

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS



**AVALIAÇÃO DA RESERVA OVARIANA EM MULHERES COM CÂNCER DE
MAMA SUBMETIDAS À QUIMIOTERAPIA**

ÂNGELA MARCON D'AVILA

PORTO ALEGRE, JUNHO DE 2013.

CIP - Catalogação na Publicação

Marcon D'Avila, Ângela
Avaliação da Reserva Ovariana em Mulheres com
Câncer de Mama Submetidas à Quimioterapia / Ângela
Marcon D'Avila. -- 2013.
123 f.

Orientador: Helena von Eye Corleta.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2013.

1. Quimioterapia e Mecanismos de
Gonadotoxicidade. 2. Importância Clínica da
Gonadotoxicidade. 3. Marcadores de Reserva Ovariana.
I. von Eye Corleta, Helena, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas
Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular
Serviço de Ginecologia e Obstetrícia
Hospital de Clínicas de Porto Alegre

**AVALIAÇÃO DA RESERVA OVARIANA EM MULHERES COM CÂNCER DE
MAMA SUBMETIDAS À QUIMIOTERAPIA**

Ângela Marcon D'Avila

Orientadora: Prof^a. Dra. Helena von Eye Corleta

Tese de defesa de doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção de título de doutor.

Porto Alegre, junho de 2013.

Dedicatória

*À minha **mãe**, exemplo de perseverança, de força, de garra e de amor à família.*

*Ao meu **pai** (in memoriam) por ter me ensinado as coisas sobre o amor, pois ele é essencial em qualquer ato de nossas vidas para que se alcance o melhor resultado.*

Obrigada por terem acreditado no meu potencial.

Agradecimentos

À minha **mãe**, que me incentivou e dedicou todo seu esforço à minha formação.

Ao meu **pai (in memorian)**, que me ensinou a valorizar as coisas do coração e os desejos, fundamental para me impulsionar a buscar todos os meus objetivos.

Ao meu marido, **Gustavo**, que me mostrou o equilíbrio e que trouxe a tranquilidade e a paz de espírito para dentro de mim. Agradeço a ele, que é o meu porto seguro e que foi fundamental para eu alcançar o sucesso em vários aspectos da minha vida, inclusive para a finalização desta tese.

Ao meu filho, **Ítalo**, que me ensina todos os dias o que é amar acima de tudo. A presença dele era o estímulo que ainda faltava na minha vida para eu lutar cada vez mais para ser uma pessoa melhor.

Aos meus **irmãos**, que mesmo longe, estavam torcendo pelo meu sucesso.

À Professora Doutora **Helena von Eye Corleta**, que me acolheu sem restrições para que eu pudesse crescer profissional e intelectualmente. Agradeço a ela por ter aberto as portas para eu adentrar no mundo da reprodução assistida, permitindo que eu aprendesse mais e mais com os seus ensinamentos.

A todos da equipe do **Gerar Núcleo de Reprodução Humana do Hospital Moinhos de Vento**, em especial à amiga **Anita Millyus Pimentel**, que foram sempre prestativos e que muitas vezes auxiliaram na coleta de dados das pacientes desta tese.

Às colegas **Ana Luiza Berwanger da Silva** e **Ana Santim**, que foram extremamente solícitas na avaliação dos resultados da tese.

Ao Professor Doutor **Edson Capp**, que muito me auxiliou, especialmente na elaboração do projeto e artigos desta tese.

À Professora Doutora **Poli Mara Spritzer**, com quem aprendi a ter disciplina no trabalho e que me apresentou e ensinou a pesquisa científica com rigor ético e metodológico.

À **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, que foi minha segunda casa por mais de 10 anos e que foi responsável pela minha formação profissional. Tenho certeza que venho construindo uma carreira de sucesso graças à base sólida, tanto em conhecimentos quanto em valores morais e éticos que esta instituição me concedeu.

Aos colegas do **Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular (LAGOM)**, pela disponibilidade em auxiliar na finalização deste trabalho.

Às **pacientes**, que se disponibilizaram a participar da pesquisa mesmo em situações em que o tratamento de sua doença, o câncer de mama, estava lhes causando dor e sofrimento.

Aos hospitais e os respectivos chefes de serviço de Mastologia, que abriram suas portas para podermos realizar esta pesquisa. **Ao Hospital de Clínicas de Clínicas de Porto Alegre**, com o Serviço de Mastologia chefiado pelo **Dr. Carlos Henrique Menke** no início desta tese e a seguir, pelo Dr. Jorge Biazus e com o

Serviço de Patologia Clínica, em especial à **Rosane Scalco**, na realização das avaliações hormonais. Ao **Hospital Nossa Senhora Conceição** e seu Serviço de Mastologia chefiado pelo **Dr. José Luiz Pedrini**. Ao **Hospital Presidente Vargas** e ao **Dr. Rogério Grossmann**. Ao **Hospital Moinhos de Vento**, em especial à **Dra. Maira Caleffi**.

Aos médicos mastologistas **Fernando Schuh** e **Rodrigo Cericatto**, que nos auxiliaram no recrutamento de novas pacientes.

"A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável."

(Galileu Galilei)

Resumo

Introdução: A reserva ovariana (RO) refere-se à quantidade e, para alguns autores, à qualidade de folículos presentes nos ovários em um dado momento. É a medida pela qual se avalia a produção de oócitos e consequente potencial reprodutivo. Ela pode ser inferida mediante dosagem dos níveis séricos do hormônio folículo estimulante (FSH), estradiol, inibina B e hormônio antimülleriano (HAM), e ainda, ultrassonograficamente, através da contagem de folículos antrais (CFA). Na década de 50 observou-se que mulheres submetidas à quimioterapia (QT) apresentavam falência ovariana mais precocemente, efeito atribuído à gonadotoxicidade quimioterápica.

Objetivos: Estudar o HAM como marcador da RO em mulheres com câncer de mama expostas à QT gonadotóxica comparando-o com outros marcadores da RO e determinar preditores de risco da ocorrência de anovulação (amenorreia ou ciclos irregulares) nessas mulheres.

Métodos: Foi realizado estudo de coorte com 52 mulheres com diagnóstico de câncer de mama e necessidade de QT com ciclofosfamida, com idade até 40 anos, ciclos menstruais regulares e sem histórico de tratamento quimioterápico prévio. As pacientes realizaram coleta de sangue e ultrassonografia pélvica transvaginal (USTV) antes da QT (T1) e 2 (T2) e 6 (T3) meses após seu término.

Resultados: A idade média das pacientes estudadas foi $35,3 \pm 3,8$ anos e o tempo médio de seguimento foi de 14 ± 3 meses. A prevalência de anovulação foi de 40% durante a QT, 85% 2 meses após o término da QT (4 a 6 ciclos de

ciclofosfamida) e de 60% 6 meses após a QT. A média de idade das pacientes que se tornaram anovulatórias foi de $36,5 \pm 3,8$ anos, enquanto que nas que permaneceram ovulatórias foi de $32,9 \pm 3,5$ anos com $p = 0,02$. O FSH acompanhou o status menstrual, apresentando aumento e queda significativos em T2 e T3. O HAM diminuiu significativamente de T1 (2,53 (1 - 5,31) ng/mL) para T2 (valores abaixo do detectável) com $p < 0,0001$ e não se modificou de T2 para T3, mesmo com uma parcela de pacientes retomando a ciclicidade menstrual. CFA em T1 foi 11 (8 - 13,5) folículos, sendo estatisticamente maior que nos tempos T2 e T3 ($p < 0,0001$). Entre T2 e T3 não houve diferença. As pacientes que mantiveram ciclos ovulatórios após o término da QT apresentaram no final do estudo níveis significativamente mais baixos de HAM do que previamente à QT (1,46 (< 0,08 - 4,31) ng/ml *versus* 6,17 (3,19 - 10,07) ng/mL) e CFA (7 (5,5 - 10) folículos *versus* 13 (11 - 15,5) folículos). HAM e CFA apresentaram correlação negativa e significativa com a idade. Trinta e dois anos foi a idade que apresentou sensibilidade de 96% e especificidade de 39% para predição de anovulação, mesmo que sem amenorreia, com área sob a curva (ASC) ROC de 0,77. Os marcadores de RO e os respectivos pontos de corte com poder de predizer ocorrência de anovulação em pacientes expostas à QT foram HAM < 3,32 ng/ml (sensibilidade de 85%, especificidade de 75% e ASC de 0,86) e CFA < 13 folículos antrais (sensibilidade de 81%, especificidade de 62% e ASC de 0,81). Para a predição de amenorreia exclusivamente, o HAM teve como ponto de corte o valor de 1,87 ng/ml (sensibilidade de 82%, especificidade de 83% e ASC de 0,84) e a CFA valor de 9 folículos (sensibilidade de 71%, especificidade de 78% e ASC de 0,73). As avaliações dos marcadores de RO não foram influenciadas pelo número de ciclos de

QT (4 ou 6 ciclos), nem pela dose de quimioterápico utilizado por área corporal. Conclusão: O HAM e a CFA são igualmente capazes de determinar a queda da RO em pacientes submetidas à QT gonadotóxica. Pacientes com diagnóstico de câncer de mama que necessitam de QT com ciclofosfamida devem ser alertadas para o risco de amenorreia especialmente quando a idade for de 32 anos ou mais, dosagens séricas de HAM abaixo de 3,32 ng/ml, CFA < 13, devendo receber informações a respeito da preservação da fertilidade. Dentre esses marcadores, o HAM foi o de maior poder em predizer a ocorrência de amenorreia.

Palavras-chave: hormônio antimülleriano, contagem de folículos antrais, reserva ovariana, amenorreia relacionada à quimioterapia, anovulação relacionada à quimioterapia.

Abstract

Introduction: Ovarian reserve (OR) refers to quantity and, to some authors, quality of follicles present in ovaries at a given time. It is the measure used to assess the capacity of the ovary to produce oocytes. Its evaluation is through serum analysis of FSH, estradiol, inhibin and anti-Müllerian hormone (AMH) and through ultrasonography to count de antrals follicles (AFC). In the 50s, it was observed that women exposed to chemotherapy experienced premature ovarian failure, effect attributed to chemotherapy.

Objectives: To ascertain OR by means of AMH in young women with breast cancer exposed to chemotherapy comparing them with another ovarian reserve tests. To define risk predictors of anovulation (oligomenorrhea or amenorrhea) in those women.

Methods: A cohort study with 52 eumenorrheic patients (age < 40years) with breast cancer who received chemotherapy with cyclophosphamide. Assessment was carried out with serum samples and pelvic ultrasonography before chemotherapy (T1), and 2 (T2) and 6 (T3) months after chemotherapy.

Results: Mean age was 35.3 ± 3.8 years. Mean duration of follow-up was 14 ± 3 months. Anovulation was present in 40% of women during the chemotherapy, 85% 2 months after and 60% 6 months after chemotherapy. Mean age of anovulatory women in T3 was 36.5 ± 3.8 years. Women with regular cycles was 32.9 ± 3.5 years ($p = 0.02$). FSH levels rises and decreased significantly in T2 and T3. AMH levels declined significantly, down to undetectable levels at T2 from a median of 2.53 (1 –

5.31 ng/mL) at T1 ($p < 0.0001$) and remained unchanged from T@ and T3, even though some patients resumed normal menses. Median AFC was 11 (8.0 – 13.5) follicles at T1 and significantly lower at T2 and T3 ($p < 0.0001$). No difference was found between T2 and T3 in patients who resumed ovulation cycles after completion of chemotherapy, AMH and AFC levels were significantly lower as compared with baseline: 1.46 ($< 0.08 – 4.31$) ng/mL vs. 6.17 (3.19 – 10.07) ng/mL and 7 (5.5 - 10) follicles vs. 13 (11 – 15.5) follicles. In patients who remained ovulatory during chemotherapy or resumed normal menses, FSH and estradiol levels remained unchanged relative to baseline. AMH and AFC presented significantly negative correlation with age. The age of thirty-two years presented 96% of sensitivity and 39% of specificity to predict anovulation with ROC area under the curve (AUC) of 0.77. The ovarian reserve (OVR) tests with power to predict anovulation in women exposed to CT were AMH < 3.32 ng/mL (sensitivity of 85%, specificity of 75% and AUC of 0.87) and AFC < 13 follicles (sensitivity of 81%, specificity of 62% and AUC of 0.81). The AMH cut off to predict amenorrhea was 1,87 ng/mL (sensitivity of 82%, specificity of 83% and AUC of 0,84) and the AFC cut off was 9 follicles (sensitivity of 71%, specificity of 78% and AUC of 0.73). The analysis was not influenced by the number of cycles or dose of CT.

Conclusions: AMH and AFC are equally able to determine the OVR decline in chemotherapy exposed women. FSH is not adequate for this purpose, except in women who become amenorrheic. Thirty-two year old or older women, AMH levels < 3.32 ng/mL and AFC < 13 follicles determined significantly higher risk of anovulation after CT with cyclophosphamide. These women should be encouraged to preserve

their fertility. Among the OVR tests, AMH was the powerful to predict the anovulation.

Key-words: anti-Müllerian hormone, antral follicles count, amenorrhea related chemotherapy, anovulation related chemotherapy.

Lista de Figuras

Figura 1: Cortes histológicos de ovário exposto à quimioterapia e de ovário normal.....pág. 21

Figura 2: Razão de Chances (*Odds Ratio*) para FOP segundo o tipo de quimioterápico utilizado.....pág. 22

Figura 3: Ocorrência de amenorreia após quimioterapia conforme idade.....pág. 25

Figura 4: Modelo de perda da reserva ovariana natural da concepção até a menopausa.....pág. 28

Figura 5: Valores médios de CFA conforme faixa etária.....pág. 34

Figura 6: HAM na modulação do desenvolvimento e recrutamento folicular.....pág. 37

Figura 7: Níveis de HAM em diferentes tipos de amenorreia.....pág. 39

Lista de Abreviaturas

CFA – contagem de folículos antrais

FIV – Fertilização *in vitro*

FOP – Falência ovariana precoce

FSH – Hormônio folículo estimulante

HAM – Hormônio antimülleriano

IMC – Índice de massa corporal

LH – Hormônio luteinizante

QT – Quimioterapia

RO – Reserva ovariana

SOP – Síndrome dos Ovários Policísticos

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

USTV – ultrassonografia pélvica transvaginal

Sumário

Abstract.....	11
Lista de Figuras	14
Lista de Abreviaturas	15
1. Introdução.....	17
2. Revisão Bibliográfica	20
2.1 Quimioterapia e Mecanismos de Gonadotoxicidade.....	20
2.2 Importância Clínica da Gonadotoxicidade	23
2.3 Reserva Ovariana	26
2.3.1 Marcadores da Reserva Ovariana.....	28
2.4 Gonadotoxicidade e Marcadores da Reserva Ovariana	40
3. Justificativas.....	44
4. Objetivos	45
5. Referências Bibliográficas da Revisão.....	46
6. Artigo 1	58
7. Artigo 2	83
8. Considerações finais.....	113
9. Anexos	114

1. Introdução

A reserva ovariana (RO) é a medida pela qual se avalia a capacidade de produção de oócitos pelo ovário e conseqüente potencial reprodutivo, isto é, oócitos passíveis de fertilização resultando em gestação. É definida como o número de folículos presentes nos ovários em um dado momento, preferencialmente na primeira fase do ciclo menstrual (1, 2). Ela pode ser inferida de várias formas. Clinicamente, pela ciclicidade menstrual; laboratorialmente, mediante dosagem dos níveis séricos do hormônio folículo estimulante (FSH), estradiol, inibina B e, mais recentemente, do hormônio antimülleriano (HAM), e ainda, ultrassonograficamente, através da contagem de folículos antrais (CFA). Uma RO baixa reflete o “envelhecimento ovariano”, comprometendo o prognóstico reprodutivo (1).

O HAM é uma glicoproteína dimérica sequenciada há mais de 20 anos. No início da última década foi estudado não só como determinante da anatomia genital interna fetal, mas como modulador da transição dos folículos primordiais a folículos em crescimento. Por esta razão, foi aventado como um teste de RO, representando a quantidade de folículos ovarianos (3). Este dado foi reforçado quando os estudos demonstraram que o HAM torna-se indetectável na menopausa, momento em que há o esgotamento da RO (4). Com base na hipótese de que o HAM tem a capacidade de quantificar a RO, inúmeros autores vem estudando este hormônio, sugerindo que ele seja o mais fiel marcador da quantidade de oócitos disponíveis (5).

Em 1956 observou-se que mulheres submetidas à quimioterapia (QT) apresentavam falência ovariana mais precocemente. Este efeito foi posteriormente atribuído à gonadotoxicidade quimioterápica (6). Atualmente, cerca de 5% das neoplasias malignas acometem pessoas com menos de 35 anos e cerca de 7,5% das neoplasias em indivíduos abaixo de 40 anos são de origem mamária. Nos Estados Unidos, cerca de 50.000 novos casos de neoplasia são diagnosticados ao ano em indivíduos com menos de 35 anos (7). Naquele país, exceto pelo câncer de pele, o câncer de mama é a neoplasia mais comumente diagnosticada em mulheres e acomete cerca de 11 mil mulheres ao ano (8, 9). Com o diagnóstico cada vez mais precoce, crianças e adolescentes melhoram seu prognóstico à custa de tratamentos quimioterápicos iniciados logo após a identificação da doença, que, embora muito efetivos contra a doença a ser tratada, podem ter efeito deletério à função gonadal (7). Hudson e colaboradores em recente revisão descreveram taxas de sobrevivência de 80% entre crianças e adolescentes acometidos por neoplasias. Estes muitas vezes alcançam a idade adulta com a função reprodutiva comprometida, mesmo que mantenham, à avaliação clínica inicial, potencial reprodutivo normal (ciclicidade menstrual no caso das meninas) (10).

Avaliações histológicas de ovários de mulheres expostas à QT gonadotóxica demonstraram que o principal mecanismo desencadeador da infertilidade nessas mulheres é a destruição dos folículos, com consequente perda da célula germinativa (oócito) e das células da esteroidogênese (teca e granulosa) (11, 12). Para alguns autores, mutações genéticas podem favorecer a depleção oocitária (13). As

mulheres têm número finito de células germinativas, sendo comum a ocorrência de falência ovariana precoce (FOP) após a QT (14, 15).

Devido à necessidade de se avaliar adequadamente o prognóstico reprodutivo de mulheres com infertilidade, a RO deve possuir métodos de avaliação confiáveis. Pensando no tempo de seguimento necessário para se avaliar com segurança um marcador da queda da RO, optou-se em utilizar um grupo de pacientes com declínio rápido da quantidade de oócitos. O grupo de pacientes selecionado para este estudo foi, então, o de mulheres com câncer de mama expostas à QT gonadotóxica. Além disso, definir quais pacientes estão sob maior risco de perda da capacidade reprodutiva após exposição à QT torna-se importante para aquelas que desejam constituir prole após a cura da doença.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Quimioterapia e Mecanismos de Gonadotoxicidade

A gonadotoxicidade foi descrita pela primeira vez em 1956, por Louis e colaboradores, onde observaram que mulheres submetidas à QT com busulfam para leucemia mielóide eram acometidas pela menopausa mais precocemente que o habitual. Em 1958 e 1960, Galton e Belohorsky respectivamente, corroboraram os dados apresentados por Louis (6). Na década seguinte, vários autores relataram que o uso da ciclofosfamida para artrite reumatóide, síndrome nefrótica e lúpus eritematoso sistêmico induzia amenorreia, eventualmente permanente. Em 1971, Miller e colaboradores relataram que em autópsia de uma jovem de 13 anos portadora de artrite reumatóide juvenil exposta a doses substanciais de ciclofosfamida foi observada a ausência de oogônias e de folículos em desenvolvimento, sugerindo que a ação tóxica da ciclofosfamida sobre a função reprodutiva era devida à ação direta do fármaco sobre o ovário (6).

