



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

Felipe Andreotta Cavagna

**Estimulação ovariana controlada para
criopreservação de oócitos em pacientes com
câncer de mama**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia.

Orientadora: Profa. Adj. Anaglória Pontes

**Botucatu
2017**

Felipe Andreotta Cavagna

Estimulação ovariana controlada para
criopreservação de oócitos em pacientes com
câncer de mama.

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Ginecologia, Obstetrícia e
Mastologia.

Orientadora: Profa.Adj. Anaglória Pontes

Botucatu
2017

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

Cavagna, Felipe Andreotta.

Estimulação ovariana controlada para criopreservação de oócitos em pacientes com câncer de mama / Felipe Andreotta Cavagna. - Botucatu, 2017

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

Orientador: Anaglória Pontes

Capes: 40101150

1. Mamas - Câncer - Prevenção. 2. Ovulação - Indução.
3. Oócitos - Criopreservação.

Palavras-chave: Câncer de mama; Criopreservação; Indução da ovulação; Preservação da fertilidade.

HOMENAGEM ESPECIAL

Este trabalho presta homenagem póstuma ao Professor Doutor Gilberto Uemura, exímio mastologista que, com sua sabedoria e postura profissional, tanto dignificou a Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista.

AGRADECIMENTOS

Uma realização deste gênero se tornou viável somente com a colaboração de pessoas especiais que contribuíram de uma maneira ou de outra, possibilitando a conclusão deste projeto.

À Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Prof. Adj. Eliana Aguiar Petri Nahás, agradeço a oportunidade e sem dúvida o privilégio de cursar este Mestrado, o qual contribuiu imensamente para o engrandecimento da minha formação científica e acadêmica.

À Faculdade de Medicina de Botucatu, (UNESP), ao Centro de Referência da Saúde da Mulher - Hospital Pérola Byington, especialmente ao Prof. Dr. Luiz Henrique Gebrim e Dr. Jorge Yoshinori Shida, e toda a equipe do laboratório do setor de Reprodução Humana, que proporcionaram todas as condições necessárias para a elaboração do estudo que embasou esta dissertação.

À Professora Adjuvante Anaglória Pontes, por todo carinho e atenção que sempre dedicou à orientação deste Mestrado durante toda a sua organização.

Aos professores da Pós-Graduação, por sua incessante capacidade de compartilhar conhecimentos e, de maneira cuidadosa, trazer elementos fundamentais para o estudo aqui realizado, bem como todos da secretaria da Pós-Graduação pelo atendimento educado, esclarecedor e solutivo de todas as questões de teor administrativo nas quais tive dificuldade.

Agradeço, como não poderia deixar de ser, meus familiares e amigos, que não mediram esforços para me encorajar e incentivar essa importante escolha em minha carreira, em especial, à minha esposa, que aguentou minha ausência física e mental, e a meu filho, que é e sempre será a principal razão de todos os meus esforços e que, apesar de não ter idade suficiente para entender o que tudo isso significava, sempre me estimulou nos momentos difíceis com seu amor, carinho e espontaneidade.

Por fim, meu melhor e mais especial agradecimento aos meus pais, por todos os ensinamentos e oportunidades que me proporcionaram com suor e carinho, construindo a pessoa que sou hoje, em especial ao meu pai, Mario Cavagna, homem honrado, sábio, amoroso e dedicado, que é um orgulho incomensurável ao seu filho, e sempre meu espelho de integridade e trabalho, sendo, portanto, condição para que este trabalho existisse. Obrigado por tudo!

SUMÁRIO

1. RESUMO	
2. ABSTRACT	
3. LISTA DE ABREVIATURAS	
4. INTRODUÇÃO.....	1
5. OBJETIVOS.....	18
6. CASUÍSTICA E MÉTODO.....	20
7. COMITÊ DE ÉTICA.....	24
8. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
9. ARTIGO 1.....	28
10. ARTIGO 2.....	45
11. CONCLUSÕES.....	67
12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
13. ANEXO.....	81

RESUMO

O câncer de mama é uma doença maligna relativamente comum em mulheres adultas jovens, justificando a preocupação com a potencial toxicidade gonadal relacionada à quimioterapia. É importante considerar o encaminhamento precoce de pacientes jovens com câncer de mama que tenham desejos reprodutivos para especialistas, a fim de discutir sobre a preservação da fertilidade. A criopreservação de embriões ou de oócitos estão entre os principais métodos à disposição, e para conseguir isso, estimulação ovariana controlada (EOC) é o primeiro passo a ser considerado.

