

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

ESCUELA DE SALUD PÚBLICA
MAESTRÍA EN SALUD SEXUAL Y REPRODUCTIVA

TRABAJO DE TESIS:

***DETERMINACIÓN DE LA RESERVA OVÁRICA EN
MUJERES LUEGO DEL TRATAMIENTO ADYUVANTE
CON QUIMIOTERAPIA POR CÁNCER DE MAMA***

MAESTRANDO: MÉD. JOSÉ MARÍA MARICONDE

DIRECTOR: PROF. DR NÉSTOR GARELLO

ÍNDICE

<u>INTRODUCCIÓN</u>	<u>4</u>
<u>OBJETIVOS</u>	<u>23</u>
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	<u>24</u>
<u>RESULTADOS</u>	<u>28</u>
<u>DISCUSIÓN</u>	<u>39</u>
<u>CONCLUSIONES</u>	<u>46</u>
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>49</u>

INTRODUCCIÓN

Aproximadamente el 5% de todos los cánceres ocurren en personas menores de 35 años, además, cada año se producen nuevos casos que afectan a personas en edad reproductiva. Se estima que una de cada mil personas menores de 20 años habrá padecido cáncer en edad pediátrica o en la adolescencia (1).

En el tratamiento del cáncer están involucradas una serie de disciplinas como la cirugía y la radioterapia, pero es indudable que el esquema sistémico, particularmente la quimioterapia, ha revolucionado estos tratamientos, ya que tornó curables ciertas neoplasias y en determinados estadios.

La era moderna de la quimioterapia nació en la Universidad de Yale hace más de 50 años; los primeros estudios clínicos fueron realizados por Goodman y Gilman aplicando mostaza nitrogenada en pacientes con linfomas. Ya en 1948, Spitz demostró los efectos de esta sustancia en los tejidos, incluyendo las gónadas (2). A partir de estos descubrimientos, y gracias a continuos avances, han surgido gran cantidad de fármacos antineoplásicos, con sus efectos positivos y negativos, entre estos últimos los más comunes son los tempranos, como vómitos, mielosupresión, mucositis, alopecia, hasta los tardíos, que pueden ser tan graves como la producción de segundas neoplasias.

Aún en nuestros días, se presta poca atención a las necesidades reproductivas de los pacientes oncológicos y pone de manifiesto la necesidad de una mayor comunicación entre los oncólogos y reproductólogos, para poder ofrecer a los pacientes la información oportuna sobre sus posibilidades reproductivas actuales y futuras.

Los pacientes que con más frecuencia suelen plantear su problema reproductivo como secuela de los tratamientos oncológicos como cirugía, radiación o quimioterapia, son pacientes con linfomas de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, leucemias y cáncer de mama, ya que un número importante de ellos se producen en edad reproductiva.

Las células germinales en división son altamente sensibles a la acción citotóxica de los agentes quimioterápicos dando lugar a alteraciones seminales en el varón y a irregularidades menstruales y amenorrea en la mujer por alteración de su reserva ovárica (RO).

Como una posible expresión de RO en mujeres menores de 40 años y tratadas con quimioterapia por cáncer de mama, el 30 al 40% entran en amenorrea y de estas el 70 al 90% vuelve a menstruar. Por otro lado, de las mayores de 40 años, el 70% entra en amenorrea y el 90% de las veces es irreversible. Cabe consignar que alrededor del 15 al 20% de las pacientes con cáncer de mama tienen menos de 40 años de edad, y la mayoría padece la enfermedad en estadios tempranos. Se ha observado además que, dependiendo del esquema, dosis, edad y duración, la quimioterapia puede alterar la RO.

Lamentablemente, en el grupo de pacientes menores de 35 años el pronóstico es desfavorable dado que la enfermedad puede ser más agresiva biológicamente, sumado a la ausencia de un método eficaz de tamizaje, produciendo detecciones más tardías. De todos modos al ser el cáncer de mama una enfermedad curable en ciertos casos, es importante tener en cuenta los factores sexuales, hormonales y reproductivos en este grupo de pacientes. Se debe considerar que

por edad y estilo de vida en nuestro medio, es mayor el número de pacientes jóvenes sin embarazos al momento del diagnóstico y con deseos de fertilidad. Por todo lo antedicho, se considera la RO de pacientes oncológicas jóvenes, una información sumamente valiosa para el médico tratante quien debe poseer un certero conocimiento de la misma, para aconsejar a las pacientes que tengan deseos reproductivos.

Esto consideramos, redundará en beneficio de nuestras pacientes.

EFFECTOS DE LOS TRATAMIENTOS QUIMOTERÁPICOS SOBRE LA FERTILIDAD

Aunque no pone en riesgo la vida del paciente, la disfunción gonadal posterior a la quimioterapia es uno de los efectos tóxicos tardíos más frecuentes y produce graves alteraciones psicosociales y familiares: desintegración del núcleo familiar, divorcios y alteraciones sexuales; es decir que al impacto emocional que produce el cáncer, se agrega el de la infertilidad. Debido a diagnósticos cada vez más tempranos y a avances terapéuticos, en la actualidad un importante porcentaje de pacientes jóvenes con cáncer sobrevivirán. Es por ello que una de las metas en la terapéutica actual, es intentar preservar la fertilidad en estas mujeres.

Como se mencionó anteriormente, los efectos de la terapéutica oncológica sobre la fertilidad dependen de diversos factores: tipo de fármaco, dosis, edad, duración del tratamiento y forma de administración (mono o poli quimioterapia) (3, 4). El fallo ovárico puede ocurrir durante el tratamiento, inmediatamente luego del mismo o ser postergado por un período variable de tiempo.

Se ha demostrado disminución de células germinales con agentes como ciclofosfamida, clorambucilo, melfalan y busulfan. Se piensa que el efecto citotóxico gonadal es menor para agentes como vinblastina, cisplatino y tamoxifeno.

Los agentes con menos toxicidad gonadal son el metrotexato y el 5-fluorouracilo. Se informa de efectos raros en células germinales por vincristina, doxorubicina y bleomicina (5).

Puntualmente en cáncer de mama, los agentes alquilantes como la ciclofosfamida, producen alteraciones importantes en la gónada femenina siendo relevante no solo la dosis del agente sino la edad de la paciente, de manera que la dosis total con la que ocurre amenorrea en las mujeres de 40 años en adelante es de 5.2 gr. mientras que en las mujeres entre 20 y 30 años las dosis que producen amenorrea son muy superiores (más de 20 gr.) (6). La gónada prepuberal es más resistente a la acción citotóxica porque posee mayor contenido de folículos primordiales que las de mayor edad, es decir mayor RO (7).

También se ha intentado minimizar los efectos de la quimioterapia sobre la gónada suprimiendo la función ovárica con Análogos de GnRH durante el tratamiento quimioterapico pero con escasos resultados (8, 9).

No han sido confirmados los posibles efectos de los agentes citostáticos provocando mutaciones a nivel del material genético de las células germinales en proceso de división (10, 11).

Uno de los esquemas quimioterapicos adyuvantes más utilizados para el cáncer de mama es el CMF (ciclofosfamida, metrotexato y 5 fluoruracilo), aunque

presenta la misma toxicidad ovárica que la esperable con ciclofosfamida como monodroga, como se remarcó anteriormente la edad y la dosis son factores decisivos en la producción de amenorrea y disminución de la RO. Otra de las combinaciones utilizadas es el FAC (5 fluoruracilo, adriamicina y ciclofosfamida), y al igual que con CMF es la ciclofosfamida la que produce las alteraciones gonadales con amenorrea en las mujeres mayores de 34 años hasta del 100% cuando se administró durante 12 ciclos o más. Con el actual conocimiento y avalado por múltiples publicaciones que afirman que 6 ciclos de quimioterapia adyuvante, comparado con 12 o 24, son igualmente eficaces, se ha logrado que la amenorrea también disminuya en forma considerable, con la consecuente mejoría en la calidad de vida al disminuir las posibilidades de síndrome climatérico precoz.

A pesar de la conocida toxicidad de los diferentes agentes, no ha sido posible predecir el riesgo individual de afectación de la reserva ovárica. Actualmente con la llegada de esquemas con múltiples agentes, es probable que el riesgo de afectación de los folículos primordiales sea mayor.

