



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

LUDMILA MACHADO NEVES BERCAIRE

**A influência do letrozol sobre a qualidade oocitária
em pacientes com câncer de mama**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Orientadora: Profa. Livre Docente Dra. Eliana Aguiar Petri Nahás

Coorientador: Prof. Livre Docente Dr. Mario Cavagna Neto

Botucatu

2018

LUDMILA MACHADO NEVES BERCAIRE

**A influência do letrozol sobre a
qualidade oocitária em pacientes com
câncer de mama**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Botucatu, Universidade
Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu para obtenção do
Título de Mestre no Programa de Pós-
Graduação em Ginecologia, Obstetrícia e
Mastologia.

Orientadora: Profa. Livre Docente Dra. Eliana Aguiar Petri Nahás
Coorientador: Prof. Livre Docente Dr. Mario Cavagna Neto

Botucatu
2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Bercaire, Ludmila Machado Neves.

A influência do letrozol sobre a qualidade oocitária em
pacientes com câncer de mama / Ludmila Machado Neves
Bercaire. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de
Botucatu

Orientador: Eliana Aguiar Petri Nahás

Coorientador: Mário Cavagna Neto

Capes: 40101150

1. Câncer de mama. 2. Mamas - Câncer. 3. Oócito.
4. Infertilidade. 5. Preservação da fertilidade

Palavras-chave: Câncer de mama; Infertilidade; Letrozol;
Preservação da fertilidade; Qualidade oocitária.

Dedicatória

Dedico esta obra...

À minha grande mestre Profa. Livre-Docente Dra. Maria do Carmo Borges de Souza, que despertou minha paixão pela Medicina Reprodutiva e me apresentou o universo da Ginecologia, sendo a primeira responsável pela minha escolha em direção a este caminho.

Ao meu grande mestre Prof. Livre-Docente Dr. Mario Cavagna Neto, que deu as chaves para que eu buscasse as minhas próprias respostas, mostrou o caminho das pedras em busca do conhecimento e abriu grandes portas para que eu continuasse no trilho certo.

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos...

À profa. Dra. Nilka Fernandes Donadio pela idealização deste estudo e por sempre me incentivar a crescer e me aprimorar, me oferecendo grandes oportunidades e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Artur Dzik por ser um grande entusiasta, sempre buscando estimular o meu crescimento profissional e pessoal.

A toda equipe de Embriologistas do Centro de Referência de Saúde da mulher, pela colaboração com o projeto e pela cortesia dos dados oferecidos, em especial a Andressa do Rosário Rocha, Vanessa Rodrigues Alves, Rafael Portela e Tamara Braga Barroso dos Santos, que participaram ativamente deste trabalho.

À Professora-adjunta livre docente Dra. Anagloria Pontes por me oferecer seus conselhos e experiência como orientadora inicial deste projeto.

À Professora-adjunta livre docente Dra. Eliana Aguiar Petri Nahás pela sua disponibilidade em me orientar neste projeto com sua grande experiência e pelo seu árduo empenho junto à coordenação do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Ao Centro de Referência de Saúde da Mulher - Hospital Pérola Byington, especialmente ao representante desta instituição, Prof. Dr. Luiz Henrique Gebrim, mas também a toda equipe médica, de enfermagem, técnica e auxiliar, por todos os ensinamentos adquiridos nestes anos, em que este hospital foi minha segunda casa, desde o início da residência em Ginecologia e Obstetrícia até esta etapa crucial na minha formação.

À Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), ao programa de Pós-Graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia e a todas as pessoas envolvidas neste projeto, por

receber alunos de todos os lugares de braços abertos e nos engrandecer com o conhecimento e competência dos seus profissionais.

Homenagem

Agradeço à minha família, em especial aos meus pais, que sempre me incentivaram a buscar o melhor conhecimento e me forneceram todas as bases e ferramentas para minha formação pessoal e profissional; Que formaram meus valores e me ensinaram a ser humana antes de tudo.

À minha irmã pelo amor e apoio incondicional que sempre me ofereceu.

Ao meu marido e à minha filha por serem minha grande fortaleza, exemplo e fonte de inspiração e estímulo, pelo amor imensurável e pela compreensão nos momentos de ausência, sem vocês nada disso seria possível.

SUMÁRIO

	Página
Lista de Abreviaturas	9
Resumo	10
Abstract	13
1. Introdução	16
2. Objetivo	31
3. Métodos	32
4. Publicação	
4.1. Artigo Original	38
<i>“The influence of letrozole on oocyte quality in breast cancer patients undergoing fertility preservation”.</i>	
5. Conclusões	65
6. Referências	66
7. Anexos	
7.1. Anexo I - Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa	74

LISTA DE ABREVIATURAS

ACS – American Cancer Society (Sociedade Americana de Câncer)

EUA – Estados Unidos da América

INCA – Instituto Nacional de Câncer

CI 95% – intervalo de confiança de 95%

OR – odds-ratio

RR – risco relativo

AMH – hormônio antimulleriano

FSH – hormônio folículo estimulante

CFA – contagem de folículos antrais

BRCA1 – Breast cancer 1 (Gene supressor de tumor, cancer de mama tipo 1)

FDA – Food and Drug Administration (Agência federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos)

hCG – gonadotrofina coriônica humana

GnRH – hormônio liberador de gonadotrofina

GnRHant – análogo antagonista do GnRH

LH – hormônio luteinizante

GnRH_a – análogo agonista do GnRH

FMB – Faculdade de Medicina de Botucatu

UNESP – Universidade Estadual Paulista

Resumo

Introdução: O câncer de mama é a neoplasia maligna mais frequente em mulheres. A redução da morbimortalidade aumentou a possibilidade de maternidade em mulheres em idade fértil após o tratamento, assim como a preocupação com a preservação da fertilidade diante da toxicidade ovariana relacionada aos tratamentos adjuvantes. A estimulação ovariana com letrozol e gonadotrofinas para a criopreservação de oócitos é procedimento bem estabelecido em pacientes com câncer de mama e desejo reprodutivo futuro. Entretanto, estudo recente comparando pacientes submetidas a preservação oncológica da fertilidade com protocolo utilizando gonadotrofinas e letrozol, com pacientes inférteis submetidas a fertilização *in vitro* mostrou maior taxa de oócitos imaturos e menor taxa de fertilização entre as pacientes que realizaram criopreservação de oócitos, sugerindo um possível efeito deletério do letrozol sobre a qualidade oocitária.

Objetivo: Avaliar a influência do letrozol sobre a qualidade oocitária em pacientes com câncer de mama submetidas a estimulação ovariana para preservação da fertilidade.

Métodos: Enstudio clínico de corte transversal realizado em hospital público terciário de São Paulo, por meio de análise de banco de dados e prontuários médicos. Foram avaliados parâmetros morfológicos de 750 oócitos obtidos de pacientes com câncer de mama submetidas a estimulação ovariana com letrozol e gonadotrofinas para preservação da fertilidade no período de 2015 a 2016. Os dados foram comparados a 699 oócitos de mulheres sem câncer de mama apresentando infertilidade por fator masculino, submetidas a estimulação ovariana para fertilização *in vitro*, através de pareamento por idade (grupo controle). A estimulação ovariana em pacientes com

câncer de mama foi realizada com letrozol em combinação a gonadotrofinas em protocolo com antagonista do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). No grupo controle a estimulação ovariana foi realizada apenas com gonadotrofinas e a supressão hipofisária obtida com antagonista de GnRH. Os oócitos maduros obtidos foram analisados quanto à presença de corpos refráteis, cor e regularidade do ooplasma, grau de granulação central, cor e espessura da zona pelúcida, tamanho do espaço perivitelínico, presença de vacúolos e retração no oócito. Os resultados obtidos foram comparados ao grupo controle por análise estatística pelos testes de Qui-quadrado e Mann-Whitney. Estimou-se o odds ratio (OR) e o intervalo de confiança de 95% (CI) através de regressão logística para observar as possíveis associações entre uso de letrozol e os parâmetros morfológicos oocitários.

Resultados: Foram analisados 750 oócitos obtidos de 69 pacientes com câncer de mama e comparados a 699 oócitos obtidos de 92 pacientes do grupo controle. A média de idade no grupo câncer de mama foi de $31,5 \pm 4,1$ anos e no grupo controle de $33,1 \pm 7,1$ anos ($p=0,210$). Foi observada maior incidência de distúrbios oocitários no grupo câncer de mama que utilizou letrozol comparado ao grupo controle: espaço perivitelínico aumentado ($p=0,007$), zona pelúcida irregular ($p<0,001$), corpos refráteis ($p<0,001$), ooplasma escuro ($p<0,001$), ooplasma granuloso ($p<0,001$), ooplasma irregular ($p<0,001$) e presença de granulação central ($p<0,001$). Outras alterações morfológicas foram mais frequentes nos oócitos do grupo controle comparado ao grupo câncer de mama com letrozol: grânulos corticais ($p<0,001$), zona pelúcida de coloração alterada ($p<0,001$) e alterações de retículo endoplasmático liso ($p<0,001$). Não houve diferença estatística entre os grupos em relação aos parâmetros: retração ($p=0,254$) e vacúolos ($p=0,974$).

Conclusão: A avaliação dos parâmetros morfológicos dos oócitos de mulheres com câncer de mama, submetidas a estimulação ovariana com letrozol e gonadotrofinas revelou maior ocorrência de distúrbios quando comparado a mulheres sem câncer de mama submetidas a estimulação ovariana com gonadotrofinas. A utilização do letrozol mostrou-se como fator de risco para a presença de distúrbios oocitários que podem ser traduzidos em pior qualidade oocitária.

Abstract

Introduction: Breast cancer is the most common malignant neoplasm in women. Recent advances in early diagnosis and treatment have led to an increase in the survival rate. The reduction of morbidity and mortality increased the possibility of maternity after cancer in women of childbearing age and raised the concern about fertility preservation against gonadotoxic adjuvant treatments. Ovarian stimulation with letrozole and gonadotropins for cryopreservation of oocytes in patients with breast cancer and reproductive desire has been shown to be effective. Although a recent study comparing patients submitted to oncological fertility preservation with protocol using gonadotropins and letrozole to infertile patients submitted to in vitro fertilization performed only with gonadotropins showed a higher rate of immature oocytes and lower fertilization rate among patients who received letrozole, suggesting a possible deleterious effect of letrozole on oocyte quality.

Objective: To evaluate the influence of letrozole on oocyte quality in patients with breast cancer submitted to fertility preservation.

Methods: An analytical cross-sectional study performed in a public tertiary hospital in São Paulo through chart analysis and medical records. We evaluated morphological parameters of 750 oocytes obtained from all breast cancer patients submitted to ovarian stimulation with letrozole and gonadotropins for fertility preservation between 2015 and 2016. They were compared to 699 oocytes from women without cancer submitted to ovarian stimulation for in vitro fertilization due to male factor infertility, matched by age (control group). Ovarian stimulation in patients with breast cancer was performed before chemotherapy with letrozole in combination with

gonadotropins in GnRH antagonist protocol. In control group, ovarian stimulation was performed with gonadotropins and pituitary suppression was obtained with GnRH antagonist. Mature oocytes obtained were analyzed for the presence of refractile bodies, color and regularity of the ooplasm, central granulation degree, zona pellucida thickness, the size of the perivitelline space, presence of vacuoles and oocyte retraction. The obtained results were compared with the corresponding age control group through statistical analysis with Chi-square and Mann-Whitney tests. Analysis consisted to estimate the odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI), considering the group of letrozole to constitute a response compared with control group as reference (OR 1.0) to observe the possible associations between letrozole use (dependent variable) and the morphological oocytes parameters (independent variables).

Results: We evaluated 750 oocytes obtained from 69 breast cancer patients and compared with 699 oocytes from 92 control patients. Mean age was 31.5 ± 4.1 years in the study group and 33.1 ± 7.1 years in control group ($p=0.210$). We observed higher incidence of in oocyte dysmorphisms in the letrozole group compared to the control group: increased perivitelline space ($p = 0.007$), irregular zona pellucida ($p<0.001$), refractile bodies ($p<0.001$), dark ooplasm ($p<0.001$), granular ooplasm ($p<0.001$), irregular ooplasm ($p<0.001$) and dense central granulation ($p<0.001$). Other dysmorphisms were higher in the control group: cortical granules ($p <0.001$), zona pellucida with altered staining ($p<0.001$) and smooth-surfaced endoplasmic reticulum aggregates ($p <0.001$). There was no statistical difference between the groups in relation to the parameters: retraction ($p=0.254$) and vacuoles ($p=0.974$).

Conclusion: The evaluation of morphological parameters of oocytes from breast cancer patients submitted to ovarian stimulation protocol with letrozole and gonadotropins revealed greater occurrence of dysmorphisms when compared to infertile patients submitted to ovarian stimulation protocol with gonadotropins. The use of letrozole seems to be a risk factor for the presence of oocyte dysmorphisms that could be translated into poor oocyte quality.

1.Introdução

1.1. Câncer de Mama

O câncer de mama é o tipo de câncer mais comum em mulheres, correspondendo a 30% das neoplasias malignas em levantamento feito pela *American Cancer Society (ACS)* nos Estados Unidos, com uma prevalência estimada em mais de 3,5 milhões de casos neste país¹. É a principal causa de morte por câncer em mulheres, com 40.619 mortes e 252.710 casos novos esperados por ano nos EUA¹. A incidência global é de 1,67 milhões de casos novos com 520 mil mortes por ano no mundo. Para o Brasil, são esperados 57.960 casos novos desta neoplasia por ano, representando 56,2 a cada 100 mil mulheres segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA) no biênio 2016-2017². O aumento histórico da incidência do câncer de mama reflete mudanças nos padrões reprodutivos da mulher, como a nuliparidade, o número reduzido de filhos por casal, primiparidade tardia, bem como avanços nos métodos de rastreamento e diagnóstico¹. Outros fatores de risco bem estabelecidos para o desenvolvimento desta neoplasia são menarca precoce, menopausa tardia, obesidade, antecedentes familiares, uso de anticoncepcionais orais ou terapia hormonal na pós-menopausa^{3,4}.

O diagnóstico precoce do câncer de mama é diretamente relacionado ao prognóstico da paciente. Desta maneira, os avanços recentes nos métodos diagnósticos e terapêuticos levaram ao aumento na taxa da sobrevida em cinco anos após a doença, atingindo valores de 99% em pacientes com doença localizada, 85% em pacientes com doença localmente avançada e 27% em pacientes com metástases à distância, em países desenvolvidos¹. Analisando as taxas globais sem estratificar pelo

estadiamento observam-se valores altos, correspondendo a 91%, 86%, e 80% a taxa de sobrevida em 5, 10 e 15 anos respectivamente, segundo a ACS¹. Na população mundial, a sobrevida global média após cinco anos da doença é de 61%, correspondendo a 57% nos países em desenvolvimento e 78% nos países desenvolvidos².