Meirow dedicou-se a inúmeros estudos com o objetivo de estudar o efeito dos quimioterápicos sobre a função reprodutiva. A apoptose, principal evento associado à gonadotoxicidade, foi seu grande foco de atenção. Em 1999, associado a colaboradores, expôs ratas jovens a diferentes doses de ciclofosfamida, demonstrando que a apoptose folicular foi proporcional à dose de quimioterápico e que ratas com até metade de seus folículos destruídos não tiveram repercussões clínicas deste evento, isto é, mantiveram ovulação e gravidez semelhantes às

controles (11). Mais tarde, ao estudarem fragmentos de ovário de mulheres expostas e não expostas à QT, demonstraram que nas primeiras, além da diminuição da contagem de folículos havia um fator vascular de gonadotoxicidade. Os vasos sanguíneos do córtex ovariano apresentavam-se espessados com proeminente hialinização, estreitamento e até obliteração e um padrão de neovascularização anárquico. (**Figura 1**) (16).

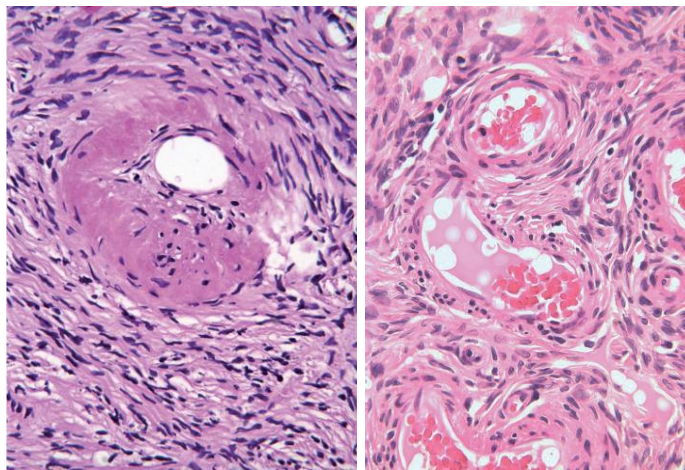


Figura 1

Esquerda: fragmento de ovário exposto à QT – hialinização da parede vascular, estreitamento da luz

Direita: ovário normal, não exposto à QT

(Meirow, Hum Reproduction vol22. Nº6 pp 1626-33, 2007)

A importância de fatores genéticos predisponentes à gonadotoxicidade também já foi avaliada. Perez e colaboradores, em 1997, demonstraram que em cultivo do complexo *cumulus oophorus* de ratas, a ativação de genes da família caspase e Bax (genes efetores de morte celular) e a ceramida (lipídeo segundo mensageiro) eram decisivos para a determinação da apoptose de células da granulosa e oócitos secundária à ação de doxirrubicina. O efluxo de potássio das células da granulosa e oócitos foi sugerido como sendo provável regulador dos eventos apoptóticos (17, 18).

Takada e colaboradores, em 2004, com base no mecanismo de ação terapêutico da ciclofosfamida, a ativação de enzimas do citocromo P450 (CYP), realizaram um estudo com objetivo de determinar se mutações no citocromo P450 eram os responsáveis pelo grau de resposta à ação quimioterápica em pacientes com nefrite lúpica, assim como pelo grau de gonadotoxicidade. Sessenta e duas pacientes foram genotipadas para variantes alélicas de genes responsáveis pela codificação de enzimas relacionadas ao metabolismo da ciclofosfamida (CYP2B6, CYP2C19, CYP2C9 e CYP3A5). Pacientes com mutações heterozigóticas ou homozigóticas para o alelo CYP2C19 apresentaram incidência significativamente menor de FOP (19).

Irene e colaboradores, em 2010, estudaram a associação de polimorfismos genéticos e a incidência FOP após a QT. Em um estudo de coorte, 127 pacientes submetidas á QT com ciclofosfamida para câncer de mama tiveram os genes responsáveis pela codificação de enzimas envolvidas na ativação da ciclofosfamida (CYP2B6, CYP3A4 e CYP3A5) e os genes responsáveis por enzimas envolvidas na detoxificação da ciclofosfamida (GSTA, GSTM1, GSTP1 e GSTT1) identificados no intuito de investigar polimorfismos. Como resultado, ao estratificarem as pacientes por idade, identificaram que pacientes com polimorfismos para CYP3A4 *1B tinham maior correlação com a incidência de falência ovariana relacionada à QT (20).

No último ano, Soleimani e colaboradores publicaram um estudo sobre os efeitos ovarianos da doxorrubicina , em que fragmentos de ovários humanos foram expostos a essa droga ou placebo *in vitro* e em xenotransplantes (tecido ovariano humano transplantado no dorso de ratos). A análise foi realizada com o objetivo de

identificar lesões do DNA / núcleo celular (*Double-strand DNA breaks*) através do aumento da expressão da γ H2AX. A análise histológica e imuno-histoquímica revelou dano celular em folículos primordiais, oócitos e células da granulosa com baixo potencial de reparo do dano ao DNA, representado por extensa apoptose. Este efeito parece ter correlação direta com a dose de quimioterápico utilizado. Além disso, identificou dano à vascularização e ao estroma ovariano, que independente da perda de oócitos e células da granulosa, deve estar relacionado ao efeito gonadotóxico da QT. Os autores concluíram que o envelhecimento ovariano após o tratamento quimioterápico parece ser desencadeado por uma série de fatores envolvendo apoptose, alterações no DNA de oócitos e das células da granulosa, além de alterações vasculares (21).

2.2 Importância Clínica da Gonadotoxicidade

A toxicidade gonadal provocada pelos agentes quimioterápicos é dependente da idade da paciente, do tipo e da dose do quimioterápico, da duração do tratamento e da associação entre os quimioterápicos (22-26). Também foi aventado que a fase do ciclo menstrual em que a QT é administrada pode ter influência sobre o efeito gonadotóxico das drogas, sendo mais nocivo quando aplicadas entre o 7º e o 14º dias do ciclo (27).

Dentre os agentes quimioterápicos, os alquilantes são os que apresentam maior potencial gonadotóxico e são os mais comumente associados à FOP, que por não serem célula-específicos, também atingem folículos primordiais em repouso. Pacientes jovens que recebem ciclofosfamida têm seu risco aumentado de 4 vezes

de entrar em falência ovariana quando comparadas aos controles que receberam outros agentes (**Figura 2**) (23, 28-30). Reh e colaboradores estudaram o efeito adicional dos taxanos à ciclofosfamida na incidência de amenorreia e não encontraram diferenças tanto a curto quanto longo prazo (31).

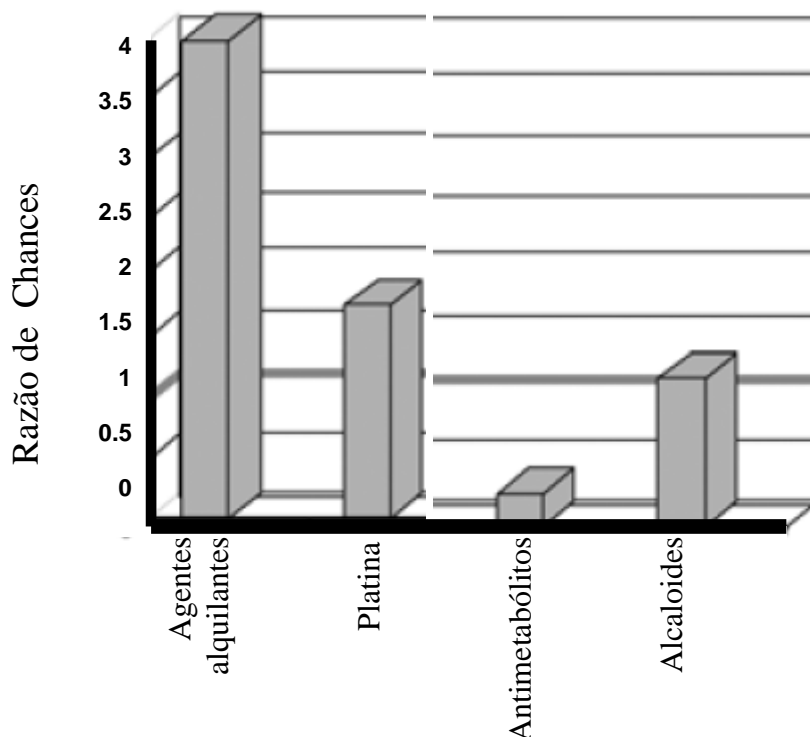


Figura 2 Razão de Chances (Odds Ratio) para FOP segundo o tipo de quimioterápico utilizado em relação ao uso de outros agentes. A Razão de Chances = 1 representa o risco geral de FOP da população estudada, independente do agente utilizado, que foi de 34%. Adaptado de Meirou et al, Clinical Obstetrics and Gynecology, Vol 53,nº4, Dec2010(28)

A parada da menstruação durante o tratamento é comum a grande parte das mulheres submetidas à QT com agentes alquilantes, entretanto pode ser um efeito temporário em torno de 50% das mulheres (13). A incidência de amenorreia em pacientes submetidas à QT varia de 5 a 40% em pacientes com idade até 40 anos e de 30 a 90% em pacientes acima desta idade (24). Lower e colaboradores

identificaram um risco de amenorreia de 33% durante a QT gonadotóxica e de 45% após seu término. A incidência de FOP foi claramente maior nas pacientes mais velhas (30). Goodwin e colaboradores relataram a ocorrência de amenorreia permanente em 40% de mulheres com câncer de mama expostas à QT com ciclofosfamida antes dos 40 anos de idade (32, 33). Em 2006, Petrek e colaboradores acompanharam aproximadamente 600 mulheres com câncer de mama expostas à QT e demonstraram claramente a importância da idade na ocorrência de falência ovariana após a QT (figura 3) (34). É importante relatar que em pacientes com câncer de mama cujas células neoplásicas apresentam receptores para estrogênios, a instalação da amenorreia após a QT pode determinar melhor prognóstico (35).

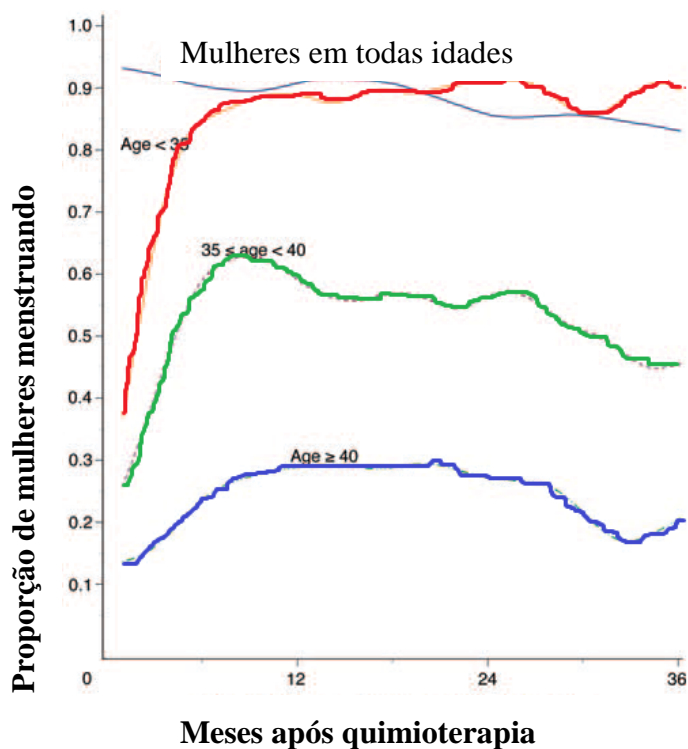


Figura 3: ocorrência de amenorreia após QT conforme idade

Adaptado de Petrek et al. *Journal of Clinical Oncology*. 2006;24(7):1045-51(34)

Outros autores demonstraram que pacientes que realizaram QT por 6 ou mais ciclos apresentaram menopausa significativamente mais cedo do que pacientes que não realizaram tratamento ou que receberam até 5 ciclos (36).

Apesar de nem todas as mulheres evoluírem para FOP após a QT, é provável que o número de folículos ovarianos diminua devido insulto gonadotóxico, ocorrendo perda da RO mesmo que se mantenham eumenorreicas. Estudos demonstram que, apesar de a ciclicidade menstrual permanecer, a evolução fisiológica até a falência ovariana é acompanhada por perda gradual da função reprodutiva devido declínio da RO (5, 37, 38).

2.3 Reserva Ovariana

Reserva ovariana é um termo utilizado para caracterizar a quantidade de folículos ovarianos passíveis de sofrerem estimulação gonadotrófica. Diz respeito, portanto, ao estoque de oócitos disponíveis para a reprodução (39). A RO diminui gradativamente desde a vida intrauterina até sua extinção na menopausa, quando ocorre a falência ovariana e consequente ausência de ciclos menstruais. Durante a vida fetal, as células germinativas multiplicam-se por mitose e estima-se que alcancem um número de aproximadamente 6 a 7 milhões de oogônias por volta de 20 semanas de vida intrauterina. A partir daí, inicia-se um processo geneticamente regulado de perda dessas células (apoptose). As oogônias que permaneceram como parte da população celular ovariana entram na primeira divisão meiótica e, ao

nascimento, estarão em número aproximado de 2 milhões de células. Pelo fato da apoptose celular ser um processo contínuo, na chegada à puberdade serão apenas 500 a 300 mil oócitos em meiose I (40). De acordo com um modelo exponencial de Faddy e colaboradores, a taxa de queda na contagem de folículos ovarianos aumenta significativamente após os 37 anos, quando a contagem de folículos está em torno de 25.000 folículos, alcançando cerca de 1000 folículos por volta dos 51 anos, média de idade da menopausa na população (41). Em 2010, Wallace e colaboradores publicaram um modelo de declínio de RO natural, da concepção até 55 anos de idade, onde identificaram perda de 88% da RO aos 30 anos e 97% aos 40 anos (**Figura 4**) (42). Estas considerações são para a população feminina global, mas certamente mulheres da mesma faixa etária apresentam reservas ovarianas diferentes, determinadas por fatores como história familiar de FOP, mutações do cromossomo X, síndrome do X frágil, polimorfismos genéticos, autoimunidade (ooforite), manipulação ovariana prévia, ooforectomia, tabagismo, tratamentos quimioterápicos ou radioterápicos, infecções e até endometriose severa. Assim, para estimar a reserva ovariana não é suficiente a simples avaliação da idade da mulher, tendo em vista que inúmeros outros fatores podem contribuir para diferenças na reserva ovariana (40).

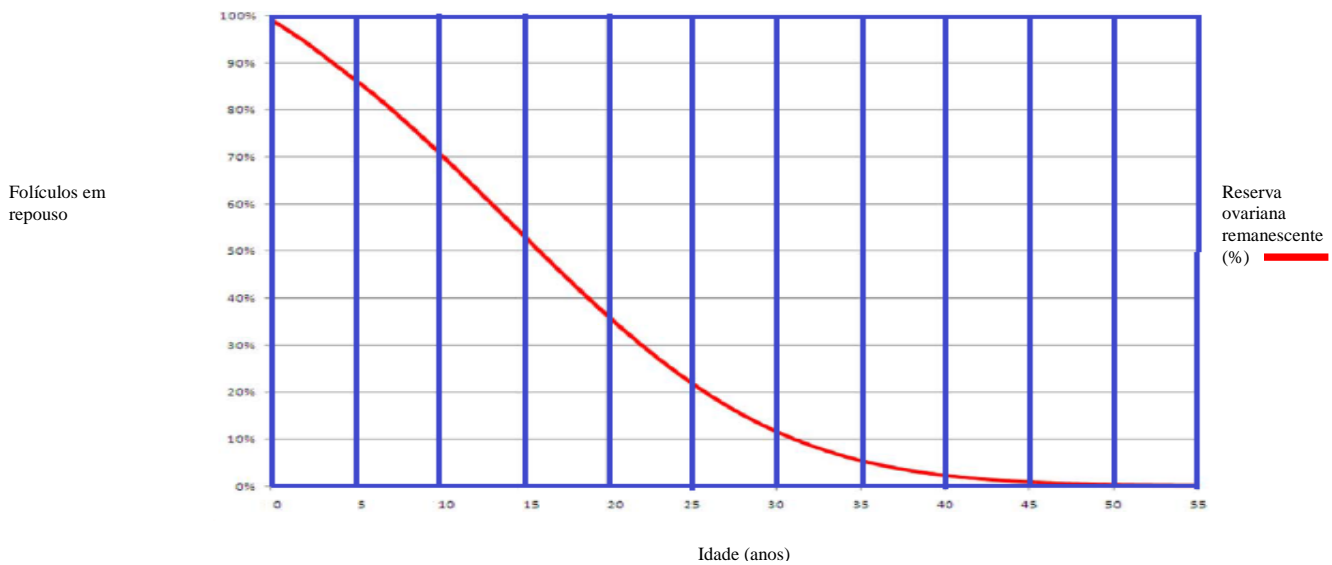


Figura 4: Modelo de perda da reserva ovariana natural da concepção até a menopausa.

Porcentagem da reserva ovariana relacionada ao aumento da idade (do nascimento até os 55 anos). 100% da reserva corresponde a aproximadamente 7 milhões de oogônias com cerca de 20 semanas de vida intrauterina. Adaptado de Wallace et al, PLoS One. 2010 Jan 27;5(1):e8772 (42).

2.3.1 Marcadores da Reserva Ovariana

A avaliação da função ovariana pode ser feita de várias maneiras. Clinicamente, ela é inferida através da avaliação da idade e da ciclicidade menstrual. A ciclicidade menstrual representa haver quantidade adequada de estrogênio, suficiente para manter o eixo hipotálamo-hipófise funcionando regularmente. Entretanto, a regularidade menstrual não oferece informação adequada a respeito da quantidade de oócitos.

A idade da mulher é o melhor preditor da RO quando se considera a população geral, isto é, independente da avaliação de marcadores laboratoriais, pela idade da mulher pode-se inferir a quantidade oocitária (43).

Os testes de RO são disponíveis em grande número, porém, nenhum deles é suficientemente fiel no que diz respeito à qualidade e quantidade oocitária (1). Portanto, comumente são utilizados em concomitância para que se possa ter uma avaliação mais precisa. Laboratorialmente, vários hormônios podem ser dosados em amostras únicas, isto é, os chamados testes estáticos, ou em várias amostras após estímulo hormonal exógeno, os chamados testes dinâmicos. Por métodos de imagem, como por ultrassonografia pélvica transvaginal (USTV), o número de folículos antrais (2 - 10 mm) pode ser avaliado (44).

Os testes de RO devem ser aplicados com cautela. Eles não têm a capacidade de prever a chance de gestação natural, pois na grande maioria dos estudos foram estudados vinculados ao sucesso de gestação após procedimentos de reprodução assistida (45).

2.3.1.1 Hormônio Folículo Estimulante

A dosagem do FSH no início do ciclo menstrual (2º ou 3º dia) tem sido utilizada como medida da RO. Níveis elevados de FSH correlacionam-se à baixa RO (46). Isso é explicado pela queda dos níveis de inibina B e estradiol produzidos pela menor quantidade de folículos ovarianos, provocando um aumento precoce do FSH no início do ciclo menstrual (47).

Níveis elevados de FSH são evidências inequívocas de queda da fertilidade, entretanto, é um parâmetro tardio no processo de envelhecimento ovariano, isto é, seus níveis só tornam-se verdadeiramente elevados quando já está ocorrendo a

transição menopáusicas, não sendo capaz de prever a queda da reserva ovariana antes que esta esteja criticamente comprometida (48).

Em 2000, van Montfrans e colaboradores estudaram mulheres subférteis com níveis de FSH maiores que 10UI/L no 3º dia do ciclo menstrual e compararam-nas com pacientes subférteis com FSH menor que 10UI/L, controles, pareadas pela idade, com o objetivo de avaliar o valor preditivo dos níveis elevados de FSH para fecundidade. Identificaram que níveis elevados de FSH têm um valor preditivo de 48% e níveis normais, de 62%. O valor preditivo positivo de terem um nascido vivo foi 42% e 46%, respectivamente. O autor concluiu que níveis séricos elevados de FSH em populações subférteis com ciclos menstruais ovulatórios não são preditores de gravidez nem acrescentam informação prognóstica na propedêutica destas mulheres (49).

O teste de Navot, descrito na década de 80, consiste em um teste dinâmico da RO onde é dosado o FSH sérico no 3º e 10º dia do ciclo menstrual, após uso de 100mg de citrato de clomifeno por via oral do 5º ao 9º dia. Este autor demonstrou que algumas mulheres, apesar de níveis séricos normais no 3º dia do ciclo menstrual, apresentam uma resposta exagerada ao estímulo com citrato de clomifeno no 10º dia do ciclo menstrual, com níveis de FSH maiores do que 26 mUI/L. Essas mulheres tiveram menores taxas de gestação em coito programado com estimulação da ovulação. Acredita-se que mulheres com menor RO tenham menor produção de inibina B e estradiol, resultando em menor retro controle sobre a hipófise, elevando os níveis séricos de FSH (50).