En relación al tratamiento hormonal administrado en cáncer de mama, y en particular con tamoxifeno en mujeres premenopáusicas, se asumiría la posibilidad de una menopausia prematura por tratarse de un SERM (modulador selectivo de los receptores de estrógenos); sin embargo, si bien puede producir menstruaciones irregulares en mujeres menores de 45 años, la amenorrea irreversible es muy rara. La probabilidad estimada de menopausia en el primer año del diagnóstico de cáncer de mama y tratadas sólo con tamoxifeno, es de 0.2 después de los 45 años; mientras que las recibieron quimioterapia, que es de 0.6

a los 40 años (12). Una dificultad que se plantea, es la determinación de RO con dosajes de FSH y E2 en mujeres que son tratadas con tamoxifeno (13). Los niveles de E2 pueden ser 4 a 5 veces mayores en mujeres bajo tratamiento prolongado con tamoxifeno, con niveles de FSH disminuidos debido a la retroalimentación negativa (14). Al respecto, en un estudio de Petrek y cols., concluyeron que por la estimulación crónica por tamoxifeno, los ovarios de mujeres con cáncer de mama usualmente se vuelven disfuncionales produciendo anormalidades menstruales temporarias (15).

Es en el cáncer de mama donde ocurre el impacto más importante con respecto al potencial de embarazo, es por ello que un gran grupo de pacientes tiene deseos reproductivos al finalizar el tratamiento oncológico.

De las primeras series que demostraron la posibilidad de embarazo posterior a la quimioterapia es la de Sutton, de 25 pacientes, en la que se obtuvieron 33 embarazos (10 abortos espontáneos y 2 electivos); todas las mujeres con deseos de continuar con el embarazo lograron neonatos saludables y sin complicaciones durante el parto (16).

Teniendo en cuenta el potencial reproductivo en estas pacientes, la terminación de los ciclos menstruales es el síntoma final de la falla ovárica y por lo tanto de infertilidad, debidos a la acción de la edad y/o quimioterapia. Sin embargo, la infertilidad debido al envejecimiento ovárico, suele preceder entre 5 a 10 años la presentación de la amenorrea. Aunque las mujeres habitualmente continúan menstruando hasta fines de los 40 y principios de los 50 años, las tasas de fertilidad disminuyen ostensiblemente luego de cumplidos los 40, con tasas de fertilidad a los 45 cercanas a 0 (17). En el artículo ya mencionado de Petrek (15),

se ha demostrado el impacto de la quimioterapia adyuvante sobre la menstruación, dependiendo del régimen quimioterápico utilizado y la edad de la paciente. Sin embargo su estudio, al igual que otros anteriores, queda limitado solo al impacto menstrual y no a una evaluación completa del estado reproductivo. Es por ello que para un certero diagnóstico de las posibilidades de embarazo en las pacientes oncológicas jóvenes, la presencia o no del sangrado menstrual es insuficiente, por lo cual se considera necesario el estudio de RO en dichas pacientes.

ESTUDIO DE LA RESERVA OVARICA

El concepto de RO se utiliza para describir la calidad y cantidad de la población de ovocitos y su relación con el resultado reproductivo, y ha adquirido mayor importancia en las mujeres que serán sometidas a técnicas de reproducción asistida. La base fisiológica de la disminución de la RO en la mujer, es la pérdida progresiva y constante del capital de folículos ováricos y por ende de ovocitos, por medio del mecanismo de atresia y apoptosis (18, 19).

El comienzo de la ovogénesis en el ovario fetal se produce entre las semanas 11 y 12 de edad gestacional, cuando comienza la meiosis. La primera división meiótica del ovocito primario se completa poco tiempo después de la ovulación, con la formación del ovocito secundario y el primer cuerpo polar. Si el ovocito es fertilizado se produce la segunda división meiótica, cuando se forma el ovocito maduro (óvulo) y el segundo cuerpo polar. A las 20 semanas de gestación, el ovario del feto femenino contiene el mayor número de folículos, estimado en 7 millones. La mayor depleción ocurre desde este momento y hasta el nacimiento

probablemente por migración hacia la cavidad abdominal. Al nacimiento restan 1 a 2 millones y luego, por un proceso constante de atresia y apoptosis, el número disminuye de acuerdo a la edad. En la menarca quedan 400000 y continúan evolucionando a atresia a un ritmo de 30 por día, restando aproximadamente 25000 a los 37 años. A partir de esta edad el proceso atrésico se acelera y la mujer llega a la menopausia aproximadamente a los 50 años, con un número cercano a los 1000 folículos.

La atresia folicular tiene un ritmo adaptativo condicionado por factores genéticos, inmunológicos, ambientales, tóxicos y traumáticos.

Si bien los eventos ováricos signan la declinación reproductiva, otros eslabones participan de este proceso: alteraciones genéticas ovocitarias que incorporan la variable de la calidad (tanto o más importante que la cantidad que determina la atresia), modificación en la secreción de gonadotropinas y alteraciones endometriales que dificultan la implantación (20).

En 2003, Nikolau y Templeton (18), plantean una hipótesis sobre la pérdida precoz de reserva ovárica, a la que proponen asignarle la categoría de entidad clínica. Esta hipótesis propone que la subfertilidad de la mujer comienza aproximadamente 13 años antes de la menopausia, cuando los ovarios tienen un número de 25000 folículos. Es en este momento cuando se disocian las funciones del ovario: se acelera la atresia, disminuye la calidad ovocitaria y se mantiene la secreción hormonal, la ovulación y los ciclos menstruales son regulares (19). Desde ese momento la mujer tendrá una ventana de 4 años para asegurar un embarazo. Así, para una mujer de 51 años este proceso se inicia a los 38 años, mientras que para otra que tenga su menopausia a los 45 años (el

10% de la población general) comenzará a los 32 años de manera silenciosa e indetectable. Se proponen estrategias para la detección precoz de esta condición de envejecimiento ovárico prematuro, para aconsejar el embarazo en la ventana de 4 años. A su vez, se establece un perfil del grupo de riesgo: historia familiar de menopausia temprana, exposición a quimioterapia o radioterapia, antecedentes de cirugía pelviana ovárica, enfermedad inflamatoria pélvica, patología tubaria, endometriosis y hábito de fumar (21, 22, 23). A todo ello se le debe agregar la incidencia importante de los factores genéticos en la edad de aparición de la menopausia. Con estos elementos, se fundamenta la necesidad del estudio de RO en cada caso en particular.

Petrek y cols., confirmaron que la edad es un determinante de falla ovárica luego de quimioterapia y encontraron que la menstruación se mantenía en mujeres menores de 35 años luego de tres años de seguimiento, dependiendo el régimen quimioterápico (15). Cada curso de quimioterapia conteniendo ciclofosfamida, resultará en la pérdida de un porcentaje de RO dependiendo de la edad de las paciente (61, 62). Debido a que las pacientes más jóvenes poseen un mayor número de folículos, es decir un mayor respaldo para tolerar pérdidas, pueden no presentar falla ovárica importante en el corto plazo luego de quimioterapia. Sin embargo, sufrirán infertilidad y por lo tanto menopausia mucho más temprano que en pacientes no tratadas (63).

Los métodos para la evaluación de RO son:

Tests endócrinos estáticos

FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH)

El marcador más precoz del inicio de la disminución de la reserva ovárica ha sido históricamente el incremento de FSH en la fase folicular temprana, debido a la disminución del retrocontrol negativo de inhibina B como consecuencia de la disminución de los folículos preantrales y antrales pequeños. Esta elevación de FSH interactuando con activina acelera el reclutamiento folicular y actuaría como mecanismo compensatorio para lograr el desarrollo de un folículo dominante en un pool disminuido de folículos primordiales (24). La elevación de FSH ocurre con ciclos regulares y comienza hasta 6 o más años antes de la menopausia. Niveles elevados de FSH a cualquier edad se correlacionan con menos cantidad de ovocitos. La FSH debe ser medida el 3º día del ciclo menstrual (25, 26) y niveles superiores de 15 mUI/ml indican compromiso de la reserva ovárica con respuesta pobre a la estimulación ovárica y bajas tasas de embarazo (27).

ESTRADIOL (E₂)

Los niveles elevados de E₂ en la fase folicular temprana (>50 pg/ml) también predicen disminución de la reserva ovárica y pueden ocurrir con niveles normales de FSH. La elevación de E₂ se produce por el reclutamiento temprano de folículos en fase lútea por la elevación de FSH. El reclutamiento luteal prematuro ocurre cuando hay una cohorte folicular disminuida que producen niveles bajos de inhibina. Los niveles basales de E₂ superiores a 50 pg/ml, marcan un compromiso de la reserva ovárica que se traduce en bajas tasas de embarazo. La medición simultánea de FSH y E₂ es mejor en predecir dificultad reproductiva que el dosaje

de ambos por separado. Por otro lado, las mujeres que tienen valores basales elevados de E_2 , raramente muestran simultáneamente niveles elevados de FSH (presumiblemente por el impacto del feed back negativo sobre FSH).