Entre todas as pacientes com diagnóstico de câncer de mama nos EUA em 2017, 4% delas tinham idade abaixo de 40 anos, correspondendo a 11.160 dos casos invasivos desta neoplasia diagnosticados neste ano¹. Se a mesma proporção for aplicada, considerando a incidência global da doença, seriam estimados 66.800 casos novos por ano em mulheres em idade fértil no mundo. A ocorrência desta neoplasia em mulheres em idade reprodutiva aliada ao aumento na taxa de sobrevida e redução da morbimortalidade levou ao aumento da preocupação em torno da qualidade de vida destas pacientes após o tratamento, incluindo a procura pela preservação da fertilidade.

Metanálise envolvendo 14 estudos para avaliar a segurança da gravidez após diagnóstico de câncer de mama não mostrou diferença na taxa de sobrevida entre pacientes com câncer de mama que engravidaram em relação às que não engravidaram (RR: 0.85; 95% CI: 0.53–1.35). Também foi observada redução de 41% do risco de morte no grupo de pacientes que engravidaram após o câncer (RR: 0.59; 90% IC: 0.50-0.70), dado atribuído provavelmente ao melhor prognóstico deste subgrupo de pacientes⁵. Recente estudo apontou que o risco de recorrência do tumor diminuiu em pacientes que amamentaram em algum momento da vida, especialmente se a duração do aleitamento foi por período maior do que seis meses (OR = 0.70, 95%

CI = 0.53 to 0.93), dado com maior relevância no subgrupo de pacientes com tumor luminal A, associado a melhor prognóstico⁶.

1.2. Câncer de mama e reserva ovariana

Um importante fator de impacto no aumento da sobrevida de pacientes com câncer de mama em estádios precoces é atribuído ao tratamento adjuvante com agentes quimioterápicos e hormonioterapia com tamoxifeno. A associação de poliquimioterapia ao tratamento precoce da neoplasia reduziu a chance de recorrência em 35% para mulheres abaixo de 50 anos e em 20% para mulheres entre 50 e 69 anos⁷. Entretanto, a associação dos tratamentos adjuvantes apresenta grande impacto na função ovariana, sobretudo em pacientes que realizaram quimioterapia ou naquelas com idade superior a 33 anos que utilizaram tamoxifeno por cinco anos⁸. Alguns agentes quimioterápicos apresentam potencial de toxicidade ovariana maior, como ciclofosfamida, melfalan, busulfan, mostarda nitrogenada, clorambucil e procarbazina, sendo a ciclofosfamida o agente mais implicado em dano celular nos oócitos e nas células da granulosa, apresentando efeito dose-dependente⁹. Outros apresentam potencial intermediário como cisplatina, adriamicina e paclitaxel. Os demais agentes como metotrexate, 5-fluoracila, vincristina, bleomicina e actinomicina D apresentam risco considerado baixo ou ausente, se utilizados em monoterapia¹⁰.

Estudo demonstrou que a ocorrência de amenorreia associada à quimioterapia no período de um ano em pacientes submetidas a esquema quimioterápico tríple com ciclofosfamida, metotrexate e 5-fluoracila foi de 68% (IC 95% de 66-70%)¹¹. Outro estudo observou que em pacientes que receberam doxorrubicina e ciclofosfamida a ocorrência de amenorreia após o tratamento foi de 38%. Este efeito foi idade

dependente, apresentando taxa de amenorreia de 65,2% em pacientes com idade maior que 42 anos e de 45,8% inferior naquelas com idade menor que 42 anos¹². A incidência de amenorreia relacionada à quimioterapia varia de acordo com o tipo de quimioterápico e a dose cumulativa utilizada, além da fase do ciclo menstrual em que é administrada¹¹. A caracterização da amenorreia como marcador de infertilidade constitui um fator limitante dos estudos prévios que avaliaram impacto da terapia adjuvante para o câncer de mama¹⁰. Isso ocorre porque a amenorreia é o último evento a aparecer no período de transição para a menopausa e muitas mulheres com diminuição da reserva ovariana menstruam regularmente. Portanto muitos estudos subestimam a extensão do dano ovariano em repostas ao tratamento quimioterápico¹⁰.

Em pacientes jovens, ainda que não seja definida falência ovariana pós-tratamento, muitas evoluem para subfertilidade ou infertilidade. Este dado tem grande impacto, pois muitas pacientes terão liberação oncológica para gravidez após cinco anos do tratamento. Estudo correlacionando níveis de hormônio antimülleriano (AMH), hormônio folículo estimulante (FSH) e inibina B em pacientes jovens com câncer de mama mostrou que, no momento do diagnóstico, a reserva ovariana não difere das pacientes com idade semelhante sem diagnóstico de câncer de mama, reforçando a indicação da preservação da fertilidade neste subgrupo de pacientes. O mesmo dado não foi comprovado para pacientes com idade superior a 37 anos, que apresentavam redução nos marcadores de reserva ovariana no momento do diagnóstico do câncer, comparadas as pacientes com idade semelhante sem câncer de mama¹³.

Pesquisas demonstraram redução nos níveis de AMH associada ao tratamento do câncer de mama, mesmo com níveis de FSH basal e inibina B inalterados e ciclos menstruais regulares^{14,15}. Partridge *et al.*¹⁴ observaram impacto nos marcadores de reserva ovariana após o tratamento quimioterápico, com valores reduzidos de AMH e contagem de folículos antrais, associados à elevação do FSH e estradiol basais¹⁴. Desta maneira, postula-se que a dosagem de AMH seria capaz de prever a perda de atividade ovariana após o tratamento quimioterápico em pacientes com câncer de mama em estádios precoces, sendo seu resultado diretamente proporcional à capacidade de retorno da função ovariana após o tratamento^{16,17}.

Diante do impacto na reserva ovariana decorrente dos tratamentos adjuvantes, o consenso atual em relação à preservação da fertilidade nas pacientes com câncer de mama consiste na vitrificação de oócitos ou embriões^{18,19}.

É importante ressaltar que a realização da estimulação ovariana para preservação da fertilidade não atrasa o início do tratamento quimioterápico, uma vez que a maioria das pacientes tem uma janela de tratamento de seis semanas entre a cirurgia mamária e o início da quimioterapia²⁰. Em média são necessários apenas duas semanas para realização de um ciclo de estimulação ovariana e coleta de oócitos para criopreservação (média 11,5 dias, variando entre 9–20 dias)^{21,22}. É fundamental a abordagem multidisciplinar entre mastologistas e especialistas em reprodução assistida, ressaltando a importância do encaminhamento precoce aos centros de Reprodução Humana. Entretanto, este encaminhamento muitas vezes é realizado tardiamente, como demonstrado por Baynossa *et al.*²³, em estudo envolvendo 82 mulheres em idade reprodutiva, cujo tempo médio foi de 30 dias (variando entre 4 a 133 dias) entre o diagnóstico e o encaminhamento especializado e mais 32 dias para

coleta dos oócitos (variando entre 13 a 66 dias)²³. O tempo disponível para estimulação ovariana é crucial no aconselhamento adequado das pacientes e no sucesso do tratamento, uma vez que algumas pacientes podem apresentar menor resposta à estimulação ovariana, como as portadoras de mutações do gene BRCA1, que apresentam associação com insuficiência ovariana primária²⁴, podendo necessitar mais de um ciclo de estimulação ovariana para criopreservação de número adequado de oócitos e/ou embriões.

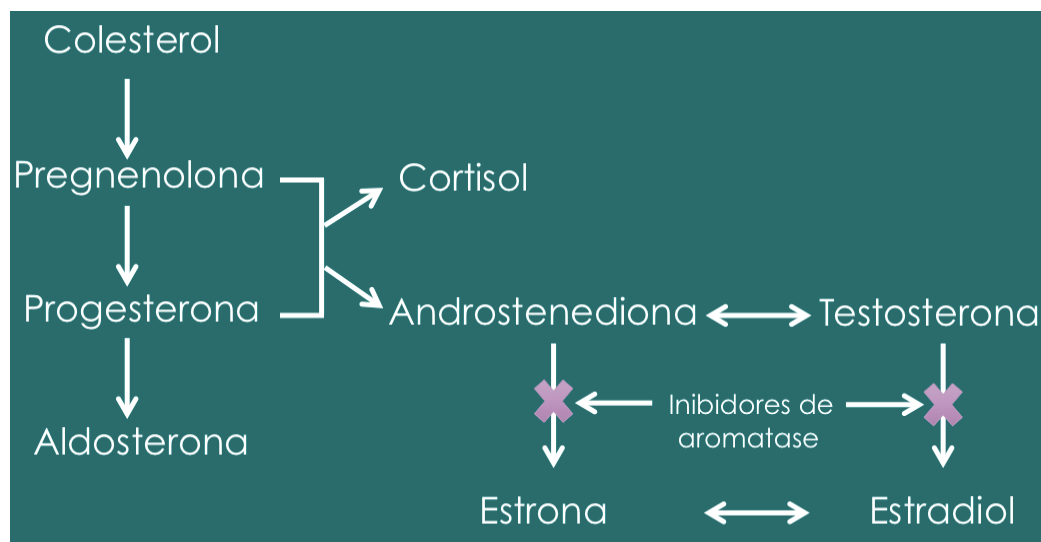
Von Wolff *et al.*²⁵ avaliaram pacientes com câncer de mama submetidas a estimulação ovariana na fase folicular e lútea do ciclo menstrual e encontraram resultados semelhantes em relação ao número de oócitos aspirados, oócitos em metáfase II (MII) e taxa de fertilização. Os autores propõem que a coleta de oócitos poderia ser realizada de forma eficaz antes do tratamento do câncer independente da fase do ciclo menstrual²⁵. Outros relatos bem sucedidos de aspiração folicular após estimulação ovariana na fase lútea foram publicados, corroborando estes achados^{19,26}. Desta forma, os protocolos atuais para estimulação ovariana na preservação da fertilidade baseiam-se no conceito de *random start*, ou seja, podem ser iniciados em qualquer fase do ciclo menstrual, sem a necessidade de aguardar a paciente menstruar para iniciar o estímulo, minimizando o atraso no tratamento quimioterápico das pacientes submetidas à preservação da fertilidade⁹. O conceito de que existem múltiplas ondas de recrutamento folicular, maiores ou menores durante o ciclo menstrual foi demonstrado anteriormente em modelos animais²⁷. Estudo comparando oócitos recuperados por meio de recrutamento na fase folicular e lútea do mesmo ciclo menstrual da paciente resultou na formação de embriões euplóides na mesma

proporção, demonstrando que a qualidade oocitária independe da fase do ciclo em que o estímulo ovariano ocorre²⁸.

1.3. Letrozol

O letrozol ($C_{17}H_{11}N_5$) é um fármaco da classe dos inibidores da aromatase de terceira geração, cuja função é promover a inibição seletiva e reversível da aromatase²⁹. Esta é uma enzima citocromo P450 localizada no retículo endoplasmático de células de diversos tecidos cuja função é a conversão de androstenediona em estrona e testosterona em estradiol, pelo processo de aromatização.

Figura 1: Mecanismo de ação dos Inibidores de Aromatase



Adaptado de Cole and Robinson, 1990

Os inibidores da aromatase são utilizados como adjuvantes no tratamento do câncer de mama, cuja ação farmacológica é a inibição da biossíntese de estrogênios endógenos, inibindo a proliferação das células tumorais estrogênio-dependentes, promovendo redução da recorrência da doença²⁹. Ensaios clínicos demonstraram

diminuição do risco de recidiva em mulheres na pós-menopausa portadoras de câncer de mama com receptor hormonal positivo em decorrência da redução dos níveis circulantes de estrogênios endógenos promovida pelo uso do inibidor da aromatase^{30,31}.

Há pouco mais de uma década, o letrozol também vêm sendo aplicado com segurança e eficácia como indutor de ovulação em ciclos de reprodução assistida, uma vez que sua ação em curto prazo na enzima aromatase promove diminuição dos níveis séricos de estradiol, reduzindo o *feed-back* negativo deste hormônio sobre a hipófise e estimulando, portanto, a secreção de FSH pela adenohipófise³². Os inibidores da aromatase são tão eficazes na indução da ovulação quanto o classicamente empregado citrato de clomifeno, com a vantagem de não apresentar efeitos colaterais antiestrogênicos no endométrio. Seu uso resulta em menores concentrações séricas de estradiol e está associado à necessidade de doses menores de gonadotrofinas para estimulação ovariana nos ciclos de fertilização *in vitro*, enquanto nos ciclos de baixa complexidade apresenta taxa de gravidez satisfatória com menor incidência de gravidez múltipla³².

Apesar de ainda ser considerado como medicação de uso *off-label* com finalidade reprodutiva, em ensaio clínico randomizado, duplo-cego e multicêntrico, o letrozol foi considerado como indutor de ovulação de primeira linha em pacientes com Síndrome de Ovários Policísticos (SOP)³³. Bilijam *et al.*³⁴ associaram o uso de letrozol com maior incidência de malformações locomotoras e anomalias cardíacas comparado ao grupo controle, apesar da incidência de todas as malformações não apresentarem diferenças significativas entre os dois grupos³⁴. Entretanto, outro estudo caso-controle não comprovou diferença significativa na taxa de malformações maiores ou menores

nas gestações concebidas com letrozol, mostrando inclusive menor incidência de malformações cardíacas em comparação ao clomifeno (0,2% versus 1,8%)³⁵. Para avaliar a segurança desta droga, foi realizado estudo prospectivo envolvendo 750 mulheres inférteis com SOP que utilizaram letrozol sob protocolo experimental para a agência reguladora norte-americana *Food and Drug Administration* (FDA). Não houve diferença na taxa de abortamento entre os grupos. Foi realizado exame criterioso por pediatra e/ou geneticista nos recém-nascidos vivos concebidos pelo tratamento na sexta semana de vida para atestar possíveis malformações relacionadas ao tratamento. Não houve diferença estatisticamente significativa em relação à presença de malformações congênitas ao nascimento quando comparados a usuárias de clomifeno (letrozol n=4 e clomifeno n=1, p=0,65). Também não foram observadas diferenças em relação aos desfechos neonatais adversos como icterícia, Síndrome da Angústia Respiratória do Recém-Nascido, restrição de crescimento intrauterino ou outra condição que exigisse hospitalização por mais de três dias³⁶.