O presente estudo tem como objetivo apresentar protocolo de estimulação ovariana em para preservação da fertilidade em pacientes com câncer de mama.

De novembro de 2014 a dezembro de 2016, 109 pacientes com câncer de mama com menos de 40 anos de idade foram selecionadas para preservar seu potencial reprodutivo. Elas foram divididas de acordo com a fase do ciclo menstrual em que o estímulo ovariano foi iniciado: fase folicular inicial, fase folicular tardia e fase lútea.

Para reduzir o tempo necessário da obtenção dos oócitos, este estudo utilizou o princípio do início aleatório, no qual a EOC pode ser iniciada durante qualquer período do ciclo menstrual sem consequências negativas.

O letrozol foi utilizado durante toda a estimulação para diminuir as concentrações de estradiol, independentemente da imunohistoquímica tumoral. Na presença de tumores positivos ao estradiol, e indicação de quimioterapia neoadjuvante, o tamoxifeno foi utilizado como uma medida de proteção adicional.

Um agonista do GnRH foi utilizado para desencadear a maturação folicular final, diminuindo o risco de síndrome de hiperestimulação ovariana.

Foram analisados os seguintes parâmetros: idade das pacientes, dia de início da EOC, número de dias de EOC, dose total de FSH, níveis de estradiol no dia de maturação folicular final, número de oócitos coletados e número de oócitos vitrificados.

A idade média dos pacientes foi de $31,27 \pm 4,22$ anos. A duração média da EOC foi de $10,0 \pm 1,39$ dias. O número médio de oócitos coletados foi de $11,62 \pm 7,96$ e o número médio de oócitos vitrificados foi de $9,60 \pm 6,87$. A concentração média de estradiol no dia do desencadeamento da ovulação foi de $706,30 \pm 450,48$ pg / mL, e a dose média de

FSH administrada foi $2610,00 \pm 716,51$ UI. Ao comparar os resultados de acordo com a fase do ciclo no qual a EOC foi iniciada, não houve diferenças significativas no número de oócitos colhidos e vitrificados, duração da estimulação ovariana e dos níveis de estradiol no dia do desencadeamento da ovulação. Observou-se uma diminuição estatisticamente significativa da dose total de FSH administrada nos grupos que iniciaram a EOC na fase folicular tardia e na fase lútea, quando comparada com a fase folicular inicial.

Esses resultados sugerem que a criopreservação de oócitos ou embriões com um protocolo específico para pacientes com câncer de mama, é eficaz e pode ser oferecida a mulheres jovens submetidas a tratamento citotóxico que têm preocupações relacionadas ao seu futuro reprodutivo.

ABSTRACT

Breast cancer is a relatively common malignancy in young adult women, justifying the concern about the potential gonadal toxicity related to chemotherapy. It is important to consider early referral of young breast cancer patients with reproductive desires to fertility specialists, in order to discuss the fertility preservation. Embryos or oocytes cryopreservation are among the main methods available, and to achieve that, controlled ovarian stimulation (COS) is the first step to be considered.

From November 2014 to December 2016, 109 breast cancers patients under 40 years were enrolled to preserve their reproductive potential. They were divided according to the menstrual cycle status in: initial follicular phase, late follicular phase and luteal phase.

In order to reduce the time necessary to obtain the oocytes, this study used the principle of random start, in which the COS can be initiated during any period of the menstrual cycle without negative consequences.

Letrozole was used during all stimulation to reduce estradiol concentrations, regardless of tumor immunohistochemistry. In the presence of estradiol positive tumors, and indication of neoadjuvant chemotherapy, tamoxifen was administered as an additional protective measure.

A GnRH agonist was used to trigger ovulation, in order to mitigate the risk of ovarian hyperstimulation syndrome.