Loumaye e colaboradores, em 1990 descreveram um teste dinâmico utilizando o citrato de clomifeno para avaliação da RO. Realizaram a dosagem de FSH no 3º dia do ciclo menstrual somando-a ao valor obtido no 10º dia do ciclo, após uso de citrato de clomifeno 100mg ao dia do 5º ao 9º dia. Demonstraram que pacientes com somatórios de FSH maiores que 26mUI/ml apresentavam menores respostas à estimulação ovariana com gonadotrofinas para ciclos de FIV com menor número de folículos aspirados, oócitos recuperados, embriões obtidos, maior taxa de cancelamento de ciclo para FIV e menores taxas de gravidez (51).

2.3.1.2 Inibina B

A inibina é um peptídeo com três subunidades (alfa, beta-A e beta-B) e é produzida pelas células da granulosa de folículos pré-antrais, tendo níveis variáveis durante o ciclo menstrual, conforme crescimento folicular. A inibina é um potente inibidor da secreção hipofisária de FSH, e a diminuição de seus níveis séricos pode predizer a baixa reserva ovariana (52).

Seifer e colaboradores, em 1997 associaram baixa resposta à estimulação com gonadotrofinas, altas taxas de cancelamento de ciclos de FIV, baixo número de oócitos recuperados e baixas taxas de gravidez quando os níveis de inibina B eram inferiores a 45 pg/ml, mesmo após ajuste para idade e níveis de FSH (53).

Muttukrishna e colaboradores, em 2004, demonstraram que o poder da inibina como marcador da RO é maior quando associado a outros marcadores como o FSH (54). Em outro estudo, o mesmo autor correlacionou os níveis de inibina B com o número de oócitos fertilizados, encontrando que valores mais altos inibina B

correlacionaram-se com maior taxa de fertilização, mas também demonstrou que ela tem limitado poder para predizer resposta ovariana quando utilizada isoladamente (55).

Outros autores, como van Rooij e Burger e seus colaboradores, em 2005 e 2007, respectivamente, relataram que a Inibina B não apresenta queda gradual de seus níveis durante a perda da quantidade folicular além de não haver um valor sérico correlacionado especificamente com menor RO, diferentemente do que sugeriram Seifer em colaboradores em 1997. Van Rooij e Burger sugeriram que a inibina B se altera significativamente apenas na fase tardia da queda da RO (53, 56, 57).

2.3.1.3 Estradiol

O estradiol foi um dos primeiros hormônios utilizado como marcador da RO. Ao longo dos anos vários autores tentaram, sem sucesso, utilizá-lo como preditor de gestação. A grande maioria deles concluiu que o estradiol sérico basal não apresenta valor na predição de desfechos relacionados à RO (resposta ovariana à estimulação com gonadotrofinas e taxa de gravidez), nem mesmo quando associado a outros marcadores (58). Broekmans e colaboradores, em 2006, realizaram revisão sistemática de vários marcadores hormonais e concluíram que níveis de estradiol são pobres preditores de gravidez e que a sua aplicabilidade clínica antes de iniciar ciclos de FIV para predição de resposta à estimulação ovariana ou para gravidez é de baixa acurácia (1).

2.3.1.4 Avaliação Ultrassonográfica

A avaliação da RO através da USTV na fase folicular precoce tem mostrado ser tão ou mais fiel do que boa parte dos marcadores séricos hormonais (59). Os dois parâmetros ultrassonográficos correlacionados com a RO são a contagem de folículos antrais (CFA) e o volume ovariano, que devem ser avaliados através da via transvaginal. O volume ovariano deve ser calculado com base na fórmula da elipse ($0,523 \times \text{comprimento} \times \text{largura} \times \text{profundidade}$). A CFA é realizada entre o 2º e 4º dia do ciclo, sendo considerados os folículos com diâmetro médio entre 2 e 10mm de ambos ovários (60-62).

Bancsi e colaboradores, em 2002, avaliaram vários possíveis preditores de má resposta à estimulação em ciclos de FIV. A CFA foi, isoladamente, o de melhor valor prognóstico para resposta ovariana ao tratamento. Apesar disso, os autores concordam que associando outros marcadores à CFA, como FSH e inibina B, pode-se aumentar a predição da resposta ovariana (58). Em 2005, Muttukrishna e colaboradores demonstraram que a CFA correlaciona-se com o número de oócitos coletados em punção ovariana para FIV e é preditiva de gestação clínica (55).

Uma metanálise de 2007, cujo objetivo foi comparar o valor preditivo do volume ovariano em relação à CFA para RO, encontrou que a CFA é claramente superior ao volume ovariano para prever a resposta ovariana em ciclos de FIV. Porém, a taxa de gestação após tratamentos de FIV não foi correlacionada a nenhum destes 2 parâmetros ultrassonográficos (63).

La Marca e colaboradores estudaram a correlação entre idade e CFA em mais de 300 mulheres, e demonstraram correlação negativa entre a idade e este marcador. Estes autores estabeleceram valores de CFA para cada idade (**Figura 5**) (64).

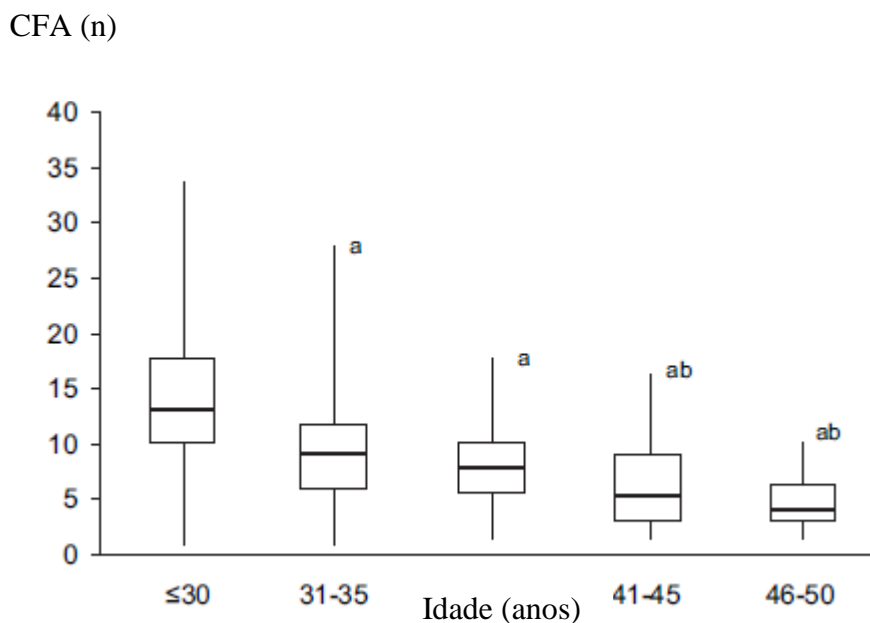


Figura 5 Valores médios de CFA conforme faixa etária.

A linha horizontal representa a média, o quadrado representa o percentil 25-75% e a linha vertical representa os valores extremos. ANOVA indica diferença estatística nos valores de CFA entre os grupos (a= $p < 0,05$ versus grupo ≤ 30 anos; b= $p < 0,05$ versus grupo ≤ 30 , 31-35 e 36-40 anos). Adaptado de La Marca et AL, *Fertility and Sterility*, 2011, vol 95, nº 2, 684-688 (64)

2.3.1.5 Hormônio Antimülleriano

O HAM tem sido alvo de estudiosos da RO, prometendo ser o mais fiel marcador da quantidade de oócitos, e muito recentemente, como possível marcador de qualidade oocitária (65).

O HAM é uma glicoproteína dimérica membro da superfamília TGF (transforming growth factor), descoberto em 1947 por Alfred Jost. Nos fetos masculinos é produzido pelas células de Sertolli testiculares a partir de sete semanas de vida intrauterina, tendo como função determinar o desenvolvimento dos ductos de Wolff e inibição dos ductos de Muller. Esta ação inibitória resulta no desenvolvimento da genitália interna masculina (epidídimo, vasos deferentes e vesícula seminal) e ausência do desenvolvimento da genitália interna feminina (útero, trompas de falópio e terço superior da vagina). Nos fetos femininos, o HAM somente é produzido pelas células da granulosa a partir de 36 semanas de vida intrauterina e em menores quantidades do que nos indivíduos masculinos. Na puberdade, passa a ser mensurável, e, diferentemente dos outros marcadores, mantém níveis constantes ao longo do ciclo menstrual, não sofrendo flutuação, o que continua durante toda a vida reprodutiva. Na menopausa, finda sua secreção com o desaparecimento dos folículos ovarianos (3, 66, 67).

2.3.1.5.1 A Ação do HAM no Ovário

O HAM parece ter um papel na regulação da seleção e maturação de folículos ovarianos, afetando a transição dos folículos primordiais em repouso a folículos em crescimento. O mecanismo envolvido seria uma ação inibitória sobre a proliferação das células da granulosa, atividade da enzima aromatase e expressão do receptor de LH (3, 68-70).

Secretado pelas células da granulosa de folículos pré-antrais e pequenos folículos antrais, o HAM é produzido até que os folículos alcancem um estado de

diferenciação suficiente para serem selecionados para dominância folicular (71, 72). Fanchin e colaboradores demonstraram que folículos pequenos de até 12mm secretam HAM em níveis até três vezes maiores do que folículos com 16mm ou mais (73). Apesar de os verdadeiros mecanismos de regulação da expressão ovariana do HAM ainda não terem sido completamente elucidados, parece que o pico de expressão do HAM em folículos que estejam até o estágio de dominância tem a função de coordenação do desenvolvimento folicular (**Figura 6**) (74).

O HAM é considerado um regulador negativo dos estágios iniciais do desenvolvimento folicular. Durlinger e colaboradores cultivaram folículos primordiais de ratas com dois dias de vida na presença de HAM e observaram que, após 48 hs, havia 50% menos folículos em crescimento, demonstrando que o HAM age como um freio na ativação dos folículos primordiais e pré-antrais (75). Com base nestas observações, acredita-se que o HAM deva ser um dos fatores envolvidos na responsividade dos folículos ovarianos durante o desenvolvimento folicular.

Modulação do HAM no desenvolvimento folicular

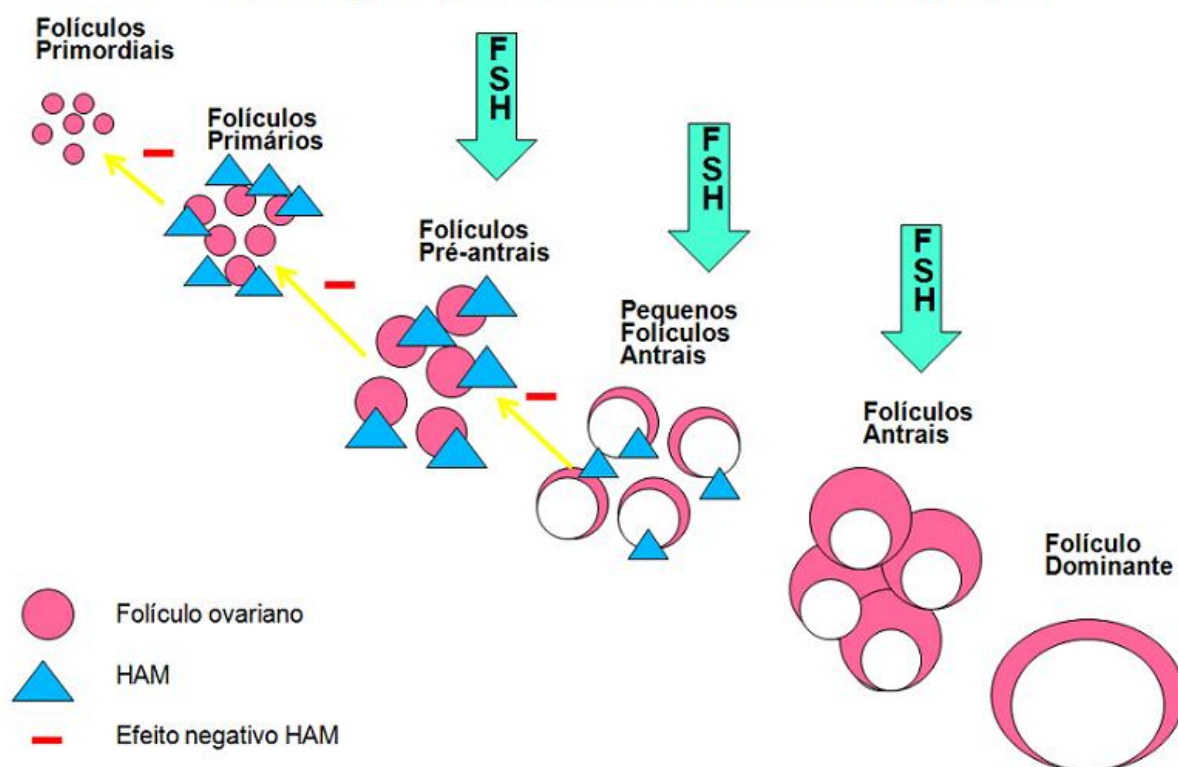


Figura 6: HAM na modulação do desenvolvimento e recrutamento folicular.

O esquema gráfico demonstra a ação negativa do HAM, secretado em maior quantidade nos estágios de folículo pré-antral e pequenos folículos antrais, exercendo uma ação negativa sobre os demais folículos que poderiam ser recrutados. Funciona como uma espécie de freio, evitando o recrutamento de maior quantidade de folículos. A partir do momento que se tornam sensíveis ao FSH, isto é, tornam-se sujeitos à dominância folicular, os folículos diminuem a produção de HAM pois o recrutamento folicular já foi estabelecido.

Esquema gráfico adaptado de D'Avila AM et al. Reprodução & Climatério. 2008 Janeiro/Março;23:14 - 9.(66)

2.3.1.5.2 O HAM na Avaliação da Reserva Ovariana

Os primeiros estudos em humanos sobre o HAM como marcador da RO datam do início da última década. Em 2002, Vet e colaboradores realizaram um estudo prospectivo com mulheres com idades entre 20 e 35 anos, dosando os níveis de HAM no 3º dia em dois ciclos menstruais com intervalo médio de $2,6 \pm 1,7$ anos.

Observaram que as concentrações de HAM e a CFA mostraram queda mesmo em mulheres que se mantiveram ovulatórias, diferentemente de outros marcadores (FSH e Inibina B), que não mostraram mudanças nos seus níveis séricos em mulheres com ciclos menstruais regulares (37).

Para avaliar marcadores da RO e definir quais apresentam maior poder preditivo para a transição à menopausa, van Rooij e colaboradores estudaram 81 mulheres entre 25 e 46 anos, com ciclos regulares, em intervalos de 4 anos. Demonstraram que o HAM, mesmo avaliado isoladamente, pode ser indicador fiel da RO. Nesse estudo o HAM caiu mesmo em pacientes jovens, enquanto que FSH e inibina B somente tiveram variação no grupo de mulheres com mais de 40 anos, concluindo que o HAM é um bom marcador laboratorial da queda fisiológica da RO em qualquer idade (5, 56). Em outra publicação, correlacionaram irregularidade menstrual destas pacientes e mudança nos marcadores de RO. Identificaram que apenas a CFA e, de forma mais expressiva, os níveis de HAM modificaram-se significativamente nas mulheres que mantiveram ciclos menstruais regulares ao longo dos 4 anos de avaliação. Níveis de FSH somente modificaram naquelas pacientes que passaram a apresentar irregularidade menstrual (70).

La Marca e colaboradores publicaram que em mulheres submetidas a ooforectomia bilateral o HAM sérico era indetectável, demonstrando ser o ovário a única fonte de HAM (4). Esta hipótese foi corroborada por outro estudo do mesmo autor, onde os níveis de HAM em pacientes com FOP foram indetectáveis, enquanto na amenorreia hipotalâmica os níveis de HAM eram similares ao grupo controle e na Síndrome dos Ovários Policísticos o HAM estava elevado (**Figura 7**) (3, 67, 76).

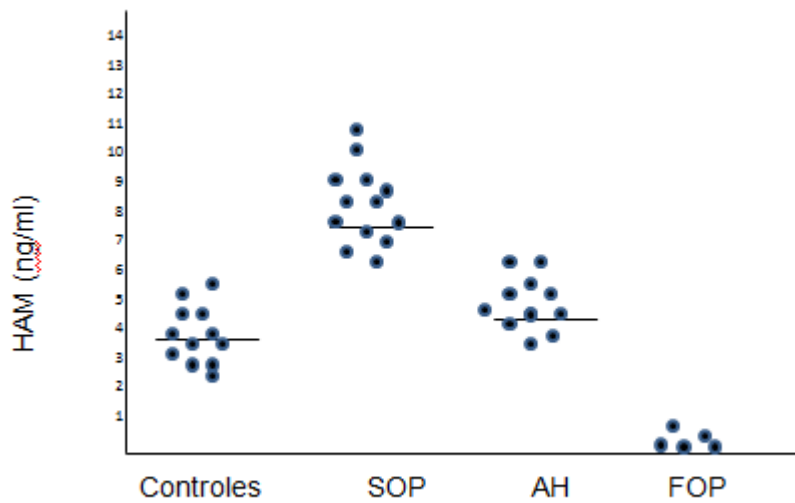


Figura 7: Níveis de HAM em diferentes tipos de amenorreia

SOP: Síndrome dos Ovários Policísticos

AH: Amenorreia Hipotalâmica

FOP: Falência Ovariana Precoce

Adaptado de La Marca et AL. *Fertility and Sterility*. 2006;85(5):1547-9.(67)

Em 2011, um estudo com 42 mulheres que seriam submetidas à ooforectomia por doença benigna avaliou a correlação entre CFA, níveis de HAM, FSH e inibina B com o número de folículos primordiais encontrados na avaliação histológica, o que reflete a real RO. Após ajuste para a idade, os autores demonstraram que a quantidade de folículos primordiais se correlacionou apenas com a CFA e com os níveis de HAM (77).

Inúmeros outros estudos compararam o HAM aos marcadores classicamente estudados FSH, estradiol, inibina B e avaliação ultrassonográfica. A grande maioria deles demonstrou que as alterações na dosagem do HAM são mais precoces,

independente da faixa etária avaliada e da presença da regularidade menstrual. Independentemente da associação com outros marcadores, o HAM demonstra ter um bom valor preditivo para boa RO, com a vantagem de poder ser avaliado em qualquer fase do ciclo menstrual (54, 61, 78, 79).

2.4 Gonadotoxicidade e Marcadores da Reserva Ovariana

Em 2003, Bath e colaboradores, compararam mulheres com mais de 16 anos e ciclos menstruais regulares que haviam sofrido QT há mais de 2 anos com um grupo controle. Os resultados mostraram que o FSH, mesmo em mulheres com ciclos menstruais regulares, foi significativamente maior nas mulheres que sofreram QT gonadotóxica, enquanto o volume ovariano e o HAM foram significativamente menores no grupo da QT (80).

Yeh e colaboradores, em 2006 publicaram um estudo comparando os níveis séricos de FSH e HAM, de HAM intrafolicular e os achados histopatológicos ovarianos em ratas expostas a diferentes doses de cisplatina e à solução salina. Demonstraram que a apoptose folicular foi gradualmente maior conforme o aumento da dose de ciclofosfamida e que os níveis séricos e intrafoliculares de HAM foram significativamente menores nos grupos da cisplastina em comparação ao grupo controle, sem diferença entre as diferentes doses de cisplastina. Quanto à avaliação do FSH, o grupo exposto à maior dose de cisplatina apresentou níveis séricos superiores quando comparados à menor dose de quimioterápico. Não houve diferença nos níveis de FSH nos grupos com menor dose de ciclofosfamida e solução salina. Concluíram que os níveis de HAM são mais sensíveis na avaliação

da RO, tendo em vista que varia seus níveis com diferentes doses de ciclofosfamida, enquanto o FSH só é alterado quando há grande dano ao ovário (81).