1.4. Estimulação ovariana com Letrozol e o Câncer de mama

A exposição estrogênica prolongada associa-se a risco maior de desenvolvimento do câncer de mama em pacientes predispostas à doença. Assim, teme-se o risco de recorrência ou crescimento tumoral em pacientes com câncer de mama mediante a exposição estrogênica nos ciclos de reprodução assistida²⁰. Estudo prévio demonstrou aumento significativo nos valores séricos de estradiol em ciclos ovarianos sob estimulação hormonal para fertilização *in vitro* comparada a ciclos sem estimulação ovariana (1279 pmol/L versus 1055 pmol/L, respectivamente). Tais achados mostraram efeito dose-dependente, quanto maior o diâmetro folicular, maior

a concentração sérica de estradiol no ciclo³⁷. Nesse sentido, foi proposto o estímulo combinado com gonadotrofinas e inibidor de aromatase, para inibir o pico supra-fisiológico de estrogênios decorrente da estimulação ovariana controlada²⁰.

Na tentativa de estabelecer um protocolo seguro para pacientes com câncer de mama, Oktay *et al.*³⁸ descreveram em 2005 um protocolo incluindo o uso de gonadotrofinas em baixas doses e letrozol 5 mg/dia. Este protocolo, quando comparado ao estímulo com tamoxifeno em altas doses (60 mg/dia) ou tamoxifeno com gonadotrofinas em baixas doses, demonstrou maior eficácia, com maior número de oócitos maduros, maior número de embriões e menores níveis de estradiol ao longo do estímulo³⁸. Em 2006, este mesmo grupo de pesquisadores comparou a eficácia do protocolo com inibidor de aromatase associado a gonadotrofinas em pacientes com câncer de mama com protocolo apenas com gonadotrofinas em pacientes inférteis submetidas à fertilização *in vitro* (controle). No grupo que recebeu associação do letrozol e gonadotrofinas, os níveis de estradiol foram significativamente menores comparados ao controle (483 ± 278.9 pg/mL vs. $1.464.6 \pm 644.9$ pg/mL; $p < .001$). A dose total de gonadotrofinas necessária para o estímulo foi 44% menor no grupo do letrozol, enquanto os demais parâmetros foram semelhantes entre os grupos: número total de oócitos, oócitos maduros, taxa de fertilização, número de embriões e duração do estímulo ovariano³⁹. O protocolo de estimulação proposto por este grupo de pesquisadores inicia-se com letrozol 5 mg/dia e após dois dias acrescentam-se doses diárias de FSH recombinante 150-300 UI até o final do estímulo. No dia da administração da gonadotrofina coriônica humana (hCG) todas as medicações são suspensas e o letrozol reiniciado após a coleta oocitária, até que os níveis de estradiol fiquem abaixo de 50 pg/mL²⁰. Estudo subsequente corroborou esses

resultados, demonstrando efetividade do estímulo ovariano e redução dos níveis de estradiol associados ao uso do letrozol em pacientes com câncer de mama⁴⁰.

Em relação à segurança da preservação da fertilidade, questiona-se o risco de recorrência do câncer após o tratamento. Apesar de existirem poucos estudos na literatura sobre o assunto, por se tratar de uma técnica relativamente recente, acredita-se que não haja impacto nas taxas de sobrevida ou recorrência da doença, uma vez que a estimulação ovariana ocorre em curto período de tempo. Estudo prospectivo com 79 pacientes portadoras de câncer de mama submetidas a estimulação ovariana com gonadotrofinas e letrozol demonstrou sobrevida livre de doença em 24 meses semelhante às pacientes que recusaram a preservação da fertilidade⁴¹. Desta forma, a criopreservação de oócitos ou embriões seguem atualmente como técnicas de primeira escolha para preservar a fertilidade de pacientes portadoras de câncer de mama que serão submetidas a tratamentos quimioterápicos, sendo o protocolo com letrozol indicado em pacientes com tumores hormônio-dependentes¹⁸.

1.5. Qualidade oocitária

A qualidade oocitária exerce impacto direto sobre a capacidade de fertilização, desenvolvimento embrionário inicial e implantação embrionária, sendo crucial para o sucesso na fertilização *in vitro*. Pode-se avaliar a qualidade oocitária por diferentes parâmetros, sendo estes morfológicos, celulares ou moleculares⁴². Considerando-se a avaliação morfológica, realizada rotineiramente nos centros de reprodução humana, diversos são os critérios estabelecidos para análise da qualidade oocitária. Trata-se de um método examinador-dependente e até a última década não existia um consenso

sobre os parâmetros utilizados para definir com precisão a qualidade do oócito avaliado. Tal heterogeneidade tornava a comparação inter-laboratorial de resultados extremamente difícil. Entretanto, hoje existem consensos de embriologia que visam uniformizar a análise global das alterações que são consideradas de maior ou menor grau^{43,44}.

O potencial de desenvolvimento embrionário e os resultados clínicos de gravidez após técnica de fertilização *in vitro* são influenciados diretamente pela presença da divisão meiótica nuclear e pelo desenvolvimento citoplasmático adequado no período de maturação oocitária intrafolicular⁴³. O núcleo e o citoplasma do oócito precisam estar sincronizados para que ocorra adequada maturação celular⁴². Apesar de reconhecer o fato que as alterações na morfologia oocitária estão associadas a taxa de sucesso, pouco se sabe sobre as suas origens e a real influência que exercem sobre o processo de fertilização e desenvolvimento embrionário subsequente⁴³. A qualidade oocitária depende não apenas do genoma nuclear e mitocondrial, mas também do microambiente folicular e das condições ovarianas, que afetam os processos de transcrição e tradução gênicas e consequentemente a maturidade citoplasmática⁴⁵.

A avaliação morfológica oocitária é realizada inicialmente pela observação das células do complexo cumulus oophorus, cujo aspecto deve ser expandido e, repleto de proteoglicanos devido à secreção ativa de ácido hialurônico. Após a remoção da camada de células do cumulus oophorus, processo conhecido como denudação, avalia-se com maior acurácia o status de maturidade nuclear, a morfologia do citoplasma e o aparecimento de estruturas extracitoplasmáticas⁴⁴. Um oócito maduro deve apresentar uma estrutura regular esférica envolvida por zona pelúcida uniforme e de espessura adequada, com citoplasma translúcido, homogêneo e livre de inclusões, e

com um único corpúsculo polar de tamanho apropriado e espaço peri-vitelínico de tamanho adequado⁴⁴⁻⁴⁶.

O aparecimento do primeiro corpúsculo polar é considerado marcador de maturidade oocitária, porém sua presença não afasta por completo a possibilidade de se tratar de um oócito imaturo⁴⁷. Outro importante marcador da qualidade oocitária *in vitro* é a presença do fuso meiótico, porém esse achado também foi questionado em metanálise que não demonstrou diferença nas taxas de implantação entre embriões que apresentavam ou não o fuso meiótico⁴⁸. Além dos aspectos nucleares, outros parâmetros são fundamentais para determinar a qualidade do oócito, como a aparência citoplasmática normal, presença de único corpúsculo polar, espessura apropriada da zona pelúcida e espaço perivitelínico adequado⁴⁹.

Durante a estimulação ovariana para fertilização *in vitro* não há o processo natural de seleção oocitária, devido ao recrutamento folicular múltiplo decorrente das altas doses de gonadotrofinas empregadas⁴⁴. O impacto do desenvolvimento embrionário no período pré-implantacional é diretamente proporcional ao tipo e a frequência de distúrbios oocitários encontrados. Segundo o Consenso de Istambul⁴³, os distúrbios oocitários devem ser classificados em intracitoplasmáticos (inclusões oocitárias, corpos refráteis, granulação central densa, vacúolos, agregação de retículo endoplasmático liso) e extracitoplasmáticos (morfologia do primeiro corpúsculo polar, tamanho e granularidade do espaço perivitelínico, coloração e defeitos de zona pelúcida e anomalias na forma do oócito), sendo os últimos indicadores de idade oocitária.

Em relação aos distúrbios extracitoplasmáticos, existe um consenso de que as inclusões no espaço perivitelínico são anormais, porém não existe evidência

científica do impacto biológico associado^{44,47,50}. Alterações no aspecto da zona pelúcida podem ser variações da normalidade, devido a problemas de secreção da matriz da glicoproteína, e apenas alterações quanto à cor ou espessura devem ser analisadas⁴⁴. Avaliando-se todas as anomalias extracitoplasmáticas em conjunto, estas parecem ser apenas desvios fenotípicos sem influência secundária negativa no desenvolvimento embrionário⁵¹.

Em relação à avaliação intracitoplasmática, o consenso é que o citoplasma deve ser homogêneo. Entretanto, com base na evidência atual, o citoplasma ligeiramente heterogêneo pode representar a variabilidade normal entre os oócitos recuperados, e não uma anomalia do desenvolvimento oocitário. Além disso, foi definido que a "granularidade" do citoplasma é de significado indefinido, podendo depender da modulação dos parâmetros ópticos utilizados na microscopia, sendo também considerado um achado distinto do agrupamento de organelas⁴⁴.

Pequenos vacúolos de 5-10 mm de diâmetro preenchidos com fluido transparente provavelmente não apresentam nenhuma consequência biológica, enquanto vacúolos grandes (maiores que 14 mm) podem estar associados a falhas de fertilização^{44,47,50}. A presença exclusiva de um vacúolo grande pode não bloquear completamente o processo de fertilização e ainda resultar em desenvolvimento embrionário normal e gestação viável⁵². Contudo, a presença de vacúolos granulares em oócitos foi relacionada à maior taxa de anormalidades do cariótipo feminino e, a transferência de embriões oriundos de oócitos com vacúolos granulares foi associada a altas taxas de aborto e resultados clínicos desfavoráveis⁵³.

Duas alterações morfológicas devem ser avaliadas com cautela: a presença de oócitos gigantes (devido à alta probabilidade de alterações genéticas neste gameta) e

a agregação de retículo endoplasmático liso (devido ao potencial risco de malformações fetais associadas)^{54,55}. Akarsu *et al.*⁵⁵ relataram o caso de uma paciente submetida a três ciclos consecutivos de injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI), com total de 59 oócitos, todos apresentando agregação do retículo endoplasmático liso. Dois dos três ciclos terminaram com gestações clínicas em curso, mas com múltiplas anomalias fetais⁵⁵. Entretanto, estudo mais recente retrospectivo, envolvendo 329 casos e 6845 controles refutou tal hipótese⁵⁶. Os embriões derivados dos oócitos com agregação de retículo endoplasmático liso tiveram a capacidade de se desenvolver normalmente, com taxas de fertilização e gravidez comparáveis, e sem aumento significativo na taxa de malformações com ou sem agregação do retículo endoplasmático liso (5,3% versus 2,1%, respectivamente)⁵⁶. De fato, a questão permanece controversa na literatura, com alguns autores encorajando inclusive o descarte de oócitos acometidos por tal dismorfismo, devido às taxas reduzidas de fertilização e gestação clínica, com altas taxas de abortamento precoce e malformações fetais^{57,58}.

Estudos prévios revelaram que os desfechos da estimulação ovariana não são impactados pelo diagnóstico de câncer de mama, mostrando número semelhante de oócitos recuperados e oócitos MII, assim como a dose total de gonadotrofinas utilizada^{20,59,60}. Entretanto, estudo comparando pacientes submetidas à preservação oncológica da fertilidade utilizando protocolo com gonadotrofinas e letrozol com pacientes inférteis submetidas à estimulação ovariana apenas com gonadotrofinas mostrou maior taxa de oócitos imaturos e menor taxa de fertilização entre as pacientes que fizeram criopreservação de oócitos, sugerindo possível efeito deletério do letrozol sobre a qualidade oocitária⁶⁰. Contudo, grande parte dos estudos

envolvendo inibidores de aromatase na estimulação ovariana avalia apenas parâmetros do ciclo, como duração do estímulo, dose de gonadotrofinas aplicadas, número de oócitos e segurança dos níveis hormonais associados à sua utilização²⁰. A literatura é escassa em relação a avaliação da qualidade oocitária associada ao uso do letrozol na estimulação ovariana⁶⁰ e nenhum estudo prévio descreve a frequência de alterações na morfologia oocitária relacionadas ao uso deste inibidor de aromatase nas pacientes com câncer de mama submetidas a criopreservação de oócitos. Os dismorfismos oocitários podem se apresentar de diversas maneiras, sendo os mais frequentemente descritos ilustrados nas figuras abaixo, fotos cedidas pela equipe de embriologia do nosso serviço (figuras 2 a 12).

Figura 2: Oócito apresentando espaço perivitelínico com grânulos corticais.



Figura 3: Oócito apresentando espaço perivitelínico aumentado.



Figura 4: Oócito apresentando zona pelúcida de coloração alterada.

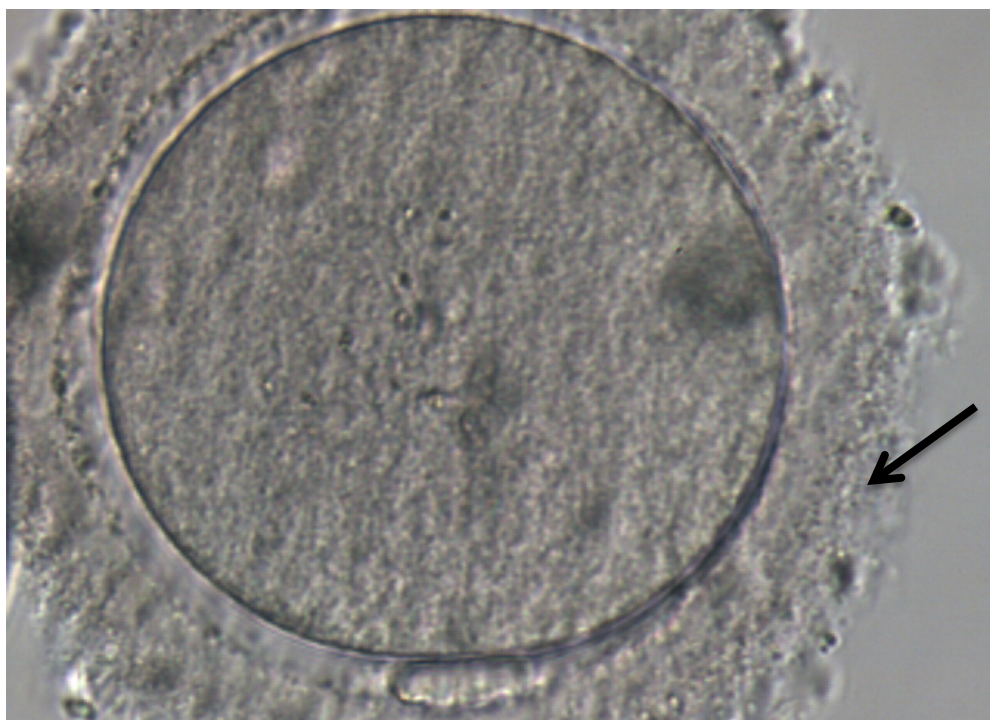


Figura 5: Oócito apresentando zona pelúcida irregular.

