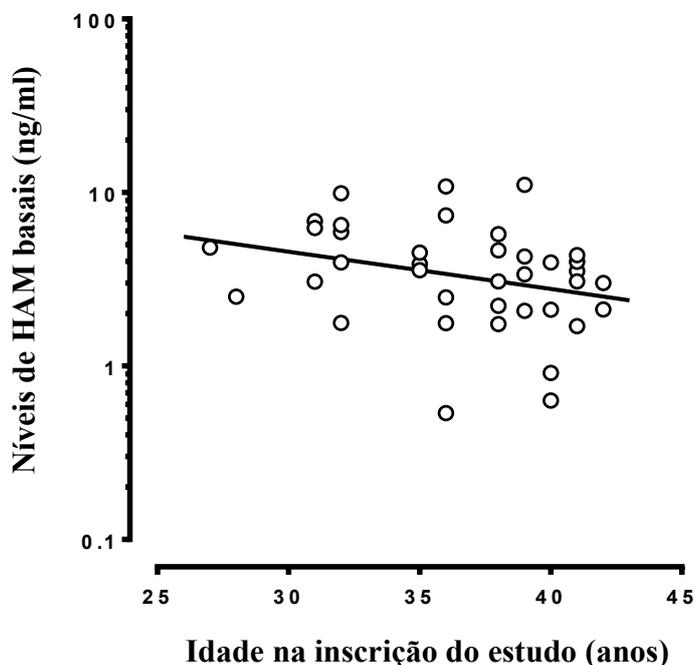
apenas duas classes) e de *Kruskal-Wallis* (grupos de variáveis com três ou mais classes) foram utilizados para comparar as concentrações séricas de HAM em relação as variáveis categóricas. O teste de comparações múltiplas de *Dunn* foi utilizado após o teste de *Kruskal-Wallis*, quando a hipótese nula foi rejeitada pelo teste de *Kruskal-Wallis*. Um modelo linear generalizado foi realizado para verificar quais os fatores estão influenciando na variável HAM antes do início da quimioterapia. Os gráficos foram construídos no programa R versão 3.3.3.

Um modelo de regressão logística múltiplo foi construído para verificar quais variáveis influenciam o desfecho menstruação no período de 12 meses. Foram consideradas como covariáveis somente as variáveis com p-valor menor do que 0,10 na análise univariada. A análise foi baseada em razões de chances (OR) utilizando-se a regressão logística múltipla e intervalos de confiança robustos (IC 95%).

Um modelo de regressão linear de efeitos mistos múltiplo foi construído para verificar quais variáveis deveriam ser incluídas no modelo de predição de comprometimento de reserva ovariana, estabelecido por meio das concentrações séricas de HAM um ano após o término da quimioterapia. Foram considerados como variáveis independentes o tempo, a idade, a raça, a presença da mutação dos genes *BRCA*, o regime de tratamento quimioterápico, o uso de tamoxifeno, o tabagismo, e as interações do tempo com *BRCA* e tamoxifeno. Foi checado o ajuste do modelo considerando uma análise de resíduos. Para que os dados ficassem bem ajustados, foi realizada uma transformação logarítmica na variável resposta. As análises foram implementadas no programa SAS versão 9.4.

Para avaliar se as mulheres com câncer de mama com mutação *BRCA1* ou *BRCA2* apresentam maior susceptibilidade aos tratamentos quimioterápicos quando comparadas com mulheres sem mutação, ou com baixo risco de mutação, foi realizada uma regressão linear univariada nos valores de HAM para as mulheres sem teste BRCA realizado (Figura 1) resultando em um nível esperado de HAM dada a idade da mulher, a fim de considerar a variação dos níveis de HAM com o avançar da idade da mulher. Os resultados de HAM basais (antes do tratamento do câncer) para todas as mulheres foram divididos pelo nível esperado com base na idade, para produzir um resultado de HAM "ajustado" com uma mediana esperada de 1,00 no grupo de referência. Os níveis basais de HAM ajustados foram então comparados entre os três grupos de mulheres com câncer de mama, utilizando análise de variância e testes t, após uma transformação logarítmica.

**Figura 1** - Regressão linear univariada dos níveis de HAM basais ajustados para a idade, entre as 38 mulheres não testadas para mutações no BRCA que apresentavam história familiar negativa para a mutação



Nota: A inclinação foi de  $-0,02154$  ( $F= -3,34$ ,  $p=0,076$ ) com um intercepto de  $1,30525$ . Fonte: Bedoschi (2018, p. 39)

Para estimar a recuperação ovariana, as concentrações séricas de HAM após um ano do tratamento quimioterápico também foram ajustadas para a idade da mulher no momento da coleta, conforme descrito anteriormente. A média geométrica do valor de HAM ajustada ao longo desse período de tempo foi então computada para cada mulher e uma razão entre este valor e seu HAM de base foi computada e relatada como a porcentagem de recuperação. Por exemplo, se a recuperação fosse inferior a 100% (níveis médios ajustados de HAM após um ano do término do tratamento igual ao nível aferido antes do início do tratamento quimioterápico), isso indicaria que a reserva ovariana da mulher não se recuperou completamente. Estas estimativas de recuperação percentual foram então comparadas entre os três grupos *BRCA* de mulheres com câncer de mama usando análise de variância e testes *t*, após uma transformação logarítmica.

***Resultados***

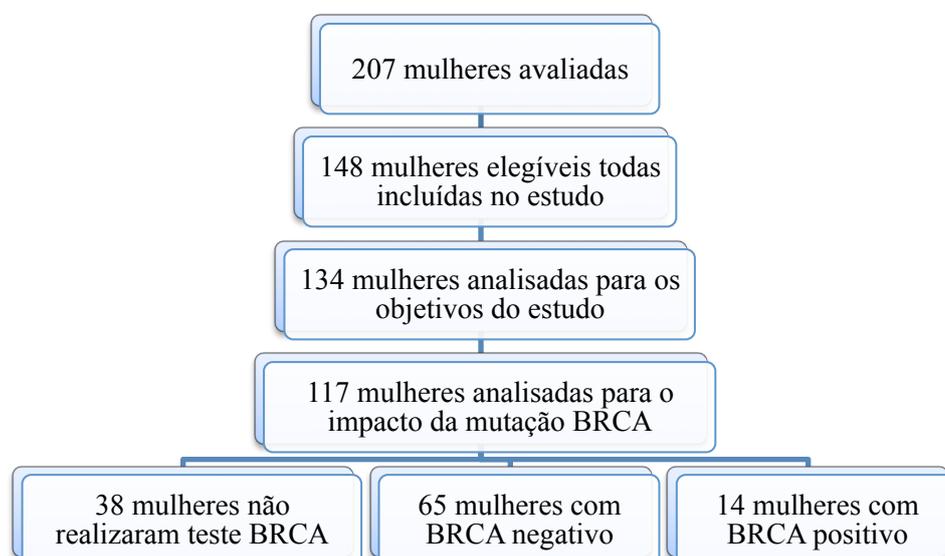
---

## RESULTADOS

### 4.1 Fluxograma do estudo

Todas as mulheres diagnosticadas com câncer de mama em idade reprodutiva atendidas no *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* foram convidadas a participar do estudo no período de Janeiro de 2009 a Julho de 2016. Duzentas e sete pacientes foram examinadas para elegibilidade do estudo. Cento e quarenta e oito pacientes preencheram os critérios de elegibilidade, todas aceitaram participar do estudo, apresentando amostras de sangue com aferição do HAM antes do início do tratamento quimioterápico. Amostras de sangue após um ano do término do tratamento quimioterápico foram obtidas de 134 pacientes, sendo aferidas as concentrações séricas de HAM em todas as amostras. Quatorze pacientes não tiveram amostras de sangue coletadas um ano após o término da quimioterapia, sendo excluídas da análise para os objetivos do estudo. Cento e dezessete mulheres apresentavam dados sobre história familiar de câncer de mama/ovário e outras informações relevantes para avaliar seu risco de ter uma mutação de *BRCA* (ancestralidade judaica ou parente com uma mutação *BRCA* deletéria conhecida, por exemplo), sendo 65 com *BRCA* negativas, 14 positivas e 38 não realizaram o teste *BRCA* por baixo risco de portar as mutações, sendo analisadas para o objetivo secundário do estudo: comparação das concentrações séricas de HAM, em mulheres com mutações *BRCA1* ou *BRCA2* e mulheres que não possuem a mutação ou com baixo risco de portar tais mutações (figura 2).

**Figura 2** - Fluxograma do estudo



#### 4.2 Caracterização das pacientes analisadas no estudo

A média de idade no diagnóstico foi de 36,67 ( $\pm$  3,95) anos. As características das pacientes elegíveis ao estudo estão listadas na Tabela 3. Setenta por cento (70,9%) das pacientes eram brancas e 59,7% apresentavam IMC normal. Cinquenta e oito por cento (58,96%) das pacientes não eram tabagistas. Vinte e nove por cento (29,85%) das pacientes apresentaram estágio 1 e 45,53% eram negativas para nódulos. Setenta e nove por cento (79,11%) eram positivas para receptores de estrógeno e 74,63% positivas para receptores de progesterona. Setenta e sete por cento (77,61%) das pacientes receberam AC-T, 9,7% receberam CMF e 12,69% receberam outros regimes de quimioterapia.