Na metade da última década, foram publicados os primeiros estudos correlacionando gonadotoxicidade e HAM em humanos. Anderson e colaboradores avaliaram uma coorte de cinquenta mulheres com câncer de mama, com idades entre 28 e 52 anos, com seguimento de um ano. Demonstraram que o HAM teve queda sérica durante a QT, tornando-se indetectável em muitas mulheres. A inibina B teve queda menos expressiva, enquanto as concentrações de estradiol se mantiveram estáveis. Com estes resultados, o autor refere-se ao HAM como um indicador mais precoce da perda folicular induzida por quimioterápicos (82).

Em 2007, Singh e colaboradores estudaram 8 pacientes com média de idade de 36 anos e ciclos menstruais regulares, com índices de massa corporal e dosagens hormonais basais semelhantes, divididas em dois grupos, conforme esquema quimioterápico, os dois contendo ciclofosfamida, e comparou-as com um grupo controles férteis pareadas pela idade. Marcadores foram avaliados imediatamente antes do início da QT e após o seu término. Como resultado, todas as 8 pacientes estavam em amenorreia ao final do tratamento. Os parâmetros que não mostraram variação entre a avaliação basal e a avaliação após a QT foram o volume ovariano e os níveis de estradiol. Os níveis de inibina B, CFA e de HAM foram significativamente menores nos grupos de intervenção após o tratamento comparados à avaliação antes da QT e ao grupo controle, enquanto os níveis de FSH aumentaram nas mesmas comparações. Este estudo tem relevância, apesar do

pequeno número de pacientes incluídas, porque avaliou as pacientes antes e após o tratamento quimioterápico e comparou-as com um grupo controle (83) .

Lie Fong e colaboradores, em 2009, realizaram um estudo de coorte onde 185 mulheres com ciclos menstruais regulares que foram expostas à QT até os 18 anos de idade há pelo menos 5 anos e foram comparadas a 42 mulheres controles com ciclos menstruais regulares. Após ajuste para a idade, os níveis de HAM foram mais baixos nas sobreviventes da QT do que nos pacientes controles (84).

Recentemente, em 2010, Rosendahl e colaboradores também demonstraram que após a exposição à QT, o HAM diminui mais precocemente após o primeiro e segundo ciclos de QT, enquanto que o FSH e a inibina B só alteram após 3 ou 4 ciclos. Além disso, níveis mais altos de HAM antes do tratamento correlacionam-se a níveis mais elevados ao final do tratamento, reforçando que quanto maior a RO antes de iniciar a QT, menor é o impacto da QT (85). Corroborando esta última conclusão, em 2011, Anderson e colaboradores, realizaram seguimento de 5 anos em 42 mulheres expostas à QT por câncer de mama. O objetivo do estudo foi avaliar qual dos marcadores da RO tinha o maior valor em prever RO após o tratamento quimioterápico. Identificaram que apenas o HAM, e não FSH ou CFA, apresentou o poder de prever a RO após 5 anos de seguimento. Determinaram que níveis de HAM < 1,9 ng/mL são preditores da ocorrência de amenorreia após QT (86).

Dentre os marcadores para avaliação de RO, o HAM parece ser o marcador com variação mais precoce e fidedigna para avaliar a função ovariana do que os níveis de inibina B ou FSH, além de manter-se constante durante as diferentes fases

do ciclo menstrual (87). Apesar de a maioria dos estudos demonstrarem a superioridade do HAM sobre outros marcadores, alguns autores acreditam que pode ser cedo para priorizar a avaliação da RO através da dosagem de HAM, tendo em vista que outros marcadores também podem ser utilizados para este fim com poder semelhante, como visto em alguns estudos. O exemplo mais claro disso é CFA, muitas vezes com possibilidade de avaliação mais fácil e rápida pelo médico assistente (88, 89).

3. Justificativas

Este estudo justifica-se por haver necessidade de utilizarmos marcadores mais fiéis da RO, com o objetivo de oferecer um prognóstico mais preciso às pacientes que desejam constituir prole.

Se confirmado o poder do HAM em avaliar a RO, pacientes com RO em decréscimo e com risco de anovulação e consequente infertilidade, como aquelas com exposição a agentes gonadotóxicos, podem ser beneficiadas e alertadas para o risco de perda de fertilidade iminente, optando mais rapidamente pela constituição da prole ou utilização de técnicas de preservação da fertilidade.

4. Objetivos

a) Principal

Estudar o hormônio antimülleriano como marcador da RO em mulheres com câncer de mama expostas à QT gonadotóxica com ciclofosfamida num seguimento de pelo menos 6 meses após o término do tratamento, e compará-lo a outros marcadores.

b) Secundários

Avaliar a função ovariana de mulheres com câncer de mama submetidas à QT gonadotóxica com agente alquilante (ciclofosfamida) através da presença de ciclos menstruais.

Avaliar a ação gonadotóxica da ciclofosfamida através de marcadores hormonais (FSH e estradiol) e ultrassonográficos (contagem de folículos antrais).

5. Referências Bibliográficas da Revisão

1. 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 Nov-Dec;12(6):685-718.
2. Testing and interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2012 Dec;98(6):1407-15.
3. La Marca A VA. Anti-Müllerian hormone (AMH) in female reproduction: Is measurement of circulating AMH a useful tool? *Clin Endocrinol*. 2006;64(6):603-10.
4. La Marca A, De Leo V, Giulini S, Orvieto R, Malmusi S, Giannella L, et al. Anti-Müllerian hormone in premenopausal women and after spontaneous or surgically induced menopause. *J Soc Gynecol Investig*. 2005 Oct;12(7):545-8.
5. van Rooij IAJ TI, Broekmans FJM, Looman CWN, Scheffer GJ, Jong FH, Themmen APN, Velde ER. Anti-Müllerian hormone is a promising predictor for the occurrence of the menopausal transition. *Menopause: The Journal of The North American Menopause Society*. 2004;11(6):601-6.
6. Apperley JF, Reddy N. Mechanism and management of treatment-related gonadal failure in recipients of high dose chemoradiotherapy. *Blood Rev*. 1995 Jun;9(2):93-116.
7. Knopman JM, Papadopoulos EB, Grifo JA, Fino ME, Noyes N. Surviving childhood and reproductive-age malignancy: effects on fertility and future parenthood. *Lancet Oncol*. 2010 May;11(5):490-8.

8. Bouchardy C, Fioretta G, Verkooijen HM, Vlastos G, Schaefer P, Delaloye JF, et al. Recent increase of breast cancer incidence among women under the age of forty. *Br J Cancer*. 2007 Jun 4;96(11):1743-6.
9. DeSantis C, Siegel R, Bandi P, Jemal A. Breast cancer statistics, 2011. *CA Cancer J Clin*. 2011 Nov-Dec;61(6):409-18.
10. Hudson MM. Reproductive outcomes for survivors of childhood cancer. *Obstet Gynecol*. 2010 Nov;116(5):1171-83.
11. Meirow D, Lewis H, Nugent D, Epstein M. Subclinical depletion of primordial follicular reserve in mice treated with cyclophosphamide: clinical importance and proposed accurate investigative tool. *Hum Reprod*. 1999 Jul;14(7):1903-7.
12. Blumenfeld Z. Ovarian rescue/protection from chemotherapy agents. *J Soc Gynecol Investg* 2001;8:S60-64. *J Soc Gynecol Investg* 2001;8:S60-4.
13. Stearns V SB, Henry NL, Hayes DF, Flockhart DA. Breast cancer treatment and ovarian failure: risk factors and emerging genetic determinants. *Nature Reviews*. 2006 november;6:886-93.
14. Thomson AB, Critchley HO, Kelnar CJ, Wallace WH. Late reproductive sequelae following treatment of childhood cancer and options for fertility preservation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2002 Jun;16(2):311-34.
15. Falcone T, Attaran M, Bedaiwy MA, Goldberg JM. Ovarian function preservation in the cancer patient. *Fertil Steril*. 2004 Feb;81(2):243-57.
16. Meirow D, Dor J, Kaufman B, Shrim A, Rabinovici J, Schiff E, et al. Cortical fibrosis and blood-vessels damage in human ovaries exposed to chemotherapy. Potential mechanisms of ovarian injury. *Hum Reprod*. 2007 Jun;22(6):1626-33.

17. Perez GI, Knudson CM, Leykin L, Korsmeyer SJ, Tilly JL. Apoptosis-associated signaling pathways are required for chemotherapy-mediated female germ cell destruction. *Nat Med.* 1997 Nov;3(11):1228-32.
18. Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol Pharmacol.* 2001 Apr;59(4):657-63.
19. Takada K, Arefayene M, Desta Z, Yarboro CH, Boumpas DT, Balow JE, et al. Cytochrome P450 pharmacogenetics as a predictor of toxicity and clinical response to pulse cyclophosphamide in lupus nephritis. *Arthritis Rheum.* 2004 Jul;50(7):2202-10.
20. Su HI, Sammel MD, Velders L, Horn M, Stankiewicz C, Matro J, et al. Association of cyclophosphamide drug-metabolizing enzyme polymorphisms and chemotherapy-related ovarian failure in breast cancer survivors. *Fertil Steril.* 2010 Jul;94(2):645-54.
21. Soleimani R, Heytens E, Darzynkiewicz Z, Oktay K. Mechanisms of chemotherapy-induced human ovarian aging: double strand DNA breaks and microvascular compromise. *Aging (Albany NY).* 2011 Aug;3(8):782-93.
22. Meirrow D, Levron J, Eldar-Geva T, Hardan I, Fridman E, Zalel Y, et al. Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *N Engl J Med.* 2005 Jul 21;353(3):318-21.
23. Stroud JS, Mutch D, Rader J, Powell M, Thaker PH, Grigsby PW. Effects of cancer treatment on ovarian function. *Fertil Steril.* 2009 Aug;92(2):417-27.
24. Sonmezer M, Oktay K. Fertility preservation in young women undergoing breast cancer therapy. *Oncologist.* 2006 May;11(5):422-34.

25. Goodwin PJ, Ennis M, Pritchard KI, Trudeau M, Hood N. Risk of menopause during the first year after breast cancer diagnosis. *J Clin Oncol.* 1999 Aug;17(8):2365-70.
26. Bines J, Oleske DM, Cobleigh MA. Ovarian function in premenopausal women treated with adjuvant chemotherapy for breast cancer. *J Clin Oncol.* 1996 May;14(5):1718-29.
27. Di Cosimo S, Alimonti A, Ferretti G, Sperduti I, Carlini P, Papaldo P, et al. Incidence of chemotherapy-induced amenorrhea depending on the timing of treatment by menstrual cycle phase in women with early breast cancer. *Ann Oncol.* 2004 Jul;15(7):1065-71.
28. Meirow D, Biederman H, Anderson RA, Wallace WH. Toxicity of chemotherapy and radiation on female reproduction. *Clin Obstet Gynecol.* 2010 Dec;53(4):727-39.
29. Byrne J, Fears TR, Gail MH, Pee D, Connelly RR, Austin DF, et al. Early menopause in long-term survivors of cancer during adolescence. *Am J Obstet Gynecol.* 1992 Mar;166(3):788-93.
30. Lower EE, Blau R, Gazder P, Tummala R. The risk of premature menopause induced by chemotherapy for early breast cancer. *J Womens Health Gend Based Med.* 1999 Sep;8(7):949-54.
31. Reh A, Oktem O, Oktay K. Impact of breast cancer chemotherapy on ovarian reserve: a prospective observational analysis by menstrual history and ovarian reserve markers. *Fertil Steril.* 2008 Nov;90(5):1635-9.
32. Goodwin PJ, Ennis M, Pritchard KI, McCready D, Koo J, Sidlofsky S, et al. Adjuvant treatment and onset of menopause predict weight gain after breast cancer diagnosis. *J Clin Oncol.* 1999 Jan;17(1):120-9.

33. Shapiro CL, Recht A. Side effects of adjuvant treatment of breast cancer. *N Engl J Med.* 2001 Jun 28;344(26):1997-2008.
34. Petrek JA, Naughton MJ, Case LD, Paskett ED, Naftalis EZ, Singletary SE, et al. Incidence, time course, and determinants of menstrual bleeding after breast cancer treatment: a prospective study. *J Clin Oncol.* 2006 Mar 1;24(7):1045-51.
35. Sheri A, Dowsett M. Predicting response to cytotoxic drugs--the endocrine part of the story. *Breast.* 2011 Oct;20 Suppl 3:S28-30.
36. Partridge A, Gelber S, Gelber RD, Castiglione-Gertsch M, Goldhirsch A, Winer E. Age of menopause among women who remain premenopausal following treatment for early breast cancer: long-term results from International Breast Cancer Study Group Trials V and VI. *Eur J Cancer.* 2007 Jul;43(11):1646-53.
37. de Vet A LJ, de Jong FH, Themmen AP, Fauser BC. Antimüllerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertil Steril.* 2002 Feb;77(2):357-62.
38. Pastor C VV, Lim LCL, Calis KA, Pharm D, Premkumar A, Guerrero NT, Nelson LM. Pilot study investigating the age-related decline in ovarian function of regulatory menstruating normal women. *Fertil Steril.* 2005 Nov;84(8):1462-69.
39. Bowen S, Norian J, Santoro N, Pal L. Simple tools for assessment of ovarian reserve (OR): individual ovarian dimensions are reliable predictors of OR. *Fertil Steril.* 2007 Aug;88(2):390-5.
40. Younis JS. Ovarian aging: latest thoughts on assessment and management. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2011 Dec;23(6):427-34.
41. Faddy MJ, Gosden RG. A model conforming the decline in follicle numbers to the age of menopause in women. *Hum Reprod.* 1996 Jul;11(7):1484-6.

42. Wallace WH, Kelsey TW. Human ovarian reserve from conception to the menopause. *PLoS One*. 2010;5(1):e8772.
43. Chuang CC, Chen CD, Chao KH, Chen SU, Ho HN, Yang YS. Age is a better predictor of pregnancy potential than basal follicle-stimulating hormone levels in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2003 Jan;79(1):63-8.
44. Broekmans FJ SG, Bancsi LFJMM, Dorland M, Blankenstein MA, Te Velde ER. Ovarian reserve tests in fertility practice and normal fertile women. *Maturitas*. 1998;30:205-14.
45. Corleta HvE, Capp E. *Ginecologia Endócrina*. 1st / 2005 ed; 2010.
46. Domingues TS, Rocha AM, Serafini PC. Tests for ovarian reserve: reliability and utility. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2010 Aug;22(4):271-6.
47. Sherman BM, West JH, Korenman SG. The menopausal transition: analysis of LH, FSH, estradiol, and progesterone concentrations during menstrual cycles of older women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1976 Apr;42(4):629-36.
48. Lambalk CB, van Disseldorp J, de Koning CH, Broekmans FJ. Testing ovarian reserve to predict age at menopause. *Maturitas*. 2009 Aug 20;63(4):280-91.
49. van Montfrans JM, Hoek A, van Hooff MH, de Koning CH, Tonch N, Lambalk CB. Predictive value of basal follicle-stimulating hormone concentrations in a general subfertility population. *Fertil Steril*. 2000 Jul;74(1):97-103.
50. Navot D, Rosenwaks Z, Margalioth EJ. Prognostic assessment of female fecundity. *Lancet*. 1987 Sep 19;2(8560):645-7.
51. Loumaye E, Billion JM, Mine JM, Psalti I, Pensis M, Thomas K. Prediction of individual response to controlled ovarian hyperstimulation by means of a clomiphene citrate challenge test. *Fertil Steril*. 1990 Feb;53(2):295-301.

52. Speroff T, Fritz MA. Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. 7th / 2005 ed; 2005.
53. Seifer DB, Lambert-Messerlian G, Hogan JW, Gardiner AC, Blazar AS, Berk CA. Day 3 serum inhibin-B is predictive of assisted reproductive technologies outcome. *Fertil Steril*. 1997 Jan;67(1):110-4.
54. Muttukrishna S, Suharjono H, McGarrigle H, Sathanandan M. Inhibin B and anti-Mullerian hormone: markers of ovarian response in IVF/ICSI patients? *BJOG*. 2004 Nov;111(11):1248-53.
55. Muttukrishna S, McGarrigle H, Wakim R, Khadum I, Ranieri DM, Serhal P. Antral follicle count, anti-mullerian hormone and inhibin B: predictors of ovarian response in assisted reproductive technology? *BJOG*. 2005 Oct;112(10):1384-90.
56. van Rooij IAJ BF, Scheffer GJ, Looman CW, Habbema JD, de Jong FH, et al. Serum antimullerian hormone levels best reflect the reproductive decline with age in normal women with proven fertility: a longitudinal study. *Fertil Steril*. 2005 Apr;83(4):979-87.
57. Burger HG, Hale GE, Robertson DM, Dennerstein L. A review of hormonal changes during the menopausal transition: focus on findings from the Melbourne Women's Midlife Health Project. *Hum Reprod Update*. 2007 Nov-Dec;13(6):559-65.
58. Bancsi LF, Broekmans FJ, Eijkemans MJ, de Jong FH, Habbema JD, te Velde ER. Predictors of poor ovarian response in in vitro fertilization: a prospective study comparing basal markers of ovarian reserve. *Fertil Steril*. 2002 Feb;77(2):328-36.
59. Kwee J, Elting ME, Schats R, McDonnell J, Lambalk CB. Ovarian volume and antral follicle count for the prediction of low and hyper responders with in vitro fertilization. *Reprod Biol Endocrinol*. 2007;5:9.

60. Broekmans FJ, de Ziegler D, Howles CM, Gougeon A, Trew G, Olivennes F. The antral follicle count: practical recommendations for better standardization. *Fertil Steril*. 2010 Aug;94(3):1044-51.
61. 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 Feb;18(2):323-7.
62. Frattarelli JL, Levi AJ, Miller BT, Segars JH. A prospective assessment of the predictive value of basal antral follicles in in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril*. 2003 Aug;80(2):350-5.
63. Hendriks DJ, Kwee J, Mol BW, te Velde ER, Broekmans FJ. Ultrasonography as a tool for the prediction of outcome in IVF patients: a comparative meta-analysis of ovarian volume and antral follicle count. *Fertil Steril*. 2007 Apr;87(4):764-75.
64. La Marca A, Spada E, Sighinolfi G, Argento C, Tirelli A, Giulini S, et al. Age-specific nomogram for the decline in antral follicle count throughout the reproductive period. *Fertil Steril*. 2011 Feb;95(2):684-8.
65. Irez T, Ocal P, Guralp O, Cetin M, Aydogan B, Sahmay S. Different serum anti-Mullerian hormone concentrations are associated with oocyte quality, embryo development parameters and IVF-ICSI outcomes. *Arch Gynecol Obstet*. 2011 Nov;284(5):1295-301.
66. D'Avila AM FG, Capp E, Brum IS, Corleta HvE. Hormônio anti-mülleriano: um marcador mais fidedigno da reserva ovariana? *Reprodução & Climatério*. 2008 Janeiro/Março;23:14 - 9.

67. La Marca A PM, Orvieto R, Satabile G, Artenisio AC, Volpe A. . Serum Anti-Müllerian hormone levels in women with secondary amenorrhea. *Fertility and Sterility*. 2006;85(5):1547-9.
68. Durlinger AL, Kramer P, Karels B, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, et al. Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology*. 1999 Dec;140(12):5789-96.
69. Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM, et al. Anti-Mullerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology*. 2001 Nov;142(11):4891-9.
70. van Rooij IAJ BF, Velde ER, Fauser BCJM, Bancsi LFJMM, Jong FH, Themmen APN. Serum anti-Müllerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Human Reproduction*. 2002;17(12):3065-71.
71. Weenen C, Laven JS, Von Bergh AR, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, et al. Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod*. 2004 Feb;10(2):77-83.
72. Munsterberg A, Lovell-Badge R. Expression of the mouse anti-mullerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development*. 1991 Oct;113(2):613-24.
73. Fanchin R, Louafi N, Mendez Lozano DH, Frydman N, Frydman R, Taieb J. Per-follicle measurements indicate that anti-mullerian hormone secretion is modulated by the extent of follicular development and luteinization and may reflect qualitatively the ovarian follicular status. *Fertil Steril*. 2005 Jul;84(1):167-73.