The following parameters were analyzed: age, day of COS start, number of days required to COS, total FSH dosage, estradiol levels at final follicular maturation day, number of collected oocytes and number of vitrified oocytes.

The mean age of patients was 31.27 ± 4.22 years. The average duration of COS was 10.0 ± 1.39 days. The mean number of collected oocytes was 11.62 ± 7.96 and the mean number of vitrified oocytes was 9.60 ± 6.87 . The mean estradiol concentration on the day of the trigger was 706.30 ± 450.48 pg/mL, and the mean dose of FSH administered was 2610.00 ± 716.51 IU. When comparing the outcomes according to the phase of the cycle in which COS was commenced, there were no significant differences in the number of

oocytes collected and vitrified, ovarian stimulation length and estradiol levels on the day of the trigger. It was observed a statistically decrease of the total FSH dose administered in the groups starting COS in the late follicular phase and in the luteal phase, when compared to the initial follicular phase

These results suggest that oocyte or embryos cryopreservation with a specific protocol for breast cancer patients, is effective, safe, and may be offered to young women undergoing cytotoxic treatment who have concerns related to their reproductive future.

LISTA DE ABREVIATURAS

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EOC – Estimulação Ovariana Controlada

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofina

GnRH-a – Agonista do Hormônio Liberador de Gonadotrofina

HAM – Hormônio Anti-Mülleriano

HER2 – Receptor Tipo 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano

hMG – Gonadotrofina Menopáusica Humana

ICSI – Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide

LH – Hormônio Luteinizante

VEGF – Fator de Crescimento Endotelial Vascular

INTRODUÇÃO

O diagnóstico precoce de neoplasias malignas, associado a tratamentos locais e sistêmicos cada vez mais eficientes, promove a remissão do câncer em considerável número de pacientes, muitos deles em idade reprodutiva. Estima-se que cerca de uma em cada 570 pessoas seja sobrevivente de um câncer na infância¹. É inegável e promissora a melhora da sobrevida em pacientes jovens com neoplasias; o tratamento da leucemia, por exemplo, que proporcionava uma sobrevida de cinco anos de 33% no período 1971-76, mostrou taxa de 80% no período 1986-90, de acordo com Meirow e Nugent².

Foram estimados 596 mil casos novos de câncer no Brasil para 2016, 300.800 em mulheres, sendo 57.960 de mama. Os tipos mais incidentes, excetuando-se o câncer de pele do tipo não melanoma, são os cânceres de próstata, pulmão e colorretal no sexo masculino, e os cânceres de mama, colorretal e do colo de útero respectivamente no sexo feminino³.

Levando-se em conta não apenas a cura, mas também a qualidade de vida, depara-se com uma questão que não deve ser esquecida pelos oncologistas: a preservação do potencial reprodutivo em pacientes jovens submetidas a terapia citotóxica. Cerca de 7% dos cânceres de mama ocorrem antes dos 40 anos⁴ e 50% das mulheres consideram ter filhos depois do tratamento de uma neoplasia maligna⁵, mas pouco menos de 50% sabem da potencial ação prejudicial do tratamento quimioterápico sobre os ovários⁶. Lee et al. recomendam que sejam feitas as seguintes ponderações no caso de pacientes em idade reprodutiva ou crianças com diagnóstico de câncer⁷:

1. Os pacientes com câncer estão interessados em intervenções que visem a preservação da fertilidade?
2. Quais as opções atuais e futuras para a preservação da fertilidade nos homens?
3. Quais as opções atuais e futuras para a preservação da fertilidade nas mulheres?
4. Qual deve ser o papel do oncologista no aconselhamento dos pacientes quanto às opções de preservação da fertilidade?