INHIBINA B

Es una glicoproteína producida por células de la granulosa del folículo que ejerce acciones de retrocontrol negativo sobre la secreción de FSH. Los niveles bajos de Inhibina B (<45pg/ml) en fase folicular temprana, se asocian a reserva ovárica disminuida y menores tasas de embarazo en reproducción asistida (16, 17) y parecen preceder al incremento de los niveles de FSH (26-28).

La combinación de niveles basales normales de FSH y elevados de inhibina B y valores altos de inhibina A y B durante la estimulación de la ovulación en ciclos de FIV se asocian a mayores tasas de embarazo.

HORMONA ANTIMÜLLERIANA (HAM)

La proteína dimérica hormona antimülleriana, es uno de los miembros de la superfamilia del factor de crecimiento β (TGF β) (30-32). La HAM, descrita por Alfred Jost en 1947, reprime el crecimiento de los conductos müllerianos y es producida por las células de Sertoli inmaduras en el testículo fetal. El ovario también produce la HAM en bajos niveles, sintetizada por las células de la granulosa pero sólo luego del nacimiento o al final de la vida fetal intrauterina. En el ovario, la HAM regula la foliculogénesis y la esteroidogénesis inhibiendo el reclutamiento inicial de folículos por inhibición de FSH (21). En la mujer, los mayores niveles de HAM son alcanzados luego de la pubertad. Su producción es a partir de los folículos preantrales y antrales tempranos y su secreción finaliza cuando un folículo es seleccionado.

La HAM está implicada en la regulación negativa de la aromatasa y los genes de los receptores de LH aumentando la producción de andrógenos por las células de la teca. Además, en el tejido ovárico postnatal, la HAM inhibe el reclutamiento inicial de folículos, a partir del momento en que la HAM inhibe los efectos estimulantes de la FSH en el crecimiento de los folículos pequeños y preantrales. Las señales de la HAM a través de dos receptores de serina/treonina tipo II, requerido como proteína ligadora, y tipo I para señal de transducción (34-37). Recientes reportes clínicos han demostrado que los niveles de AMH en el período folicular temprano, están fuertemente asociados con el estado folicular del ovario y con el número de oocitos recolectados luego de la estimulación ovárica para ciclos de reproducción asistida de alta complejidad (29).

Hazout y col. (2005), obtuvo valores promedio en el 3º día del ciclo para embarazo clínico, una HAM de 2.4 ng/ml en comparación con 1,1 ng/ml en las pacientes que no arribaron a embarazo ($p < 0.002$). No se encontraron diferencias entre ambos grupos en cuanto a FSH, E₂ o inhibina B. Se arribó a la conclusión que la HAM de manera independiente, es el mejor indicador para predecir probabilidad de embarazo y por lo tanto mejor valor pronóstico para respuesta a las técnicas de reproducción asistida (37).

En tanto, Blazar y col. (2005), arribaron a la conclusión que el nivel de HAM se correlaciona de manera significativa con un mayor número de embriones de 6 células y mejor niveles de embriomorfología, mientras que los niveles basales de FSH no se correlacionan con estas variables. Los niveles de HAM por encima de 2.7 ng/ml predicen mejora en la calidad ovocitaria, lo que se ve reflejado en una

mayor tasa de implantación ($p=0.001$) y una tendencia a una mejor tasa de embarazos clínicos ($p=0.084$) (36).

La HAM ha demostrado tener correlación con el grado de RO sin objetivar cambios en sus niveles serológicos de acuerdo a la etapa del ciclo menstrual. Por lo anterior, es de utilidad en pacientes con oligo o amenorrea; siendo frecuentes estos síntomas luego del tratamiento quimioterápico.

Tests endocrinos dinámicos

ESTIMULACION CON CLOMIFENO

Consiste en medir FSH sérica el 3° y el 10° día del ciclo, luego de la administración de 100mg/día de citrato de clomifeno desde el 5° día hasta el 9°. Un test anormal es predictivo de reserva ovárica disminuida en ciclos naturales y en inducción de la ovulación (38), aunque pierde valor predictivo en mujeres mayores de 40 años en términos de respuesta a la superovulación y a las tasas de embarazo en reproducción asistida.

ESTIMULACION CON GONADOTROFINAS

La medición de la respuesta clínica de los ovarios a la estimulación con gonadotrofinas es uno de los tests más sensibles para evaluar reserva ovárica (39). La baja respuesta a la inducción de ovulación con gonadotrofinas parece ser un signo temprano de reserva ovárica alterada ya que precede a la elevación perimenopáusica de FSH (40-43).

Tests ecográficos

La evaluación ecográfica de ambos ovarios realizada entre el día 5° al 7° del ciclo, representa un método de buen valor predictivo y fácil implementación (43, 44). Los parámetros a evaluar son: medición del volumen ovárico, conteo de folículos antrales (CFA), diámetro folicular máximo y medición del área de superficie folicular. Los ovarios adultos miden 3 a 5 cm por 1,5 a 3 cm por 0,5 a 1,5 cm y pesan entre 5 a 8 grs. Durante la ecografía transvaginal, los ovarios son medidos en tres planos y el volumen ovárico se calcula empleando la fórmula siguiente: $V = D1 \times D2 \times D3 \times 0,5$ (D: diámetro; V: volumen) (46-47).

Van Rooij y col. describen como mejores predictores de reserva ovárica la medición de los parámetros ecográficos más los niveles de HAM, la que está altamente relacionada con el número de folículos antrales y el número de ovocitos capturados para FIV. A su vez, describe como únicos patrones correlacionados de manera significativa con la edad a los antedichos ($p < 0,001$) (34).

Biopsia ovárica

Se sabe que la distribución folicular en la corteza ovárica es muy heterogénea, lo que implica que la biopsia ovárica no sea representativa del pool de folículos, siendo además, un procedimiento invasivo. Se considera que la biopsia ovárica no agrega información adicional a los test de reserva ovárica descritos (48).

Como se ha enunciado previamente, se utilizan ampliamente como marcadores de RO la FSH y E₂ dosadas entre el 3º y 5º día del ciclo menstrual. Mientras que dos mediciones de FSH de 40 mIU/mL confirman valores menopáusicos en mujeres que menstrúan, niveles de FSH mayores a 20 mIU/mL indican severo compromiso reproductivo (49, 50). A pesar de ser el marcador más utilizado en la práctica diaria, su confiabilidad se ve disminuida por grandes variaciones interciclo.

Asimismo, niveles elevados de E₂ mayores a 50 pg/mL también se asocian con fertilidad disminuida o ausente. Aunque parece paradójico, la aceleración de la pérdida folicular, se evidencia primariamente por niveles elevados de E₂ por incremento previo de FSH (51).

Los mayores niveles de FSH resultan en una estimulación ovárica endógena precoz, causando ovulaciones más tempranas, en algunos casos a los pocos días de concluido el sangrado menstrual. Además, debido a la retroalimentación negativa del E₂, los niveles de FSH son disminuidos y pueden ser medianamente normales. Es así que los niveles elevados de estas dos hormonas, indican disminución en la fertilidad a pesar de la continuación y periodicidad de los ciclos menstruales (49).

En un estudio reciente de Oktay y cols, se analizaron los niveles de FSH y E₂ en ocho mujeres que continuaban menstruando luego de haber recibido doxorubicina y ciclofosfamida (AC por 4) o AC seguido por paclitaxel (por 4) luego de una media de seguimiento de 38 meses. El promedio de edad fue de 40.9 años. Dos de cuatro pacientes que recibieron AC más paclitaxel, y todos los

pacientes que recibieron AC, presentaron niveles anormalmente elevados de FSH y/o E2 en el 3º día del ciclo (50).

Un elemento no tenido en cuenta en algunos estudios (15) es la frecuencia de los ciclos menstruales luego del tratamiento quimioterápico.

En mujeres con RO disminuida, los ciclos suelen volverse más cortos y menos variables debido al desarrollo folicular acelerado (51). Esto explicaría, el hallazgo por diferentes autores de un “efecto paradójico” de persistencia de la menstruación en el corto plazo luego de recibir los regímenes más gonadotóxicos como CMF (52, 53).