74. Salmon NA, Handyside AH, Joyce IM. Oocyte regulation of anti-Mullerian hormone expression in granulosa cells during ovarian follicle development in mice. *Dev Biol.* 2004 Feb 1;266(1):201-8.
75. Durlinger AL, Grujters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, et al. Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology.* 2002 Mar;143(3):1076-84.
76. Visser JA dJF, Laven JS, Themmen AP. Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction.* 2006 Jan;131(1):1-9.
77. Hansen KR, Hodnett GM, Knowlton N, Craig LB. Correlation of ovarian reserve tests with histologically determined primordial follicle number. *Fertil Steril.* 2011 Jan;95(1):170-5.
78. Kwee J, Schats R, McDonnell J, Themmen A, de Jong F, Lambalk C. Evaluation of anti-Mullerian hormone as a test for the prediction of ovarian reserve. *Fertil Steril.* 2008 Sep;90(3):737-43.
79. Eldar-Geva T, Ben-Chetrit A, Spitz IM, Rabinowitz R, Markowitz E, Mimoni T, et al. Dynamic assays of inhibin B, anti-Mullerian hormone and estradiol following FSH stimulation and ovarian ultrasonography as predictors of IVF outcome. *Hum Reprod.* 2005 Nov;20(11):3178-83.
80. Bath LE WW, Shaw MP, Fitzpatrick C, Anderson RA. Depletion of ovarian reserve in young women after treatment for cancer in childhood: detection by anti-Mullerian hormone, inhibin B and ovarian ultrasound. *Human Reproduction.* 2003 Nov;18(11):2368-74.

81. Yeh J, Kim B, Liang YJ, Peresie J. Mullerian inhibiting substance as a novel biomarker of cisplatin-induced ovarian damage. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Sep 22;348(2):337-44.
82. 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 Oct;21(10):2583-92.
83. 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. *Br J Cancer.* 2007 Jun 18;96(12):1808-16.
84. Lie Fong S, Laven JS, Hakvoort-Cammel FG, Schipper I, Visser JA, Themmen AP, et al. Assessment of ovarian reserve in adult childhood cancer survivors using anti-Mullerian hormone. *Hum Reprod.* 2009 Apr;24(4):982-90.
85. 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.* 2009 Mar 31.
86. Anderson RA, Cameron DA. Pretreatment serum anti-mullerian hormone predicts long-term ovarian function and bone mass after chemotherapy for early breast cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 May;96(5):1336-43.
87. Streuli I, Fraise T, Pillet C, Ibecheole V, Bischof P, de Ziegler D. Serum antimullerian hormone levels remain stable throughout the menstrual cycle and after oral or vaginal administration of synthetic sex steroids. *Fertil Steril.* 2008 Aug;90(2):395-400.

88. Rosen MP, Johnstone E, McCulloch CE, Schuh-Huerta SM, Sternfeld B, Reijo-Pera RA, et al. A characterization of the relationship of ovarian reserve markers with age. *Fertil Steril*. 2012 Jan;97(1):238-43.
89. La Marca A, Argento C, Sighinolfi G, Grisendi V, Carbone M, D'Ippolito G, et al. Possibilities and limits of ovarian reserve testing in ART. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012 Mar 1;13(3):398-408.
90. Long WQ, Ranchin V, Pautier P, Belville C, Denizot P, Cailla H, et al. Detection of minimal levels of serum anti-Mullerian hormone during follow-up of patients with ovarian granulosa cell tumor by means of a highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000 Feb;85(2):540-4.

6. Artigo 1

Antral follicles and anti-Müllerian hormone levels after gonadotoxic chemotherapy in patients with breast cancer

Ângela Marcon D'Avila¹, Edison Capp^{1,2}, Helena von Eye Corleta^{1,2,3}

¹Graduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul School of Medicine

²Department of Obstetrics and Gynecology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul School of Medicine

³Gerar - Núcleo de Reprodução Humana do Hospital, Moinhos de Vento, Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding author:

Profa. Dra. Helena von Eye Corleta

Serviço de Ginecologia e Obstetrícia - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350/11º andar

Porto Alegre, RS, CEP 90035-903, Brazil

Phone/FAX: 0055 51 33598117 - e-mail: hcorleta@portoweb.com.br

Abstract

Introduction: Ovarian reserve (OVR) is the measure used to assess the capacity of the ovary to produce oocytes. It may be inferred from serum levels of follicle-stimulating hormone (FSH), anti-Müllerian hormone (AMH), and antral follicle count (AFC). Chemotherapy, particularly with alkylating agents, is known to be associated with loss of gonadal function, which progresses to amenorrhea in approximately 40% of women under the age of 40.

Objectives: To ascertain OVR by means of AMH, FSH, and AFC measurement in eumenorrheic women with breast cancer exposed to gonadotoxic chemotherapy.

Methods: Cohort study of 52 female patients with breast cancer (age <40 years) who received cyclophosphamide-containing chemotherapy. Assessment was carried out before chemotherapy (T1) and 2 and 6 months (T2, T3) after its completion.

Results: Mean age was 35.3 ± 3.8 years. Mean duration of follow-up was 14 ± 3 months. At 6 months post-chemotherapy, the prevalence of anovulation (amenorrhea or oligomenorrhea) was 60%. FSH levels were altered significantly in patients who developed anovulation. AMH declined significantly, down to undetectable levels at T2 from a median of 2.53 [1.00–5.31] ng/mL at T1 ($p < 0.0001$), and remained unchanged from T2 at T3, even though some patients resumed normal menses. Median AFC was 11 [8.0–13.5] follicles at T1 and significantly lower at T2 and T3 ($p < 0.0001$), with no difference between the latter

two time points. Even in patients who resumed ovulation cycles after completion of chemotherapy, AMH and AFC levels were significantly lower as compared with baseline: 1.46 [< 0.08 –4.31] ng/mL vs. 6.17 [3.19–10.07] ng/mL and 7 [5.5–10.0] follicles vs. 13 [11.0–15.5] follicles. In patients who remained ovulatory during chemotherapy or resumed normal menses, FSH and estradiol levels remained unchanged relative to baseline. In patients who developed anovulation all ORM (estradiol, FSH, AMH, AFC) and age were significantly different of ORM in eumenorrheic patients.

Conclusion: AMH and AFC are equally useful as markers of OVR decline in women exposed to chemotherapy. FSH is not adequate for this purpose, except in women who become anovulatory.

Keywords: anti-Müllerian hormone, antral follicle count, ovarian reserve, chemotherapy-induced amenorrhea, anovulation.

Introduction

Ovarian reserve (OVR) is the measure used to assess the capacity of the ovary to produce oocytes. It can be inferred from serum levels of estradiol, follicle-stimulating hormone (FSH), inhibin B, and anti-Müllerian hormone (AMH), as well as by the antral follicle count (AFC), the number of follicles 2–10 mm in size as assessed by transvaginal ultrasonography during the first phase of the cycle. Low OVR reflects ovarian “aging” and jeopardizes reproductive potential (1, 2).

A systematic review of the literature assessing several markers of OVR in the assisted reproductive technology setting was published in 2006 (2). Levels of estradiol, the first marker assessed, were not shown to be effective predictors of OVR-related outcomes, even when combined with other markers (3). FSH measurements are affected only when OVR is critically jeopardized (4, 5). In a 2002 study of potential predictors of poor response to ovarian stimulation for in vitro fertilization (IVF) cycles, Bancsi et al. showed that AFC alone provided the best prognostic value as compared with FSH, inhibin B, and estradiol (3).

More recently, AMH has been considered the best available marker of OVR, particularly as its levels do not vary over the course of the menstrual cycle and become undetectable after menopause (6-9). AMH is a dimeric glycoprotein produced by granulosa cells from the 3rd month of intrauterine life. Its production increases in puberty, and it is believed to exert autocrine and paracrine effects during follicle development. It modulates the primordial to primary follicle transition by

inhibiting granulosa cell proliferation, aromatase activity, and LH receptor expression (7, 10-13).

In the 1950s, investigators found that women exposed to chemotherapy (CTX) developed premature ovarian failure (14). This effect was later attributed to the gonadotoxicity of chemotherapeutic agents and found even in patients who resumed regular menses after CTX (15, 16). The main mechanism underlying chemotherapy-induced anovulation, particularly in women treated with alkylating agents, are follicular depletion by apoptosis with loss of germ cells (oocytes) and steroidogenic theca and granulosa cells (17).

This study sought to assess OVR by means of AMH measurement in eumenorrheic women with breast cancer exposed to gonadotoxic CTX. Other OVR markers (estradiol, FSH and AFC) were compared with AMH in an attempt to ascertain which is most sensitive for measurement of the decline in OVR after CTX.

Methods

Design

Cohort study.

Patients

The study sample comprised women with a diagnosis of breast cancer and indications for cyclophosphamide-containing CTX. From July 2007 to November

2009, 52 women aged 40 years or younger, with regular menses and no prior history of CTX, were recruited from six hospitals in Porto Alegre, state of Rio Grande do Sul, Brazil. The study protocol was approved by the corresponding Research Ethics Committees and was conducted in accordance with Brazilian guidelines and standards for human subject research (National Research Council Resolution 196/96).

Assessments were carried out at baseline before start of CTX (T1) and 2 months (T2) and 6 months (T3) after completion of therapy. Each assessment consisted of an interview, blood sample collection for hormone measurement, and gynecologic ultrasonography for AFC quantification.

AMH Measurement

Blood samples were centrifuged at 3500 rpm for 15 minutes and the supernatant serum stored at -80°C for later analysis. FSH and estradiol were measured by chemiluminescence (ADVIA CentaurXP Immunoassay System, Siemens). AMH was measured with a commercially available ELISA kit (Beckman Coulter, Genese Immunotech, France), as described elsewhere in the literature (18).

Ultrasonography

All sonograms were obtained by the same examiner, using a Siemens Sonoline Adara system and 5 MHz transvaginal transducer. In view of the urgency of

instituting CTX, ultrasonography was performed on any day of the menstrual cycle. AFC determination took into account follicles with a mean diameter of 2–10 mm (19–21).

Statistics

The sample size required to detect a 1.4 ng/mL difference in AMH levels from baseline at 6 months after CTX, with a significance level of 0.05 and a statistical power of 90%, was 44 patients. Calculation was based on the findings of van Rooj et al (8).

Data processing and analysis were carried out in the SPSS 18 software environment. Data were asymmetrically distributed and are thus expressed as medians. The Mann–Whitney *U* test, Kruskal–Wallis test for independent samples, Friedman test for related samples, and Wilcoxon test were used for comparisons. The significance level was set at $p > 0.05$.

Results

Table 1 describes the sample profile. Mean age was 35.3 ± 3.8 years (range, 27–40 years).

Ductal invasive carcinoma was the most common histologic tumor type. Most cases were treated by breast-conserving surgery with adjuvant or neoadjuvant CTX

(Table 1). Mean length of follow-up was 14 ± 3 months.

Over the course of the study, 5 patients were lost to follow-up (3 were unable to keep appointments due to disease recurrence, 1 discontinued treatment, and 1 died).

Table 2 shows variation in menstrual cycles during and after CTX. During CTX, 40% of women developed anovulation (amenorrhea or oligomenorrhea); 2 months after completion of CTX (4 to 6 cycles of cyclophosphamide), 85% were anovulatory. At 6 months post-CTX, 60% of patients remained anovulatory, whereas 40% had resumed normal menses (Table 2).

Table 3 shows changes in the evaluated markers of OVR before and after CTX. Baseline assessment of OVR before CTX yielded values within the expected range for women of reproductive age (Table 3).

There were no significant differences in estradiol levels at any of the time points of assessment. FSH was 6.71 [3.87–8.64] IU/mL at T1, significantly higher at T2 (47.67 [32.51–88.01] IU/mL), and significantly lower at T3 (16.31 [7.41–41.16] IU/mL) ($p < 0.001$). AMH levels declined significantly from T1 (2.53 [1–5.31] ng/mL) to T2 (undetectable), with $p < 0.0001$. Six months after CTX (T3), AMH levels were unchanged from T2 ($p = 0.128$), even though some patients had resumed normal menses. The median AFC at T1 was 11 [8–13.5] follicles, significantly higher than at T2 and T3 ($p < 0.0001$). There were no significant differences between AFCs at T2 (5.5 [3.75–8]) and T3 (5 [2.5–7]) (Table 3).

Table 4 shows the levels of OVR markers in eumenorrheic and anovulatory patients (40% and 60% of the sample respectively) at 6 months post-CTX (T3). There were statistically significant differences in estradiol, FSHAMH levels, as well as in AFCs. Median estradiol in the eumenorrhea group was 146.9 [70.1 – 515.6] pg/mL versus 54.9 [9.87 – 302.9] pg/mL in the anovulatory group ($p = 0,032$). Median FSH in the eumenorrhea group was 7.24 [3.87–14] IU/mL, versus 34.91 [15.71–52.65] IU/mL in the anovulatory group ($p < 0.0001$). Median AMH levels were 1.46 ng/mL (range, undetectable–4.31) in eumenorrheic patients, whereas all anovulatory women group had levels below the threshold of detection ($p < 0.0001$). AFCs also differed between groups, with a median of 7 [5.5–10] follicles in patients who had resumed normal menses versus 3.5 [2–6] in anovulatory patients ($p = 0.001$) (Table 4).

Assessment of patients who remained eumenorrheic at T3 and comparison by pre-CTX OVR markers showed that AMH and AFC declined significantly, despite normal ovulation. In these patients, FSH and estradiol remained unchanged from baseline (Table 5).

At T1, there were significant negative correlations between AMH and age ($r = -0.523$, $p < 0.0001$) and between AFC and age ($r = -0.469$, $p < 0.001$). AFC and AMH were positively correlated at T1 and T3 only (Figure 1).

Assessment of OVR markers was not influenced by the number of CTX cycles (4 or 6), nor by the dose of chemotherapeutic agent by total body surface area

(mg/m²). There was no difference in OVR markers between women who received adjuvant radiation therapy and those who did not.

Discussion

This study assessed the impact of chemotherapeutic agents on OVR in 52 young women with breast cancer. From a clinical standpoint, CTX exerts rapid and major effects on ovarian function, as 60% of patients had become anovulatory by the end of the study. These findings are comparable to those of Stearns et al., who reported amenorrhea as a common event in women exposed to CTX, although it is transient in 50% of cases (22). Goodwin et al. assessed women with breast cancer exposed to cyclophosphamide-containing CTX before the age of 40 and found that 40% became permanently amenorrheic (23, 24). Nevertheless, even patients who continue to have normal menses are not spared the negative effects of CTX on ovarian function (25). In these patients, assessment of reproductive prognosis after cancer therapy required determination of OVR by reliable markers.

Partridge et al. showed that CTX-induced damage to ovarian function becomes dose-dependent only after the 6th treatment cycle; this corroborates our findings, in which no significant differences in OVR or menstrual pattern were observed after 4 or 6 CTX cycles with cyclophosphamide (26).

According to Petrek et al., the time to resumption of menses in women with transient amenorrhea after CTX does not exceed 15 months (27). Therefore,

assessment of OVR in our study, which was conducted on average 14 months after diagnosis and treatment of breast cancer, should accurately reflect OVR after CTX.

As shown elsewhere in the literature, estradiol was not a good marker of OVR (2, 3). FSH levels followed the change in menstrual pattern of the patients at T2 and T3, but did not represent the actual decline in reproductive capacity, as oocyte depletion occurs even with normal menses. A reliable marker of OVR should exhibit changes before amenorrhea becomes clinically apparent. As FSH reflects these changes too late, as reported by other authors, it is not an adequate marker of OVR (4).

AMH remained stable at T2 and T3 despite resumption of menstrual cycles by some patients who were anovulatory at T2, which demonstrates that changes in AMH reflect the true impact of CTX on OVR. As AMH is secreted by developing follicles, their depletion after exposure to chemotherapeutic agents leads to a decline in levels of the hormone, even in eumenorrheic patients.

In 2006, Anderson et al. published the 1-year results of a cohort of 50 women with breast cancer treated with CTX. AMH was the earliest marker of chemotherapy-induced follicular depletion (28). Lie Fong et al. compared AMH levels in a cohort of 185 women with regular menses who had been exposed to CTX before age 18 (at least 5 years before the study) to those of 42 control subjects and found that survivors with lower levels of AMH were under greater risk of irregular menses and ovarian failure (29).

AFCs decrease after CTX and, despite resumption of menstrual cycles in some patients at T3, counts remained unchanged as compared with T2. These findings suggest that AFC and AMH reflect the gonadotoxicity of chemotherapeutic agents on OVR regardless of menses. Markers able to demonstrate substantial changes even before changes in menstrual pattern become clinically apparent and, hence, can be used to identify women with poor OVR (whether induced by a gonadotoxic insult or by physiological changes such as age) should be considered best for assessment of ovarian function and reproductive prognosis.

Although CTX damages the ovarian stroma and affects oocytes at any stage, it appears to be particularly deleterious to primary follicles and spare resting follicles, which explains the transient anovulation exhibited by some patients at T2 (30). Patients with a higher primordial follicle count (usually younger ones or those with a richer pre-CTX ovarian reserve) still preserve a significant number of these follicles, which, upon development as part of the normal folliculogenesis process, lead to resumption of regular menses at T3. We believe the correlation between AMH and AFC is probably lost at T2 due to a decline in the number of AMH-producing follicles, which is expected to resume at T3, once the primordial follicles that remained unaffected at T2 reach the antral stage and start producing AMH.

As expected, on comparison between anovulatory (amenorrheic or oligomenorrheic) and eumenorrheic patients at T3, all OVR-related parameters showed significant differences. However, this finding does not appear relevant to determination of the optimal marker of OVR, because clinical changes were already present.

Comparison of the AMH levels and AFCs of eumenorrheic patients at T3 with their T1 levels clearly showed the sensitivity of these parameters as markers of OVR, as both were decreased despite resumption of normal menses. Similar findings were reported by Vet et al., who assessed ovarian aging over time among eumenorrheic patients not exposed to gonadotoxic agents. The authors found that, in women whose cycles remained regular, only AMH decreased significantly over time, unlike the other markers assessed (31). In a similar study, Van Rooij et al. concluded that AMH at any age and AFC, FSH and inhibin B in older women, accurately reflect changes in OVR among eumenorrheic women at 4-year follow-up (8, 32, 33).

Markers that allow early identification of a decline in OVR before clinical changes in the menstrual cycle become apparent could help determine reproductive prognosis, with major clinical implications in this patient population. This study shows that, in cases of overt decline in ovarian function induced by a proven gonadotoxic agent, AMH and AFC are equally capable markers of OVR. From a practical standpoint, however, their utility may differ in certain aspects. AMH is readily measured in serum, not investigator-dependent, and provides more reproducible results, whereas AFC can be assessed immediately on ultrasound by a gynecologist or sonographer.

Acknowledgements

Financial support for this study was provided by Fundo de Incentivo a Pesquisa (FIPE), Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG), Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Edison Capp is a CNPq grant recipient.

References

1. Testing and interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion. *Fertility and sterility*. 2012 Dec;98(6):1407-15.
2. Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Human reproduction update*. 2006 Nov-Dec;12(6):685-718.
3. Bancsi LFJMM BF, Eikemans MJC, de Jong FH, Habbema JDF, te Velde ER. Predictors of poor ovarian response in in vitro fertilization: a prospective study comparing basal markers of ovarian reserve. *Fertil Steril*. 2002 Feb;77(2):328-36.
4. Lambalk CB, van Disseldorp J, de Koning CH, Broekmans FJ. Testing ovarian reserve to predict age at menopause. *Maturitas*. 2009 Aug 20;63(4):280-91.
5. Domingues TS, Rocha AM, Serafini PC. Tests for ovarian reserve: reliability and utility. *Current opinion in obstetrics & gynecology*. 2010 Aug;22(4):271-6.
6. La Marca A PM, Orvieto R, Satabile G, Artenisio AC, Volpe A. . Serum Anti-Müllerian hormone levels in women with secondary amenorrhea. *Fertility and sterility*. 2006;85(5):1547-9.
7. La Marca A VA. Anti-Müllerian hormone (AMH) in female reproduction: Is measurement of circulating AMH a useful tool? *Clin Endocrinol*. 2006;64(6):603-10.