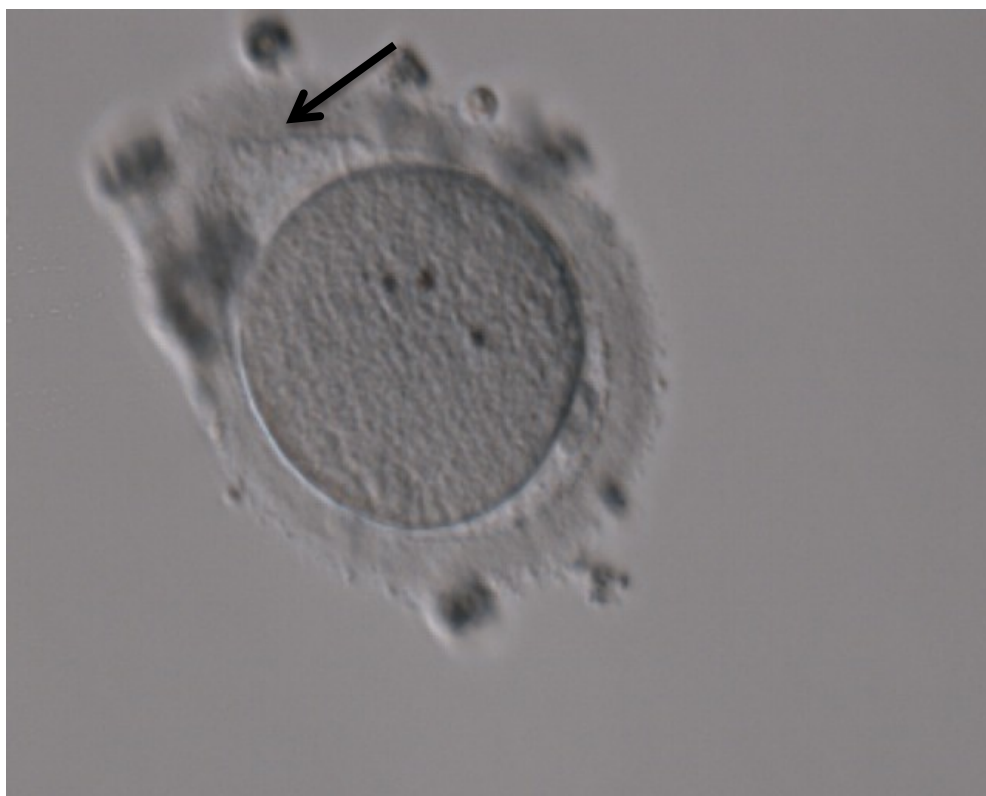


Figura 6: Oócito apresentando corpos refráteis.



Figura 7: Oócito apresentando ooplasma escuro.



Figura 8: Oócito apresentando ooplasma granuloso.

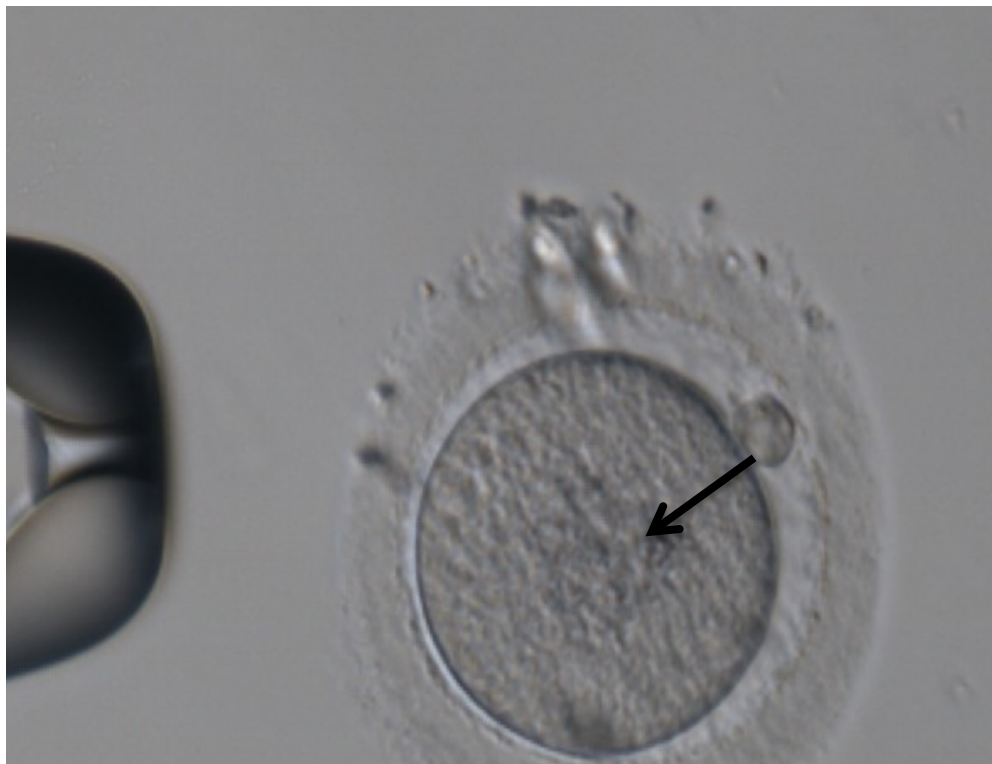


Figura 9: Oócito apresentando ooplasma irregular.



Figura 10: Oócito apresentando granulação central.



Figura 11: Oócito apresentando retração.



Figura 11: Oócito apresentando vacúolos.



Figura 12: Oócito apresentando agregação de retículo endoplasmático liso.



2. Objetivo

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a influência da estimulação ovariana com letrozol sobre a qualidade oocitária em pacientes com câncer de mama submetidas à preservação da fertilidade com criopreservação de oócitos.

2.2. Objetivo Específico

Analisar os parâmetros morfológicos de qualidade oocitária após estimulação ovariana com letrozol e gonadotrofinas em pacientes com câncer de mama submetidas à preservação da fertilidade com vitrificação de oócitos, comparados aos oócitos de mulheres sem câncer de mama submetidas à estimulação ovariana com gonadotrofinas sem associação ao letrozol.

3. Métodos

Desenho do estudo e Seleção da Amostra

Trata-se de estudo clínico de corte transversal. O grupo populacional foi constituído de pacientes atendidas em um Hospital Público Terciário de São Paulo, o Centro de Referência de Saúde da Mulher – Hospital Pérola Byington, no período de 2015 a 2016. O cálculo do tamanho amostral foi realizado pelo programa *Power Sample* baseado no estudo de Jonhson *et al.*⁶⁰. Considerando a diferença entre os valores e corrigindo a estimativa para os efeitos dos erros do tipo I (5%) e poder do estudo de 80%, estimou-se tamanho amostral de no mínimo 84 elementos no grupo de estudo para 112 elementos no grupo controle. Considerando o elemento de estudo como oócitos avaliados, selecionamos todas as pacientes inscritas no serviço com diagnóstico de câncer de mama que foram submetidas à estimulação ovariana para preservação da fertilidade, totalizando 69 pacientes. Através de pareamento pela idade foram selecionadas 92 pacientes sem câncer de mama como controle para obtenção de número equiparável de oócitos. Dessa maneira foram selecionados para avaliação no grupo de estudo 750 oócitos e comparados a 699 oócitos do grupo controle.

No grupo de estudo foram incluídas todas as mulheres com diagnóstico recente de câncer de mama e idade inferior a 40 anos, submetidas a tratamento de preservação de fertilidade com vitrificação de oócitos. Os critérios de exclusão foram: início da quimioterapia previamente à estimulação ovariana, idade ≥ 40 anos, realização de criopreservação de oócitos por outros tipos de neoplasias e realização prévia de cirurgias e/ou radioterapia pélvica. Foram incluídas no grupo controle

pacientes sem câncer de mama, submetidas a estimulação ovariana controlada para fertilização *in vitro* por infertilidade relacionada a fatores masculinos. Os grupos foram pareados por idade, de acordo com o número de oócitos selecionados para avaliação. Foi solicitada a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com exigência da resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde. O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Referência de Saúde da Mulher, tendo sido aprovado em 05 de abril de 2017, sob o número 888.972 **(Anexo I).**

Metodologia

Foram coletados por meio de análise de prontuário e bancos de dados os seguintes dados clínicos: idade, dose total de gonadotrofinas empregada, número de folículos com diâmetro entre 14 e 17mm, número de folículos com diâmetro maior ou igual a 18 mm, número total de oócitos obtidos e oócitos maduros (MII). Para avaliação da morfologia oocitária foi considerada a presença ou ausência dos seguintes parâmetros:

- Espaço perivitelínico com grânulos corticais
- Espaço perivitelínico aumentado
- Zona pelúcida de coloração alterada
- Zona pelúcida irregular
- Corpus refráteis
- Ooplasma escuro
- Ooplasma granuloso
- Ooplasma irregular

- Granulação central
- Retração
- Vacúolos
- Alterações de retículo endoplasmático liso

Avaliação da morfologia dos oócitos

Os oócitos recuperados foram mantidos em meio de cultura (Irvine Scientific®) suplementada com 10% de proteína e coberto com óleo mineral (Irvine Scientific®) a 37°C e 6% de CO₂ durante 2 horas antes da remoção das células do cumulus. As células do cumulus circundantes foram removidas através da exposição a um meio tamponado com HEPES [ácido N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-2-etanossulfônico] que contém hialuronidase (80 UI/mL, Irvine Scientific®). Células do cumulus restantes foram removidas mecanicamente por pipetagem suave com uma pipeta de Pasteur (Humagen Fertility Diagnostics, VA). A morfologia do oócito foi avaliada usando uma ampliação invertida pelo microscópio Nikon® sob 400X. A avaliação da morfologia oocitária foi realizada de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo Consenso de Istambul⁴³, por avaliador qualificado e treinado para esse procedimento.

Estimulação ovariana controlada e recuperação de oócitos

A estimulação ovariana para preservação da fertilidade em pacientes com câncer da mama foi realizada com letrozol em combinação às gonadotrofinas em protocolo curto com análogo antagonista do GnRH (GnRH-ant), como descrito previamente em publicação por nosso grupo de pesquisa (**Figura 13**)²². O estímulo para criopreservação foi realizado segundo o princípio de *random start*, ou seja,

iniciado em qualquer fase do ciclo menstrual, no momento em que a paciente deu entrada no serviço com o intuito de não promover atraso no início da quimioterapia. O protocolo de estimulação foi realizado com letrozol 5 mg/dia por via oral, 300UI/dia de hormônio folículo estimulante (FSH) recombinante ou urinário associado ou não ao hormônio luteinizante (LH) por via subcutânea, com objetivo de otimizar a resposta ovariana destas pacientes. O bloqueio hipofisário foi obtido com GnRH-ant (acetato de cetorelix ou acetato de ganirelix 0,25 mg/dia) por via subcutânea, em protocolo flexível, na presença de pelo menos um folículo com diâmetro médio ≥ 14 mm. Todas as medicações foram mantidas até o final do estímulo, com duração média prevista de nove a dez dias. O critério para desencadeamento da ovulação, ou *trigger*, foi definido como presença de dois ou mais folículos com diâmetro médio ≥ 18 -20mm. Na presença deste critério, todas as medicações para estímulo foram suspensas. O *trigger* foi realizado com duas ampolas do análogo agonista do GnRH (GnRH-a) acetato de triptorelina 0,1 mg/ml totalizando 0,2mg e a coleta oocitária agendada para 36 horas após esta aplicação. A **Figura 13** ilustra o protocolo de estimulação ovariana controlada utilizada no grupo de pacientes com câncer de mama.

Dias	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10
Letrozol 5 mg/dia por via oral	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
FSH (+ LH) 150-300 UI/dia SC	FSH + LH	FSH + LH	FSH + LH	FSH + LH	FSH + LH	FSH + LH	FSH + LH	FSH + LH	FSH + LH	FSH + LH
GnRH-ant 0,25mg/dia Cetorelix/Ganirelix SC						GnRH- ant	GnRH- ant	GnRH- ant	GnRH- ant	GnRH- ant
Acetato de triptorelina 0,2mg SC										GnRH- a

Figura 13: Protocolo de estimulação ovariana controlada, no Grupo de pacientes com câncer de mama (Letrozol).

No grupo controle a estimulação ovariana foi realizada apenas com gonadotrofinas e a supressão hipofisária obtida com GnRHant (**Figura 14**). O protocolo de estimulação foi realizado com FSH recombinante ou urinário associado ou não ao LH cujas doses variaram entre 150-300UI/dia, por via subcutânea, de acordo com a reserva ovariana e idade da paciente. O bloqueio hipofisário foi obtido com GnRH-ant (acetato de cetorelix ou acetato de ganirelix 0,25 mg/dia) por via subcutânea na presença de pelo menos um folículo com diâmetro médio ≥ 14 mm. A duração média do estímulo foi prevista em nove a dez dias. O *trigger* foi realizado com gonadotrofina coriônica humana (hCG) 5.000UI por via subcutânea, na presença de dois ou mais folículos com diâmetro médio ≥ 18 -20mm. A coleta oocitária foi programada para 36 horas após o *trigger*. A **Figura 14** ilustra o protocolo utilizado para estimulação ovariana controlada no Grupo Controle.

Dias	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10
FSH (+LH) 150-300 UI/dia SC	FSH + LH	FSH + LH	FSH + LH	FSH + LH	FSH + LH	FSH + LH	FSH + LH	FSH + LH	FSH + LH	FSH + LH
GnRH-ant 0,25mg/dia Cetorelix/Ganirelix SC						GnRH- ant	GnRH- ant	GnRH- ant	GnRH- ant	GnRH- ant
Gonadotrofina coriônica humana 5.000 UI (hCG) SC										hCG

Figura 14: Protocolo de estimulação ovariana controlada, utilizado no Grupo Controle.