Mientras que no hay estudios prospectivos sobre reserva ovárica en sobrevivientes adultos con cáncer, sí hay reportes sobre su uso en sobrevivientes adolescentes. Un estudio ha reportado que, a pesar de la regularidad en sus ciclos menstruales, los sobrevivientes adolescentes tienen menor volumen ovárico y disminución del CFA y niveles de inhibina B disminuidos comparados con controles (54). Los mismos autores mostraron que en la cohorte de los supervivientes de cáncer a pesar de los niveles normales de FSH, la reserva ovárica se continúa encontrando reducida, como evidencia el menor volumen ovárico y el menor CFA comparado con los controles influenciados por la edad (55). En una cohorte similar de sobrevivientes con cáncer, los investigadores encontraron diferencias en los niveles de HAM y FSH comparados con los controles (56). Estos reportes preliminares afirman que existen marcadores certeros de reserva ovárica en pacientes con cáncer, más sensibles que el dosaje aislado de FSH, como son HAM, Inhibina B y CFA. Oktay y cols (50) midieron niveles de HAM en tres pacientes con cáncer de mama antes de la quimioterapia. En todas las pacientes, los niveles de HAM disminuyeron luego de cada ciclo de

quimioterapia. En dos pacientes de 36 años (recibieron FAC) y 34 años (recibió dosis densa de AC), los niveles de HAM disminuyeron hasta ser indetectables y estas pacientes permanecieron amenorreicas. En pacientes más jóvenes (30 años) bajo tratamiento con AC, los niveles disminuyeron más del 75% luego del último curso de quimioterapia y las mismas retomaron sus ciclos menstruales.

Concluyendo, diremos que los niveles basales de FSH y E2 no determinan la RO remanente previa al comienzo de la infertilidad, a su vez son marcadores muy variables y se requiere dosarlas en la fase folicular precoz, siendo imposible en pacientes amenorreicas luego del tratamiento con quimioterápicos. Para suplir esta necesidad, se utilizan marcadores como inhibina-B y la HAM, que junto con el CFA, pueden ser más sensibles para determinar la reserva ovárica remanente (57-59). A su vez, la HAM puede ser un certero marcador para determinar la reserva ovárica en estas pacientes, ya que los niveles de esta hormona no son influenciados por el momento del ciclo menstrual (60), inclusive en amenorrea presenta valores estables.

Se considera que es parte de la tarea del equipo tratante, informar a las pacientes jóvenes que su vida fértil puede verse reducida o acortada, pudiendo planear el nacimiento de sus hijos más precozmente. A su vez, las pacientes que no deseen procrear próximamente, pueden verse beneficiadas con métodos de preservación de la fertilidad (64).

OBJETIVOS

Objetivo General

- Estudiar la reserva ovárica en mujeres jóvenes luego de tratamiento oncológico con quimioterapia.

Objetivos específicos

- Determinar los síntomas que puedan indicar un deterioro de la reserva ovárica.
- Individualizar la acción sobre la función ovárica de los esquemas utilizados

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes

Se obtuvieron de dos Instituciones:

- II Cátedra de Ginecología del Hospital Universitario de Maternidad y Neonatología: Servicio de Asistencia a la Reproducción. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Instituto Modelo Privado de Ginecología y Obstetricia, Departamento de Oncología Clínica. Córdoba, Argentina.

- Consultorio de Ginecología General de ambas instituciones.

Criterios de inclusión:

- Pacientes en edad reproductiva menores de 40 años de edad.
- Sexo femenino.
- Diagnóstico de cáncer de mama que haya realizado tratamiento sistémico dentro de los 2 años anteriores.
- Consentimiento informado firmado.
- Pacientes sin trastornos hormonales reproductivos.

Criterios de exclusión:

- Mayores de 40 años.
- Alteraciones hipofisarias previas.
- Desordenes hormonales previos asociados con función ovárica.

- Ooforectomía.
- Quistectomía ovárica por endometriosis.
- Radioterapia abdominopélvica.
- Medicación hormonal indicada para control reproductivo.
- Sospecha clínica de falla ovárica prematura.
- Cualquier patología asociada que pueda disminuir la reserva ovárica, que no se haya mencionado.

Variables evaluadas

Los parámetros evaluados en estas pacientes fueron: edad, diagnóstico, receptores hormonales del tumor, características de los ciclos menstruales previos y posteriores a la quimioterapia, características menstruales durante el tratamiento, gestas y paras, lactancia, tratamientos instituidos, síntomas climatéricos. Toda paciente participante ha brindado su consentimiento por escrito.

Grupos de Estudio

Grupo Problema: pacientes que ya recibieron tratamiento quimioterapico en las cuales se evaluó la reserva ovárica con hormona antimülleriana.

Grupo Control: pacientes menores de 40 años con fertilidad comprobada, en las cuales se evaluó la RO con HAM.

Protocolo de Estudio

Se obtuvo muestra de sangre para dosaje de HAM en suero de las pacientes problema, dentro de los primeros 24 meses de comenzado el tratamiento adyuvante con quimioterapia. Debido a la inalterabilidad de este parámetro con respecto al ciclo menstrual, no se tuvo en cuenta si las mujeres se encontraban en amenorrea. En el momento de la extracción, se realizó el interrogatorio pertinente para evaluar las variables del estudio.

Glosario

RO: reserva ovárica.

HAM: hormona antimülleriana.

FSH: hormona foliculoestimulante.

E₂: hormona 17 β estradiol.

CFA: conteo de folículos antrales.

CMF: ciclofosfamida, metotrexate y 5-fluoruracilo.

FAC: 5 fluoruracilo, antraciclina y ciclofosfamida.

AC: antraciclina y ciclofosfamida.

RESULTADOS

Se reclutaron 40 pacientes menores de 40 años que realizaron tratamiento quimioterapico por cáncer de mama entre julio de 2007 y mayo de 2009. Por criterios de exclusión, restaron como grupo problema de estudio 12 casos. En cuanto a los casos controles, se incluyeron 11 casos. En la Tabla 1 se detallan los datos recolectados en los casos problema (P) y controles (C).

Tabla 1: datos recolectados en los casos problema y control.

Variable	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
EDAD problema	12	27,00	40,00	33,8333	4,34497
EDAD control	11	25,00	37,00	30,8182	3,81623
HAM problema	12	,01	1,50	,3165	,46728
HAM control	11	,40	13,00	3,2273	3,51968
LACTANCIA problema	12	,00	1,00	,5833	,51493
LACTANCIA control	11	,00	1,00	,5455	,52223
GESTAS problema	12	,00	5,00	1,2500	1,54479
GESTAS control	11	,00	3,00	,9091	,94388
PARAS problema	12	,00	4,00	1,0833	1,37895
PARAS control	11	,00	3,00	,9091	,94388

EDAD: se obtuvo un promedio de 33,83 años en el grupo problema, con un rango de 27-40 años. En cuanto al grupo control, el promedio de edad fue de 30,81 años con un rango de 25-37 años. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa (p 0,183).

Figura 1: comparación de edad entre los casos problema y controles.

LACTANCIA: el 58% (7) de las mujeres problema y 58 % (6) de las controles, tuvieron antecedentes de lactancia. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

Figura 2: lactancia en mujeres problema.

Figura 3: comparación de la variable lactancia entre los problemas y controles.

CARACTERÍSTICAS MENSTRUALES POSTQUIMIOTERAPIA: luego del tratamiento adyuvante, la regularidad de los síntomas menstruales fueron las siguientes: 4 eumenorreicas, 4 oligomenorreicas, 1 hipermenorreica y 3 amenorreicas.

Figura 4: características menstruales post quimioterapia.

GESTAS Y PARAS: de las 12 paciente problema, 5 son nuligestas y 6 son nulíparas (1 caso de embarazo ectópico). De los 11 controles, 4 son nuligestas y nulíparas.

Figura 5: gestas pre-tratamiento en los casos problema.

HAM: se objetivó una disminución de los niveles de HAM entre el grupo problema (0,3165 poner) VS grupo control (3,2273). Esta diferencia fue estadísticamente significativa (p 0,024), representando una disminución de 10,3 veces de la reserva ovárica en las mujeres expuestas a quimioterapia (Figura 6).

Figura 6: niveles de HAM.

Figura 7: comparación entre niveles de HAM problema VS HAM control.