8. van Rooij IAJ TI, Broekmans FJM, Looman CWN, Scheffer GJ, Jong FH, Themmen APN, Velde ER. Anti-Müllerian hormone is a promising predictor for the occurrence of the menopausal transition. *Menopause: The Journal of The North American Menopause Society*. 2004;11(6):601-6.
9. D'Avila AM FG, Capp E, Brum IS, Corleta HvE. Hormônio anti-mülleriano: um marcador mais fidedigno da reserva ovariana? *Reprodução & Climatério*. 2008 Janeiro/Março;23:14 - 9.
10. van Rooij IAJ BF, Velde ER, Fauser BCJM, Bancsi LFJMM, Jong FH, Themmen APN. Serum anti-Müllerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Human Reproduction*. 2002;17(12):3065-71.
11. Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM, et al. Anti-Mullerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology*. 2001 Nov;142(11):4891-9.
12. Durlinger AL, Kramer P, Karels B, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, et al. Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology*. 1999 Dec;140(12):5789-96.
13. La Marca A, De Leo V, Giulini S, Orvieto R, Malmusi S, Giannella L, et al. Anti-Mullerian hormone in premenopausal women and after spontaneous or surgically induced menopause. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 2005 Oct;12(7):545-8.
14. Louis J, Limarzi LR, Best WR. Treatment of chronic granulocytic leukemia with myleran. *AMA archives of internal medicine*. 1956 Mar;97(3):299-308.

15. Apperley JF, Reddy N. Mechanism and management of treatment-related gonadal failure in recipients of high dose chemoradiotherapy. *Blood reviews*. 1995 Jun;9(2):93-116.
16. Hudson MM. Reproductive outcomes for survivors of childhood cancer. *Obstetrics and gynecology*. 2010 Nov;116(5):1171-83.
17. Blumenfeld Z. Ovarian rescue/protection from chemotherapy agents. *J Soc Gynecol Investg* 2001;8:S60-64. *J Soc Gynecol Investg* 2001;8:S60-4.
18. Long WQ, Ranchin V, Pautier P, Belville C, Denizot P, Cailla H, et al. Detection of minimal levels of serum anti-Mullerian hormone during follow-up of patients with ovarian granulosa cell tumor by means of a highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2000 Feb;85(2):540-4.
19. Frattarelli JL, Levi AJ, Miller BT, Segars JH. A prospective assessment of the predictive value of basal antral follicles in in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril*. 2003 Aug;80(2):350-5.
20. 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 Feb;18(2):323-7.
21. Broekmans FJ, de Ziegler D, Howles CM, Gougeon A, Trew G, Olivennes F. The antral follicle count: practical recommendations for better standardization. *Fertil Steril*. 2010 Aug;94(3):1044-51.

22. Stearns V SB, Henry NL, Hayes DF, Flockhart DA. Breast cancer treatment and ovarian failure: risk factors and emerging genetic determinants. *Nature Reviews*. 2006 november;6:886-93.
23. Goodwin PJ, Ennis M, Pritchard KI, Trudeau M, Hood N. Risk of menopause during the first year after breast cancer diagnosis. *J Clin Oncol*. 1999 Aug;17(8):2365-70.
24. Shapiro CL, Recht A. Side effects of adjuvant treatment of breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2001 Jun 28;344(26):1997-2008.
25. 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 Feb 1;116(3):592-9.
26. Partridge A, Gelber S, Gelber RD, Castiglione-Gertsch M, Goldhirsch A, Winer E. Age of menopause among women who remain premenopausal following treatment for early breast cancer: long-term results from International Breast Cancer Study Group Trials V and VI. *Eur J Cancer*. 2007 Jul;43(11):1646-53.
27. Petrek JA, Naughton MJ, Case LD, Paskett ED, Naftalis EZ, Singletary SE, et al. Incidence, time course, and determinants of menstrual bleeding after breast cancer treatment: a prospective study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006 Mar 1;24(7):1045-51.
28. 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 Oct;21(10):2583-92.

29. Lie Fong S, Laven JS, Hakvoort-Cammel FG, Schipper I, Visser JA, Themmen AP, et al. Assessment of ovarian reserve in adult childhood cancer survivors using anti-Mullerian hormone. *Hum Reprod.* 2009 Apr;24(4):982-90.
30. Ben-Aharon I, Shalgi R. What lies behind chemotherapy-induced ovarian toxicity? *Reproduction.* 2012 Aug;144(2):153-63.
31. de Vet A LJ, de Jong FH, Themmen AP, Fauser BC. Antimüllerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertil Steril.* 2002 Feb;77(2):357-62.
32. van Rooij IAJ BF, Scheffer GJ, Looman CW, Habbema JD, de Jong FH, et al. Serum antimullerian hormone levels best reflect the reproductive decline with age in normal women with proven fertility: a longitudinal study. *Fertil Steril.* 2005 Apr;83(4):979-87.
33. Di Cosimo S, Alimonti A, Ferretti G, Sperduti I, Carlini P, Papaldo P, et al. Incidence of chemotherapy-induced amenorrhea depending on the timing of treatment by menstrual cycle phase in women with early breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO.* 2004 Jul;15(7):1065-71.

Legends

Table 1 – Sample profile.

Table 2 – Menstrual pattern of patients during chemotherapy, 2 months after chemotherapy, and 6 months after chemotherapy.

Table 3 – Markers of ovarian reserve before chemotherapy (T1) and 2 months (T2) or 6 months (T3) after completion of chemotherapy. Data expressed as median [interquartile range]. The limit of detection for AMH was 0.08 ng/mL.

Table 4 – Markers of ovarian reserve at T3 stratified by menstrual status. Data expressed as median [interquartile range].

Table 5 – Comparative analysis of OR markers in eumenorrheic patients 6 months after completion of chemotherapy at T1 and T3. Data expressed as median [interquartile range].

Figure 1 – Correlation between AFC and AMH levels at T1, T2, and T3.

Table 1

	No. of patients (n=52)	%
Age (years)		
27–30	7	13
31–35	18	35
36–40	27	52
Tumor type		
Ductal invasive	52	100
Chemotherapy		
Neoadjuvant	21	40
Adjuvant	31	60
Radiation therapy	39	75

Table 2

Menses	During CTX	2 months after CTX	6 months after CTX
Regular, n (%)	31 (60%)	8 (15%)	19 (40%)
Anovulatory, n (%)	21 ^a (40%)	41 ^b (85%)	28 ^c (60%)

CTX, chemotherapy.

^a14 irregular + 7 amenorrheic patients

^b16 irregular + 25 amenorrheic patients

^c10 irregular + 18 amenorrheic patients

Table 3

Marker	T1	T2	T3
Estradiol (pg/mL)	79.42 (48.22–149)	27.55 (8.47–108.85)	95.50 (29.37 -310.85)
FSH (IU/mL)	6.71 (3.87–8.64)	47.67 (32.51–88.01)	16.31 (7.41–41.16) ^{a,b}
AMH (ng/mL)	2.53 (1.0–5.31)	<0.08	<0.08 (<0.08–1.07) ^c
AFC	11.0 (8–13.5)	5.50 (3.75–8.0)	5.0 (2.5–7.0) ^c

^a $p < 0.05$, T1 vs. T3;

^b $p < 0.001$, T1 vs. T2 and T2 vs. T3;

^c $p < 0.0001$, T1 vs. T2 and T1 vs. T3.

Table 4

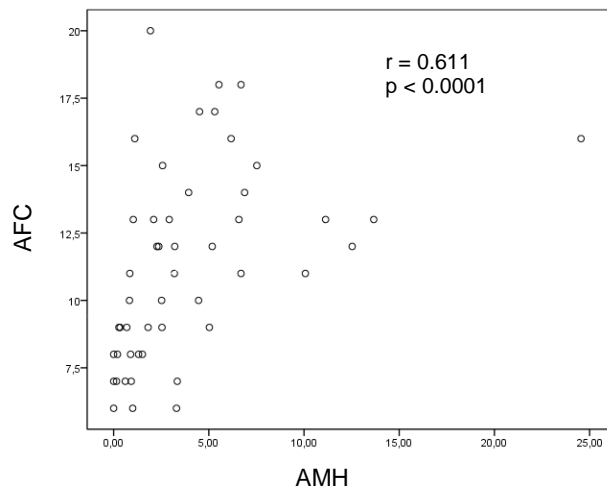
	Eumenorrhea (40%)	Anovulation (60%)	P
Estradiol (pg/mL)	146.9 (70.1 – 515.6)	54.9 (9.87 – 302.9)	0.032
AMH (ng/mL)	1.46 (< 0.08 – 4.31)	< 0.08	< 0.0001
FSH (IU/mL)	7.24 (3.87 – 14)	34.91 (15.7 – 52.65)	< 0.0001
AFC	7.0 (5.5–10.0)	3.5 (2.0 – 6.0)	< 0.001

Table 5

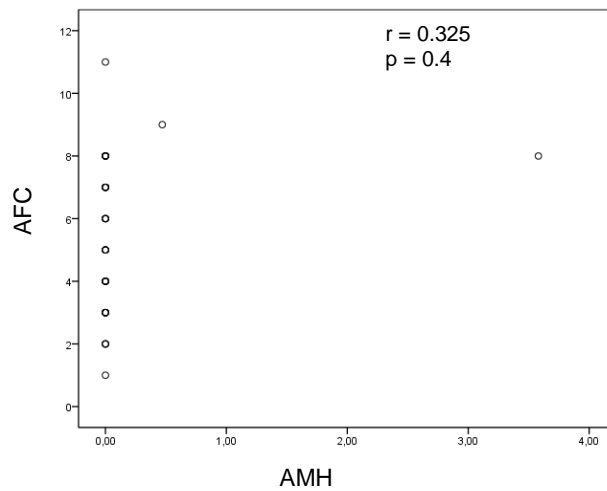
	T1	T3	P
FSH (IU/mL)	5.03 (2.88–7.3)	7.24 (3.87–14)	0.125
Estradiol (pg/mL)	123.15 (49.55–185.12)	146.9 (70.1–515.62)	0.96
AFC	13 (11–15.5)	7 (5.5–10)	0.001
AMH (ng/mL)	6.17 (3.19–10.07)	1.46 (< 0.08–4.31)	0.001

Figure 1

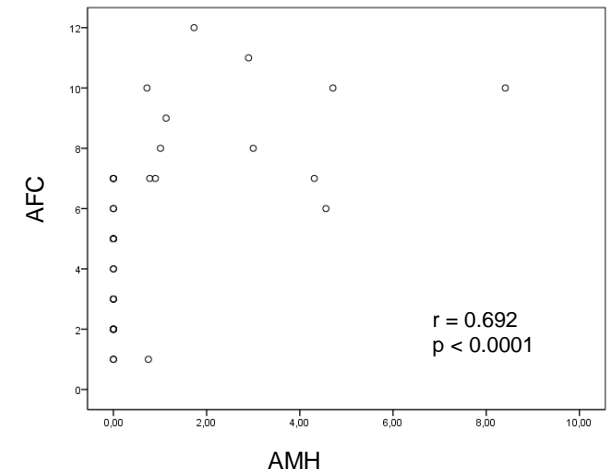
T1



T2



T3



7. Artigo 2

Risk predictors for anovulation after chemotherapy with cyclophosphamide

Ângela Marcon D'Avila¹, Edison Capp^{1,2}, Helena von Eye Corleta^{1,2,3}

Ângela Marcon D'Avila¹, Edison Capp^{1,2}, Helena von Eye Corleta^{1,2,3}

¹Graduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul School of Medicine

²Department of Obstetrics and Gynecology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul School of Medicine

³Gerar - Núcleo de Reprodução Humana do Hospital, Moinhos de Vento, Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding author:

Profa. Dra. Helena von Eye Corleta

Serviço de Ginecologia e Obstetrícia - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350/11º andar

Porto Alegre, RS, CEP 90035-903, Brazil

Phone/FAX: 0055 51 33598117 - e-mail: hcorleta@portoweb.com.br

Abstract

Introduction: Early diagnosis and chemotherapy treatment for cancer in young women with malignancy are increasingly common. The accurate identification of patients with high risk of anovulation (oligomenorrhea or amenorrhea) related to chemotherapy (CTX) with loss of reproductive capacity is crucial to establish preventive actions to preserve fertility.

Objectives: To identify which ovarian reserve markers (ORM) can be used as predictors of anovulation 6 months after CTX with cyclophosphamide in women with breast cancer.

Methods: Cohort study of 52 eumenorrheic patients with breast cancer underwent CTX with cyclophosphamide assessing ORM (before CTX and 6 months after CTX) and relating them to occurrence of anovulation.

Results: The mean age of patients was 35.3 ± 3.8 years and the follow-up time was 14 ± 3 months. Forty percent of the patients experienced anovulation during CTX and 60% 6 months after CTX. The mean age of anovulatory women 6 months after CTX was 36.5 ± 3.8 years, while the ovulatory women were 32.9 ± 3.5 years ($p = 0.02$). The age of thirty-two years presented 96% of sensitivity and 39% of specificity to predict anovulation with ROC area under the curve (AUC) of 0.77. The ovarian reserve (OVR) tests with power to predict anovulation in women exposed to CTX were anti-Müllerian hormone (AMH) < 3.32 ng/mL (sensitivity of 85%, specificity of 75% and AUC of 0.87) and antral follicles count (AFC) < 13 follicles (sensitivity of

81%, specificity of 62% and AUC of 0.81). The AMH cut off to predict amenorrhea was 1.87 ng/mL (sensitivity of 82%, specificity of 83% and AUC of 0.84) and the AFC cut off was 9 follicles (sensitivity of 71%, specificity of 78% and AUC of 0.73). The analysis was not influenced by the number of cycles or dose of CTX.

Conclusions: Thirty-two year old or older women, AMH levels < 3.32 ng/mL and AFC < 13 follicles determined significantly higher risk of anovulation after CTX with cyclophosphamide. These women should be encouraged to preserve their fertility. Among the OVR tests, AMH was the powerful to predict the anovulation

Key-words: anti-Müllerian hormone, antral follicles count, ovarian reserve, amenorrhea related chemotherapy, anovulation related chemotherapy.

Introduction

Currently, around 5% of the malignant neoplasias affect people younger than 35 years old (1). In the United States, approximately 50,000 new cases of malignancy are diagnosed per year in young people (2). Breast cancer is the second most frequent malignancy, affecting around 11,000 women per year (3). The prognosis of malignancy improved because of early diagnosis and CTX treatment which, despite their effectiveness against the disease, can have damaging effect on the gonadal function, compromising these women's reproductive future (2, 4).

The gonadotoxicity was described for the first time in women with leukemia exposed to CTX with busulfan who presented premature menopause (5). The main causes of gonadotoxicity are the oocyte and steroidogenesis cells apoptosis, in addition to vascular damage (6, 7). It was also shown that some genetic polymorphisms favor oocyte depletion (8-11). Lesions in the DNA of oocyte and granulosa cells caused by CTX treatment also cause oocyte depletion (12).

Among chemotherapeutic agents, the alkylating are the ones that show higher gonadotoxic potential (4 to 10 times higher). They are the most commonly associated with premature ovarian failure (POF), because they are not specific for tumor cells, also affecting resting primordial follicles (13-15). Although some women maintain regular menstrual cycles after CTX, the number of follicles decreases with a reduction the in ovarian reserve (OVR), therefore compromising the reproductive function (16, 17).

The gonadal toxicity and its impact on the reproductive future of the patients exposed to CTX is determined by their age, type and dose of chemotherapeutic agents, length of treatment and chemotherapeutic agents association. (14, 18, 19). However, the literature is poor about the importance of assessing OVR before undergoing CTX treatment to predict the reproductive prognosis after the cure of the disease.

OVR refers to quantity and, to some authors, quality of follicles present in ovaries at a given time. It is the measure of oocyte production and consequently reproductive potential (20, 21). Its evaluation is through serum analysis of FSH, estradiol, inhibin and anti-Müllerian hormone (AMH) and through ultrasonography to count antral follicles (AFC). AFC refers to the number of follicles visible in ovaries during ultrasound scan in the first days of the menstrual cycle. There is controversy in the literature about the size of follicles that must be counted, 2 to 5 mm or 2 to 10 mm (20).

AMH has been hypothesized as the best and most reliable ovarian reserve marker (ORM), because it does not vary its levels during the menstrual cycle and it is not detectable in menopause (22-25). It is a dimeric glycoprotein that determines the anatomy of the female internal genitalia and works in the development of primordial and growing follicles (26).

Age and CTX treatment are among main predictor factors for occurrence of menopause in eumenorrheic women with breast cancer (4). Levels of AMH before gonadotoxic CTX also seem to be a predictor. Anderson and colleagues followed women with breast cancer for 5 years and demonstrated that AMH levels lower than 1.9 ng/mL are predictors of ovarian failure occurrence (27).

As fertility preservation may be a priority for young women with cancer, we analyzed which ORM can be used as predictors of anovulation (oligomenorrhea or amenorrhea) 6 months after CTX with cyclophosphamide in women with breast cancer.

Patients and Methods

A cohort study was conducted.

The study followed fifty-two eumenorrheic women younger than 40 years of age with breast cancer requiring CTX containing cyclophosphamide, who had not undergone previous CTX treatment. Patients were selected between July 2007 and November 2009 from six hospitals in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. The study was approved by the ethics committees of each hospital and in compliance with the Guidelines and Standards for Research involving Humans .

The sample size was calculated based on the study by van Rooij. The minimum number of 44 patients was estimated to find a difference of 1.4 ng / mL in AMH values between baseline and 6 months after completion of CTX with a significance level of 0.05 and a power of 90% (22).

Patients were assessed through an interview, blood sampling and ultrasound scan before CTX and 6 months after CTX. The blood samples were centrifuged at 3500 rpm for 15 min and the serum was stored at – 80 °C. Measurement of FSH and estradiol through chemiluminescence was performed using the ADVIA Centaur® XP

Immunoassay System (Siemens®). AMH was measured through ELISA (Beckman Coulter, Genese Immunotech®, France), as described in the literature (28).

The same researcher performed ultrasound scans in all patients with Siemens Sonoline Adara, an ultrasound device with vaginal probe of 5 MHz, any day within a menstrual cycle because of the urgency to begin CTX. All Follicles with a mean diameter between 2 and 10 mm were considered for AFC (29-31).

The analysis was based on a statistical package of SPSS 18. Results are presented as median and interquartile range (25% -75%) because the data of this study do not show Gaussian normal distribution. The data were tested with the Mann-Whitney test and the multiple comparisons were corrected through Bonferroni. The categorical variables were analyzed through Pearson Chi-Square test. A logistic regression for independent samples and determination of the ROC curve were performed. The significance level was considered $p < 0.05$.

Results

The mean age of patients was 35.3 ± 3.8 years (range 27 – 40 years) and the age distribution is presented in table 1. The main histological type of breast cancer was invasive ductal carcinoma (98%). Forty percent of patients underwent breast conserving surgery prior to or followed by CTX treatments and 75% of patients underwent adjuvant radiotherapy. The follow-up mean time was 14 ± 3 months since the first assessment. Five patients quit the follow-up study. Three for recurrence of the disease, making it impossible to attend the assessment appointment, one gave up the treatment and another died.

FSH, AMH and AFC before CTX are presented in Table 2. Patients younger than 32 years of age had levels of AMH and AFC significantly higher than of those 32-years old or older women, respectively $p = 0.048$ and $p = 0.023$. FSH was not different in this analysis (table 2).

Thirty-nine percent of patients were amenorrheic 6 months after CTX, 21% were oligomenorrheic and 40% eumenorrheic. The baseline ORM were related to menstrual outcome after CTX, showing that the amenorrheic women and women with regular menstrual cycles are statistically different with regard to age, AMH and AFC, with $p = 0.006$; <0.001 ; 0.003 , respectively. Comparing oligomenorrheic patients (irregular menstrual cycles) versus amenorrheic and oligomenorrheic versus eumenorrheic patients no differences were found in age, AMH or AFC (table 3).

Table 4 shows the analysis of patients with irregular menstrual cycles grouped together with amenorrheic women versus eumenorrheic women and patients with irregular menstrual cycles grouped together with eumenorrheic women versus amenorrheic women. Regardless of the groups the oligomenorrheic patients were included in, the ORM are statistically different. For these reason, the researchers decided to group the oligomenorrheic with amenorrheic patients (anovulatory group) in order to compare it with eumenorrheic women, aiming to define the risk predictors for significant loss of OVR after CTX, even if the patients remained with vaginal bleeding.

The mean age of anovulatory women six months after CTX was 36.5 ± 3.8 years, while ovulatory women had a mean age of 32.9 ± 3.5 years ($p = 0.02$). The AFC, independently of age, was statistically significant for risk prediction for

anovulation ($p = 0.001$ and confidence interval (CI) of 0.548 – 0.931). AMH also showed to be a good predictor for the decline of reproductive function, with $p < 0.001$ and CI of 0.541 – 0.941 (table 4).