**Tabela 3** - Caracterização das pacientes analisadas no estudo

<b>Variável</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Raça</b>		
Asiática	18	13,44
Negra	12	8,95
Outra	5	3,73
Branca	95	70,90
Indisponível	4	2,98
<b>IMC</b>		
Normal	80	59,70
Sobrepeso	39	29,10
Obesidade	12	8,96
Indisponível	3	2,24
<b>Tabagismo</b>		
Não	79	58,96
Sim	34	25,37
Indisponível	21	15,67
<b>Receptor HER2</b>		
Negativo	97	72,39
Positivo	35	26,12
Indisponível	2	1,49

<b>Variável</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Receptor de estrogênio</b>		
Negativo	26	19,40
Positivo	106	79,11
Indisponível	2	1,49
<b>Receptor de progesterona</b>		
Negativo	32	23,88
Positivo	100	74,63
Indisponível	2	1,49
<b>Estadiamento</b>		
1	40	29,85
2	55	41,05
3	37	27,61
Indisponível	2	1,49
<b>Linfonodos</b>		
N0	61	45,53
N1	43	32,09
N2	18	13,43
N3	10	7,46
Indisponível	2	1,49
<b>Mutação BRCA</b>		
negativo	65	48,51
positivo	14	10,45
Não testado	38	28,35
Indisponível	17	12,69
<b>Tipo de mutação BRCA</b>		
1	6	42,86
2	8	57,14
<b>Regimes de Quimioterapia</b>		
AC-T	104	77,61
CMF	13	9,70
Outros regimes	17	12,69

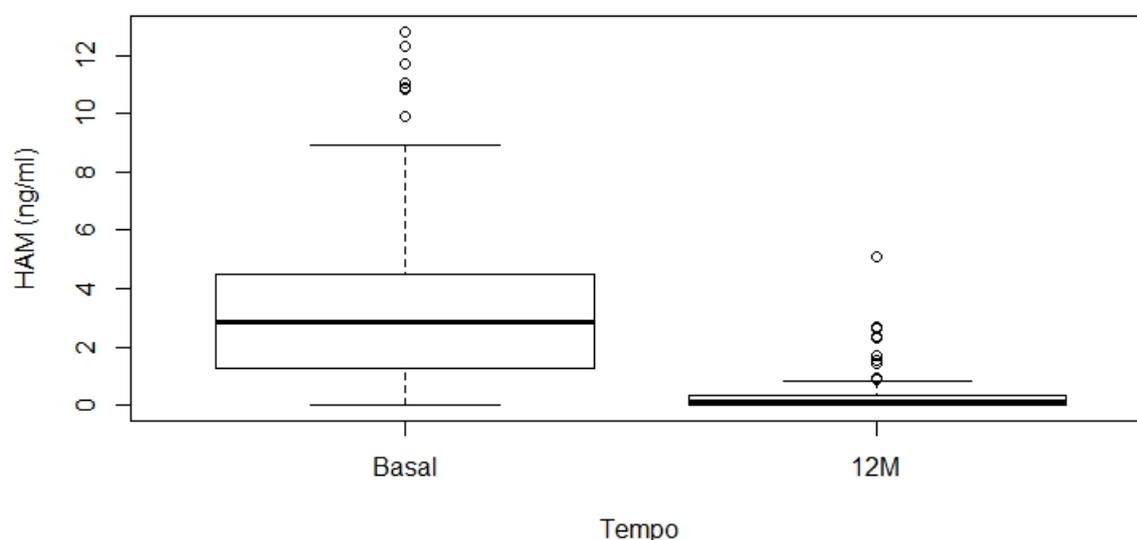
Fonte: Bedoschi (2018, p. 43-44)

### 4.3 Concentrações séricas de hormônio anti-Mulleriano e padrão menstrual

Visando caracterizar o impacto dos regimes quimioterápicos comumente utilizados no tratamento do câncer de mama em mulheres na menopausa sobre a reserva ovariana avaliada por da aferição das concentrações séricas de HAM, as concentrações de HAM foram avaliadas antes e um ano após o término da quimioterapia.

Antes da quimioterapia, a mediana da concentração sérica de HAM foi de 2,84 ng/ml (N=134; intervalo interquartil (IIQ), 1,26; 4,65), sendo que nenhuma paciente apresentou concentrações séricas de HAM basais abaixo do limiar mínimo de detecção do teste. Apenas 21,64% das pacientes apresentavam concentrações séricas de HAM basais <1,1 ng/ml, indicativo de baixa reserva ovariana, enquanto 78,36% apresentavam concentrações séricas de HAM basais  $\geq$  1,1 ng/ml, demonstrando que a maioria das pacientes apresentavam reserva ovariana normal no início do estudo. Um ano após o término da quimioterapia, observou-se uma redução significativa das concentrações séricas de HAM, sendo a mediana da concentração sérica de HAM de 0,13 ng/ml (IIQ, 0,02; 0,35 ng/ml) (Figura 3). Um ano após o término da quimioterapia, as concentrações séricas de HAM foram <1,1 ng/ml em 92,31%, sendo que em 11,54% das pacientes as concentrações apresentavam-se indetectáveis. Apenas 7,69% das pacientes apresentaram concentrações séricas de HAM  $\geq$  1,1 ng/ml após 1 ano do término da quimioterapia. Sendo assim, a percentagem de mulheres com reserva ovariana normal reduziu de maneira significativamente após o tratamento quimioterápico (78,36% vs. 7,69%,  $p < 0,001$ ).

**Figura 3** - Concentrações de HAM antes e um ano após o término da quimioterapia



O calendário menstrual encontrava-se devidamente preenchido em 61,94% (83/134) das pacientes analisadas no estudo. A amenorreia induzida por quimioterapia ocorreu em 25,30% (21/83) das pacientes após 12 meses do término da quimioterapia. Maiores concentrações basais de HAM foram preditivas de um período mais curto de amenorreia induzida pela quimioterapia (Tabela 4).

**Tabela 4** - Comparação das concentrações séricas de HAM (ng/ml) basal e presença de menstruação após 12 meses do término do tratamento quimioterápico

	N	Mediana	Q1	Q3	p-valor
Menstruação 12 meses					
Não	21	1,82	0,80	3,52	0,0351
Sim	62	3,07	1,77	4,43	

Nota: p-valor referente ao teste de Mann Whitney. Fonte: Bedoschi (2018, p. 46)

Visando caracterizar o impacto dos regimes quimioterápicos comumente utilizados no tratamento do câncer de mama em mulheres na menopausa sobre a reserva ovariana avaliada por meio do calendário menstrual, um modelo de regressão logística múltiplo foi construído para verificar quais variáveis influenciam o desfecho menstruação no período de 12 meses. As covariáveis com p-valor menor do que 0,10 na análise univariada, incluídas no modelo de regressão logística múltiplo, foram: IMC ( $p=0,08$ ), estadiamento ( $p=0,04$ ) e níveis de HAM aferidos antes do início do tratamento quimioterápico ( $p=0,03$ ). A variável raça ( $p=0,02$ ) não entrou na análise multivariada por motivos de problemas de separação quase completa. Os problemas de separação são aqueles casos nos quais uma determinada categoria se classifica totalmente em um evento de interesse (presença de menstruação, por exemplo) e, consequentemente, não apresenta nenhum registro no evento complementar (amenorreia, por exemplo). Nesses problemas, ocorre o impedimento da obtenção da razão de chances (OR) na referente categoria devido à formulação matemática do cálculo do OR. A única covariável que influenciou a recuperação do fluxo menstrual no modelo de regressão logístico múltiplo foi a concentração sérica de HAM aferida antes do início do tratamento quimioterápico, que foi maior em pacientes que apresentaram recuperação do fluxo menstrual em comparação com aquelas que não o recuperaram.

Estabelecendo o valor aleatório de HAM aferido antes do início da quimioterapia de 2,2 ng/ml, observamos que as mulheres que apresentaram valores de HAM basais maiores que 2,2 ng/ml, apresentaram maiores taxas de menstruação ao término de um ano do tratamento

quimioterápico do que quando comparadas com mulheres com níveis de HAM basais iguais ou inferiores a 2,2 ng/ml (67,16% vs. 32,84%, respectivamente;  $p=0,0287$ ). A razão de chances para todas as mulheres analisadas ( $N=83$ ) foi de 3,841 (IC 95%, 1,259-11,720).

Além disso, encontramos associação estatisticamente significativa entre as concentrações séricas de HAM das pacientes e seu padrão menstrual um ano após o término da quimioterapia (Tabela 5).