SÍNTOMAS CLIMATÉRICOS: a partir del cuestionario realizado, se objetivaron síntomas climatéricos en 4 de las pacientes del grupo problema (Figura 7), siendo el síntoma dominante el sofoco. En tanto, en el grupo control no se evidenciaron síntomas climatéricos.

Figura 8: presencia de síntomas climatéricos en el grupo problema.

DESEOS GESTACIONALES: solo 1 de las pacientes pertenecientes al grupo problema, presentó deseos gestacionales. No se presentaron embarazos luego del tratamiento quimioterápico en las pacientes estudiadas.

TRATAMIENTO EFECTUADO:

Quimioterapia: el 50% de las pacientes recibió FAC por 6 ciclos, mientras que el restante 50% recibió AC por 4 ciclos completado por Paclitaxel por 4 ciclos (Figura 9).

Figura 9: esquema quimioterápico recibido por los casos problema.

Hormonoterapia: el 58,33% de las pacientes del grupo problema (7), se encontraron al momento del estudio bajo tratamiento con Tamoxifeno (Figura 10).

Figura 10: pacientes que se encuentran bajo tratamiento con Tamoxifeno.

MENSTRUACIÓN POST QUIMIOTERÁPIA: el 83% de las pacientes problema (10), presentaron ciclos menstruales nuevamente (Figura 11). En tanto que el promedio de retorno del ciclo menstrual en las pacientes que no menstruaron durante el tratamiento fue de 4,71 meses, con un rango de 2-8 meses. En 3 casos, la menstruación persistió durante el tratamiento, modificando solo su perioricidad.

Figura 11: presencia de menstruación post quimioterapia.

CICLOS MENSTRUALES DE ACUERDO AL USO DE TAMOXIFENO: de las pacientes tratadas con, solo 1 caso permaneció en amenorrea, presentando 3 casos eumenorrea, 2 casos hipermenorrea y el restante oligomenorrea (Figura 12).

Figura 12: ciclos menstruales en pacientes bajo tamoxifeno

DISCUSIÓN

Como hemos mencionado anteriormente, aproximadamente el 2.7% de los cánceres de mama ocurre en mujeres que se encuentran en el pico de su edad reproductiva (25–35 años) (67). Por otro lado, la nueva tendencia imperante en los países desarrollados de retrasar la maternidad, ha llevado al aumento de porcentaje de mujeres que reciben tratamientos oncológicos por cáncer de mama, antes de lograr su primer embarazo.

Además de la posibilidad de disminuir la capacidad reproductiva de estas pacientes, las mismas deben a su vez enfrentarse a múltiples dilemas: deseos gestacionales, anticoncepción, proyección de vida futura, sexualidad, entre otros (68). El cáncer de mama afecta la reproducción por dos aspectos: el tratamiento quimioterápico per se, el cual produce una disminución en el pool de folículos ováricos, y la indicación o consejo habitual por parte del equipo tratante de retrasar el embarazo por al menos 2 años. Esto último hace que la disminución de la RO producida por los quimioterápicos, se vea acrecentada por la edad como factor fisiológico. No debe dejarse de tener en cuenta la utilización en gran cantidad de casos de hormonoterapia, generalmente tamoxifeno, el cual se administra por el lapso de 5 años. En ciertos casos se llega a indicar de manera terapéutica, y sobre todo en mujeres jóvenes con cáncer de mama, la ablación ovárica como parte del tratamiento en carcinomas hormono sensibles (69, 70).

La disfunción ovárica luego de la quimioterapia por cáncer de mama, se relaciona a la edad de la paciente, a la función ovárica previa al comienzo del tratamiento y a los agentes a utilizar en el mismo (71). Los efectos de la quimioterapia sobre la función ovárica incluyen: amenorrea temporaria debido a la pérdida de la cohorte de folículos en desarrollo o amenorrea permanente debido a la pérdida de los

folículos remanentes (50). La quimioterapia causa la depleción del pool de folículos primordiales, siendo este efecto droga y dosis dependiente (62).

Edad

Como podría esperarse, las mujeres más jóvenes suelen presentar menor tasa de amenorrea que las mayores. En nuestra serie, el grupo problema presentó mayor edad promedio que el grupo control (33,83 vs 30,81, respectivamente), sin embargo este resultado no fue estadísticamente significativo ($p = 0,183$). Este dato no es irrelevante, ya que es fundamental la homogeneidad de las dos muestras comparadas, siendo la edad un factor modificador fundamental de la RO. Como regla general, la quimioterapia por cáncer de mama, suele agregar 10 años al envejecimiento ovárico términos reproductivos.

Lamentablemente, gran cantidad de mujeres jóvenes que van a iniciar su tratamiento, no son informadas al respecto o no comprenden acabadamente los efectos del tratamiento sobre su fertilidad futura (72).

Amenorrea y síntomas climatéricos

Las tasa de amenorrea permanente o temporaria varían debido a los diferentes esquemas y, como hemos mencionado, a la RO base con la cual una paciente recibe tratamiento. Debe tenerse en cuenta que la presencia o ausencia de ciclos menstruales, no siempre es un verdadero reflejo del estado reproductivo. En la mayoría de los casos, y teniendo en cuenta los esquemas habituales utilizados en cáncer de mama, la fertilidad se ve disminuida, lo cual conlleva a su vez un adelanto en la edad de menopausia (50, 68).

Las tasas de amenorrea oscilan entre 21 a 71% en mujeres menores de 40 años, y de 40 a 100% en mayores de 40 años (73), sin embargo este esquema es

utilizando más esporádicamente en la actualidad. En la mayoría de las series, los esquemas basados en antraciclinas, aparentan producir una menor tasa de amenorrea en las pacientes tratadas. Esto podría deberse a la menor dosis de ciclofosfamida utilizada en FAC o AC que en CMF.

Por otro lado, el impacto de los taxanos sobre los ciclos menstruales es incierto. Algunos estudios sugieren que no produce efectos relevantes

(74), mientras que otros comunican que las tasas de amenorrea se incrementan (15). Podría también establecerse una diferencia entre el paclitaxel y el docetaxel, pero aun no hay evidencias suficientes al respecto (75).

En nuestra serie 4 pacientes entraron en amenorrea, representando el 34% del grupo problema. A su vez esas mismas pacientes presentaron síntomas climatéricos, siendo el más relevante el sofoco. En el resto de las pacientes no se presentaron síntomas climatéricos. Cabe consignar que 2 de las 4 pacientes que entraron en amenorrea, menstruaron nuevamente, un caso a los 8 y el restante a los 6 meses.

Endocrinoterapia

Aproximadamente el 60% de las pacientes premenopáusicas tratadas por cáncer de mama reciben hormonoterapia. Esta varía de acuerdo al paciente y a las características tumorales, pero generalmente varía entre tamoxifeno, supresión ovárica farmacológica o ablación quirúrgica. Los inhibidores de aromatasa, suelen utilizarse preferentemente en mujeres postmenopáusicas y su efecto, al igual que el de los análogos de GnRh, aun se encuentra bajo estudio.

El tamoxifeno es un agonista-antagonista estrogénico, que comúnmente induce tuforadas o sofocos de calor, secreción y/o sequedad vaginal. Frecuentemente,

se ha relacionado a esta droga como causa de alteraciones menstruales en las pacientes tratadas, sin embargo no existe información concluyente al respecto. Es relevante que las pacientes bajo tratamiento con tamoxifeno comprendan que no es anticonceptivo, sino que por el contrario puede producir ovulaciones múltiples y por lo tanto, embarazos múltiples. En pacientes postmenopáusicas, incrementa el riesgo de hiperplasia, pólipos y cáncer de endometrio; sin embargo esta asociación no se ha confirmado en mujeres premenopáusicas.

En nuestra casuística, 2 pacientes recibieron anexohisterectomía total, luego de cerrado el período de reclutamiento del presente estudio; en ambos casos por hipermenorrea. En anatomía patológica no se informaron hallazgos relevantes.

En cuanto a las características menstruales de las pacientes que se encuentran bajo tratamiento con Tamoxifeno, el 43% de los casos permanecen eumenorreicas (3), 29% (2) presentaron hipermenorrea (actualmente ambos casos en amenorrea post-histerectomía), 14% amenorrea (1 caso) y otro 14% (1 caso) en oligomenorrea.