Baseline estradiol levels, smoking habits and body mass index were not different between anovulatory and ovulatory women 6 months after CTX.

Table 5 shows ORM analyzed through logistic regression. The multiple regression used to analyze many variables together was not possible because of the multicollinearity of age, AMH and AFC, therefore the analysis was independently performed for each variable controlled by age. The age of thirty-two showed 96% of sensitivity and 39% of specificity to predict anovulation. The odds ratio (OR) for anovulation for the 32 years was 15.9 with CI of 1 – 145 and $p = 0.03$ (Table 5). Figure 1 represents the ROC curve that defines the most accurate age to predict anovulation, 32 years, with AUC of 0.77 (figure 1). Analyzing exclusively amenorrheic women 6 months after CTX, the age of 35 years or more predicted amenorrhea with sensitivity of 76%, specificity of 66%, CI of 0.53 – 0.85 and AUC of 0.69.

FSH was not a predictor of anovulation after CTX. However, 32-year-old women and older with $FSH \geq 6.66$ UI/mL had significantly higher anovulation than women with FSH lower than this cut off, with OR of 6.36 (CI 1.11 – 36.41), $p = 0.021$ with sensitivity of 60% and specificity of 82 % (Table 5 and figure 2).

The cut off for AFC was 12 follicles. Patients with 12 follicles or fewer presented higher risk of anovulation 6 months after CTX, with sensitivity of 81 %,

specificity of 62 % and AUC of 0,81. The OR was 4.43 (CI 0.943 – 20.8, $p= 0.059$). Although there was no statistical significance, 33% of the patients with AFC of 13 follicles or more developed anovulation, while 78% with 12 or fewer follicles developed the same outcome (table 5).

Values of AMH under 3.32 ng/mL presented sensitivity of 85% and specificity of 75% to occurrence of anovulation. The ROC AUC for 3.32 ng/mL was 0.86. Only 20% of the patients with AMH levels equal or above this cut off presented anovulation, while 80% of the women with AMH levels under 3.32 ng/mL developed the same outcome. OR for anovulation in women with AMH levels under 3.32 ng/mL was 10.3 (CI 2.14 – 50.37, $p = 0.04$) (table 5). Analyzing exclusively amenorrheic women 6 months after CTX, the cut off for AMH to predict this outcome was 1.87 ng/mL, sensitivity of 82%, specificity of 83% and AUC of 0.84, with OR of 21 (CI de 4.47 – 98).

The analysis of ORM was not influenced by the number of cycles (4 or 6), dose of CTX calculated according to body mass index, or by radiotherapy association. The Pearson correlation between cyclophosphamide dose and AMH, FSH and AFC 6 months after CTX was, respectively, 0,24 with $p = 0.944$, -0,442 with $p = 0.174$ and 0,21 with $p = 0.342$.

Discussion

This cohort study evaluated the sensitivity and specificity of the ORM (FSH, AMH, AFC) and age correlating them with anovulation occurrence in young women

with breast cancer exposed to CTX with cyclophosphamide. The occurrence of amenorrhea in these patients has been reported as up to 70%, varying with the age of the woman (32). In our study, the incidence of anovulation 6 months after CTX was 60% and the exclusive occurrence of amenorrhea in the same period was 39%.

In order to identify more accurately which patients would benefit from fertility preservation procedures, women with irregular cycles (oligomenorrheic women) and amenorrhea were grouped together 6 months after CTX. According to Van Rooij and colleagues, patients with irregular cycles already show significant decline in their reproductive function (22). Singh and colleagues reported the importance of predicting the decline of OVR in patients with breast cancer, even when there is no amenorrhea (33). Thus, the outcome in our study was considered anovulation (irregular cycles and amenorrhea), comparing it to ovulatory (regular cycles) women 6 months after CTX. In the literature there are no studies that consider oligomenorrhea or anovulation as an outcome of gonadotoxicity resulting from CTX.

Previous studies have defined the age of 40 as the cut off to determine a greater or smaller risk of amenorrhea (32, 34). Jung and colleagues, in 2010, proved that the age of 44 was the mean age of patients with breast cancer who developed amenorrhea after CTX with cyclophosphamide (range 28 – 53 years). In Jung's study, the mean age of women who maintained ovulatory cycles was 36 years (range 25 – 49 years) (35). In our study, the mean age for anovulation occurrence was 36.5 ± 3.8 years and for exclusive amenorrhea occurrence it was 36.9 ± 3.4 years. The absence of statistical significance confirms the need to evaluate patients with both amenorrhea and oligomenorrhea together.

Goodwin and colleagues found that the incidence of amenorrhea after CTX is greater in patients aged 45 years than in patients aged 42 (4). Petrek and colleagues came to the same conclusion for women older than 40 years of age (36). Our study was able to define more precisely which women will have greater impairment in their reproductive capacity even when they were younger than 40 years old. Age that determines a higher incidence of exclusive amenorrhea was 35. However, as the main objective of this study is to define which women will have loss of reproductive function, even with menstrual cycle presence, we chose an age cut off with a higher sensitivity, without loss of specificity, in predicting risk of anovulation i.e., 32 years. The age of 32 shows sensitivity near 100%. ORM (AMH and AFC) in 32-year-old women or older were significantly smaller than in women younger than 32 years. Therefore, for patients without offspring, 32 years seems to be the age to alert doctors and patients to preserve fertility prior to CTX.

FSH was not a good ORM, as demonstrated by other authors. FSH changes only when amenorrhea has already occurred being a marker of ovarian failure and not of decline in OVR (37, 38). However, FSH greater than or equal to 6.66 IU / mL in women over 32 years of age seems to carry a higher risk of anovulation after CTX. Similar analysis was not found in the literature.

With respect to the AFC, it was demonstrated that patients with 12 or less follicles, independent of age, are more susceptible to anovulation (OR 4.43, sensitivity of 81% and specificity of 62% and $p = 0,059$). We believe that no statistical significance for the AFC in the prediction of anovulation in this group of patients is due to the calculation of the sample size, which aimed to find differences in the AMH

levels. Probably if we had a larger sample, even if discreetly, would have achieved statistical significance in the AFC cut off for the prediction of anovulation. Anderson and colleagues, in a similar study, did not describe the cut off in the number of antral follicles associated with amenorrhea. They reported that the AFC mean before CTX in women who maintained ovulatory cycles was 19 versus 8 in those who developed amenorrhea (27).

AMH values greater than or equal to 3.32 ng / mL, regardless of the patient's age, are protective for the occurrence of anovulation after CTX with cyclophosphamide, with sensitivity and specificity of 85% and 75%, respectively. Even with a high confidence interval in this analysis, the OR was 10.3 meaning that patients with AMH < 3.32 ng / mL are 10 times more likely to develop anovulation.

In 2008, Anders and colleagues demonstrated that AMH values below 1.09 ng/mL increased the risk of amenorrhea after CTX in the evaluation of 44 patients with breast cancer and a mean age of 40 years. (39). Anderson and colleagues in 2011 conducted a similar study and found that value of AMH of 1.9 ng/mL with sensitivity of 54% and specificity of 92%, ROC AUC 0.91 and OR 7.0 as a predictor of risk for amenorrhea during a 5-year follow-up study of 42 women exposed to CTX (27). Our results were similar to the occurrence of exclusive amenorrhea, finding AMH values below 1.87ng/mL for this outcome. However, we prioritized the group of patients who would need counseling for fertility preservation, that is, those who would have their fertility compromised either by amenorrhea or oligomenorrhea (anovulation). Literature only shows studies that have evaluated OVR of patients who developed exclusive amenorrhea. These studies included the oligomenorrheic

women in the group of patients who had not been damaged by CTX, that is, the eumenorrheic women.

Our analysis raises the cut off of ORM that indicate the need to use techniques to preserve fertility, but certainly protect a larger number of infertile patients after CTX.

Conclusion

Patients with breast cancer who require CTX with cyclophosphamide should be warned against the risk of infertility, even in the absence of amenorrhea, a side effect of malignant neoplasia treatment. Thirty-two year old or older women, serum AMH < 3.32 ng/mL or AFC <13 offer a higher risk of anovulation and infertility after CTX with cyclophosphamide. These women should be encouraged to undergo fertility preservation techniques as a way of trying to ensure successful conception after the cure of the disease.

Acknowledgments

This project was funded by the Research Incentive Fund (FIPE) of the Research and Graduate Studies Group (GPPG) of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Edison Capp, a researcher of the National Council for Scientific and Technological Development - CNPq.

Bibliographic references

1. Blumenfeld Z. Ovarian rescue/protection from chemotherapeutic agents. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 2001 Jan-Feb;8(1 Suppl Proceedings):S60-4.
2. Knopman JM, Papadopoulos EB, Grifo JA, Fino ME, Noyes N. Surviving childhood and reproductive-age malignancy: effects on fertility and future parenthood. *The lancet oncology*. 2010 May;11(5):490-8.
3. DeSantis C, Siegel R, Bandi P, Jemal A. Breast cancer statistics, 2011. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2011 Nov-Dec;61(6):409-18.
4. Goodwin PJ, Ennis M, Pritchard KI, Trudeau M, Hood N. Risk of menopause during the first year after breast cancer diagnosis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1999 Aug;17(8):2365-70.
5. Apperley JF, Reddy N. Mechanism and management of treatment-related gonadal failure in recipients of high dose chemoradiotherapy. *Blood reviews*. 1995 Jun;9(2):93-116.
6. Meirow D, Lewis H, Nugent D, Epstein M. Subclinical depletion of primordial follicular reserve in mice treated with cyclophosphamide: clinical importance and proposed accurate investigative tool. *Hum Reprod*. 1999 Jul;14(7):1903-7.

7. Meiorow D, Dor J, Kaufman B, Shrim A, Rabinovici J, Schiff E, et al. Cortical fibrosis and blood-vessels damage in human ovaries exposed to chemotherapy. Potential mechanisms of ovarian injury. *Hum Reprod.* 2007 Jun;22(6):1626-33.
8. Stearns V, Schneider B, Henry NL, Hayes DF, Flockhart DA. Breast cancer treatment and ovarian failure: risk factors and emerging genetic determinants. *Nature reviews Cancer.* 2006 Nov;6(11):886-93.
9. 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 Nov;3(11):1228-32.
10. Takada K, Arefayene M, Desta Z, Yarboro CH, Boumpas DT, Balow JE, et al. Cytochrome P450 pharmacogenetics as a predictor of toxicity and clinical response to pulse cyclophosphamide in lupus nephritis. *Arthritis and rheumatism.* 2004 Jul;50(7):2202-10.
11. Su HI, Sammel MD, Velders L, Horn M, Stankiewicz C, Matro J, et al. Association of cyclophosphamide drug-metabolizing enzyme polymorphisms and chemotherapy-related ovarian failure in breast cancer survivors. *Fertility and sterility.* 2010 Jul;94(2):645-54.
12. Soleimani R, Heytens E, Darzynkiewicz Z, Oktay K. Mechanisms of chemotherapy-induced human ovarian aging: double strand DNA breaks and microvascular compromise. *Aging.* 2011 Aug;3(8):782-93.

13. 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 Mar;166(3):788-93.
14. Stroud JS, Mutch D, Rader J, Powell M, Thaker PH, Grigsby PW. Effects of cancer treatment on ovarian function. *Fertility and sterility*. 2009 Aug;92(2):417-27.
15. Meiorow D, Biederman H, Anderson RA, Wallace WH. Toxicity of chemotherapy and radiation on female reproduction. *Clinical obstetrics and gynecology*. 2010 Dec;53(4):727-39.
16. Ficioglu C, Kutlu T, Baglam E, Bakacak Z. Early follicular antimullerian hormone as an indicator of ovarian reserve. *Fertility and sterility*. 2006 Mar;85(3):592-6.
17. Pastor CL, Vanderhoof VH, Lim LC, Calis KA, Premkumar A, Guerrero NT, et al. Pilot study investigating the age-related decline in ovarian function of regularly menstruating normal women. *Fertility and sterility*. 2005 Nov;84(5):1462-9.
18. Meiorow D, Levron J, Eldar-Geva T, Hardan I, Fridman E, Zalel Y, et al. Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *The New England journal of medicine*. 2005 Jul 21;353(3):318-21.
19. Sonmezer M, Oktay K. Fertility preservation in young women undergoing breast cancer therapy. *The oncologist*. 2006 May;11(5):422-34.

20. Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Human reproduction update*. 2006 Nov-Dec;12(6):685-718.
21. Testing and interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion. *Fertility and sterility*. 2012 Dec;98(6):1407-15.
22. van Rooij IA, Tonkelaar I, Broekmans FJ, Looman CW, Scheffer GJ, de Jong FH, et al. Anti-mullerian hormone is a promising predictor for the occurrence of the menopausal transition. *Menopause*. 2004 Nov-Dec;11(6 Pt 1):601-6.
23. D'Avila AM FG, Capp E, Brum IS, Corleta HvE. Hormônio anti-mülleriano: um marcador mais fidedigno da reserva ovariana? *Reprodução & Climatério*. 2008 Janeiro/Março;23:14 - 9.
24. La Marca A, Pati M, Orvieto R, Stabile G, Carducci Artenisio A, Volpe A. Serum anti-mullerian hormone levels in women with secondary amenorrhea. *Fertility and sterility*. 2006 May;85(5):1547-9.
25. La Marca A, Volpe A. Anti-Mullerian hormone (AMH) in female reproduction: is measurement of circulating AMH a useful tool? *Clinical endocrinology*. 2006 Jun;64(6):603-10.
26. La Marca A, De Leo V, Giulini S, Orvieto R, Malmusi S, Giannella L, et al. Anti-Mullerian hormone in premenopausal women and after spontaneous or surgically induced menopause. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 2005 Oct;12(7):545-8.

27. 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 May;96(5):1336-43.
28. Long WQ, Ranchin V, Pautier P, Belville C, Denizot P, Cailla H, et al. Detection of minimal levels of serum anti-Mullerian hormone during follow-up of patients with ovarian granulosa cell tumor by means of a highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2000 Feb;85(2):540-4.
29. Frattarelli JL, Levi AJ, Miller BT, Segars JH. A prospective assessment of the predictive value of basal antral follicles in in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril*. 2003 Aug;80(2):350-5.
30. 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 Feb;18(2):323-7.
31. Broekmans FJ, de Ziegler D, Howles CM, Gougeon A, Trew G, Olivennes F. The antral follicle count: practical recommendations for better standardization. *Fertility and sterility*. 2010 Aug;94(3):1044-51.
32. Shapiro CL, Recht A. Side effects of adjuvant treatment of breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2001 Jun 28;344(26):1997-2008.

33. 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 Jun 18;96(12):1808-16.
34. 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 May;14(5):1718-29.
35. Jung M, Shin HJ, Rha SY, Jeung HC, Hong S, Moon YW, et al. The clinical outcome of chemotherapy-induced amenorrhea in premenopausal young patients with breast cancer with long-term follow-up. *Annals of surgical oncology*. 2010 Dec;17(12):3259-68.
36. Petrek JA, Naughton MJ, Case LD, Paskett ED, Naftalis EZ, Singletary SE, et al. Incidence, time course, and determinants of menstrual bleeding after breast cancer treatment: a prospective study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006 Mar 1;24(7):1045-51.
37. Fanchin R, Schonauer LM, Righini C, Frydman N, Frydman R, Taieb J. Serum anti-Mullerian hormone dynamics during controlled ovarian hyperstimulation. *Hum Reprod*. 2003 Feb;18(2):328-32.
38. van Montfrans JM, Hoek A, van Hooff MH, de Koning CH, Tonch N, Lambalk CB. Predictive value of basal follicle-stimulating hormone concentrations in a general subfertility population. *Fertility and sterility*. 2000 Jul;74(1):97-103.

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 investigation*. 2008 Apr-May;26(3):286-95.

Legends

Table 1 - Age of the patients.

Table 2 - Values of ORM (FSH, AMH and AFC) before CTX (median and interquartile range - 25% -75%)

Table 3 – ORM before CTX and menstrual outcome 6 months after CTX.

Table 4 – Baseline ORM related to menstrual outcome 6 months after CTX. Patients with irregular cycles (oligomenorrhic patients) are grouped together with both amenorrhic patients and with eumenorrhic patients.

Table 5 – ORM cut off in predicting anovulation 6 months after CTX with cyclophosphamide.

Figure 1 – ROC curve for age in predicting anovulation 6 months after CTX. AUC = 0.77; circle = age > 32.

Figure 2 - ROC curve for FSH in 32-year old or older anovulatory patients. Circulating point on the curve corresponding to 6.66 IU FSH UI/mL.

Figure 3 – AMH and AFC ROC curve for anovulation 6 months after CTX. Circles on the curves indicate the cut off with better sensitivity and specificity in predicting anovulation. AUC (AMH) = 0.86. AUC (AFC) = 0.81.

Table 1

	n (total = 52)	%
Age (years)		
< 32	8	15
≥ 32	44	85
32 - 35	17	33
36 - 38	11	21
39 - 40	16	31

Table 2

	All patients	< 32 years	≥ 32 years	p
FSH (IU/mL)	6.71 (3.87 – 8.64)	7.76 (4.67 – 11.81)	6.66 (3.42 – 8.25)	0.214
AMH (ng/mL)	2.53 (0.94 – 5.27)	5.41 (2.17-11.27)	2.32 (0.85 – 4.92)	0.048
AFC (follicles)	11 (8.00 -13.50)	14 (12.25 -15.75)	10 (8.00 – 13.00)	0.023

Table 3

	Regular (19 patients)	Irregular (10 patients)	Amenorrhea (18 patients)
Age (years)	32.9 ± 3.5	35.7 ± 3	36.9 ± 3.4 ^a
AMH (ng/mL)	5.34 (2.71-8.15)	3.21 (1.55 – 4.74)	0.92 (0.24 – 1.66) ^b
AFC (follicles)	13.5 (11-16)	10 (8 - 12)	9 (7.5 - 12) ^c

Regular X Amenorrhea ^ap = 0.006; ^bp < 0.001; ^cp = 0.003.

Table 4

	Regular	Irregular + Regular	Irregular + Amenorrhea	Amenorrhea
Age (years)	32.9 ± 3.5	34.5 ± 3.9 ^a	36.5 ± 3.8 ^d	36.9 ± 3.4
AMH (ng/mL)	5.34 (2.71-8.15)	4.9 (2.27 – 6.69) ^b	1.31 (0.72 – 2.89) ^e	0.92 (0.24 – 1.66)
AFC (follicles)	13.5 (11-16)	12.4 (10- 15) ^c	9 (7.75 - 12) ^e	9 (7.5 - 12)

Irregular + Regular **X** Amenorrhea: ^ap = 0.01; ^bp < 0.001; ^cp = 0.006.

Irregular + Amenorrhea **X** Regular: ^dp = 0.02; ^ep < 0.001.