Não há dúvidas de que os pacientes devem receber as informações pertinentes para poderem decidir sobre intervenções que visam salvaguardar a fertilidade. No caso de crianças, os pais ou responsáveis devem ser informados e participar das decisões. As opções devem ser apresentadas de modo claro e honesto e, obviamente, o oncologista é o primeiro profissional que deve ser capaz de abordar o problema e fornecer uma primeira ideia das alternativas disponíveis. A atuação conjunta com um serviço de medicina reprodutiva faz-se mandatória naqueles pacientes que manifestem o desejo de manutenção da capacidade reprodutiva. A abordagem inicial deve levar em conta que os pacientes submetidos a tratamento para o câncer podem ter sua função reprodutiva comprometida transitória ou permanentemente. A quimioterapia e a radioterapia exercem efeitos deletérios à função gonadal. Outras consequências tardias da terapia oncológica, diretamente relacionadas à função ovariana da paciente, são as disfunções sexuais. Em um estudo realizado com pacientes tratadas de algum tipo de câncer ginecológico com falência ovariana pós-quimioterapia, 67% delas apresentavam insatisfação sexual, 62% com dispareunia de penetração e 56% com diminuição de libido⁸.

Efeito dos agentes quimioterápicos sobre a função gonadal

Os ovários são glândulas sensíveis às drogas citotóxicas comumente empregadas na terapia oncológica, que terminam por induzir uma insuficiência gonadal que pode ser irreversível. O resultado da ação dos quimioterápicos sobre os ovários é o dano às células granulosas e tecaais, como também comprometimento do oócito, levando à falência ovariana prematura, que tem como consequência a infertilidade permanente⁹. A função ovariana, em alguns casos, pode ser comprometida transitoriamente, com retorno da atividade endócrina e liberação de oócito fertilizável. Ressalte-se, entretanto, que a quimioterapia associa-se a uma acentuada toxicidade ovariana e perda folicular, especialmente com o emprego de agentes como a ciclofosfamida, clorambucil, melfalan, busulfan, mecloretamina, cisplatina, vinblastina, procarbazina e mostarda nitrogenada^{9, 10}. A perda da função ovariana relaciona-se ao número de folículos primordiais existentes nos ovários; dessa forma, mulheres mais velhas

apresentam maior risco de desenvolver falência ovariana total¹¹. De acordo com Arnon et al, os agentes quimioterápicos podem ser divididos em seis classes diferentes, de acordo com seu mecanismo de ação: agentes alquilantes, cisplatina e análogos, alcalóides da vinca, antimetabólitos, agentes inibidores de topoisomerase e novos agentes¹². A ciclofosfamida é o agente alquilante mais envolvido no dano dos oócitos e das células da granulosa numa forma dose-dependente¹³. É uma droga citotóxica muito usada no tratamento antineoplásico sendo a que apresenta maiores taxas de falência ovariana¹⁴. Mulheres tratadas com ciclofosfamida estão quatro vezes mais propensas a desenvolver falência ovariana¹⁵. A cisplatina e análogos são os agentes quimioterápicos mais utilizados no tratamento de câncer endometrial, tumores ovarianos e alguns tumores sólidos. O mecanismo de ação consiste na interrupção da duplicação do DNA. Elas são possivelmente específicas para a fase G2 do ciclo celular e são considerados moderadamente gonadotóxicos¹³. Os antimetabólitos são utilizados no tratamento da leucemia infantil, câncer de mama, câncer de ovário e câncer gastrointestinal. Essa classe inclui o metrotexato, aminopterina, 5-fluorouracila e citarabina; atuam na divisão celular, sendo que não são específicos para nenhuma fase do ciclo celular. Sua gonadotoxicidade é média ou ausente¹³. Os agentes inibidores de topoisomerase são utilizados no tratamento de neoplasias hematológicas e tumores sólidos. Essa classe inclui a bleomicina, actinomicina, doxorubicina e daunorubicina. Seu mecanismo de ação consiste na inibição da atividade da topoisomerase II. Esses agentes são específicos para as fases G2 e S do ciclo celular e também apresentam uma gonotoxicidade média ou ausente. Drogas como a bleomicina induzem mutação letal na maturação e pré-ovulação em oócitos de camundongos. Os novos agentes utilizados atualmente compreendem a droga paclitaxel, que atua no sistema de microtúbulos celulares; essa droga não é específica para nenhuma fase do ciclo celular. Doses elevadas ou a longa duração do tratamento estão associadas com um alto risco de falência ovariana^{2, 12, 14, 15}. As taxas de amenorreia costumam ser mais altas em pacientes tratadas com quimioterapia combinada por 36 semanas comparadas com as das pacientes tratadas por 12 semanas para câncer de mama (83% contra 55%)¹⁶.