Estudio de RO post quimioterapia

La falta de estudios prospectivos del efecto de cada esquema quimioterápico sobre la reserva ovárica, hace difícil establecer conclusiones definitivas al respecto y brindar un pronóstico certero del futuro reproductivo de estas pacientes. Como se ha mencionado anteriormente, la mayoría de los estudios han utilizado la amenorrea o irregularidad menstrual como objetivo de estudio, pero no siempre estos síntomas se relacionan al estado de la RO.

Estudios recientes han utilizado dosajes de FSH, E₂, Inhibina B y HAM entre el 2º y 5º día del ciclo para medir respuesta a técnicas de reproducción asistida (TRA).

La declinación de la reserva ovárica se manifiesta como niveles disminuidos de E₂, Inhibina B y HAM, producidas por células de la granulosa del folículo ovárico y un número reducido de folículos antrales. Estos parámetros han demostrado efectividad para predecir respuesta a inducción de ovulación (76), edad de menopausia temprana, sin embargo no han sido útiles para predecir embarazo.

La validez de estos estudios luego de quimioterapia por cáncer de mama aun no se ha demostrado y su disponibilidad en práctica clínica no es habitual.

Estudios prospectivos en pacientes con cáncer de mama, indican que la RO disminuye durante el tratamiento quimioterápico, con regímenes incluyendo taxanos en adición a ciclofosfamida mostrando importante gonadotoxicidad.

En un estudio actual se evaluaron los “nuevos” marcadores de RO en mujeres tratadas con quimioterapia por cáncer de mama: inhibina B, HAM y CFA por ecografía (77). En nuestro caso, realizamos solo el dosaje de HAM debido a la estabilidad de sus niveles independientemente del momento del ciclo, amenorrea o tratamiento hormonal. En 2007 se publicó un estudio realizando la evaluación dinámica en estas pacientes, sin embargos estos tests son útiles preferentemente para evaluar respuesta a estimulación (65).

En el primero de los estudios mencionados, la HAM fue particularmente útil como un indicador precoz de envejecimiento ovárico, representando la pérdida de folículos ováricos inducida por quimioterapia (77). En este estudio, la edad de las pacientes fue significativamente mayor que en el presente trabajo: rango 28–52 años VS 27-40 años y 41,3 años promedio VS 33,83 años respectivamente.

Estudios anteriores en cáncer de mama, se basaron sobre todo en la presencia de amenorrea y en la menopausia prematura (12). Otras investigaciones que evaluaron las consecuencias endocrinas de la quimioterapia, lo hicieron teniendo en cuenta la alteración de FSH Y E₂. Cabe consignar que estos estudios son anteriores al concepto de reserva ovárica. Debido a las limitaciones técnicas de estos ensayos, no arrojaron conclusiones relevantes en la práctica clínica (78). Los agentes alquilantes como la ciclofosfamida, que es no ciclo celular específico, son más tóxicos para el tejido ovárico que los agentes ciclo celular específico como metotrexato y flúor uracilo. Sin embargo, aun no es clara la afectación de la poliquimioterapia sobre la reserva ovárica, teniendo además en cuenta la aparición de nuevos agentes (79).

La HAM es considerada un marcador directo de RO y es producida por folículos antrales pequeños, sensibles a FSH.

Según estudios actuales, la HAM puede ser el preeditor más sensible de RO que otros marcadores, como el conteo ecográfico folicular y la inhibina B, que detectan folículos primordiales maduros (60, 80). En un estudio actual arribaron a la conclusión que la HAM se redujo de manera dramática luego de la quimioterapia. En nuestro estudio, se objetivó una disminución de 10,3 veces en el grupo problema vs el grupo control, siendo el valor promedio de HAM en las pacientes que recibieron quimioterapia de 0,3165, mientras que fue de 3,2273 en los controles; esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0,024$). Sin embargo, consideramos necesario un mayor universo de estudio para establecer conclusiones más relevantes sobre el problema.

CONCLUSIONES

En el presente estudio, se evaluaron una serie de factores acompañantes del tratamiento quimioterapico por cáncer de mama: función reproductiva, síntomas

menstruales y menopáusicos y deseos gestacionales luego del tratamiento oncológico.

Como se ha mencionado, y debido al retraso en la búsqueda de embarazo, se está viendo un incremento de mujeres tratadas con quimioterapia por cáncer de mama sin fertilidad cumplida.

Con respecto a este punto, se objetivó en las pacientes estudiadas, una alta incidencia de amenorrea con respecto a los casos controles. Sin embargo no siempre es este último síntoma un reflejo directo de la reserva ovárica; al respecto se presentó en este trabajo, un alto índice de retorno de los ciclos menstruales (y de los ciclos ovulatorios) tras la quimioterapia.

En cuanto a la reserva ovárica, el dosaje de la hormona antimülleriana (HAM), presentó una disminución importante en los casos problema con respecto a los controles. Estos resultados arrojan un futuro reproductivo incierto en las pacientes tratadas con quimioterapia por cáncer de mama, debiendo ser evaluada cada paciente de manera individual, teniendo en cuenta la edad y reserva ovárica de inicio del tratamiento. Es por ello que los resultados del presente estudio, pueden ser de utilidad para aconsejar o informar a pacientes jóvenes con deseos gestacionales. Sin embargo, cabe consignar que solo una de las pacientes problema, manifestó tras la quimioterapia.

Se debe concluir también que la HAM, es un marcador útil en la práctica clínica, ya que sus valores son inalterables con respecto al ciclo menstrual, siendo de indicación en mujeres en amenorrea.

Las evidencias actuales sugieren que el embarazo no actúa en detrimento de la curación de pacientes tratadas por cáncer de mama. En cuanto a deseos gestacionales se refiere, cada caso debe ser tomado en particular teniendo en cuenta el pronóstico y riesgos de recurrencia basados en la edad, histología y respuesta al tratamiento. Con esta información junto con un certero diagnóstico del potencial reproductivo (RO), el facultativo puede aconsejar a sus pacientes sobre sus posibilidades reproductivas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Blasco L. Cáncer y Reproducción Asistida. Rev. Iberoamericana de Fertilidad. Vol XIII; 121-126, 1996.
2. Holland J. Desarrollo Histórico de la Quimioterapia del Cáncer, Sem Oncol 11:11-26, 1978.
3. Byrne J, Mulvorhill JJ, Myers MH. Effects of treatment on fertility in long-term survivor of childhood or adolescent cancer. N Engl J Med 317-318, 1987.
4. Chapman RN, Sutcliffe SB, Malpas JS: Male gonadal dysfunction in Hodgkin's disease. A prospective study. JAMA 245:1323, 1981.
5. Klein CE. Gonadal complications and teratogenicity of cancer therapy. In The chemotherapy source Book, Ed 2. Baltimore, Williams and Wilkins, 1977.
6. Warne GL, Fairley KF, Hobbs JB et al. Cyclophosphamide-induced ovarian failure. N Engl J Med 289:1159, 1973.
7. Shalet SM. Effects of cancer chemotherapy on gonadal function of patients. Cancer Treat Rev 7:141, 1980.
8. Blumenfeld Z. Ovarian rescue/protection from chemotherapeutic agents. J Soc Ginecol Investig 8:1(supl), 2001.

9. Kreuser ED, Klingmuller D, Thiel E The role of LHRH-analogues in protecting gonadal functions during chemotherapy and irradiation. *Eur Urol* 23:157, 1993.
10. Robbins WA. Chemotherapy induces transient sex chromosomal and autosomal aneuploidy in human sperm. *Nature Genetic* 16:74, 1997.
11. Brandiff BF. Chromosomal damage in sperm of patients surviving Hodgkin's disease following MOPP therapy with and without radiotherapy. *Human Genetic* 93:295, 1994.
12. Goodwin P, Ennis M, Pritchard K, Trudeau M, Hood N. Risk of Menopause During The First Year After Breast Cancer Diagnosis, *J Clin Oncol* 17:2365-2370, 1999.
13. Oktay K, Buyuk E, Libertella N, et al: Fertility preservation in breast cancer patients: A prospective controlled comparison of ovarian stimulation with tamoxifen and letrozole for embryo cryopreservation. *J Clin Oncol* 23:4347-4353, 2005.
14. Klijn JGM, Beex LV, Mauriac L, et al: Combined treatment with buserelin and tamoxifen in premenopausal metastatic breast cancer: A randomized study. *J Natl Cancer Inst* 92:903-911, 2000.