**Tabela 5** - Comparação das concentrações séricas de HAM (ng/ml) um ano após o término da quimioterapia e presença de menstruação após 12 meses do término do tratamento quimioterápico

	<b>N</b>	<b>Mediana</b>	<b>Q1</b>	<b>Q3</b>	<b>p-valor</b>
Menstruação 12 meses					
Não	21	0,017	0,003	0,057	<0,0001
Sim	62	0,18	0,049	0,59	

Nota: p-valor referente ao teste de Mann Whitney. Fonte: Bedoschi (2018, p. 47)

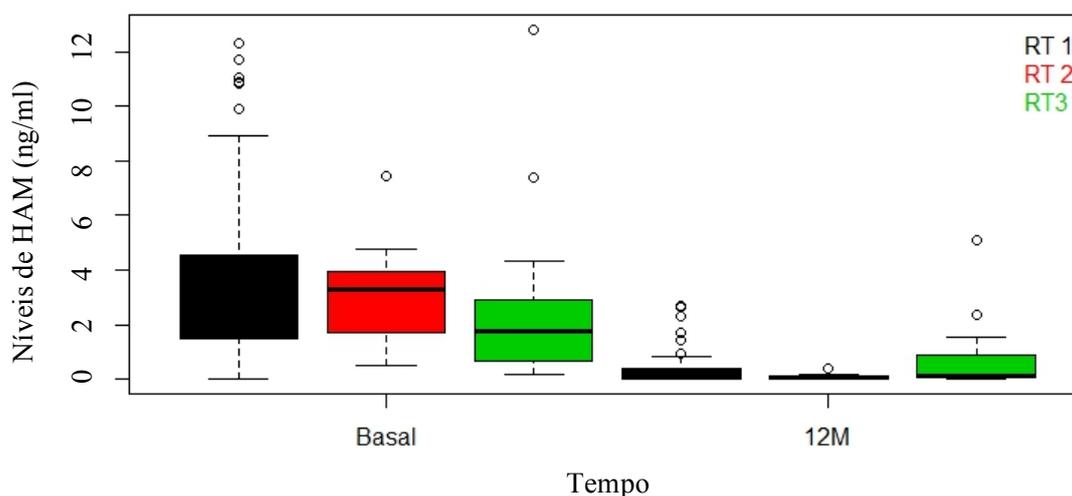
#### 4.4 Outras análises

##### 4.4.1 Concentrações séricas de hormônio anti-Mulleriano nos diferentes regimes de quimioterapia

Antes da quimioterapia, a mediana da concentração sérica de HAM foi de 3,04 ng/ml, 3,29 ng/ml e 1,74 ng/ml para as pacientes que realizaram o regime AC-T ( $N=104$ ; IIQ 1,48; 4,52), CMF ( $N=13$ ; IIQ 1,70; 3,92) e outros regimes quimioterápicos ( $N=17$ ; IIQ 0,66; 2,93), respectivamente. A análise univariada demonstrou que os diferentes grupos de regime de tratamento não apresentavam diferenças estatisticamente significativas nas concentrações séricas de HAM aferidas antes do início do tratamento quimioterápico ( $p=0,17$ ). Um ano após o término da quimioterapia, observou-se uma redução significativa das concentrações séricas de HAM, sendo a mediana da concentração sérica de HAM de 0,14 ng/ml, 0,04 ng/ml e 0,14 ng/ml para as pacientes que realizaram o regime AC-T (IIQ, 0,02; 0,38 ng/ml), CMF (IIQ, 0,03; 0,15 ng/ml) e outros regimes quimioterápicos (IIQ, 0,05; 0,91 ng/ml), respectivamente. A análise univariada demonstrou que o regime de tratamento influenciou de maneira significativa a redução dos níveis do HAM após 1 ano do término do tratamento

quimioterápico (figura 4). O grupo de tratamento que utilizou CMF apresentou maior redução da reserva ovariana quando comparado com o grupo de tratamento que utilizou outros regimes quimioterápicos ( $p=0,049$ ). Não existe diferença estatística entre os grupos AC-T e CMF ( $p=0,099$ ), nem entre os grupos AC-T e outros regimes quimioterápicos ( $p=0,208$ ).

**Figura 4** - Concentrações séricas de HAM antes e doze meses após o término do tratamento quimioterápico com AC-T (RT1), CMF (RT2) e outros regimes de tratamento (RT3)



#### 4.4.2 Concentrações séricas de hormônio anti-Mulleriano e terapia com tamoxifeno

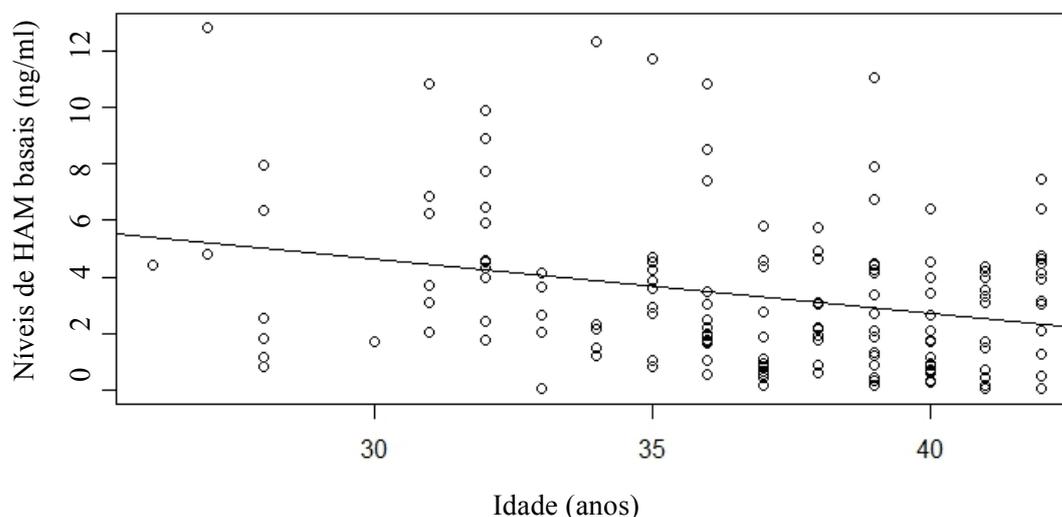
Noventa e seis das 119 pacientes com câncer de mama com receptores de estrogênio positivos (80,7%) receberam tratamento adjuvante com tamoxifeno após a quimioterapia. Pacientes que realizaram adjuvância com tamoxifeno tiveram concentrações séricas de HAM similares (0,13 ng/ml; IIQ, 0,02; 0,33 ng/ml) as de pacientes que não receberam tamoxifeno (0,17 ng/ml; IIQ, 0,04; 0,38 ng/ml;  $p=0,68$ ).

#### 4.4.3 Determinação de quais variáveis qualitativas ou quantitativas possuem a melhor capacidade de predizer o comprometimento da reserva ovariana

A idade foi a única variável preditora de níveis de HAM antes da quimioterapia. Na análise univariada, maior idade no início do estudo foi significativamente associada com níveis mais baixos de HAM, com uma diminuição de 0,19 ng/ml por ano de vida ( $p=0,003$ ) (Figura 5). Esse achado foi consistente na análise multivariada, mostrando apenas a idade

como uma variável que influencia os níveis de HAM ( $p=0,0016$ ), enquanto nenhuma associação com marcadores prognósticos clássicos, como raça, IMC, tabagismo e estágio tumoral.

**Figura 5** - Gráfico de dispersão para verificar a relação entre a variável HAM aferida antes do início do tratamento quimioterápico em relação a variável idade



Nota: Verificamos que existe uma correção inversa entre a idade e o HAM (coeficiente de correlação de Pearson  $-0,2789$ , com  $p$ -valor  $0,003$ ). Considerando um modelo de regressão univariado, com a variável HAM como desfecho e a idade como variável preditora, verificamos que a queda no HAM é de  $0,19$  ng/ml por ano. Fonte: Bedoschi (2018, p. 49).

A análise de regressão linear de efeitos mistos múltiplo confirmou que, para todas as mulheres analisadas ( $N=134$ ), as concentrações séricas de HAM basais ( $p<0,0001$ ), a idade ( $p=0,0438$ ) e o regime de tratamento realizado ( $p=0,0259$ ) foram significativamente e independentemente relacionados com a redução dos níveis de HAM após um ano do término da quimioterapia.

#### 4.4.4 Desenvolvimento de um modelo de predição de comprometimento de reserva ovariana

Os resultados da análise multivariada são apresentados como um nomograma (Figura 6) em que as concentrações séricas de HAM basais, idade da paciente e regime quimioterápico utilizado são dados de entrada para estimar valores de HAM após um ano do término da quimioterapia. Maiores níveis de HAM pós-tratamento serão obtidos em pacientes

com maiores níveis séricos de HAM basais e em idades mais jovens.

**Figura 6** - Modelo de nomograma desenvolvido para predizer os níveis séricos de HAM (pg/ml) após 1 ano do final da quimioterapia em pacientes na pré-menopausa com câncer de mama

$$Y \text{ (pg/ml)} = 1698,52 + (0,106 \times \text{HAM basal em pg/ml}) - (34,52 \times \text{Idade}) - (535,97 \times \text{Regime de Tratamento AC-T}) - (506,88 \times \text{Regime de Tratamento CMF})$$

Nota: A variável regime de tratamento foi transformada em uma variável qualitativa (variável *dummy*). Portanto, se “Regime de Tratamento AC-T” for igual a 1, então o paciente recebeu regime de tratamento AC-T. Caso contrario, o valor deve ser igual a 0. Da mesma maneira, se “Regime de Tratamento CMF” for igual a 1, então a paciente recebeu regime tratamento CMF. Caso contrario, o valor deve ser igual a zero. No modelo de nomograma, os valores de HAM devem ser expressos em picograma por mililitro (pg/ml). Sendo assim, 1 picograma por mililitro (pg/ml) = 0,001 nanograma por mililitro (ng/ml). Fonte: Bedoschi (2018, p. 50)

#### 4.4.5 Mutações BRCA1 ou BRCA2 e comprometimento da reserva ovariana

Cento e dezessete das 134 pacientes analisadas no estudo (87,31%) apresentavam dados sobre história familiar de câncer de mama/ovário e outras informações relevantes para avaliar seu risco de ter uma mutação de BRCA (ancestralidade judaica, por exemplo) e foram analisadas para caracterização do impacto da mutação do BRCA nos níveis de HAM coletados antes do início do tratamento e após um ano do término da quimioterapia. Quatorze pacientes apresentavam mutação patogênica, 65 pacientes apresentavam teste negativo para mutação e 38 pacientes não realizaram o teste para mutação do BRCA por serem de baixo risco para apresentar a mutação.