Table 5

	Cut Off	p	OR	CI	Sensitivity	Specificity
Age	≥ 32 anos	0.03	15.9	1 - 145	96%	39%
AMH	< 3.32 ng/mL	0.04	10.3	2.14 – 50.37	85%	75%
AFC	≤ 12 folículos	0.059	4.43	0.943 – 20.8	81%	62%
FSH (≥32 years)	≥ 6.66 UI/mL	0.021	6.36	1.11 – 36.41	60%	82%

Figure 1

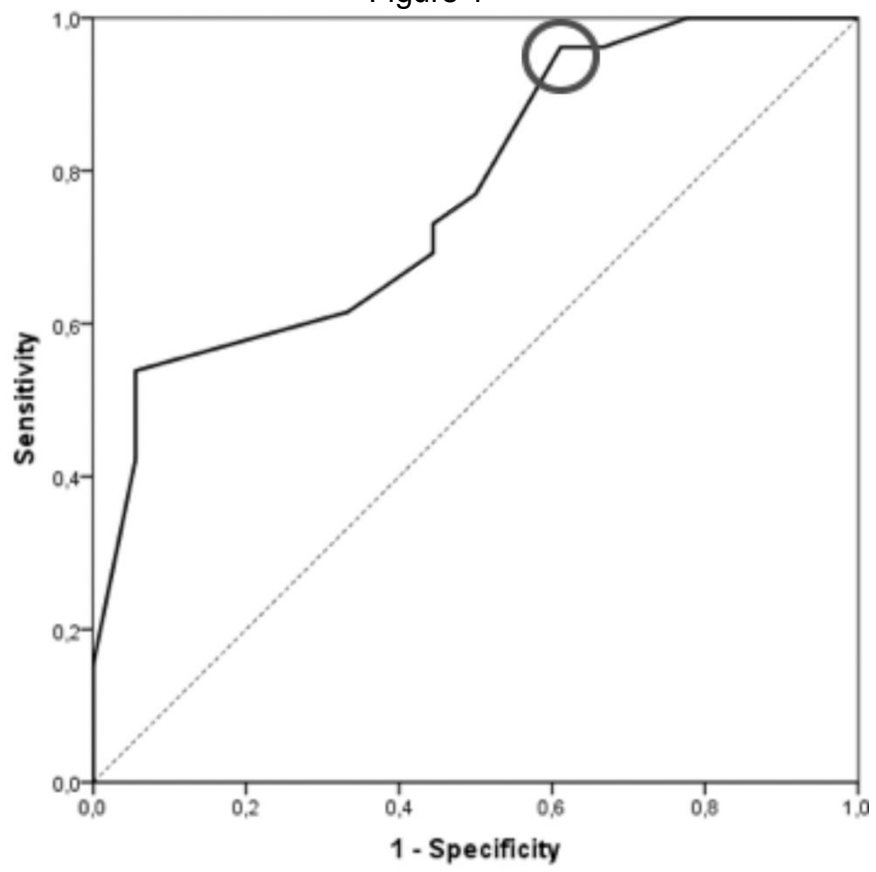


Figure 2

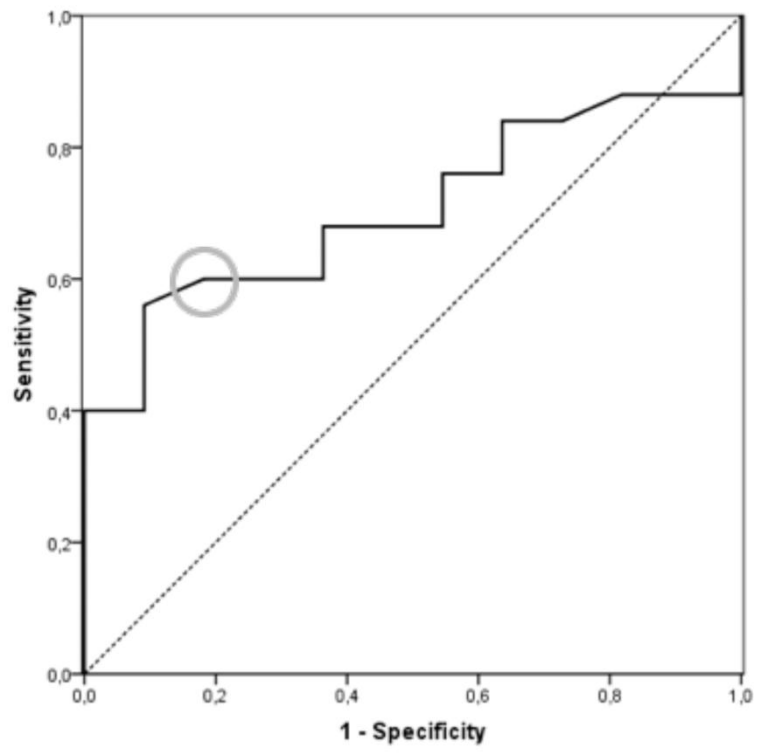
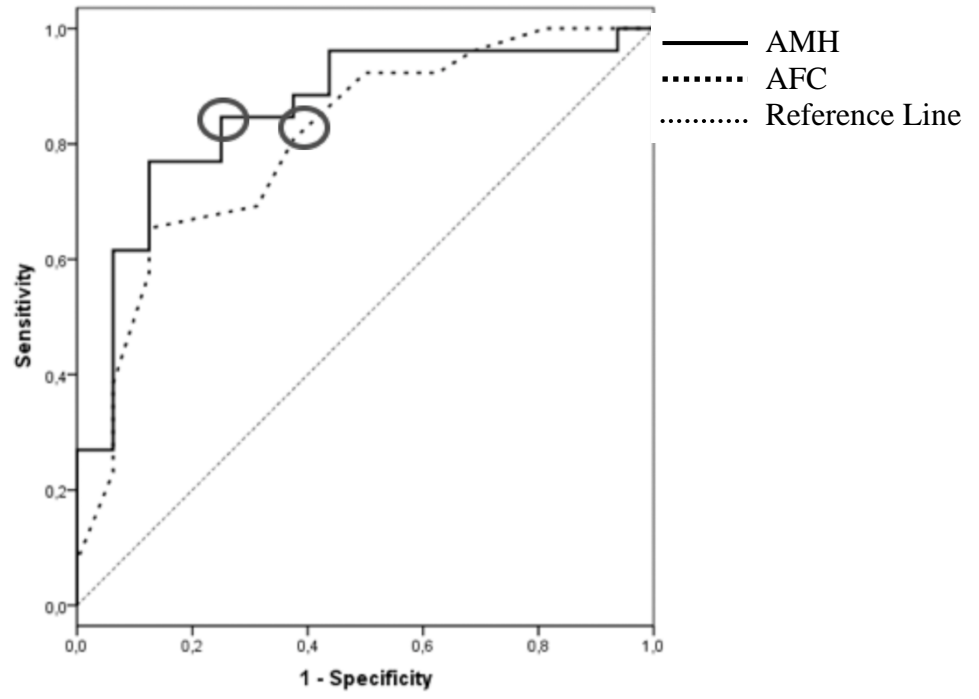


Figure 3



8. Considerações finais

Nosso estudo corrobora os achados mais atuais da literatura que tendem a consolidar o hormônio antimülleriano como sendo o marcador mais fiel da reserva ovariana. Entretanto, é preciso ser criterioso em avaliar a relevância do uso desse marcador da reserva ovariana na prática clínica rotineira em detrimento de outros marcadores com poder muito semelhante a ele para a avaliação da reserva ovariana, muitas vezes, com um resultado mais rápido do que a sua dosagem, como é o caso da contagem de folículos antrais realizada no consultório médico.

Importante ressaltar que o fato de termos determinado pontos de corte para idade, hormônio antimülleriano e contagem de folículos antrais na predição do risco de perda significativa da reserva ovariana sem amenorreia, isto é, anovulação, fortalece a abordagem preventiva da fertilidade para pacientes jovens com diagnóstico de neoplasia maligna. Nosso estudo deve ser um alerta à comunidade médica no que diz respeito à proteção da fertilidade feminina. Mulheres que com terapias antigas poderiam não ter a cura da doença e por isso a fertilidade não ser tema de discussão terapêutica, nos dias atuais, com maiores índices de cura das neoplasias, não podem ser privadas da oportunidade de preservarem a fertilidade e constituir uma família no futuro. A determinação de quais mulheres se beneficiam e necessitam de técnicas de preservação da fertilidade certamente tem importância no tratamento oncológico.

9. Anexos

Anexo 1 – Pacientes e Métodos

Delineamento: Estudo de coorte.

Pacientes: Foram avaliadas 52 pacientes no menacme até 40 anos de idade que foram submetidas à QT com agentes de ação gonadotóxica, possuindo obrigatoriamente a ciclofosfamida em seus esquemas quimioterápicos. O número de pacientes estudadas foi 8 pacientes a mais que a orientação do cálculo do tamanho da amostra, devido a previsão de perdas ao longo do seguimento, no período de julho de 2007 a novembro de 2009.

Critérios de inclusão:

- mulheres com diagnóstico de câncer de mama e indicação de tratamento quimioterápico,
- idade menor ou igual a 40 anos,
- ciclos menstruais regulares
- uso de agentes quimioterápicos comprovadamente gonadotóxicos, com pelo menos um agente alquilante (ciclofosfamida);
- concordância com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo 1)

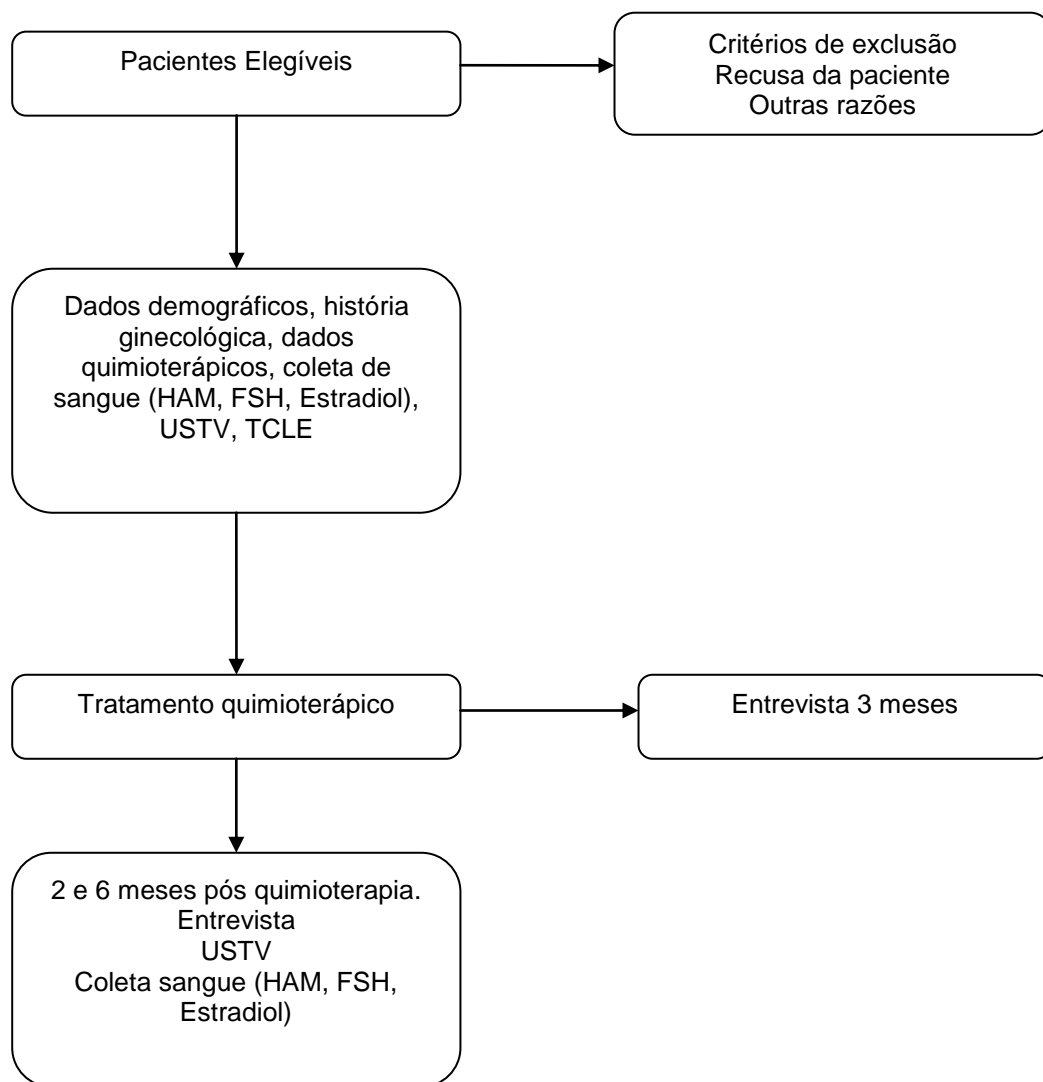
Critérios de exclusão:

- tratamento quimioterápico prévio;
- uso de hormônios
- critérios prévios à QT de FOP (mosaicismo, mudanças no padrão menstrual, sintomas de hipoestrinismo),

Protocolo de estudo: As pacientes foram selecionadas nos ambulatórios de Mastologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, de Mastologia dos Hospitais Nossa Senhora Conceição e Fêmeina, de ginecologia do Hospital Presidente Vargas e no Núcleo Mama do Hospital Moinhos de Vento, atendendo aos critérios de inclusão previamente mencionados. As pacientes foram recrutadas a partir do conhecimento, por parte dos pesquisadores, do diagnóstico de câncer de mama e da indicação de QT pelos médicos assistentes. Nos hospitais do Grupo Hospitalar Conceição, o pesquisador teve contato direto com o Serviço de Patologia, onde realizava rastreamento dos resultados de todos exames anatomopatológicos, para então identificar as pacientes com doença mamária maligna. Após esta identificação, o pesquisador dirigia-se ao ambulatório de Mastologia daqueles hospitais (Nossa Senhora Conceição e Fêmeina) para contato com o médico assistente e paciente. Nos hospitais Moinhos de Vento e no Hospital Presidente Vargas, o pesquisador mantinha contato com os médicos mastologistas para identificar pacientes passíveis de inclusão no estudo. No Hospital de Clínicas de Porto Alegre, o pesquisador mantinha contato com os médicos do ambulatório de mastologia e realizava rastreio dos laudos anatomopatológicos de peças mamárias.

Foram incluídas no estudo as pacientes que, após esclarecidas sobre os objetivos, benefícios e riscos do projeto concordaram em participar e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Após preenchimento do instrumento de coleta de dados em anexo, foi coletada amostra de sangue em jejum, em qualquer fase do ciclo menstrual para dosagem de HAM, FSH e estradiol e realização de USTV. A opção de não padronizar a fase do ciclo menstrual da primeira avaliação ocorreu com o objetivo de não postergar o tratamento quimioterápico, prioridade naquele momento. Dois e seis meses após o término da QT, foram coletadas novas amostras de sangue e realizada US pélvica transvaginal para a obtenção dos novos valores dos marcadores da reserva ovariana. Durante a QT, as pacientes foram entrevistadas sobre a ciclicidade menstrual.

Fluxograma de estudo



Métodos: Após a elegibilidade da paciente e a concordância com a participação no estudo, foram realizadas a entrevista, com o questionário presente no Anexo 1, a USTV e a coleta de sangue. As ultrassonografias foram realizadas com o aparelho de ultrassom da marca Siemens Sonoline Adara™ com transdutor vaginal de 5MHz, sempre pelo mesmo médico ginecologista. As amostras de sangue foram centrifugadas por quinze minutos com velocidade de três mil rotações por minuto. O soro foi separado do material excedente da centrifugação e armazenado em ependorfes de 1ml em temperatura de 80° Celsius negativos. Estas avaliações foram realizadas em qualquer dia do ciclo menstrual em virtude da urgência pelo início do tratamento quimioterápico. As mesmas avaliações foram repetidas, priorizando-se a primeira fase do ciclo menstrual para as pacientes que se mantiveram eumenorreicas, com dois e seis meses após o término da QT. Após o término das coletas das amostras de sangue, estas foram descongeladas em temperatura ambiente para a realização de todas as dosagens hormonais em um único momento, para evitar possíveis variações de leitura. Para a dosagem de FSH e Estradiol utilizou-se a quimioluminescência realizada através do ADVIA Centaur®XP Immunoassay System (Siemens®). O HAM foi avaliado através do kit ELISA (Beckman Coulter, Genese Immunotech®, France), conforme descrito (90).

Análise estatística: O tamanho da amostra calculado, visando encontrar uma diferença de 1,4 ng/ml nos valores de HAM basal e 6 meses após a QT, para um nível de significância de 0,05 e um poder de 90 %, foi de 44 pacientes, conforme os resultados de van Rooj e colaboradores, de 2004 (3). O processamento e análise dos dados foram feitos com auxílio do pacote estatístico SPSS 18. Os dados são

apresentados como mediana em virtude de não apresentarem distribuição normal. As comparações foram realizadas utilizando-se o teste T Chi-quadrado de Pearson teste de Mann-Whitney, teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes, Friedman para amostras relacionadas, regressão logística para amostras independentes, curva ROC e teste de Wilcoxon. Foi considerado nível de significância de 0,05.

Aspectos éticos: Este estudo foi realizado de acordo ética e metodologicamente com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa envolvendo Seres Humanos (Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde) e sendo aprovado pelo Comitê de Ética do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo Instituto de Educação e Pesquisa do Hospital Moinhos de Vento, pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição e pelo Comitê de Ética do Hospital Presidente Vargas.

Anexo 2 -Termo de consentimento livre e esclarecido

Projeto: Impacto Sobre a Reserva Ovariana em Mulheres Submetidas à Quimioterapia Gonadotóxica Avaliado Através de Dosagens de Hormônio Anti-Mülleriano.

Pesquisadores responsáveis: Helena von Eye Corleta, Ângela Marcon D'Avila (angelamdavila@yahoo.com.br)

Telefones para contato com pesquisadores: (051) 2101 8117, (054)9605-8971

Prezada paciente,

Estamos realizando um estudo com pacientes que serão submetidas à quimioterapia, com o objetivo de avaliar a função do ovário. Isto porque, em mais de 50% das pacientes que realizam quimioterapia ocorre, durante ou após o término do tratamento, a suspensão da função ovariana – Falência Ovariana Precoce – o que impede a mulher de continuar produzindo hormônios ovarianos. Conseqüentemente, a menstruação deixa de ocorrer (como na menopausa), e a possibilidade de engravidar é remota.

Algumas mulheres, apesar de retomarem a ciclicidade menstrual, apresentam queda da reserva ovariana, isto é, apresentam uma função diminuída em relação ao que possuíam antes de iniciar o tratamento quimioterápico. Porém, clinicamente isto não é identificado por continuarem a menstruar. Estes dados são importantes porque podem prever a ocorrência da menopausa, além de avaliar a chance de gestar em mulheres que assim desejarem.

Para podermos fazer esta avaliação serão necessárias uma coleta de sangue antes de iniciar o tratamento quimioterápico e duas após seu término. Será

necessária a realização de ecografias pélvicas transvaginais para avaliação do tamanho do ovário e número de folículos, também em três ocasiões – antes do tratamento quimioterápico e com dois e seis meses após seu término. Na metade do tratamento quimioterápico, cerca de três meses após seu início, será entrado em contato com você para responder perguntas quanto a sintomas de diminuição da função ovariana e para saber as datas de suas últimas menstruações. Você não deverá arcar com nenhum custo para a realização deste projeto.

Os seus dados serão mantidos em sigilo, não sendo revelados a outras pessoas que não os participantes do estudo, com o único fim de estudo.

Você poderá interromper a participação neste estudo a qualquer momento, sem que haja prejuízo no seu atendimento médico.

Qualquer dúvida que surja ao longo do estudo, basta entrar em contato com um dos telefones acima citados.

Eu, _____, concordo em participar do estudo acima nomeado, e afirmo que fui adequadamente informada sobre o protocolo em questão, podendo me retirar do estudo quando assim desejar, sem prejuízo qualquer do tratamento de minha doença. Declaro que recebi cópia do presente termo de consentimento.

Paciente: _____

Investigador: _____

Porto Alegre, _____ de _____ de _____

Anexo 3 – Instrumento de coleta de dados

Data: _____

Nome: _____

Hospital: _____

Prontuário: _____

Endereço: _____

Telefones: _____

Idade: _____ Peso: _____ Altura: _____ IMC: _____

Menarca: _____ Ciclos menstruais: _____

MAC: _____

DUM: _____ Paridade: _____

Medicações em uso: _____

Comorbidades: _____

Tabagismo: _____

Diagnóstico tumoral: _____

Data do diagnóstico: _____ Data da cirurgia: _____

Quimioterápicos: _____

Dia do início quimioterapia: _____

Dose total de quimioterápico: _____

Dia Término quimioterapia: _____ Nº de ciclos: _____

Radioterapia: () Sim () Não Dose: _____

PRÉ-QXT DATA: DUM:	2M PÓS QT DATA: DUM:	6M PÓS QT DATA: DUM:
FSH		
HAM		
Folículos antrais		
Volume ovariano D		
Volume ovariano E		
Volume uterino		
Espessura endometrial		

	Pré-QT	3m de QT(entre 3º e 4 ciclos)	2m pós QT	6m pós QT
Ciclos menstruais				
Uso de tamoxifeno				
Fogachos				
Secura vaginal				
Diminuição da libido				
Irritabilidade				
Insônia				

DUMs: _____

Observações: _____

Contatos telefônicos realizado pelos pesquisadores (nome/data/motivo):

Contatos telefônicos realizados pela paciente: (data/motivo):