15. Petrek JA, Naughton MJ, Case LD, et al: Incidence, time course, and determinants of menstrual bleeding after breast cancer treatment: A prospective study. *J Clin Oncol* 24:1045-1051, 2006.
16. Sutton R, Buzdar A, Hortobagyi G. Pregnancy and Offspring after Adjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Patients. *Cancer* 39:1403-1409, 2000.
17. te Velde ER, Pearson PL: The variability of female reproductive aging. *Hum Reprod Update* 8:141-154, 2002.
18. Nikolau D, Templeton A. Early ovarian ageing: a hypothesis. *Hum Reprod.*18-1137-1139, 2003.
19. Lee SJ, Lenton EA. The effect of age on the cyclical patterns of plasma LH, FSH, Estradiol and progesterone in women with regular menstrual cycles. *Hum Reprod.* 3-851-855, 1988.
20. Hughes EG, Robertson DM, Handelsman DJ, Haywood S, Healy DL, de KretserDM. Inhibin and estradiol responses to ovarian hyperstimulation: effects of age and predictive value for in vitro fertilization outcome. *J Clin Endocrinol. Metab.* 70-358-364, 1990.
21. Lass A, Ellenbogen A, Croucher C, Trew G, Margara R, Becattini C, Winston R. Effect of salpingectomy on ovarian response to superovulation

- in an in vitro fertilization embryo transfer program. *Fertil Steril.* 70-1035-1038, 1998.
22. Sharcera F. 1998. Poor responders to gonadotrophines and levels of antibodies to *Chlamydia trachomatis*. *Fertil Steril.* 1-388-389. Augood C, Duckitt K, Templeton A. Smoking and female infertility: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod.* 13-1532-1539, 1998.
23. Augood C, Duckitt K, Templeton A. Smoking and female infertility: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod.* 13-1532-1539, 1998.
24. Hansen KR, Thyler AC, Sluss P, Bremmer W, Soules MR, Klein NA. Reproductive ageing and ovarian function: is the early follicular phase FSH rise necessary to maintain adequate secretory function in older ovulatory women? *Hum Reprod.* 20-1-89-95, 2004.
25. Creus M, Peñarubia J, Fabrejues F, Vidal E, Carmona F, Casanit Hana R, Vanrell J, Balasch J. Day 3 serum inhibin β and FSH and age as predictor of assisted reproduction treatment outcome. *Hum Reprod.* 15-2341-2346, 2000.
26. Abdalla H, Thum MG. An elevated basal FSH reflects a quantitative rather than qualitative decline of the ovarian reserve. *Hum Reprod.* 19-893-898, 2004.

27. Kligman I, Rosenwaks Z. Differentiating clinical profiles: predicting good responders, poor responders and hyperresponders. *Fertil Steril.* 76-6-1185-1189, 2001.

28. Seifer DB, Lambert-Masserlian G, Hogan JW, et al. Day 3 serum inhibin β is predictive of assisted reproductive technologies outcome. *Fertil Steril.* 67-110-114, 1997.

29. Seifer DB, Scott RT, Bergh PA, et al. Women with decline ovarian reserve may demonstrate a decrease in day 3 serum inhibin β before a rise in day 3 follicle stimulating hormone. *Fertil Steril.* 72-63-65, 1999.

30. de Vet A, Laven JS, de Jong FH, Themmen AP, Fauser BC. Antimüllerian hormone serum levels: A putative marker for ovarian ageing. *Fertil Steril.* 77-357-362, 2002.

31. Franchin R, Schonaer LM, Righini C, Guibourdenche J, Frydman R, Taieb J. Serum antimüllerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin β , estradiol, FSH, LH on day 3. *Hum Reprod.* 18-323-327, 2003.

32. Franchin R, De Pawn K, Taieb J, Cavagna M, Feyereisen E, Dzik A. Lack of AMH Response to effort Suggests That AMH production Is Gonadotropin-Independent in Adult Women. *Fertil Steril*. 84- Issue (Supplement 1), S424, 2005.

33. Van Rooij IAJ, Broekmans FJM, Claudine CH, Scheffer GJ, Eijkemans MJC, de Jong FH, Themmen APN, te Velde ER. Use of ovarian reserve tests for the prediction of ongoing pregnancy in couples with unexplained or mild male infertility. *Reproductive BioMedicine Online*. Vol 12,2-182-190, 2005.

34. Van Rooij I A, Broekmans F J, te Velde E R, Fauser B C, Bancsi L F, de Jong F H, Themmen A P. Serum antimullerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod*. 17-3065-3071, 2002.

35. Laven JS, Mulders AG, Visser JA, Themmen AP, de Jong FH, Fauser BC. Antimullerian hormone serum concentrations in normo ovulatory anovulatory women. *J Clin Endocrinol Metab*. 89-318-320, 2004.

36. Silberstein T, MacLaughlin DT, Shai T, Trimarchi JR, Lambert-Messerlian G, Seifer DB, Keefe DL, Blazar AS. Müllerian inhibiting substance levels at the time of HCG administration in IVF cycles predict both ovarian reserve and embryo morphology. *Hum Reprod*. 21-159-163, 2005.

37. Hazout A, Bouchard P, Seifer DB et al. Serum antimullerian hormone/mullerian inhibiting substance appears to be a more discriminatory marker of assisted reproductive technology outcome than follicle stimulating hormone, inhibin B or estradiol. *Fertility and Sterility*. 82-1323-1329, 2004.
38. Scott RT, Leonard MR, Hoffmann GE, et al. A prospective evaluation of clomiphene citrate challenge test screening in the general infertility population. *Obstet Gynecol*. 83-539-545, 1993.
39. Fahari J, Homburg R, Ferberg A, Orvieto R, Ben Rafael Z. Non response to ovarian stimulation in normogonadotrophic, normagonadal women: a clinical sign of impending onset of ovarian failure pre-empting the rise in basal follicle stimulation hormone levels. *Hum Reprod*. 12-241-243, 1997.
40. De Boer EJ, den Tonkelaar I, te Velde ER, Burger CN, Klip H, Van Leeuwen FE. A low number of retrieved oocytes at in vitro fertilization treatment is predictive of early menopause. *Fertil Steril*. 77-978-985, 2002.
41. El-Toukhy TH, Khalaf Y, Hart R, Taylor A, Braude P. Young age does not protect against the adverse effects of reduced ovarian reserve – an eight year study. *Hum Reprod*. 17-1519-1524, 2002.

42. Lawson R, Toukhy TE, Kassab A, Taylor A, Braude P, Parsons J, Seed P. Poor response to ovulation induction is a stronger predictor of early menopause than elevated basal FSH: a life table analysis. *Hum Reprod.* 18,3-527-533, 2003.
43. Lass A, Brinsden P. The role of ovarian volume in reproductive medicine. *Hum Reprod.* Up date. 5-256-266, 1999.
44. Wallace WH, Kelsey TW. Ovarian reserve and reproductive age may be determined from measurement of ovarian volume by transvaginal sonography. *Hum Reprod.* 19,7-1612-1617, 2004.
45. Paulik E, De Priest PD, Gallion HH, Veland FR, Reedy MB, Kryscio RJ, Van Nagell JR. Ovarian volume related to age. *Gynecol Oncol.* 77-410-412, 2000.
46. Lass A, Skull J, Mc Veigh E, Margara R, Winston RML. Measurement of ovarian volume by transvaginal sonography before ovulation induction with human menopausal gonadotrophin for in vitro fertilization can predict poor response. *Hum Reprod.* 12-294-297, 1997.
47. Kline J, Kinney A, Kelly A, Reuse ML, Levin B. Predictors of antral follicle count during the reproductive years. *Hum Reprod.* 20,8-2179-2189, 2005.

48. Sharara F, Scott RT. Assessment of ovarian reserve. Is there still a role for ovarian biopsy? Hum Reprod. 19,3-470-471, 2004.
49. Licciardi FL, Liu HC, Rosenwaks Z: Day 3 estradiol serum concentrations as prognosticators of ovarian stimulation response and pregnancy outcome in patients undergoing in vitro fertilization. Fertil Steril 64:991-994, 1995.
50. Oktay K, Oktem O, Reh A, Vahdat L: Measuring the Impact of Chemotherapy on Fertility in Women With Breast Cancer. www.jco.org. 40.251.88.167, 2006.
51. Klein NA, Battaglia DE, Fujimoto VY, et al: Reproductive aging: Accelerated ovarian follicular development associated with a monotropic follicle-stimulating hormone rise in normal older women. J Clin Endocrinol Metab 81:1038-1045, 1996.
52. Gougeon A: Regulation of ovarian follicular development in primates: Facts and hypotheses. Endocr Rev 17:121-155, 1996.
53. Faddy MJ, Gosden RG: A model conforming the decline in follicle numbers to the age of menopause in women. Hum Reprod 11:1484-1486, 1996.
54. Larsen EC, Muller J, Schmiegelow K, et al: Reduced ovarian function in long-term survivors of radiation- and chemotherapy-treated childhood cancer. J. Clin Endocrinol Metab. 88:5307-5314, 2003.