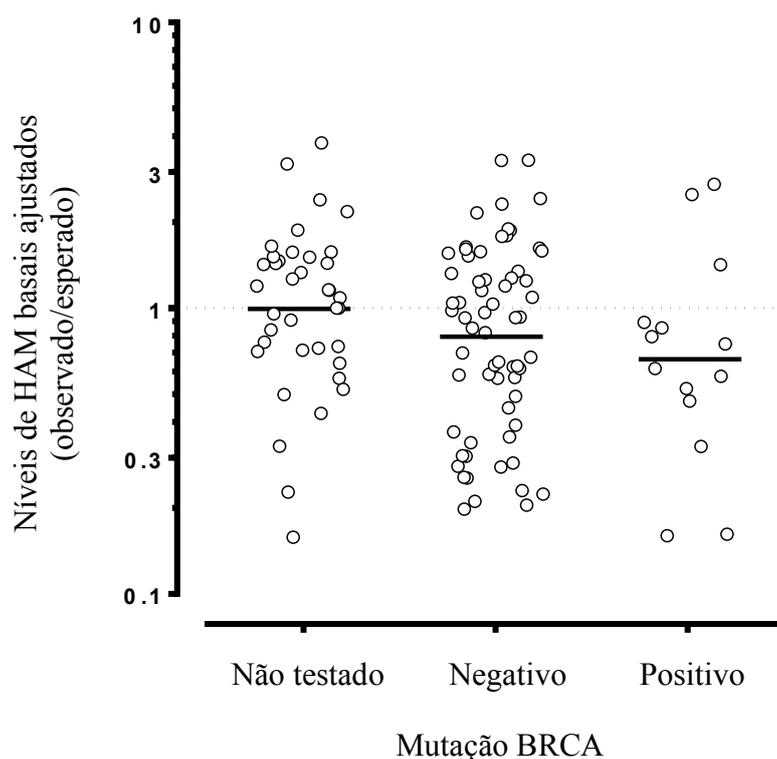
Aquelas com uma mutação BRCA identificada eram um pouco mais jovens (33,7 anos) em comparação com os outros grupos (37,1 e 36,8 anos, para os grupos teste negativo e não testadas, respectivamente), porém sem significância estatística ( $p=0,066$ ). Não houve diferenças significativas no índice de massa corporal (IMC), no status do receptor de estrogênio ou na mediana dos níveis de HAM basal entre os grupos. Os menores níveis de

mediana do HAM basal ocorreram naquelas com uma mutação patogênica *BRCA* identificada. No entanto, dado que aquelas portadoras de mutação tendem a ser mais jovens, os níveis de HAM deveriam ser os mais altos, devido à associação negativa entre idade e HAM.

Os resultados iniciais do HAM em todas as 117 mulheres foram então ajustados dividindo-se pelos níveis esperados de HAM de acordo com a idade de cada mulher. Os resultados são mostrados na Figura 7. A razão das médias geométricas dos níveis de HAM observados para os níveis de HAM esperados para os três grupos de *BRCA* (não testadas, negativas e positivas) são 1,00, 0,79 e 0,66, respectivamente.

A análise de variância com contraste linear (-1, 0, 1) mostra que esse achado não atinge significância estatística ( $p=0,078$ ). Assim, depois de contabilizar a idade, as mulheres negativas ou positivas para mutação *BRCA* (todas tendo uma história familiar positiva) apresentam níveis basais de HAM ajustados para a idade 11% e 34% mais baixos do que as mulheres que não foram testadas (grupo referente, família com história negativa).

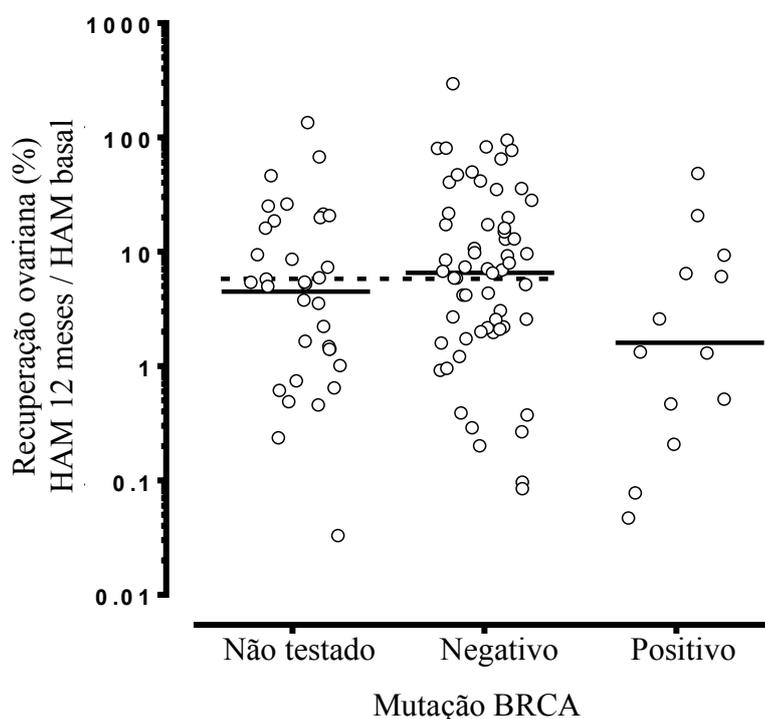
**Figura 7** - Concentrações séricas de HAM basais ajustadas pelos níveis esperados de HAM de acordo com a idade em 117 mulheres com câncer de mama, sendo 38 não testadas para as mutações (baixo risco), 65 negativas e 14 portadoras de mutação patogênica no *BRCA*



A recuperação ovariana foi definida como a média geométrica dos níveis de HAM

ajustados aos 12 meses pós-tratamento. A Figura 8 mostra as distribuições resultantes da recuperação percentual de HAM, estratificadas pelos três grupos de testes *BRCA*. As recuperações médias geométricas foram de 3,71%, 5,25% e 1,62%, respectivamente, em pacientes não testadas, *BRCA* negativo e *BRCA* positivo. A recuperação de 4,61% nos grupos de *BRCA* negativos combinado com o grupo não testado foi 2,8 vezes maior do que a recuperação de 1,62% no grupo positivo de *BRCA* (ANOVA,  $p=0,034$ ,  $F=4,59$ ).

**Figura 8** - Recuperação ovariana um ano após o término da quimioterapia para o tratamento do câncer de mama, avaliada pelas concentrações sérias de HAM, em pacientes não testadas (com baixo risco de mutação), *BRCA* negativo e *BRCA* positivo



Nota: As concentrações sérias de HAM de cada mulher aos 12 meses foram divididas pelo nível esperado com base em sua idade na coleta da amostra. As linhas horizontais sólidas indicam os valores médios geométricos para os três grupos *BRCA* (6,3%, 4,1% e 1,6%, respectivamente para as não testadas, negativas e positivas). A linha tracejada (5,4%) mostra a média geométrica para os grupos não testado e *BRCA* negativo combinados. Fonte: Bedoschi (2018, p. 52).

Como o potencial da recuperação ovariana foi dependente do tipo de quimioterapia, os dados para a recuperação dos ovários foram reanalisados para os três grupos *BRCA* após a restrição para as pacientes tratadas com AC-T. Oitenta e três mulheres foram tratadas com AC-T, sendo 25, 46 e 12, respectivamente, não testadas, negativas e positivas para mutação do *BRCA*. As recuperações médias de HAM para esses novos grupos foram, respectivamente, de 3,2%, 4,7% e 1,3%. O grupo *BRCA* positivo apresentou recuperação ovariana significativamente pior dos níveis séricos de HAM um ano após o término do tratamento quando comparado aos grupos não testados e *BRCA* negativo (1,3 vs. 4,1%, respectivamente; ANOVA,  $p=0,014$ ,  $F=6,28$ ).

## ***Discussão***

---

## DISCUSSÃO

No presente estudo longitudinal prospectivo, nós avaliamos amostras de soro em 134 pacientes com câncer de mama em idade reprodutiva, com idades entre 18 a 42 anos no momento do diagnóstico primário. Os níveis séricos de HAM basais foram maiores em mulheres mais jovens, sendo a idade a única variável preditora dos níveis basais de HAM. Esses resultados são consistentes com os relatados de outros estudos de pacientes com câncer de mama submetidas a tratamento quimioterápico (Bozza *et al.*, 2014).

O HAM é considerado o marcador de reserva ovariana mais confiável em mulheres saudáveis e em pacientes afetadas por várias condições, incluindo aquelas submetidas a tratamentos quimioterápicos (Dewailly *et al.*, 2014). Em nossa amostra, 134 mulheres foram submetidas a quimioterapia (neo)adjuvante e foram incluídas na análise. Observamos uma diminuição significativa nos níveis de HAM após o tratamento quimioterápico. A reserva ovariana em 92,3% das pacientes apresentou-se reduzida após o período de acompanhamento de um ano, com apenas 7,7% das pacientes apresentando níveis séricos de HAM  $\geq 1,1$  ng/ml, que em geral indica reserva ovariana adequada. Esses achados estão de acordo com os dados atuais sobre as concentrações de HAM medidas em pacientes com câncer de mama na pré-menopausa (Anderson *et al.*, 2006; Freour *et al.*, 2017; Dezellus *et al.*, 2017; Partridge *et al.*, 2010; Oktay *et al.*, 2006). No estudo de Anderson *et al.*, os níveis séricos de HAM analisados durante e após um ano do término do tratamento quimioterápico em 42 mulheres diagnosticadas com câncer de mama na pré-menopausa apresentaram uma queda rápida e acentuada durante a quimioterapia, tornando-se indetectáveis em muitas pacientes (Anderson *et al.*, 2006).