Análise Estatística

Para análise dos dados foram calculados a média e o desvio-padrão para variáveis quantitativas e, frequência e porcentagem para variáveis qualitativas. Para comparação entre os grupos em relação a variáveis quantitativas, utilizou-se o teste de

Mann-Whitney. O teste de Qui-Quadrado foi utilizado para avaliar a associação entre as frequências de variáveis categóricas. A análise foi realizada para estimar o odds ratio (OR) e o intervalo de confiança de 95% (CI), considerando o grupo letrozol constituindo uma resposta em comparação com o grupo controle como referência (OR 1,0) para observar as possíveis associações entre uso de letrozol (variável dependente) e os parâmetros morfológicos oocitários (variáveis independentes). Os testes estatísticos foram bilaterais e um nível de significância de 5% foi adotado. Todas as análises foram realizadas usando o programa *IBM SPSS (Statistical Package for Social Sciences)*, em sua versão 23.0.

4. Publicação

4.1. Artigo Original

Running title: Letrozole and oocyte quality in cancer

Title: The influence of letrozole on oocyte quality in breast cancer patients undergoing fertility preservation.

Authors: L.M.N. Bercaire^{1,2}, M. Cavagna¹, N.F. Donadio¹, A.R. Rocha¹, R. Portela¹, V.R. Alves¹, T.B.B. Santos¹, F. Cavagna¹, A. Dzik¹, L.H. Gebrim¹, E.A.P. Nahas²

¹Women's Health Reference Center, Division of Human Reproduction, Pérola Byington Hospital, Sao Paulo State, Brazil.

²Department of Gynecology and Obstetrics, Botucatu Medical School, Sao Paulo State University - UNESP, Sao Paulo, Brazil.

Corresponding author: Ludmila Machado Neves Bercaire

E-mail: lud.bercaire@gmail.com

Hospital Pérola Byington – Centro de Referência de Saúde da Mulher

Address: Avenida Brigadeiro Luís Antônio 683, Bela Vista, São Paulo - SP, Zip Code 01317-000 Departamento de Reprodução Humana

Capsule: The use of letrozole was shown to be a risk factor for worse oocyte quality, considering increased perivitellinic space, irregular zona pellucida, refractile bodies and dark and granular ooplasm.

Abstract

Objective: To evaluate the influence of letrozole on oocyte morphology in patients with breast cancer submitted to fertility preservation.

Design: Cross sectional study

Setting: Public tertiary hospital

Patients: Oocytes retrieved from patients with breast cancer undergoing fertility preservation (n=69) and from infertile women undergoing in vitro fertilization (n=92).

Interventions: We evaluated 750 oocytes obtained from breast cancer patients submitted to ovarian stimulation with letrozole and gonadotropins and 699 oocytes from patients without breast cancer submitted to ovarian stimulation for in vitro fertilization only with gonadotropins due to male factor infertility. The mature oocytes retrieved were analyzed for the presence of refractile bodies, color and regularity of the ooplasm, central granulation degree, cortical granules, zona pellucida staining and regularity, perivitellinic space, presence of vacuoles or abnormal smooth-surfaced endoplasmic reticle and oocyte retraction.

Main Outcome Measures: oocyte morphology parameters.

Results: It was observed a higher incidence of alterations in oocyte morphology in the letrozole group compared to the control group: increased perivitellinic space ($p=0.007$), irregular zona pellucida ($p<0.001$), refractile bodies ($p<0.001$), dark ooplasm ($p<0.001$), granular ooplasm ($p<0.001$), irregular ooplasm ($p<0.001$) and dense central granulation ($p<0.001$).

Conclusion: The use of letrozole was shown to be a risk factor for worse oocyte morphology. However, clinical impact of ovarian stimulation protocol with combined use of gonadotropins and letrozole for fertility preservation remains unclear in this setting. These data underline the importance of determining predictive potential of morphological dysmorphisms of human oocytes in IVF outcomes.

Key-words: oocyte morphology; random-start ovarian stimulation; fertility preservation.

Introduction

Breast cancer is the leading worldwide cause of cancer death in women, accounting for 30% of malignancies in the United States. Recent advances in screening and diagnosis methods as well as treatment options have led to an increase of survival rate to 91% over five years in developed countries (1). The historical increase in the incidence of breast cancer reflects changes in reproductive patterns and lifestyle habits. Early menarche, nulliparity, late primiparity (after the age of 30 years), obesity or hormone replacement therapy can increase the risk of breast cancer (2-4). Among all women diagnosed with breast cancer in the United States in 2017, about 4% were under 40 years. In 2014, there were an estimated prevalence of more than 3,5 million women living with breast cancer in USA (1).

The high incidence and survival rate of this cancer in women of childbearing age has led to a considerable concern about fertility preservation treatments. The increased life expectancy of breast cancer patients is attributed to adjuvant treatment with chemotherapeutic agents and hormone therapy with tamoxifen (5). However, association of adjuvant treatments has a great impact on ovarian function, and different chemotherapeutic agents have distinct potential of ovarian toxicity. Although ovarian failure is not always defined after chemotherapy treatment, many young women evolve to subfertility or infertility (6). In this context, importance of fertility preservation programs is a raising priority in order to improve quality of life to these patients. It is important to emphasize that the performance of ovarian stimulation for fertility preservation does not delay initiation of chemotherapy treatment, since most

patients have a treatment window of 6 weeks between breast surgery and the beginning of chemotherapy (7).

Regarding the safety of fertility preservation, ovarian stimulation does not seem to be a risk factor for cancer recurrence (8, 9). Thus, cryopreservation of oocytes or embryos are currently the first choice technique to preserve fertility of patients with breast cancer who will undergo chemotherapy, and the protocol with letrozole is usually applied in patients with hormone-dependent tumors (10). Letrozole is a selective and reversible aromatase inhibitor, used as adjuvant treatment in breast cancer, since it inhibits proliferation of estrogen-dependent breast cancer cells, promoting reduction of tumor recurrence (11, 12). Letrozole has also been safely and effectively applied as an ovulation inducer agent in assisted reproduction cycles, due to a reduction in serum estradiol levels that releases the negative feedback and stimulates pituitary production of follicle stimulating hormone (FSH) with the advantage of avoiding anti-estrogenic side effects in the endometrium as occurs with clomiphene citrate (12, 13).

It is widely known that successful outcomes of in vitro fertilization (IVF) are directly influenced by the presence of both nuclear meiotic division and adequate cytoplasmic development in the period of oocyte-to-fetal maturation (14, 15). The oocyte nucleus and cytoplasm need to be synchronized so oocyte maturation occurs adequately to ensure optimal conditions for subsequent development, since nuclear maturity alone is not enough to determine the oocyte aspects (15-17). There are different morphological, cellular and molecular parameters to evaluate oocyte quality. Considering morphological evaluation, it is performed initially by observing the aspect of the cumulus oophorus complex cells (13). After denudation, oocyte evaluation is

more accurate and is based on the nuclear maturity status, cytoplasmic morphology and the appearance of extracytoplasmic structures. An ideal mature oocyte should have a spherical structure enclosed by a uniform zona pellucida, with a uniform translucent cytoplasm free of inclusions and a single sized-appropriate polar body, with an adequate zona pellucida thickness and proper perivitelline space (14, 17).

The majority of MII oocytes retrieved after controlled ovarian stimulation protocols displays one or more discrepancies in this described morphological criteria, called oocyte dysmorphisms(17-20).

Previous studies revealed that outcomes from ovarian stimulation are not impaired by a breast cancer diagnosis, showing similar numbers of total oocytes, MII oocytes and total gonadotrophin dose required (21). Nevertheless, no studies regarding morphological parameters of oocyte quality have been published yet (22). Although there are few papers about this topic, a previous research comparing oocyte quality between patients submitted to oncological fertility preservation with letrozole and gonadotropins to infertile patients submitted to IVF cycles with gonadotropins showed a higher rate of immature oocytes and lower rate of fertilization among the letrozole group, which highlights to a possible deleterious effect of letrozole on oocyte quality (23).

Based on these data, the aim of this study was to evaluate the influence of letrozole on oocyte quality in patients with breast cancer submitted to fertility preservation through oocyte morphology analysis.

Methods

Study design

An analytical cross-sectional study was performed at Women's Health Reference Center – Hospital Pérola Byington, a public tertiary hospital in São Paulo, Brazil, through chart analysis and medical records. The sample size was calculated by the Power Sample program, based on the study of Johnson et al. (23), assuming type I errors of 5% and sample power of 80%. Considering the element of study as evaluated oocytes, the estimated sample size was at least 84 elements in the study group and 112 elements in the control group.

Patients

All women with a recent diagnosis of breast cancer and age < 40 years who underwent ovarian stimulation for fertility preservation between 2015 and 2016 were included in this study (n=69), corresponding to 750 oocytes (study elements). Exclusion criteria were: initiation of chemotherapy prior to ovarian stimulation, age $\geq$ 40 years, cryopreservation of oocytes by other types of neoplasms and previous surgery and/or pelvic radiotherapy. Patients submitted to controlled ovarian stimulation for in vitro fertilization due to infertility related to male factors and not affected by cancer were defined as controls, and the selection of patients was performed through age pairing (n=92), in order to obtain a similar proportion of 699 oocytes (study elements).

Controlled ovarian stimulation and oocyte retrieval

Controlled ovarian stimulation for fertility preservation in patients with breast cancer was performed in a random-start protocol, as proposed by our group in previous study (24), by using letrozole 5 mg/day orally in combination with recombinant or urinary follicle stimulating hormone (FSH) 150-300 IU/day subcutaneously, associated or not with luteinizing hormone (LH) in order to optimize the ovarian response of these patients. Pituitary blockade was obtained with GnRH antagonist (cetorelix acetate or ganirelix acetate 0.25 mg/day) subcutaneously in the presence of at least one follicle with ≥ 14 mm diameter. Follicular growth was monitored using transvaginal ultrasound examination until two or more follicles achieved diameter ≥ 18 mm. GnRH agonist (triptorelin acetate 0.2 mg) was administered subcutaneously to trigger final follicular maturation. Oocytes were collected 36 hours after trigger through transvaginal ultrasound guided oocyte pick-up.

In the control group, ovarian stimulation was performed with recombinant or urinary FSH subcutaneously associated or not with LH in doses varying between 150-300 IU/day according to ovarian reserve and patient's age. Pituitary suppression was obtained with GnRH antagonist (cetorelix acetate or ganirelix acetate 0.25 mg/day) subcutaneously in the presence of at least one follicle ≥ 14 mm diameter. Human chorionic gonadotrophin (hCG) 5,000 IU was administered subcutaneously to trigger final follicular maturation, in the presence of two or more follicles with mean diameter ≥ 18 -20 mm. Oocytes were collected 36 hours after trigger through transvaginal ultrasound guided oocyte pick-up.

Oocyte morphology assessment

Retrieved oocytes were maintained in culture medium (Irvine Scientific®) supplemented with 10% protein and covered with mineral oil (Irvine Scientific®) at 37°C and 6% CO₂ for 2 hours before removal of the cumulus cells. The surrounding cumulus cells were removed through exposure to a HEPES-buffered medium [N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid] containing hyaluronidase (80 IU/mL, Irvine Scientific®) and any remaining cumulus cells were mechanically removed by gently pipetting with a hand-drawn Pasteur pipette (Humagen Fertility Diagnostics, VA). Oocyte morphology was assessed using an inverted Nikon® microscope under 400X magnification. Oocyte morphology evaluation was performed according to the parameters established in the Istanbul Consensus (14), by qualified and trained embryologists. The following oocyte abnormalities were evaluated: cytoplasmic staining and granularity; vacuoles in the ooplasm; refractile bodies in the ooplasm; perivitelline space dysmorphisms; cortical granules; zona pellucida (ZP) alterations; endoplasmic reticle aggregations and oocyte shape dysmorphisms. Oocytes that had released the first polar body were considered mature and were used for vitrification (letrozole group) or ICSI (control group). Morphological parameters of 750 oocytes were evaluated in the letrozole group and compared to 699 oocytes from the control group.

Statistical analysis

The mean and standard deviation were calculated for quantitative variables, and frequency and percentage for qualitative variables. For comparison between the groups in relation to quantitative features, Mann-Whitney test was used. Chi-Square test was used to assess the association between the frequencies of categorical features. Analysis was performed to estimate the odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI), considering the group of letrozole to constitute a response compared with control group as reference (OR 1.0) to observe the possible associations between letrozole use (dependent variable) and the morphological oocytes parameters (independent variables). The statistical tests were bilateral and a level of significance of 5% was adopted. All analyses were performed using the IBM SPSS (Statistical Package for Social Sciences) program, 23.0 version.

Ethical considerations

Written informed consent was not obtained, according Resolution 446/2012 from National Health Council. The study was approved by the Research Ethics Committee of the Women's Health Reference Center – Hospital Pérola Byington (number 888.972, 04/05/2017).

Results

We evaluated 750 oocytes obtained from 69 breast cancer patients submitted to ovarian stimulation with letrozole and gonadotropins for fertility preservation. In the control group, we analyzed 699 oocytes from 92 patients without breast cancer submitted to ovarian stimulation with only gonadotropins for IVF. Groups were similar regarding mean age (33.1 ± 7.1 years control group *versus* 31.5 ± 4.1 years letrozole group, $p=0,210$); total FSH dose (2197.8 ± 875.1 IU control group *versus* 2061.5 ± 1207.1 letrozole group, $p=0,704$); total number of oocytes retrieved (10.3 ± 6.1 control group *versus* 12.1 ± 7.9 letrozole group, $p=0,222$); and number of MII oocytes retrieved (7.6 ± 4.8 control group *versus* 9.4 ± 6.6 letrozole group, $p=0,303$) (Table 1).

Regarding oocyte morphological parameters, we observed higher incidence of oocyte dysmorphisms the letrozole group compared to the control group: increased perivitellinic space ($p=0.007$), irregular zona pellucida ($p<0.001$), refractile bodies ($p<0.001$), dark ooplasm ($p<0.001$), granular ooplasm ($p<0.001$), irregular ooplasm ($p<0.001$) and dense central granulation ($p<0.001$). Other alterations were higher in the control group: cortical granules ($p<0.001$), zona pellucida with altered staining ($p<0.001$) and smooth-surfaced endoplasmic reticulum aggregates ($p<0.001$). There was no statistical difference between the groups in relation to the parameters: retraction ($p=0,254$) and vacuoles ($p=0,974$) (Table 2).

The association of oocyte dysmorphisms risk with letrozole use in breast cancer patients compared to patients without breast cancer was shown in the Table 3. The risk for dimorphism was higher in the letrozole group when compared to the control

group (as reference, OR 1.0) in most of the evaluated morphological oocytes parameters (Table 3).

Table 1. Comparison of in vitro fertilization cycle parameters between letrozole group (n=69 patients) and control group (n=92 patients).