Os quimioterápicos comprometem a fertilidade da mulher decorrente de vários fatores não completamente compreendidos. Além da ação citotóxica direta sobre o “pool” de folículos primordiais, uma ação indireta sobre a população de folículos em

crescimento também contribui para a redução da fertilidade. Isso acontece, pois os folículos em crescimento produzem o hormônio anti mulleriano (HAM), o qual regula a captação dos folículos primordiais. Com a queda abrupta dos níveis de HAM, novos folículos primordiais são recrutados, diminuindo ainda mais sua população. O dano causado na granulosa também resulta em dano indireto nos oócitos, já que um regula o crescimento e a maturação do outro¹⁷.

A tabela 1 mostra resumo do mecanismo de ação e do risco de toxicidade ovariana de quimioterápicos comumente utilizados no tratamento do câncer de mama:

Tabela 1 – Mecanismo de ação e risco de toxicidade ovariana de quimioterápicos comumente utilizados no tratamento do câncer de mama.

Classe	Mecanismo de Ação	Quimioterápico	Risco de Toxicidade Ovariana
Agente Anquilante	Ligação no ADN impedindo a separação dos dois filamentos na dupla hélice espiralar.	Cisplatina	Intermediário
		Ciclofosfamida	Alto
Antimetabólito	Inibição da biossíntese dos componentes essenciais do ADN e ARN na fase S do ciclo celular	Metotexate	Baixo
		5 - Fluoracil	Baixo
Antibióticos Antitumorais	Ligação na dupla hélice, interrompendo o prolongamento da cadeia de ADN causando graves distorções cromossômicas.	Doxorrubicina	Intermediário
		Epirubicina	Intermediário
Inibidores Mitóticos	Estabilizam os microtúbulos, impedindo sua quebra e consequentemente a divisão celular.	Paclitaxel	Intermediário
		Docitaxol	Intermediário

Muitas adolescentes desenvolvem amenorreia durante a quimioterapia, mas a falência ovariana primária acontece raramente a não ser que também sejam submetidas à radioterapia pélvica. Assim, os quimioterápicos serão tolerados muito melhor por pacientes mais jovens provavelmente devido às suas maiores reservas foliculares enquanto mulheres de idade mais avançada possuem taxa mais alta de falência ovariana completa e infertilidade permanente¹⁸.

Efeitos da radioterapia sobre a função gonadal

A radiação ionizante tem efeitos adversos na função ovariana. Entretanto, no caso específico do câncer de mama, o tratamento radioterápico, quando indicado, é local e não pélvico, o que o torna pouco relevante como promotor de insuficiência ovariana. De acordo com estudos realizados em modelos animais, o número de folículos primordiais diminui sensivelmente com irradiação¹⁹. O padrão de degeneração pode ser a apoptose de células da granulosa com um oócito relativamente intacto, apoptose de um oócito com células foliculares intactas, ou degenerações apoptóticas dos dois tipos celulares. Folículos ovarianos são mais radiosensíveis durante a fase proliferativa do ciclo menstrual¹⁸. Pacientes mais jovens conseguem preservar mais a função ovariana residual devido à maior reserva de folículos primordiais²⁰. A dose de radiação na qual ocorre a falência ovariana prematura é tida como 20.3 Gy no nascimento, 18.4 Gy os 10 anos, 16.5 Gy aos 20 anos, e 14.3 Gy aos 30 anos². Portanto, mulheres com idade avançada que receberam radioterapia apresentam um risco maior de falência ovariana e amenorreia quando comparadas com mulheres mais jovens¹⁴.

Câncer de mama: quando preservar a fertilidade?