As concentrações séricas de HAM podem até aumentar novamente ao longo do tempo, mas o retorno aos níveis basais parece improvável. Nossos resultados demonstram recuperação dos níveis HAM em algumas pacientes. Mulheres com concentrações basais mais altas de HAM tendem a ter concentrações mais altas de HAM após a quimioterapia, como uma variável preditora de maior reserva ovariana. Isso é consistente com os achados de um estudo de Dezellus *et al.*, que investigou 250 pacientes com câncer de mama em idade reprodutiva que receberam quimioterapia (neo)adjuvante. Esses autores relataram que os níveis de HAM analisados após 24 meses do término da quimioterapia apresentavam-se maiores em mulheres com maiores níveis séricos basais de HAM, o que é concordante com nossos resultados, pois encontramos uma redução dos níveis de HAM significativamente maior em pacientes com menores níveis basais de HAM do que em pacientes com níveis normais de HAM (Dezellus *et al.*, 2017). Também confirmamos os resultados publicados por

Rosendahl *et al.*, que demonstraram uma redução importante nos níveis de HAM durante a quimioterapia até um nível indetectável na maioria das mulheres, sendo que as pacientes com níveis séricos de HAM basais acima da mediana recuperaram níveis significativamente mais elevados de HAM após a quimioterapia (Rosendahl *et al.*, 2010). Além de confirmar dados de outros estudos evidenciando que as concentrações basais de HAM são preditoras das concentrações após a quimioterapia, em nosso estudo demonstramos que o tipo de regime quimioterápico utilizado e a idade da paciente no momento do diagnóstico do câncer também são variáveis preditoras do risco de comprometimento da reserva ovariana após a quimioterapia.

Em nosso estudo, cerca de 60% das pacientes incluídas apresentavam dados relativos ao calendário menstrual. Embora tenhamos encontrado um número muito baixo de pacientes com concentrações de HAM  $\geq 1,1$  ng/ml (7,7%), a retomada do sangramento menstrual ocorreu em cerca de 75% das participantes após um ano da quimioterapia, demonstrando uma associação limitada entre as concentrações de HAM e o padrão menstrual após a quimioterapia. Esses achados estão de acordo com outros estudos e sugerem que, após o término do tratamento quimioterápico, é relativamente comum a presença de menstruação na vigência de reserva ovariana reduzida (Yu *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2010). Isso pode ser explicado pela hipótese de que a contagem absoluta de folículos primordiais é prejudicada em número e qualidade, embora os ovários pareçam continuar funcionando adequadamente. Todavia, em média, as taxas de gravidez são 40% menores em sobreviventes de câncer em comparação com a população geral, o que claramente corrobora o comprometimento ovariano (Peccatori *et al.*, 2013). Infelizmente, faltam dados sobre desfechos reprodutivos em sobreviventes do câncer de mama.

As taxas de amenorreia têm sido frequentemente utilizadas como um marcador clínico de comprometimento da função ovariana induzida pela quimioterapia. Entretanto, a subjetividade desse marcador e sua fraca associação com a reserva ovariana destacaram a necessidade de marcadores adicionais de função ovariana, tais como a dosagem das concentrações séricas de HAM, pois alterações profundas da reserva ovariana podem ocorrer, apesar da manutenção dos ciclos menstruais (Amir *et al.*, 2010). As concentrações de HAM basais (antes da quimioterapia) apresentaram correlação com o risco de amenorreia induzida pela quimioterapia, assim como os níveis de HAM no acompanhamento também se correlacionam com a duração da amenorreia induzida pela quimioterapia em nossas pacientes. Esses achados vão de encontro com os dados apresentados por Anders e Rosendahl, que também observaram concentrações basais de HAM baixas em pacientes com câncer de mama

na pré-menopausa que sofriam de amenorreia persistente induzida por quimioterapia (Anders *et al.*, 2008; Schover *et al.*, 1999). De acordo com a meta-análise de Frèour *et al.* mulheres que apresentam amenorreia induzida por quimioterapia tendem a ter idade mais avançada, além de apresentarem níveis basais de HAM mais baixos (Frèour *et al.*, 2017).

Os regimes quimioterápicos avaliados (AC-T, CMF e outros regimes quimioterápicos) promoveram redução significativa das concentrações séricas de HAM um ano após o término do tratamento. Dos regimes avaliados, o grupo de tratamento que utilizou CMF apresentou maior redução da reserva ovariana quando comparado com o grupo de tratamento que utilizou outros regimes quimioterápicos. Nosso estudo não demonstrou diferença estatística quando outras comparações foram realizadas entre os grupos de tratamento. O padrão de comprometimento da reserva ovariana pode variar, dependendo dos protocolos de quimioterapia. Decanter *et al.* mostraram diferentes padrões de comprometimento da reserva ovariana entre os grupos de mulheres diagnosticadas com linfoma tratadas com regimes quimioterápicos que incluíam ou não agentes alquilantes (Decanter *et al.*, 2010). Os autores avaliaram 17 mulheres tratadas com adriamicina, bleomicina, vimblastina e dacarbazina e 13 mulheres tratadas com um protocolo que incluía drogas potencialmente gonadotóxicas (ciclofosfamida, ifosfamida ou melfalana, por exemplo), antes e durante a quimioterapia, e depois a cada 3 meses após o final do tratamento por um período de 1 ano. As pacientes que foram tratadas com o regime não-alkilante recuperaram os níveis de HAM basais no sexto mês de acompanhamento. Em contraste, no grupo do regime quimioterápico que incluía agentes alquilantes, os valores de HAM durante todo o seguimento permaneceram significativamente reduzidos quando comparados com os valores pré-tratamento, apresentando níveis significativamente baixos ou indetectáveis (Decanter *et al.*, 2010). Rosendahl *et al.* também demonstraram valores significativamente mais altos de HAM em pacientes que não receberam agentes alquilantes. Todas as mulheres tratadas para câncer de mama receberam agentes alquilantes e os níveis séricos de HAM após a quimioterapia permaneceram significativamente baixos ou indetectáveis (Rosendahl *et al.*, 2010).

O tratamento adjuvante com tamoxifeno não pareceu influenciar as concentrações de HAM um ano após o término do tratamento quimioterápico, sugerindo que o HAM não é dependente da secreção de gonadotrofinas. Dezellus *et al.* também não encontraram associação com o uso de tamoxifeno (Dezellus *et al.*, 2017) e Su *et al.* encontraram níveis semelhantes de HAM pós-quimioterapia em pacientes que receberam tamoxifeno adjuvante e foram pareadas com uma coorte de pacientes com câncer de mama com receptor hormonal negativo (Su *et al.*, 2010).

Como previamente apresentado, demonstramos que a idade, os níveis basais de HAM e o tipo de regime quimioterápico são os fatores de predição mais importantes da reserva ovariana após o tratamento citotóxico. A partir destes achados, neste estudo, geramos o primeiro modelo de nomograma para prever o impacto da quimioterapia na reserva ovariana em mulheres diagnosticadas com câncer em idade reprodutiva que serão submetidas a tratamento quimioterápico. O nomograma descrito deve ser validado prospectivamente em novos estudos prospectivos. O nomograma pode ser uma ferramenta valiosa para melhorar o atendimento de mulheres na pré-menopausa que necessitam de tratamento quimioterápico para o câncer de mama, fornecendo informações sobre o risco individual de toxicidade gonadal, que pode ser extremamente útil para definir sobre a indicação ou não de procedimentos para tentativa de preservação da fertilidade.

Com base nos dados apresentados, sugerimos que todas as mulheres diagnosticadas com câncer de mama em idade reprodutiva recebam uma investigação básica com anamnese, com inclusão de dados como idade e tipo de regime quimioterápico que será utilizado, e análise das concentrações séricas de HAM. Isso servirá como base para o aconselhamento dessas mulheres, com discussão sobre os possíveis riscos de redução da reserva ovariana e as opções para tentativa de preservação da fertilidade. Atualmente, apenas uma parte de todas as pacientes recebem essa orientação (Partridge *et al.*, 2004). Como resultado, muitas mulheres iniciam o tratamento quimioterápico sem estarem conscientes da potencial perda de fertilidade (Peccatori *et al.*, 2012). Isso é alarmante, visto que aproximadamente um terço de todas as mulheres diagnosticadas com câncer de mama em idade reprodutiva ainda desejam ter filhos no momento do diagnóstico (Ruddy *et al.*, 2014).

Em nosso estudo, demonstramos, pela primeira vez, que mulheres tratadas de câncer de mama portadoras de mutações *BRCA* apresentam menores concentrações séricas basais de HAM, sugestivas de maior comprometimento de sua reserva ovariana, do que mulheres com câncer de mama que não carregam tal mutação ou com baixo risco devido a uma história familiar negativa. A perda de reserva ovariana foi quantificada usando as concentrações séricas de HAM antes e 12 meses após o término do tratamento quimioterápico após ajuste para a idade das mulheres na amostragem. Entre o subgrupo de mulheres tratadas com AC-T, a recuperação dos níveis de HAM pós-quimioterapia foi de apenas 30% em mulheres com mutações positivas para *BRCA* em comparação com as observadas nos grupos *BRCA* Negativo/Não testado (1,3% vs. 4,1%;  $p=0,014$ ). Essa diferença também resultou em maior incidência de insuficiência ovariana induzida pela quimioterapia, conforme determinado pelos níveis de HAM pós-quimioterapia menores que o limite de detecção do teste (29% em

mulheres *BRCA*-positivos, em comparação com 9 e 16% em grupos não testados e *BRCA*-negativos), embora isso não tenha alcançado significância estatística ( $p=0,1$ ).