Variables	Letrozole	Control	P value*
Age (years)	31.5 ± 4.1	33.1 ± 7.1	0.210
Total FSH dose (IU)	2061.5 ± 1207.1	2197.8 ± 875.1	0.704
Follicles 14-17 mm (n)	5.8 ± 3.85	5.5 ± 3.2	0.762
Follicles _≥ 18 mm (n)	5.4 ± 3.4	5.3 ± 3.4	0.946
Retrieved oocytes (n)	12.1 ± 7.9	10.2 ± 6.1	0.222
Retrieved MII oocytes (n)	9.4 ± 6.6	7.6 ± 4.8	0.303

Values are expressed as mean ± SD (Standard deviation).

*Significantly different if $p < 0.05$ (Mann-Whitney test)

Table 2. Comparison of morphological oocytes parameters between the letrozole group (n= 750 oocytes) and the control group (n= 699 oocytes).

Parameters	Letrozole	Control	P value*
Cortical Granules			< 0.001
No	604 (80.5)	292 (41.8)	
Yes	146 (19.5)	407 (58.2)	
Increased Perivitellinic Space			0.007
No	490 (65.3)	503 (72.0)	
Yes	260 (34.7)	196 (28.0)	
ZP altered staining			< 0.001
No	743 (99.1)	657 (94.0)	
Yes	7 (0.9)	42 (6.0)	
Irregular ZP			< 0.001
No	641 (85.5)	668 (95.6)	
Yes	109 (14.5)	31 (4.4)	
Refractile Bodies			< 0.001
No	344 (45.9)	385 (55.1)	
Yes	406 (54.1)	314 (44.9)	
Dark Ooplasm			< 0.001
No	522 (69.6)	587 (84.0)	

Yes	228 (30.4)	112 (16.0)	
Granular Ooplasm			< 0.001
No	418 (55.7)	481 (68.8)	
Yes	332 (44.3)	218 (31.2)	
Irregular Ooplasm			< 0.001
No	625 (83.3)	685 (98.0)	
Yes	125 (16.7)	14 (2.0)	
Dense Central Granulation			0.001
No	687 (91.6)	670 (95.6)	
Yes	63 (8.4)	29 (4.1)	
Retraction			0.254
No	696 (92.8)	659 (94.3)	
Yes	54 (7.2)	40 (5.7)	
Vacuoles			0.974
No	717 (95.6)	668 (95.6)	
Yes	33 (4.4)	31 (4.4)	
Smooth ER aggregates			< 0.001
No	749 (99.9)	681 (97.4)	
Yes	1 (0.1)	18 (2.6)	

Values are expressed as number (%). ZP, Zona Pellucida; ER, Endoplasmic Reticule.

*Significantly different if $p < 0.05$ (Chi-Square test)

Table 3: Association of oocyte dysmorphisms risk on letrozole group compared to control group (as reference, OR 1.0).

Parameters	OR	CI 95%	<i>P</i> -value*
Increased Perivitellinic Space	1.4	1.1 - 1.7	0.007
Irregular ZP	3.7	2.4 - 5.5	< 0.001
Refractile Bodies	1.4	1.2 - 1.8	< 0.001
Dark Ooplasm	2.3	1.8 - 2.9	< 0.001
Granular Ooplasm	1.7	1.4 - 2.2	< 0.001
Irregular Ooplasm	9.8	5.6 - 17.2	< 0.001
Dense Central Granulation	2.1	1.3 - 3.3	< 0.001

OR, Odds Ratio; CI, confidence interval; ZP, Zona pellucida; ER, Endoplasmic

Reticule.

*Significantly different if $p < 0.05$ (Logistic regression)

Discussion

As far as we know, this is the first study to evaluate the influence of letrozole on oocyte quality in breast cancer patients. The use of letrozole was shown to be a risk factor for worse oocyte quality in general, particularly intracytoplasmic effects regarding granular ooplasm.

The major concern associated with conventional controlled ovarian stimulation protocols is the supra-physiological circulating estrogen levels due to the development of large number of follicles. For this reason, conventional stimulation protocols may be considered risky in women with estrogen-sensitive breast cancer, even if stimulation is performed within a short period of time, usually less than 15 days. Hence, modifications to standard stimulation protocols have been made in an attempt to reduce any detrimental aspect associated with raised serum estradiol levels (25, 26). Letrozole is an aromatase inhibitor developed in the 1990's, as a treatment in women with positive estrogen-receptor metastatic breast cancer, as it blocks catalytic conversion of androstenedione to estrone, and testosterone to estradiol. (25, 27, 28). Letrozole is administered as long-term adjuvant therapy, associated with higher disease free survival rates by inhibiting the proliferation of estrogen-dependent breast cancer cells (22, 25, 26).

Letrozole has also been used as safe and new treatment option for ovulation induction. While reducing circulating estrogen levels, aromatase inhibitors increase gonadotropin production by releasing hypothalamic-pituitary axis (8). Some previous studies have demonstrated that a letrozole plus gonadotropin protocol is effective for safely inducing controlled ovarian stimulation in patients with breast tumor before

initiating adjuvant chemotherapy (24), without increasing rates of its recurrence and without decreasing oocyte yield. Nonetheless, fertility preservation should always be initiated in agreement with patient's oncologist (7, 25, 26, 28-31).

In our study, follicular maturation trigger was performed with GnRH agonist in the letrozole group. The use of GnRH agonist trigger for final oocyte maturation is particularly important in cancer patients, in order to decrease the post-trigger estradiol exposure as well as ovarian hyperstimulation syndrome risk compared to an hCG trigger. This syndrome could not only result in a delay of cancer treatment but also amplify the baseline risk for coagulopathy and other cancer-related morbidities (32-34). Besides this, GnRH agonist trigger usually results in a greater mature (MII) oocyte yield without a reduction in clinical pregnancy or live birth rates in cryopreservation cycles (25, 28, 35, 36). The most recent studies showed no differences between these two protocols concerning number of retrieved oocytes (32, 34). There is no evidence of a difference in live birth rate or ongoing pregnancy rate between frozen-thawed cycles with hCG or GnRH agonist, suggesting that oocyte and embryo quality and morphological characteristics are similar with hCG or GnRH agonist trigger (5, 37). Similarly to these studies, we found no difference regarding MII oocytes retrieved between GnRH agonist trigger (letrozole group) and hCG trigger (control group).

During an IVF/ICSI cycle, daily doses of the gonadotrophin FSH are used to induce multifollicular development. Generally the dose of gonadotrophin used is associated with the number of eggs retrieved, however the response of individual women is variable (38). In the present study, letrozole was used in combination with FSH

associated or not with LH in doses varying between 150-300 IU/day according to ovarian reserve and patient's age. Similar to our findings, Turan et al. showed no difference on number of oocytes retrieved and MII retrieved applying FSH daily injections of 150-300 IU/day (34). Previous studies displayed a higher number of total oocytes retrieved and total number of MII oocytes with letrozole compared to standard protocol (9). However, other researchers showed lower oocyte maturity rates in breast cancer patients using letrozole compared to IVF patients not affected by cancer (21, 23, 32). We have seen more MII oocytes in the letrozole group (9.4 ± 6.6) than in control group (7.6 ± 4.8), but this difference was not statistically significant.

It is established that high quality MII oocytes should have a homogeneous cytoplasm, without inclusions and refractile bodies, with a small perivitellinic space comprising a non-fragmented polar body and a colorless and clear zona pellucida (17, 39). Events such as fertilization, early embryo development and implantation are directly influenced by the normality of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation during the preovulatory period (14, 15). Oocyte quality depends on the nuclear and mitochondrial genome, but also by the follicular microenvironment and ovarian conditions, which affect gene transcription and translation processes and consequently cytoplasmic maturity (14, 16, 17). Oocyte dysmorphisms are classified into cytoplasmic (granules and/or cytoplasmic inclusions) and extracytoplasmic (anomalies in oocyte shape, zona pellucida, perivitellinic space and polar body) (17). In our study, oocytes from the letrozole group revealed significantly more dysmorphisms than the control group, including some extracytoplasmic alterations in zona pellucida and in perivitellinic space. In control group, zona pellucida showed significantly more altered staining (6% versus 0.9%). However, letrozole group displayed higher frequency of irregular zona

pellucida (14.5%) compared to control (4.4%), but these alterations could be patient-specific, due to the secretion and patterning problems of the glycoprotein matrix (14, 17). These morphological aspects should be considered only as phenotypic alterations due oocyte heterogeneity (17, 39, 40). Concerning perivitellinic space, letrozole group showed 34.7% of abnormal oocytes, versus 28% on the control group. A large perivitellinic space could be related to lower fertilization rate and embryo quality or over mature oocytes (17). According to the Istanbul Consensus (14), regarding extracytoplasmic dysmorphisms, it was agreed that inclusions in the perivitelline space is anormal, but there was no associated evidence to support any specific prognosis (14, 17, 18).

Concerning intracytoplasmic abnormalities, the agreement is that homogeneous cytoplasm is expected, and that non-homogeneous cytoplasm is of unknown biological significance, and based on current evidence, slightly heterogeneous cytoplasm may represent normal variability among retrieved oocytes rather than being an abnormality of developmental (14, 17).

Small vacuoles of 5–10 mm in diameter that are fluid filled but transparent are unlikely to have a biological consequence, whereas large vacuoles (14 mm) are associated with fertilization failure (14, 17, 18). However, the presence of a large vacuole does not completely block the fertilization process and can still result in normal embryo development and a viable offspring (41). Although, presence of granular vacuoles in oocytes was associated with a higher rate of female karyotype abnormalities, and the transfer of embryos derived from oocytes with granular vacuoles was associated with high abortion rates and poor clinical outcomes (19).

Among intracytoplasmic dysmorphisms, smooth endoplasmic reticulum aggregates was considered the most severe abnormality of MII oocytes due the reported outcomes, such as reduced fertilization and clinical pregnancy rates, early fetal demise and imprinting disorders in newborns (14, 17, 39, 42). These aggregates can be identified as translucent vacuole-like structures in the cytoplasm by phase contrast microscopy (14, 17, 42).

Moreover, it was possible to evaluate more frequently in the letrozole group than in the control group some intracytoplasmic dysmorphisms as refractile bodies (54.1% versus 44.9%), dark ooplasm (30.4% versus 16%), granular ooplasm (44.3% versus 31.2%), irregular ooplasm (16.7% versus 2%) and dense central granulation (8.4% versus 4.1%). Dark zona pellucida was previously related to lower fertilization, implantation and pregnancy rates (43).

While clustering is easy detectable, "granularity" is only seen with modulation of the optical microscopy and probably slightly heterogeneous cytoplasm may only represent normal variability (14, 17, 39, 40). Different degrees of cytoplasmic granularity may have diverse outcomes. It seems that oocyte cytoplasmic granularity improves normal fertilization (18, 39). However, a dense central granulation is considered a severe cytoplasmic dysmorphism and should be considered for an oocyte quality evaluation, since it may impair embryo development and implantation potential (14, 17, 20, 39, 40).

Among intracytoplasmic dysmorphisms, smooth endoplasmic reticulum aggregates was considered the most severe abnormality of MII oocytes (14, 17, 39, 42). In control group, smooth endoplasmic reticulum was observed in 2.5% of retrieve oocytes versus

0,1% in letrozole group. Previous studies recommend that oocytes with this feature should not be used for injection (14, 17, 42). Nevertheless, more recent studies could not find an adverse effect on embryological, clinical or neonatal data for oocytes with smooth endoplasmic reticulum aggregates, since more than 20 children were born from oocytes with this abnormality. Moreover, the exclusion of these oocytes from ICSI cycles causes an increased frequency of transfer cancellation (20, 42, 44, 45).

As mentioned above, general evaluation of oocytes morphological parameters revealed that letrozole group showed more dysmorphisms than control group. In this study, we did not analyze fertilization or embryo development, as oocytes from breast cancer patients were vitrified, but the probability of a normal fertilization is reduced by the presence of those alterations (14, 40). Based on our results, the use of letrozole was shown to be a risk factor for worse oocyte morphology. However, clinical impact of ovarian stimulation protocol with combined use of gonadotropins and letrozole for fertility preservation remains unclear in this setting. These data underline the importance of determining predictive potential of dysmorphisms of human oocytes in IVF outcomes.

Conflicts of interest: none

References:

1. Society AC. Breast Cancer Facts & Figures 2017-2018. 2017; Available from: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/breast-cancer-facts-and-figures/breast-cancer-facts-and-figures-2017-2018.pdf>.
2. Akram M, Iqbal M, Daniyal M, Khan AU. Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biol Res* 2017; 50 Suppl 1: 33.
3. Kerr J, Anderson C, Lippman SM. Physical activity, sedentary behaviour, diet, and cancer: an update and emerging new evidence. *Lancet Oncol* 2017; 18 Suppl 8: e457-e471.
4. Picon-Ruiz M, Morata-Tarifa C, Valle-Goffin JJ, Friedman ER, Slingerland JM. Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: Mechanistic insights and strategies for intervention. *CA Cancer J Clin* 2017; 67 Suppl 5: 378-397.
5. Orvieto R. Triggering final follicular maturation--hCG, GnRH-agonist or both, when and to whom? *J Ovarian Res* 2015; 8 Suppl: 60.
6. Sonmezer M, Oktay K. Fertility preservation in young women undergoing breast cancer therapy. *Oncologist* 2006; 11 Suppl 5: 422-34.
7. Reddy J, Oktay K. Ovarian stimulation and fertility preservation with the use of aromatase inhibitors in women with breast cancer. *Fertil Steril* 2012; 98 Suppl 6: 1363-9.
8. Azim AA, Costantini-Ferrando M, Oktay K. Safety of fertility preservation by ovarian stimulation with letrozole and gonadotropins in patients with breast cancer: a prospective controlled study. *J Clin Oncol* 2008; 26 Suppl 16: 2630-5.
9. Cakmak H, Katz A, Cedars MI, Rosen MP. Effective method for emergency fertility preservation: random-start controlled ovarian stimulation. *Fertil Steril* 2013; 100 Suppl 6: 1673-80.
10. Kasum M, von Wolff M, Franulic D, Cehic E, Klepac-Pulanic T, Oreskovic S, et al. Fertility preservation options in breast cancer patients. *Gynecol Endocrinol* 2015; 31 Suppl 11: 846-51.
11. American College of O, Gynecologists. Committee Opinion No. 663: Aromatase Inhibitors in Gynecologic Practice. *Obstet Gynecol* 2016; 127 Suppl 6: e170-4.
12. Casper RF, Mitwally MF. Review: aromatase inhibitors for ovulation induction. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91 Suppl 3: 760-71.
13. Oktay K, Buyuk E, Libertella N, Akar M, Rosenwaks Z. Fertility preservation in breast cancer patients: a prospective controlled comparison of ovarian stimulation with tamoxifen and letrozole for embryo cryopreservation. *J Clin Oncol* 2005; 23 Suppl 19: 4347-53.
14. Alpha Scientists in Reproductive M, Embryology ESIGo. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod* 2011; 26 Suppl 6: 1270-83.