55. Larsen EC, Muller J, Rechnitzer C, et al: Diminished ovarian reserve in female childhood cancer survivors with regular menstrual cycles and basal FSH ≥ 10 IU/l. *Hum. Reprod* 18:417-422, 2003.
56. Bath LE, Wallace WH, Shaw MP, et al: Depletion of ovarian reserve in young women after treatment for cancer in childhood: Detection by anti-Mullerian hormone, inhibin B and ovarian ultrasound. *Hum Reprod* 18:2368-2374, 2003.
57. Baarends WM, Uilenbroek JT, Kramer P, et al: Anti-Mullerian hormone and anti-Mullerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotropin-induced follicle growth. *Endocrinology* 136:4951-4962, 1995.
58. Durlinger AL, Visser JA, Themmen AP: Regulation of ovarian function: The role of anti-Mullerian hormone. *Reproduction* 124:601-609, 2002.
59. Fanchin R, Schonauer LM, Righini C, et al: 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* 18:323-327, 2003.
60. Cook CL, Siow Y, Taylor S, et al: Serum mullerian-inhibiting substance levels during normal menstrual cycles. *Fertil Steril* 73:859-861, 2000.

61. Meiorin D, Nugent D: The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. *Hum Reprod Update* 7:535-543, 2001.
62. Sonmezer M, Oktay K: Fertility preservation in female patients. *Hum Reprod Update* 10:251-266, 2004.
63. Byrne J, Fears TR, Gail MH, et al: Early menopause in long-term survivors of cancer during adolescence. *Am J Obstet Gynecol* 166:788-793, 1992.
64. Lee SJ, Schover LR, Partridge AH, et al: American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. *J Clin Oncol* 24:2917-2931, 2006.
65. Lutchman Singh K, Muttukrishna S, Stein RC, McGarrigle HH, Patel A, Parikh B, Groome NP, Davies MC, Chatterjee R. Predictors of ovarian reserve in young women with breast cancer. *British Journal of Cancer*. 96, 1808 – 1816, 2007.
66. Hickey M, Peate M, Saunders CM, Friedlander M. Breast cancer in young women and its impact on reproductive function. *Human Reproduction Update*, Vol.1, No.1 pp. 1–17, 2009.
67. Axelrod D, Smith J, Kornreich D, Grinstead E, Singh B, Cangiarella J, Guth AA. Breast cancer in young women. *J Am Coll Surg*. 206:1193–1203, 2008.

68. Partridge AH, Gelber S, Peppercorn J, Sampson E, Knudsen K, Laufer M, Rosenberg R, Przepyszny M, Rein A, Winer EP. Web-based survey of fertility issues in young women with breast cancer. *J Clin Oncol* 2004. En: Breast cancer in young women and its impact on reproductive function. Hickey M, Peate M, Saunders CM, Friedlander M. *Human Reproduction Update*, Vol.1, No.1 pp. 1–17, 2009.
69. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005;365:1687–1717. En: Breast cancer in young women and its impact on reproductive function. Hickey M, Peate M, Saunders CM, Friedlander M. *Human Reproduction Update*, Vol.1, No.1 pp. 1–17, 2009.
70. Bao T, Davidson NE. Adjuvant endocrine therapy for premenopausal women with early breast cancer. *Breast Cancer Res* 2007;9:115. En: Breast cancer in young women and its impact on reproductive function. Hickey M, Peate M, Saunders CM, Friedlander M. *Human Reproduction Update*, Vol.1, No.1 pp. 1–17, 2009.
71. Lee SJ, Schover LR, Partridge AH, Patrizio P, Wallace WH, Hagerty K, Beck LN, Brennan LV, Oktay K, American Society of Clinical O. American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. *J Clin Oncol* 2006;24:2917–2931. En: Breast cancer in young women and its impact on reproductive function. Hickey M, Peate M,

- Saunders CM, Friedlander M. Human Reproduction Update, Vol.1, No.1 pp. 1–17, 2009.
72. Duffy CM, Allen SM, Clark MA. Discussions regarding reproductive health for young women with breast cancer undergoing chemotherapy. *J Clin Oncol* 2005;23:766–773. En: Breast cancer in young women and its impact on reproductive function. Hickey M, Peate M, Saunders CM, Friedlander M. Human Reproduction Update, Vol.1, No.1 pp. 1–17, 2009.
73. Gadducci A, Cosio S, Genazzani AR. Ovarian function and childbearing issues in breast cancer survivors. *Gynecol Endocrinol* 2007;23:625–631. En: Breast cancer in young women and its impact on reproductive function. Hickey M, Peate M, Saunders CM, Friedlander M. Human Reproduction Update, Vol.1, No.1 pp. 1–17, 2009.
74. Tham YL, Sexton K, Weiss H, Elledge R, Friedman LC, Kramer R. The rates of chemotherapy-induced amenorrhea in patients treated with adjuvant doxorubicin and cyclophosphamide followed by a taxane. *Am J Clin Oncol* 2007;30:126–132. En: Breast cancer in young women and its impact on reproductive function. Hickey M, Peate M, Saunders CM, Friedlander M. Human Reproduction Update, Vol.1, No.1 pp. 1–17, 2009.
75. Alton J, Jacobs L, Fox K, Schuchter L, Domchek S, Glick J, Meadows A, DeMichele A. Chemotherapy-related amenorrhea (CRA) in breast cancer survivors: impact of taxanes on ovarian function. *Breast Cancer Res Treat* 2004;88:S61–S62. En: Breast cancer in young women and its impact on

- reproductive function. Hickey M, Peate M, Saunders CM, Friedlander M. Human Reproduction Update, Vol.1, No.1 pp. 1–17, 2009.
76. Bukulmez O, Arici A. Assessment of ovarian reserve. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2004;16:231–237. En: Breast cancer in young women and its impact on reproductive function. Hickey M, Peate M, Saunders CM, Friedlander M. Human Reproduction Update, Vol.1, No.1 pp. 1–17, 2009.
77. Anderson RA, Themmen AP, Al Qahtani A, Groome NP, Cameron DA (2006) The effects of chemotherapy and long-term gonadotrophin suppression on the ovarian reserve in premenopausal women with breast cancer. *Hum Reprod* 21(10): 2583–2592. En: Predictors of ovarian reserve in young women with breast cancer. Lutchman Singh K, Muttukrishna S, Stein R, McGarrigle HH, Patel A, Parikh B, Groome NP, Davies MC, Chatterjee R. *British Journal of Cancer*. 96, 1808 – 1816, 2007.
78. Hensley ML, Reichman BS (1998) Fertility and pregnancy after adjuvant chemotherapy for breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 28(2): 121– 128. En: Predictors of ovarian reserve in young women with breast cancer. Lutchman Singh K, Muttukrishna S, Stein R, McGarrigle HH, Patel A, Parikh B, Groome NP, Davies MC, Chatterjee R. *British Journal of Cancer*. 96, 1808 – 1816, 2007.
79. Awada A, Cardoso F, Atalay G, Giuliani R, Mano M, Piccart MJ (2003) The pipeline of new anticancer agents for breast cancer treatment in 2003. *Crit Rev Oncol Hematol* 48(1): 45–63. En: Predictors of ovarian reserve in

young women with breast cancer. Lutchman Singh K, Muttukrishna S, Stein R, McGarrigle HH, Patel A, Parikh B, Groome NP, Davies MC, Chatterjee R. *British Journal of Cancer*. 96, 1808 – 1816, 2007.

80. La Marca A, Stabile G, Ardenisio AC, Volpe A (2006) Serum anti-Mullerian hormone throughout the human menstrual cycle. *Hum Reprod* 21(12): 3103– 3107. En: Predictors of ovarian reserve in young women with breast cancer. Lutchman Singh K, Muttukrishna S, Stein R, McGarrigle HH, Patel A, Parikh B, Groome NP, Davies MC, Chatterjee R. *British Journal of Cancer*. 96, 1808 – 1816, 2007.