Esses achados podem ter implicações importantes para mulheres jovens com mutações *BRCA*. Primeiro, as menores concentrações basais de HAM, associadas a sua menor recuperação após a quimioterapia e, possivelmente, a maior incidência de insuficiência ovariana induzida pela quimioterapia entre mulheres com mutações *BRCA* indicam que elas podem ser mais propensas a perder sua fertilidade após o tratamento do câncer de mama. De fato, diversos estudos demonstram que mulheres com mutações *BRCA* podem apresentar um envelhecimento ovariano acelerado, conforme demonstrado pelos menores níveis de HAM basais (Titus *et al.*, 2013), menor número de folículos primordiais e maior dano ao ADN em seus óvulos (Lin *et al.*, 2017), bem como menor idade de diagnóstico de menopausa (Lin *et al.*, 2013) em comparação com controles. Se esse for o caso, nossas descobertas merecem atenção especial para a tentativa de preservação da fertilidade entre mulheres com mutações *BRCA*. Mulheres com mutações *BRCA* podem ser submetidas à criopreservação de óvulos ou embriões com o auxílio de protocolos de estimulação ovariana suplementados com inibidor de aromatase, como demonstrado anteriormente (Kim *et al.*, 2016). A efetividade e a segurança da ooforectomia precoce seguida pela criopreservação ovariana como outra estratégia para tentativa de preservação da fertilidade ainda precisa ser determinada (Rodriguez-Wallberg *et al.*, 2012).

A segunda, e mais ampla, implicação desses achados é que os mecanismos de reparo de ADN danificados, tais como em mulheres com mutações do *BRCA*, podem estar relacionados ao envelhecimento reprodutivo. Isto inclui não apenas a perda acelerada de reserva ovariana devido ao declínio da função de *BRCA* e outros genes de reparo de ADN em óvulos humanos (Titus *et al.*, 2013), mas também o aumento nas taxas de aneuploidias. Em modelos animais experimentais utilizando ratos, a interferência na função *BRCA* altera a função do fuso meiótico e resulta em alterações cromossômicas (Deans *et al.*, 2003).

Os pontos fortes do nosso estudo são a sua natureza prospectiva, a uniformidade da doença e do tratamento oncológico e seguimento a longo prazo após a quimioterapia, uma vez que todas as pacientes incluídas no estudo foram tratadas e acompanhadas em uma única instituição (*Memorial Sloan Kettering Cancer Center*), seguindo protocolos padronizados. Todas as amostras de sangue foram coletadas, processadas e estocadas adequadamente, assim como dosadas por técnico experiente, usando um único lote de kits ultra sensíveis para detecção do HAM. A força desta análise resulta também do adequado tamanho da amostra analisada em um estudo prospectivo. Nosso tamanho amostral é suficiente para proporcionar

90% de poder estatístico para detectar uma redução maior ou igual a 25% nas concentrações séricas de HAM a partir da dos níveis basais, considerando todos os regimes de tratamento analisados conjuntamente (objetivo primário do estudo). Todavia, salientamos que para o regime AC-T, o tamanho amostral analisado também é suficiente para proporcionar 80% de poder estatístico para detectar uma redução maior ou igual a 25% nas concentrações séricas de HAM a partir da dos níveis basais. Salientamos que o estudo continua, nossas pacientes estão sendo monitoradas por um período de acompanhamento de 4 anos após a quimioterapia e os achados serão divulgados após o término de seguimento das pacientes, previsto para julho de 2020.

Nosso estudo apresenta alguma limitações. O método enzimático de imunoquimioluminescência quantitativo altamente específico utilizado, apesar de ultrasensível, não é automatizado. Embora esses testes apresentem boa reprodutibilidade dentro do mesmo laboratório, eles apresentam variabilidade entre laboratórios, devido à falta de automação e processos específicos do local (Zuvela *et al.*, 2013). Outra limitação é que baixos níveis de HAM não necessariamente definem fertilidade reduzida (Hagen *et al.*, 2012; Steiner *et al.*, 2017). Este ponto tem sido frequentemente discutido pois existem mulheres com níveis séricos de HAM indetectáveis que engravidaram (Reichman *et al.*, 2014). O principal motivo parece estar relacionado ao fato que os níveis séricos de HAM não representam a qualidade do óvulo, e outro motivo pode estar relacionado à baixa sensibilidade dos kits de HAM convencionais para detectar níveis muito baixos de HAM. Sendo assim, são necessários novos estudos para definir os valores de corte do HAM preditivos de redução da fertilidade natural. Além disso, o HAM não é totalmente capaz de prever a ocorrência de gravidez em tratamentos de reprodução assistida (Broekmans *et al.*, 2006).

Em suma, evidenciamos que a maioria dos pacientes apresenta reserva ovariana comprometida, conforme demonstrado pelos baixos níveis de HAM, um ano após o término do tratamento quimioterápico. A relação entre as baixas concentrações séricas de HAM durante o acompanhamento dessas pacientes e o impacto na fertilidade ainda precisa ser mais bem investigada. Ainda faltam estudos investigando se menores concentrações de HAM após o tratamento quimioterápico estão, de fato, relacionados a piores desfechos reprodutivos. A tentativa de preservação da fertilidade de mulheres diagnosticadas com câncer de mama em idade reprodutiva é uma tarefa de cooperação interdisciplinar de especialistas em reprodução humana, mastologistas e oncologistas. As diretrizes atuais sugerem aconselhar nossas pacientes sobre os riscos e benefícios das estratégias de criopreservação e sugerem congelamento de embriões ou óvulos antes da quimioterapia em mulheres com alto risco de

infertilidade e insuficiência ovariana (Loren *et al.*, 2013; Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine, 2013; Peccatori *et al.*, 2013). Todavia, ferramentas validadas para definir de forma acurada este risco não estão disponíveis, sendo que validar a ferramenta construída no presente estudo pode ser de grande valia para o adequado aconselhamento de mulheres com câncer de mama em idade reprodutiva.

***Conclusões***

---

## CONCLUSÕES

Os regimes quimioterápicos comumente utilizados no tratamento do câncer de mama em mulheres na menacme promoveram redução significativa das concentrações séricas de HAM um ano após o término do tratamento, sugerindo promoverem um comprometimento significativo da reserva ovariana. Antes do início do tratamento quimioterápico, cerca de 78% das pacientes apresentavam concentrações séricas de HAM basais maiores ou iguais a 1,1 ng/ml, indicativas de reserva ovariana normal, ao passo que um ano após o término do tratamento, apenas 7,7% das pacientes apresentavam estes valores de HAM.

A amenorreia induzida por quimioterapia ocorreu em cerca de 25% das pacientes após 12 meses do término da quimioterapia. Maiores concentrações basais de HAM foram preditivas de um período mais curto de amenorreia induzida pela quimioterapia. A única covariável que influenciou a recuperação do fluxo menstrual foi a concentração sérica de HAM basal, que foi maior em pacientes que apresentaram recuperação do fluxo menstrual em comparação com aquelas que não o recuperaram.

Embora tenhamos encontrado um número muito baixo de pacientes com recuperação dos níveis de HAM, a retomada do sangramento menstrual ocorreu em 74,7% das participantes após um ano da quimioterapia, demonstrando uma associação limitada entre os níveis de HAM e o padrão menstrual após a quimioterapia.

Os regimes quimioterápicos avaliados (AC-T, CMF e outros regimes quimioterápicos) promoveram redução significativa das concentrações séricas de HAM um ano após o término do tratamento. Dos regimes avaliados, o grupo de tratamento que utilizou CMF apresentou maior redução da reserva ovariana quando comparado com o grupo de tratamento que utilizou outros regimes quimioterápicos. Nosso estudo não demonstrou diferença estatística quando outras comparações foram realizadas entre os grupos de tratamento

Mulheres que realizaram tratamento adjuvante com tamoxifeno após a quimioterapia apresentaram concentrações séricas de HAM similares a de mulheres que não o utilizaram, sugerindo que o tratamento adjuvante com tamoxifeno não exacerba o comprometimento a reserva ovariana promovido pelo tratamento quimioterápico.

Demonstramos que a idade, os níveis basais de HAM e o tipo de regime quimioterápico são os fatores de predição mais importantes da reserva ovariana após o tratamento citotóxico. Neste estudo, geramos o primeiro modelo de nomograma para prever o impacto da quimioterapia na reserva ovariana em mulheres diagnosticadas com câncer em

idade reprodutiva que serão submetidas a tratamento quimioterápico. O nomograma descrito deve ser validado prospectivamente em novos estudos prospectivos. O nomograma pode ser uma ferramenta valiosa para melhorar o atendimento de mulheres na pré-menopausa que necessitam de tratamento quimioterápico para o câncer de mama, fornecendo informações sobre o risco individual de toxicidade gonadal e sobre a indicação de procedimentos para tentativa de preservação da fertilidade.