15. Liu L, Cai J, Li P, Jiang X, Ren J. Clinical outcome of cycles with oocyte degeneration after intracytoplasmic sperm injection. *Syst Biol Reprod Med* 2017; 63 Suppl 2: 113-119.
16. Gilchrist RB, Luciano AM, Richani D, Zeng HT, Wang X, Vos MD, et al. Oocyte maturation and quality: role of cyclic nucleotides. *Reproduction* 2016; 152 Suppl 5: R143-57.
17. Rienzi L, Balaban B, Ebner T, Mandelbaum J. The oocyte. *Hum Reprod* 2012; 27 Suppl 1 Suppl: i2-21.
18. de Cassia SFR, de Almeida Ferreira Braga DP, Semiao-Francisco L, Madaschi C, Iaconelli A, Jr., Borges E, Jr. Metaphase II human oocyte morphology: contributing factors and effects on fertilization potential and embryo developmental ability in ICSI cycles. *Fertil Steril* 2010; 94 Suppl 3: 1115-7.
19. Sousa M, Cunha M, Silva J, Oliveira E, Pinho MJ, Almeida C, et al. Ultrastructural and cytogenetic analyses of mature human oocyte dysmorphisms with respect to clinical outcomes. *J Assist Reprod Genet* 2016; 33 Suppl 8: 1041-57.
20. Ashrafi M, Karimian L, Eftekhari-Yazdi P, Hasani F, Arabipoor A, Bahmanabadi A, et al. Effect of oocyte dysmorphisms on intracytoplasmic sperm injection cycle outcomes in normal ovarian responders. *J Obstet Gynaecol Res* 2015; 41 Suppl 12: 1912-20.
21. Quinn MM, Cakmak H, Letourneau JM, Cedars MI, Rosen MP. Response to ovarian stimulation is not impacted by a breast cancer diagnosis. *Hum Reprod* 2017; 32 Suppl 3: 568-574.
22. Dahhan T, Balkenende EME, Beerendonk CCM, Fleischer K, Stoop D, Bos AME, et al. Stimulation of the ovaries in women with breast cancer undergoing fertility preservation: Alternative versus standard stimulation protocols; the study protocol of the STIM-trial. *Contemp Clin Trials* 2017; 61 Suppl: 96-100.
23. Johnson LN, Dillon KE, Sammel MD, Efymow BL, Mainigi MA, Dokras A, et al. Response to ovarian stimulation in patients facing gonadotoxic therapy. *Reprod Biomed Online* 2013; 26 Suppl 4: 337-44.
24. Cavagna F, Pontes A, Cavagna M, Dzik A, Donadio NF, Portela R, et al. A specific controlled ovarian stimulation (COS) protocol for fertility preservation in women with breast cancer undergoing neoadjuvant chemotherapy. *Contemp Oncol (Pozn)* 2017; 21 Suppl 4: 290-294.
25. Rodgers RJ, Reid GD, Koch J, Deans R, Ledger WL, Friedlander M, et al. The safety and efficacy of controlled ovarian hyperstimulation for fertility preservation in women with early breast cancer: a systematic review. *Hum Reprod* 2017; 32 Suppl 5: 1033-1045.
26. Taylan E, Oktay KH. Current state and controversies in fertility preservation in women with breast cancer. *World J Clin Oncol* 2017; 8 Suppl 3: 241-248.
27. Halaszova N, Crha I, Huser M, Weinberger V, Zakova J, Jeseta M, et al. [Fertility preserving methods in women with breast cancer before gonadotoxic therapy]. *Ceska Gynekol* 2017; 82 Suppl 4: 287-292.
28. Rodriguez-Wallberg KA, Oktay K. Fertility preservation in women with breast cancer. *Clin Obstet Gynecol* 2010; 53 Suppl 4: 753-62.

29. Checa Vizcaino MA, Corchado AR, Cuadri ME, Comadran MG, Brassesco M, Carreras R. The effects of letrozole on ovarian stimulation for fertility preservation in cancer-affected women. *Reprod Biomed Online* 2012; 24 Suppl 6: 606-10.
30. Keskin U, Ercan CM, Yilmaz A, Babacan A, Korkmaz C, Duru NK, et al. Random-start controlled ovarian hyperstimulation with letrozole for fertility preservation in cancer patients: case series and review of literature. *J Pak Med Assoc* 2014; 64 Suppl 7: 830-2.
31. Ben-Haroush A, Farhi J, Ben-Aharon I, Sapir O, Pinkas H, Fisch B. High yield of oocytes without an increase in circulating estradiol levels in breast cancer patients treated with follicle-stimulating hormone and aromatase inhibitor in standard gonadotropin-releasing hormone analogue protocols. *Isr Med Assoc J* 2011; 13 Suppl 12: 753-6.
32. Kim JH, Kim SK, Lee HJ, Lee JR, Jee BC, Suh CS, et al. Efficacy of random-start controlled ovarian stimulation in cancer patients. *J Korean Med Sci* 2015; 30 Suppl 3: 290-5.
33. Oktay K, Turkcuoglu I, Rodriguez-Wallberg KA. GnRH agonist trigger for women with breast cancer undergoing fertility preservation by aromatase inhibitor/FSH stimulation. *Reprod Biomed Online* 2010; 20 Suppl 6: 783-8.
34. Turan V, Bedoschi G, Moy F, Oktay K. Safety and feasibility of performing two consecutive ovarian stimulation cycles with the use of letrozole-gonadotropin protocol for fertility preservation in breast cancer patients. *Fertil Steril* 2013; 100 Suppl 6: 1681-5 e1.
35. Oktay K, Kim JY, Barad D, Babayev SN. Association of BRCA1 mutations with occult primary ovarian insufficiency: a possible explanation for the link between infertility and breast/ovarian cancer risks. *J Clin Oncol* 2010; 28 Suppl 2: 240-4.
36. Pereira N, Kelly AG, Stone LD, Witzke JD, Lekovich JP, Elias RT, et al. Gonadotropin-releasing hormone agonist trigger increases the number of oocytes and embryos available for cryopreservation in cancer patients undergoing ovarian stimulation for fertility preservation. *Fertil Steril* 2017; 108 Suppl 3: 532-538.
37. Youssef MA, Van der Veen F, Al-Inany HG, Mochtar MH, Griesinger G, Nagi Mohesen M, et al. Gonadotropin-releasing hormone agonist versus HCG for oocyte triggering in antagonist-assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst Rev* 2014 Suppl 10: CD008046.
38. Lensen F SW, Jack & Mol, Ben W Mol & La Marca, Antonio & Torrance, H.L. & J Broekmans, Frank. Individualised gonadotropin dose selection using markers of ovarian reserve for women undergoing IVF/ICSI. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2017 Suppl 6: 1-20.
39. Rienzi L, Vajta G, Ubaldi F. Predictive value of oocyte morphology in human IVF: a systematic review of the literature. *Hum Reprod Update* 2011; 17 Suppl 1: 34-45.
40. Setti AS, Figueira RC, Braga DP, Colturato SS, Iaconelli A, Jr., Borges E, Jr. Relationship between oocyte abnormal morphology and intracytoplasmic sperm injection outcomes: a meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011; 159 Suppl 2: 364-70.

41. Fancsovits P, Murber A, Gilan ZT, Rigo J, Jr., Urbancsek J. Human oocytes containing large cytoplasmic vacuoles can result in pregnancy and viable offspring. *Reprod Biomed Online* 2011; 23 Suppl 4: 513-6.
42. Shaw-Jackson C, Thomas AL, Van Beirs N, Ameye L, Colin J, Bertrand E, et al. Oocytes affected by smooth endoplasmic reticulum aggregates: to discard or not to discard? *Arch Gynecol Obstet* 2016; 294 Suppl 1: 175-84.
43. Shi W, Xu B, Wu LM, Jin RT, Luan HB, Luo LH, et al. Oocytes with a dark zona pellucida demonstrate lower fertilization, implantation and clinical pregnancy rates in IVF/ICSI cycles. *PLoS One* 2014; 9 Suppl 2: e89409.
44. Restelli L, Delle Noci S, Mangiarini A, Ferrari S, Somigliana E, Paffoni A. The impact of Alpha/ESHRE consensus regarding oocytes with aggregates of smooth endoplasmic reticulum (SERa) on in vitro fertilization outcome. *J Assist Reprod Genet* 2015; 32 Suppl 11: 1629-35.
45. Shaw-Jackson C, Van Beirs N, Thomas AL, Rozenberg S, Autin C. Can healthy babies originate from oocytes with smooth endoplasmic reticulum aggregates? A systematic mini-review. *Hum Reprod* 2014; 29 Suppl 7: 1380-6.

Supplemental Figures

Figure 1. Ovarian stimulation protocol on letrozole group.

Days	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10
Letrozole 5 mg/day orally	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
FSH (+ LH) 150-300 UI/day SC	FSH + LH	FSH + LH	FSH + LH	FSH + LH	FSH + LH	FSH + LH	FSH + LH	FSH + LH	FSH + LH	FSH + LH
GnRH-ant 0,25mg/day Cetrorelix/Ganirelix SC						GnRH-ant	GnRH-ant	GnRH-ant	GnRH-ant	GnRH-ant
Triptorelin Acetate 0,2mg SC										GnRH-a

Figure 2. Ovarian stimulation protocol on control group.

Days	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10
FSH (+ LH) 150-300 UI/day SC	FSH + LH	FSH + LH	FSH + LH	FSH + LH	FSH + LH	FSH + LH	FSH + LH	FSH + LH	FSH + LH	FSH + LH
GnRH-ant 0,25mg/day Cetrorelix/Ganirelix SC						GnRH-ant	GnRH-ant	GnRH-ant	GnRH-ant	GnRH-ant
Human chorionic gonadotrophin 5.000 UI (hCG) SC										hCG

5. Conclusões

No presente estudo, foi observada associação entre uso do inibidor da aromatase letrozol e a presença de distúrbios oocitários. Em relação às pacientes submetidas à Fertilização *in Vitro* com gonadotrofinas, aquelas que usaram associação com o letrozol apresentaram maior ocorrência de oócitos com granulação central, corpos refráteis, espaço perivitelínico aumentado, além de alterações no ooplasma (escuro, irregular ou granuloso) e alterações de Zona Pelúcida. Tais alterações da morfologia oocitária estão relacionadas a prognóstico desfavorável nos ciclos de fertilização *in vitro*, caracterizado por menor taxa de fertilização e gravidez. A utilização do letrozol em associação às gonadotrofinas mostrou-se como fator de risco para a presença de distúrbios oocitários que poderiam ser traduzidos em pior qualidade oocitária. Entretanto, apesar da utilização rotineira do letrozol em ciclos de reprodução assistida, trata-se do primeiro trabalho que sugere um possível impacto sobre a qualidade oocitária associado ao seu uso, sendo necessários novos estudos para corroborar tal associação. No entanto, o impacto clínico do uso do letrozol no protocolo de estimulação ovariana para preservação da fertilidade permanece incerto neste cenário. Estes dados reiteram a importância em determinar o potencial preditivo dos distúrbios de oócitos humanos em resultados de fertilização *in vitro*.

6. Referências

1. American Cancer Society. Breast Cancer Facts & Figures 2017-2018. Atlanta: American Cancer Society, Inc. 2017.
2. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2015
3. Akram M, Iqbal M, Daniyal M, Khan AU. Awareness and current knowledge of breast cancer. Biol Res 2017; 50 Suppl 1: 33.
4. Picon-Ruiz M, Morata-Tarifa C, Valle-Goffin JJ, Friedman ER, Slingerland JM. Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: Mechanistic insights and strategies for intervention. CA Cancer J Clin 2017; 67 Suppl 5: 378-397.
5. Azim H, Santoro L, Pavlidis N, Gelber S, Kroman N, Azim H et al. Safety of pregnancy following breast cancer diagnosis: A meta-analysis of 14 studies. Eur J Cancer 2011;47(1):74-83.
6. Kwan M, Bernard P, Kroenke C, Factor R, Habel L, Weltzien E et al. Breastfeeding, PAM50 Tumor Subtype, and Breast Cancer Prognosis and Survival. J Natl Cancer Inst 2015;107(7).
7. The Adjuvant Breast Cancer Trials Collaborative Group. Polychemotherapy for Early Breast Cancer: Results From the International Adjuvant Breast Cancer Chemotherapy Randomized Trial. J Natl Cancer Inst 2007;99:506–15
8. Hickey M, Peate M, Saunders C, Friedlander M. Breast cancer in young women and its impact on reproductive function. Hum Reprod Update 2009;15(3):323-339.