Mulheres na menacme com câncer de mama e mutação no *BRCA* apresentaram recuperação ovariana significativamente pior dos níveis séricos de HAM um ano após o término do tratamento quando comparadas a mulheres de baixo risco não testadas e mulheres sem a mutação. Estes achados demonstram que a presença de mutações *BRCA* pode colocar as mulheres em desvantagem reprodutiva quando expostas ao estresse genotóxico, como a quimioterapia do câncer de mama. Essas descobertas têm uma influência significativa tanto no aconselhamento sobre preservação da fertilidade quanto na pesquisa e tratamento do envelhecimento reprodutivo.

## ***Referências Bibliográficas***

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amir E, Freedman O, Allen L, Colgan T, Clemons M. Defining ovarian failure in amenorrheic young breast cancer patients. *Breast*. 2010;19(6):545-8.
- Anckaert E, Smits J, Schiettecatte J, Klein BM, Arce JC. The value of anti-Mullerian hormone measurement in the long GnRH agonist protocol: association with ovarian response and gonadotrophin-dose adjustments. *Hum Reprod*. 2012;27(6):1829-39.
- Anders C, Marcom PK, Peterson B, Gu L, Unruhe S, Welch R, et al. A pilot study of predictive markers of chemotherapy-related amenorrhea among premenopausal women with early stage breast cancer. *Cancer Invest*. 2008;26(3):286-95.
- Anders CK, Hsu DS, Broadwater G, Acharya CR, Foekens JA, Zhang Y, et al. Young age at diagnosis correlates with worse prognosis and defines a subset of breast cancers with shared patterns of gene expression. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(20):3324-30.
- Anderson RA, Cameron DA. Pretreatment serum anti-mullerian hormone predicts long-term ovarian function and bone mass after chemotherapy for early breast cancer. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011;96(5):1336-43.
- Anderson RA, Themmen AP, Al-Qahtani A, Groome NP, Cameron DA. The effects of chemotherapy and long-term gonadotrophin suppression on the ovarian reserve in premenopausal women with breast cancer. *Hum Reprod*. 2006;21(10):2583-92.
- Bines J, Oleske DM, Cobleigh MA. Ovarian function in premenopausal women treated with adjuvant chemotherapy for breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1996;14(5):1718-29.
- Bozza C, Puglisi F, Lambertini M, Osa EO, Manno M, Del Mastro L. Anti-Mullerian hormone: determination of ovarian reserve in early breast cancer patients. *Endocr Relat Cancer*. 2014;21(1):R51-65.
- Broekmans FJ, Knauff EA, te Velde ER, Macklon NS, Fauser BC. Female reproductive ageing: current knowledge and future trends. *Trends Endocrinol Metab*. 2007;18(2):58-65.
- Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update*. 2006;12(6):685-718.
- Broer SL, Dolleman M, Opmeer BC, Fauser BC, Mol BW, Broekmans FJ. AMH and AFC as predictors of excessive response in controlled ovarian hyperstimulation: a meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2011;17(1):46-54.
- Byrne J, Fears TR, Gail MH, Pee D, Connelly RR, Austin DF, et al. Early menopause in

- long-term survivors of cancer during adolescence. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1992;166(3):788-93.
- Carroll J, Marangos P. The DNA damage response in mammalian oocytes. *Frontiers in genetics*. 2013;4:117.
- Carter J, Rowland K, Chi D, Brown C, Abu-Rustum N, Castiel M, et al. Gynecologic cancer treatment and the impact of cancer-related infertility. *Gynecol Oncol*. 2005;97(1):90-5.
- Committee on Practice Bulletins-Gynecology. Practice bulletin no. 128: diagnosis of abnormal uterine bleeding in reproductive-aged women. *Obstet Gynecol*. 2012;120(1):197-206.
- Cook CL, Siow Y, Taylor S, Fallat ME. Serum mullerian-inhibiting substance levels during normal menstrual cycles. *Fertility and sterility*. 2000;73(4):859-61.
- Curtin SC, Abma JC, Ventura SJ, Henshaw SK. Pregnancy rates for U.S. women continue to drop. *NCHS Data Brief*. 2013(136):1-8.
- De Laurentiis M, Canello G, D'Agostino D, Giuliano M, Giordano A, Montagna E, et al. Taxane-based combinations as adjuvant chemotherapy of early breast cancer: a meta-analysis of randomized trials. *J Clin Oncol*. 2008;26(1):44-53.
- de Moor JS, Mariotto AB, Parry C, Alfano CM, Padgett L, Kent EE, et al.. Cancer survivors in the United States: prevalence across the survivorship trajectory and implications for care. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2013;22(4):561-70.
- de Vet A, Laven JS, de Jong FH, Themmen AP, Fauser BC. Antimullerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertil Steril*. 2002;77(2):357-62.
- Deans B, Griffin CS, O'Regan P, Jasin M, Thacker J. Homologous recombination deficiency leads to profound genetic instability in cells derived from Xrcc2-knockout mice. *Cancer Res*. 2003;63(23):8181-7.
- Decanter C, Morschhauser F, Pigny P, Lefebvre C, Gallo C, Dewailly D. Anti-Mullerian hormone follow-up in young women treated by chemotherapy for lymphoma: preliminary results. *Reprod Biomed Online*. 2010;20(2):280-5.
- Dewailly D, Andersen CY, Balen A, Broekmans F, Dilaver N, Fanchin R, et al. The physiology and clinical utility of anti-Mullerian hormone in women. *Hum Reprod Update*. 2014;20(3):370-85.
- Dezellus A, Barriere P, Campone M, Lemanski C, Vanlemmens L, Mignot L, et al. Prospective evaluation of serum anti-Mullerian hormone dynamics in 250 women of reproductive age treated with chemotherapy for breast cancer. *Eur J Cancer*. 2017;79:72-80.
- Dillon KE, Sammel MD, Prewitt M, Ginsberg JP, Walker D, Mersereau JE, et al.

Pretreatment antimullerian hormone levels determine rate of posttherapy ovarian reserve recovery: acute changes in ovarian reserve during and after chemotherapy. *Fertility and sterility*. 2013;99(2):477-83.

Durlinger AL, Visser JA, Themmen AP. Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone. *Reproduction*. 2002;124(5):601-9.

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 2005;365(9472):1687-717.

Economopoulou P, Dimitriadis G, Psyri A. Beyond BRCA: new hereditary breast cancer susceptibility genes. *Cancer Treat Rev*. 2015;41(1):1-8.

Fanchin R, Schonauer LM, Righini C, Frydman N, Frydman R, Taieb J. Serum anti-Mullerian hormone dynamics during controlled ovarian hyperstimulation. *Human reproduction*. 2003;18(2):328-32.

Fanchin R, Schonauer LM, Righini C, Guibourdenche J, Frydman R, Taieb J. Serum anti-Mullerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. *Hum Reprod*. 2003;18(2):323-7.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-86.

Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BC, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L, et al. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Human reproduction*. 2011;26(7):1616-24.

Fornier M MS, Hudis C. Incidence of amenorrhea in breast cancer patients <40 years of age after paclitaxel-based adjuvant chemotherapy. *San Antonio Breast Cancer Symposium*. 2002;December 2002(Abstract number 645).

Freour T, Barriere P, Masson D. Anti-mullerian hormone levels and evolution in women of reproductive age with breast cancer treated with chemotherapy. *Eur J Cancer*. 2017;74:1-8.

Gandhi S, Fletcher GG, Eisen A, Mates M, Freedman OC, Dent SF, et al. Adjuvant chemotherapy for early female breast cancer: a systematic review of the evidence for the 2014 Cancer Care Ontario systemic therapy guideline. *Curr Oncol*. 2015;22(Suppl 1):S82-94.

Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ, et al. Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2007;18(7):1133-44.

- Gosden RG, Faddy MJ. Ovarian aging, follicular depletion, and steroidogenesis. *Experimental gerontology*. 1994;29(3-4):265-74.
- Hagen CP, Vestergaard S, Juul A, Skakkebaek NE, Andersson AM, Main KM, et al. Low concentration of circulating antimullerian hormone is not predictive of reduced fecundability in young healthy women: a prospective cohort study. *Fertil Steril*. 2012;98(6):1602-8 e2.
- Hortobagyi GN, Buzdar AU, Marcus CE, Smith TL. Immediate and long-term toxicity of adjuvant chemotherapy regimens containing doxorubicin in trials at M.D. Anderson Hospital and Tumor Institute. *NCI monographs : a publication of the National Cancer Institute*. 1986(1):105-9.
- Juriscova A, Lee HJ, D'Estaing SG, Tilly J, Perez GI. Molecular requirements for doxorubicin-mediated death in murine oocytes. *Cell death and differentiation*. 2006;13(9):1466-74.
- Kalich-Philosoph L, Roness H, Carmely A, Fishel-Bartal M, Ligumsky H, Paglin S, et al. Cyclophosphamide triggers follicle activation and "burnout"; AS101 prevents follicle loss and preserves fertility. *Sci Transl Med*. 2013;5(185):185ra62.
- Kim J, Turan V, Oktay K. Long-Term Safety of Letrozole and Gonadotropin Stimulation for Fertility Preservation in Women With Breast Cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(4):1364-71.
- Lee SJ, Schover LR, Partridge AH, Patrizio P, Wallace WH, Hagerty K, et al. American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006;24(18):2917-31.
- Li F, Turan V, Lierman S, Cuvelier C, De Sutter P, Oktay K. Sphingosine-1-phosphate prevents chemotherapy-induced human primordial follicle death. *Hum Reprod*. 2014;29(1):107-13.
- Licciardi FL, Liu HC, Rosenwaks Z. Day 3 estradiol serum concentrations as prognosticators of ovarian stimulation response and pregnancy outcome in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertility and sterility*. 1995;64(5):991-4.
- Lin W, Titus S, Moy F, Ginsburg ES, Oktay K. Ovarian Aging in Women With BRCA Germline Mutations. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(10):3839-47.
- Lin WT, Beattie M, Chen LM, Oktay K, Crawford SL, Gold EB, et al. Comparison of age at natural menopause in BRCA1/2 mutation carriers with a non-clinic-based sample of women in northern California. *Cancer*. 2013;119(9):1652-9.
- Loren AW, Mangu PB, Beck LN, Brennan L, Magdalinski AJ, Partridge AH, et al. Fertility