9. von Wolff M, Capp E, Jauckus J, Strowitzki T, Germeyer A. Timing of ovarian stimulation in patients prior to gonadotoxic therapy: an analysis of 684 stimulations. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2016;199:146-149.
10. Sonmezer M, Oktay K. Fertility Preservation in Young Women Undergoing Breast Cancer Therapy. *Oncologist* 2006; 11:422–434.
11. Bines J, Oleske D, Cobleigh M. Ovarian function in premenopausal women treated with adjuvant chemotherapy for breast cancer. *J Clin Oncol* 1996;14(5):1718-1729.
12. Poniatowski B, Grimm P, Cohen G. Chemotherapy-Induced Menopause: A Literature Review. *Cancer Invest* 2001;19(6):641-648.
13. Su H, Flatt S, Natarajan L, DeMichele A, Steiner A. Impact of breast cancer on anti-mullerian hormone levels in young women. *Breast Cancer Res Treat* 2012;137(2):571-577.
14. Partridge A, Ruddy K, Gelber S, Schapira L, Abusief M, Meyer M et al. Ovarian reserve in women who remain premenopausal after chemotherapy for early stage breast cancer. *Fertil Steril* 2010;94(2):638-644.
15. Dewailly D, Andersen C, Balen A, Broekmans F, Dilaver N, Fanchin R et al. The physiology and clinical utility of anti-Müllerian hormone in women. *Hum Reprod Update* 2014;20(3):370-385.
16. Anderson R, Rosendahl M, Kelsey T, Cameron D. Pretreatment anti-Müllerian hormone predicts for loss of ovarian function after chemotherapy for early breast cancer. *Eur J Cancer* 2013;49(16):3404-3411.
17. Dillon K, Sammel M, Prewitt M, Ginsberg J, Walker D, Mersereau J et al. Pretreatment antimüllerian hormone levels determine rate of posttherapy ovarian

- reserve recovery: acute changes in ovarian reserve during and after chemotherapy. *Fertil Steril* 2013;99(2):477-483.e1.
18. Kasum M, von Wolff M, Franulić D, Čehić E, Klepac-Pulanić T, Orešković S, Juras J. Fertility preservation options in breast cancer patients. *Gynecol Endocrinol* 2015;31(11):846-51.
 19. Cakmark H, Katz A, Cedars MI, Rosen MP. Effective method for emergency fertility preservation: random-start controlled ovarian stimulation. *Fertil Steril* 2013;100(6):1673-1680.
 20. Reddy J, Oktay K. Ovarian stimulation and fertility preservation with the use of aromatase inhibitors in women with breast cancer. *Fertil Steril* 2012;98(6):1363-1369.
 21. Madrigano A, Westphal L, Wapnir I. Egg retrieval with cryopreservation does not delay breast cancer treatment. *Am J Surg* 2007;194:477–81.
 22. Cavagna F, Pontes A, Cavagna M, Dzik A, Donadio NF, Portela R, et al. A specific controlled ovarian stimulation (COS) protocol for fertility preservation in women with breast cancer undergoing neoadjuvant chemotherapy. *Contemp Oncol (Pozn)* 2017; 21 Suppl 4: 290-294.
 23. Baynosa J, Westphal LM, Madrigano A, Wapnir I. Timing of breast cancer treatments with oocyte retrieval and embryo cryopreservation. *J Am Coll Surg* 2009;209:603–7.
 24. Oktay K, Kim JY, Barad D, Babayev SN. Association of BRCA1 mutations with occult primary ovarian insufficiency: a possible explanation for the link between infertility and breast/ovarian cancer risks. *J Clin Oncol* 2009;28:240–4.

25. Von Wolff M, Thaler CJ, Frambach T, Zeeb C, Lawrenz B, Popovici RM, et al. Ovarian stimulation to cryopreserve fertilized oocytes in cancer patients can be started in the luteal phase. *Fertil Steril* 2009;92:1360–5.
26. Sönmezer M, Türkçüoğlu I, Coşkun U, Oktay K. Random-start controlled ovarian hyperstimulation for emergency fertility preservation in letrozole cycles. *Fertil Steril* 2011;95(6):2125.e9–2125.e11.
27. Adams GP, Singh J, Baerwald AR. Large animal models for the study of ovarian follicular dynamics in women. *Theriogenol* 2012;78:1733–48.
28. Ubaldi FM, Capalbo A, Vaiarelli A, Cimadomo D, Colamaria S, Alviggi C, Trabucco E, Venturella R, Vajta G, Rienzi L, 2016. Follicular versus luteal phase ovarian stimulation during the same menstrual cycle (DuoStim) in a reduced ovarian reserve population results in a similar euploid blastocyst formation rate: new insight in ovarian reserve exploitation. *Fertil Steril* 105,1488–1495.
29. Cole PA, Robinson CH. Mechanism and inhibition of cytochrome P-450 aromatase. *J Med Chem* 1990;33:2933–44.
30. 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 randomized trials. *Lancet* 2005;365: 1687–717.
31. American College of O, Gynecologists. Committee Opinion No. 663: Aromatase Inhibitors in Gynecologic Practice. *Obstet Gynecol* 2016; 127 Suppl 6: e170-4.
32. Casper R, Mitwally M. Aromatase Inhibitors for Ovulation Induction. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(3):760-771.

33. Legro R, Brzyski R, Diamond M, Coutifaris C, Schlaff W, Casson P et al. Letrozole versus Clomiphene for Infertility in the Polycystic Ovary Syndrome. *N Engl J Med* 2014;371(15):1465-1465.
34. Biljan M, Hemmings R, Brassard N. The Outcome of 150 Babies Following the Treatment With Letrozole or Letrozole and Gonadotropins. *Fertil Steril* 2005;84:S95.
35. Tulandi T, Martin J, Al-Fadhi R, Kabli N, Forman R, Hitkari J et al. Congenital Malformations Among 911 Newborns Conceived After Infertility Treatment With Letrozole or Clomiphene Citrate. *Obstet Gynecol Survey* 2006;61(12):782-783.
36. Legro R, Brzyski R, Diamond M, Coutifaris C, Schlaff W, Casson P et al. Letrozole versus Clomiphene for Infertility in the Polycystic Ovary Syndrome. *N Engl J Med* 2014;371(2):119-129.
37. Cahill D, Wardle P, Harlow C, Hunt L, Hull M. Expected contribution to serum oestradiol from individual ovarian follicles in unstimulated cycles. *Hum Reprod* 2000;15(9):1909-1912.
38. Oktay K, Buyuk E, Libertella N, Akar M, Rosenwaks Z. Fertility Preservation in Breast Cancer Patients: A Prospective Controlled Comparison of Ovarian Stimulation With Tamoxifen and Letrozole for Embryo Cryopreservation. *J Clin Oncol* 2005;23(19):4347-4353.
39. Oktay K, Hourvitz A, Sahin G, Oktem O, Safro B, Cil A, et al. Letrozole reduces estrogen and gonadotropin exposure in women with breast cancer undergoing ovarian stimulation before chemotherapy. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:3885-3890.

40. Checa Vizcaíno M, Corchado A, Sastre I, Cuadri M, Comadran M, Brassesco M, Carreras R. The effects of letrozole on ovarian stimulation for fertility preservation in cancer-affected women. *Reprod BioMed Online* 2012;24(6):606-610.
41. Azim AA, Costantini-Ferrando M, Oktay K. Safety of fertility preservation by ovarian stimulation with letrozole and gonadotropins in patients with breast cancer: a prospective controlled study. *J Clin Oncol* 2008;26:2630–5.
42. Lasiene K, Vitkus A, Valanciūte A, Lasys V. Morphological criteria of oocyte quality. *Medicina (Kaunas)* 2009;45(7):509-15.
43. Alpha Scientists in Reproductive M, Embryology ESIGo. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod* 2011; 26(6): 1270-83.
44. Rienzi L, Balaban B, Ebner T, Mandelbaum J. The oocyte. *Hum Reprod* 2012;27(1):12–121.
45. Liu L, Cai J, Li P, Jiang X, Ren J. Clinical outcome of cycles with oocyte degeneration after intracytoplasmic sperm injection. *Syst Biol Reprod Med* 2017; 63(2): 113-119.
46. Gilchrist RB, Luciano AM, Richani D, et al. Oocyte maturation and quality: role of cyclic nucleotides. *Reproduction* 2016; 152(5): R143-57.
47. Rienzi L, Rienzi L, Ubaldi FM, Iacobelli M, Minasi MG, Romano S, Greco E. Meiotic spindle visualization in living human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2005;10:192-198.
48. Petersen CG, Oliveira JBA, Mauri AL, Massaro FC, Baruffi RLR, Pontes A, Franco JG Jr. Relationship between visualization of meiotic spindle in human oocytes and ICSI outcomes: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2009;18:235–243.

49. Swain JE, Pool TB. ART failure: oocyte contributions to unsuccessful fertilization. *Hum Reprod Update* 2008;14:431–446.
50. de Cassia SFR, de Almeida Ferreira Braga DP, Semiao-Francisco L, et al. Metaphase II human oocyte morphology: contributing factors and effects on fertilization potential and embryo developmental ability in ICSI cycles. *Fertil Steril* 2010; 94(3): 1115-7.
51. Ashrafi M, Karimian L, Eftekhari-Yazdi P, et al. Effect of oocyte dysmorphisms on intracytoplasmic sperm injection cycle outcomes in normal ovarian responders. *J Obstet Gynaecol Res* 2015; 41(12): 1912-20.
52. Fancsovits P, Murber A, Gilan ZT, Rigo J, Jr., Urbancsek J. Human oocytes containing large cytoplasmic vacuoles can result in pregnancy and viable offspring. *Reprod Biomed Online* 2011; 23(4): 513-6.
53. Sousa M, Cunha M, Silva J, et al. Ultrastructural and cytogenetic analyses of mature human oocyte dysmorphisms with respect to clinical outcomes. *J Assist Reprod Genet* 2016; 33(8): 1041-57.
54. Ebner T, Moser M, Shebl O, Sommerguber M, Tews G. Prognosis of oocytes showing aggregation of smooth endoplasmic reticulum. *Reprod BioMed Online* 2008;16(1):113-118.
55. Akarsu C, Çağlar G, Vicdan K, Sözen E, Biberoglu K. Smooth endoplasmic reticulum aggregations in all retrieved oocytes causing recurrent multiple anomalies: case report. *Fertil Steril* 2009;92(4):1496.e1-1496.e3.
56. Mateizel I, Van Landuyt L, Tournaye H, Verheyen G. Deliveries of normal healthy babies from embryos originating from oocytes showing the presence of smooth endoplasmic reticulum aggregates. *Hum Reprod* 2013;28(8):2111-2117.

57. Rienzi L, Vajta G, Ubaldi F. Predictive value of oocyte morphology in human IVF: a systematic review of the literature. *Hum Reprod Update* 2011; 17(1): 34-45.
58. Shaw-Jackson C, Thomas AL, Van Beirs N, et al. Oocytes affected by smooth endoplasmic reticulum aggregates: to discard or not to discard? *Arch Gynecol Obstet* 2016; 294 Suppl 1: 175-84.
59. Quinn MM, Cakmak H, Letourneau JM, Cedars MI, Rosen MP. Response to ovarian stimulation is not impacted by a breast cancer diagnosis. *Hum Reprod* 2017; 32(3): 568-574.
60. Johnson L, Dillon K, Sammel M, Efymow B, Mainigi M, Dokras A et al. Response to ovarian stimulation in patients facing gonadotoxic therapy. *Reprod BioMed Online* 2013;26(4):337-344.

7. Anexos

7.1. Anexo- Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

CENTRO DE REFERÊNCIA DA
SAÚDE DA MULHER - CRSM



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: A influência do letrozol sobre a qualidade oocitária em pacientes com câncer de mama

Pesquisador: LUDMILA MACHADO NEVES BERCAIRE

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 66221317.4.0000.0069

Instituição Proponente: Centro de Referência da Saúde da Mulher

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.001.625

Apresentação do Projeto:

O câncer de mama é a segunda neoplasia maligna mais comum em mulheres e avanços recentes em diagnóstico precoce e tratamento levaram a um incremento na taxa de sobrevivência que aumentou a possibilidade de maternidade em mulheres em idade fértil após o câncer.

A estimulação ovariana com letrozol e gonadotropinas para a criopreservação de oócitos é um procedimento bem estabelecido em pacientes com câncer de mama e desejo reprodutivo. O letrozol demonstrou ser eficaz como indutor da ovulação, com resultados comparáveis aos protocolos convencionais de estimulação ovariana.

Estudo recente comparando pacientes submetidas a criopreservação oncológica da fertilidade com protocolo utilizando gonadotropinas e letrozol e pacientes inférteis submetidas a fertilização in vitro mostrou maior taxa de oócitos imaturos e menor taxa de fertilização entre as pacientes que fizeram criopreservação, o que chama a atenção para um possível efeito deletério do letrozol na qualidade oocitária.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a influência do estímulo ovariano com letrozol sobre a qualidade oocitária em pacientes com câncer de mama submetidos à preservação da fertilidade.

Endereço: Av. Brigadeiro Luiz Antonio, 683

Bairro: Bela Vista

CEP: 01.317-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3248-8087

Fax: (11)3248-8080

E-mail: dircient@ig.com.br

Continuação do Parecer: 2.001.625

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Não está claro se pode ser extrapolado os resultados obtidos em mulheres saudáveis para pacientes com câncer de mama. Além disso, alguns pacientes do grupo de estudo iniciaram a estimulação ovariana na fase lútea, o que poderia ser um fator de confusão.

Benefícios: Definir o melhor protocolo para criopreservação de oócitos em pacientes com câncer de mama.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O câncer de mama é a segunda neoplasia maligna mais comum em mulheres, após o câncer de pele não-melanoma. Avanços recentes em diagnóstico precoce e tratamento levaram a um incremento significativo na taxa de sobrevivência dessas pacientes chegando a 81 a 87%, aumentando a preocupação com a fertilidade e a possibilidade de maternidade em mulheres em idade fértil após o câncer de mama (Viscaino et al, 2012). A estimulação ovariana controlada usando letrozol e gonadotropinas para a criopreservação de oócitos é um procedimento bem estabelecido visando a preservação da fertilidade em pacientes com câncer de mama com desejos reprodutivos após tratamento com quimioterapia. O letrozol demonstrou ser eficaz como indutor da ovulação e mostrou resultados comparáveis aos protocolos convencionais de estimulação ovárica.

Estudo recente comparando pacientes submetidas a criopreservação oncológica da fertilidade com protocolo utilizando gonadotropinas e letrozol com pacientes inférteis submetidas a fertilização in vitro mostrou maior taxa de oócitos imaturos (2.2 versus 1.1; $P = 0.03$) e menor taxa de fertilização (52% versus 70%; $P = 0.002$.) comparados ao grupo controle pareado por idade, sexo, raça, dia de estímulo e método de fertilização, o

que chama a atenção para um possível efeito deletério do letrozol na qualidade oocitária (Johnson et al. 2014), embora outras investigações não tenham encontrado diferenças nos resultados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

De acordo com a resolução 466/12 da Conep.

Recomendações:

nenhuma recomendação específica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma pendência ou inadequação.

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com o parecer do relator

Endereço: Av. Brigadeiro Luiz Antonio, 683

Bairro: Bela Vista

CEP: 01.317-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3248-8087

Fax: (11)3248-8080

E-mail: dircient@ig.com.br

**CENTRO DE REFERÊNCIA DA
SAÚDE DA MULHER - CRSM**



Continuação do Parecer: 2.001.625

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_888972.pdf	04/04/2017 23:41:18		Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoatual.pdf	04/04/2017 23:39:34	LUDMILA MACHADO NEVES BERCAIRE	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoletrozol.docx	24/03/2017 20:41:10	LUDMILA MACHADO NEVES BERCAIRE	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 05 de Abril de 2017

Assinado por:
Roberto Euzebio dos Santos
(Coordenador)

Endereço: Av. Brigadeiro Luiz Antonio, 683

Bairro: Bela Vista

CEP: 01.317-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3248-8087

Fax: (11)3248-8080

E-mail: dirclient@ig.com.br