- preservation for patients with cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2013;31(19):2500-10.
- Lutchman Singh K, Muttukrishna S, Stein RC, McGarrigle HH, Patel A, Parikh B, et al. Predictors of ovarian reserve in young women with breast cancer. *British journal of cancer*. 2007;96(12):1808-16.
- McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev*. 2000;21(2):200-14.
- Meirow D FE, Rabinovici J, Shrim A, Levron J, Dor J. Cortical fibrosis and blood vessels damage in human ovaries exposed to non-sterilizing chemotherapy. *Fertility and sterility*. 2006;86(3):S98.
- Meirow D, Nugent D. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. *Human reproduction update*. 2001;7(6):535-43.
- Morita Y, Perez GI, Paris F, Miranda SR, Ehleiter D, Haimovitz-Friedman A, et al. Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy. *Nature medicine*. 2000;6(10):1109-14.
- Nardo LG, Gelbaya TA, Wilkinson H, Roberts SA, Yates A, Pemberton P, et al. Circulating basal anti-Mullerian hormone levels as predictor of ovarian response in women undergoing ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2009;92(5):1586-93.
- National Cancer Institute U.S. Department of Health and Human Services. *Assessing Progress, Advancing Change, President's Cancer Panel. 2005-2006 Annual Report*.
- NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®). *Breast Cancer - v.3.2015*. July, 2015 ([http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/PDF/breastpdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/breastpdf)).
- NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®). *Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian*. October, 2017 ([http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/genetics\\_screening.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/genetics_screening.pdf)).
- Nikolaou D, Templeton A. Early ovarian ageing: a hypothesis. *Detection and clinical relevance*. *Human reproduction*. 2003;18(6):1137-9.
- Oktay K, Buyuk E, Libertella N, Akar M, Rosenwaks Z. Fertility preservation in breast cancer patients: a prospective controlled comparison of ovarian stimulation with tamoxifen and letrozole for embryo cryopreservation. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(19):4347-53.
- Oktay K, Kim JY, Barad D, Babayev SN. Association of BRCA1 mutations with occult primary ovarian insufficiency: a possible explanation for the link between infertility and breast/ovarian cancer risks. *J Clin Oncol*. 2010;28(2):240-4.

- Oktay K, Oktem O, Reh A, Vahdat L. Measuring the impact of chemotherapy on fertility in women with breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006;24(24):4044-6.
- Oktay K, Turan V, Titus S, Stobezki R, Liu L. BRCA Mutations, DNA Repair Deficiency, and Ovarian Aging. *Biol Reprod*. 2015;93(3):67.
- Partridge AH, Gelber S, Peppercorn J, Sampson E, Knudsen K, Laufer M, et al. Web-based survey of fertility issues in young women with breast cancer. *J Clin Oncol*. 2004;22(20):4174-83.
- Partridge AH, Ruddy KJ, Gelber S, Schapira L, Abusief M, Meyer M, et al. Ovarian reserve in women who remain premenopausal after chemotherapy for early stage breast cancer. *Fertil Steril*. 2010;94(2):638-44.
- Peccatori FA, Azim HA, Jr., Orecchia R, Hoekstra HJ, Pavlidis N, Kesic V, et al. Cancer, pregnancy and fertility: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2013;24 Suppl 6:vi160-70.
- Peccatori FA, Pup LD, Salvagno F, Guido M, Sarno MA, Revelli A, et al. Fertility Preservation Methods in Breast Cancer. *Breast Care (Basel)*. 2012;7(3):197-202.
- Perez GI, Knudson CM, Leykin L, Korsmeyer SJ, Tilly JL. Apoptosis-associated signaling pathways are required for chemotherapy-mediated female germ cell destruction. *Nature medicine*. 1997;3(11):1228-32.
- Plowchalk DR, Mattison DR. Phosphoramidate mustard is responsible for the ovarian toxicity of cyclophosphamide. *Toxicology and applied pharmacology*. 1991;107(3):472-81.
- Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Fertility preservation in patients undergoing gonadotoxic therapy or gonadectomy: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2013;100(5):1214-23.
- Reichman DE, Goldschlag D, Rosenwaks Z. Value of antimullerian hormone as a prognostic indicator of in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril*. 2014;101(4):1012-8 e1.
- Rodriguez-Wallberg KA, Oktay K. Fertility preservation and pregnancy in women with and without BRCA mutation-positive breast cancer. *Oncologist*. 2012;17(11):1409-17.
- Rosendahl M, Andersen CY, la Cour Freiesleben N, Juul A, Lossl K, Andersen AN. Dynamics and mechanisms of chemotherapy-induced ovarian follicular depletion in women of fertile age. *Fertil Steril*. 2010;94(1):156-66.
- Ruddy KJ, Gelber SI, Tamimi RM, Ginsburg ES, Schapira L, Come SE, et al. Prospective study of fertility concerns and preservation strategies in young women with breast cancer. *J Clin Oncol*. 2014;32(11):1151-6.
- Salter KH, Acharya CR, Walters KS, Redman R, Anguiano A, Garman KS, et al. An

integrated approach to the prediction of chemotherapeutic response in patients with breast cancer. *PloS one*. 2008;3(4):e1908.

Scheffer GJ, Broekmans FJ, Looman CW, Blankenstein M, Fauser BC, teJong FH, et al. The number of antral follicles in normal women with proven fertility is the best reflection of reproductive age. *Human reproduction*. 2003;18(4):700-6.

Schover LR, Rybicki LA, Martin BA, Bringelsen KA. Having children after cancer. A pilot survey of survivors' attitudes and experiences. *Cancer*. 1999;86(4):697-709.

Seifer DB, Baker VL, Leader B. Age-specific serum anti-Mullerian hormone values for 17,120 women presenting to fertility centers within the United States. *Fertil Steril*. 2011;95(2):747-50.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(1):7-30.

Smith IE, Dowsett M, Yap YS, Walsh G, Lonning PE, Santen RJ, et al. Adjuvant aromatase inhibitors for early breast cancer after chemotherapy-induced amenorrhoea: caution and suggested guidelines. *J Clin Oncol*. 2006;24(16):2444-7.

Sonmezer M, Oktay K. Fertility preservation in female patients. *Human reproduction update*. 2004;10(3):251-66.

Steiner AZ, Pritchard D, Stanczyk FZ, Kesner JS, Meadows JW, Herring AH, et al. Association Between Biomarkers of Ovarian Reserve and Infertility Among Older Women of Reproductive Age. *JAMA*. 2017;318(14):1367-76.

Su HI, Sammel MD, Green J, Velders L, Stankiewicz C, Matro J, et al. Antimullerian hormone and inhibin B are hormone measures of ovarian function in late reproductive-aged breast cancer survivors. *Cancer*. 2010;116(3):592-9.

te Velde ER, Pearson PL. The variability of female reproductive ageing. *Human reproduction update*. 2002;8(2):141-54.

Tilly JL, Kolesnick RN. Sphingolipids, apoptosis, cancer treatments and the ovary: investigating a crime against female fertility. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1585(2-3):135-8.

Titus S, Li F, Stobezki R, Akula K, Unsal E, Jeong K, et al. Impairment of BRCA1-related DNA double-strand break repair leads to ovarian aging in mice and humans. *Sci Transl Med*. 2013;5(172):172ra21.

van Rooij IA, Broekmans FJ, te Velde ER, Fauser BC, Bancsi LF, de Jong FH, et al. Serum anti-Mullerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod*. 2002;17(12):3065-71.

Villarreal-Garza C, Bargallo-Rocha JE, Soto-Perez-de-Celis E, Lasa-Gonsebatt F, Arce-Salinas C, Lara-Medina F, et al. Real-world outcomes in young women with breast cancer

- treated with neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat.* 2016;157(2):385-94.
- Walshe JM, Denduluri N, Swain SM. Amenorrhea in premenopausal women after adjuvant chemotherapy for breast cancer. *J Clin Oncol.* 2006;24(36):5769-79.
- Wang ET, Pisarska MD, Bresee C, Chen YD, Lester J, Afshar Y, et al. BRCA1 germline mutations may be associated with reduced ovarian reserve. *Fertil Steril.* 2014;102(6):1723-8.
- Xu J, Murphy SL, Kochanek KD, Arias E. Mortality in the United States, 2015. *NCHS Data Brief.* 2016(267):1-8.
- Yu B, Douglas N, Ferin MJ, Nakhuda GS, Crew K, Lobo RA, et al. Changes in markers of ovarian reserve and endocrine function in young women with breast cancer undergoing adjuvant chemotherapy. *Cancer.* 2010;116(9):2099-105.
- Zavos A, Valachis A. Risk of chemotherapy-induced amenorrhea in patients with breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Acta Oncol.* 2016;55(6):664-70.
- Zuvela E, Walls M, Matson P. Within-laboratory and between-laboratory variability in the measurement of anti-mullerian hormone determined within an external quality assurance scheme. *Reprod Biol.* 2013;13(3):255-7.