O câncer de mama é responsável por cerca de um quarto de todos os cânceres em mulheres adultas abaixo dos 45 anos²¹. Dos quase 60 mil novos de câncer de mama estimados em 2016, próximo de 7% acontecem antes dos 40 anos de idade⁴. Visando não comprometer a qualidade de vida, da qual a saúde sexual e reprodutiva são elementos fundamentais, levanta-se a questão da preservação da fertilidade. A primeira pergunta que surge é quais são as pacientes às quais devem ser oferecidos procedimentos de preservação de fertilidade. Inicialmente, o foco deste procedimento não é paciente com um prognóstico ruim, mas sim aquelas com uma chance de remissão significativa. O problema da idade é mais complexo, mas consideramos que após os 35 anos a indicação deve ser feita com muita cautela, pois os resultados reprodutivos tendem a ser insatisfatórios, independentemente das técnicas utilizadas. A preservação da fertilidade tem indicação nas mulheres em fase reprodutiva com diagnóstico de câncer de mama, desde que o prognóstico da doença não seja afetado com a ocorrência de uma gravidez.

É importante levar em consideração que não são todas as mulheres que quando tratadas com quimioterapia irão apresentar lesão suficiente nos ovários ao ponto de ter sua fertilidade prejudicada, pelo menos em curto prazo. Um dos fatores principais que deve ser considerado é a idade da paciente. De uma maneira geral, de 40-90% das pacientes na pré-menopausa submetidas à terapia citotóxica irão apresentar amenorreia. Metanálise publicada por Zavos et al em 2016, mostrou que a chance da paciente evoluir para amenorreia após uma quimioterapia para câncer de mama é de 26% (95% IC 12-43%), 39% (95% IC 31-58%) e 77% (95% IC 71-83%) para as mulheres <35, 35-40 e > 40 anos, respectivamente²². Os ciclos podem retornar espontaneamente mesmo até um ano depois do término do tratamento, sendo reversível em cerca de 50% das pacientes com idades de até 35 anos, 30% entre 35-45 anos e 15% acima dos 45 anos^{23, 24}. O fato de a paciente retomar as menstruações não garante a fertilidade. Outro relevante instrumento para a avaliação e acompanhamento da reserva ovariana durante o tratamento em mulheres pré-menopáusicas é a aferição sérica do HAM, o qual diminui rapidamente até atingir níveis indetectáveis na maioria das mulheres durante a quimioterapia e geralmente persistem muito baixo após o

tratamento. Ele pode ser usado como um preditor de amenorreia, mas ainda são necessários ulteriores estudos para determinar seu interesse preditivo para a fertilidade residual pós o tratamento quimioterápico²⁵.

Aproximadamente 10% das mulheres com câncer de mama acabam obtendo uma gravidez após o tratamento²¹. Atualmente, os dados existentes suportam a hipótese de que a gestação não parece afetar de forma negativa o prognóstico de uma paciente tratada por câncer de mama^{21, 26-28}.

Em 2007, os níveis de sobrevida para o câncer de mama aos cinco e 10 anos foram melhores em mulheres australianas que conceberam em relação aos seus controles²⁸. Prognósticos iguais ou superiores aos controles também foram obtidos em outras populações²⁷⁻²⁹. Sankila et al. descreveram esse efeito benéfico como uma marca de identificação de pacientes com melhor prognóstico para o câncer de mama³⁰. Por outro lado, apesar do número insuficiente de informações sobre o acompanhamento de crianças nascidas após a exposição dos ovários aos agentes quimioterápicos, efeitos adversos específicos não foram descritos até o momento, inclusive quando essas drogas foram usadas durante a gestação^{31, 32}.

A quimioterapia está sempre indicada no câncer de mama?

Pacientes com risco de recidiva baixo e algumas com risco moderado, não necessitam de tratamento citotóxico. Avaliar o risco de recidiva de uma paciente não é uma tarefa tão simples, devido aos múltiplos fatores de risco e suas possíveis combinações. A Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica (SBOC) classifica este risco de acordo com a Tabela 2 abaixo³³:

Tabela 2: Diretrizes da SBOC para câncer de mama inicial: definições de categorias de risco para recidiva.

Baixo risco *	Linfonodo negativo e todos os seguintes critérios: ✓ pT ≤2 cm, ✓ Grau 1, ✓ Ausência de extensa invasão vascular e peritumoral ✓ RE e/ou RPg positivos ✓ HER2 negativo ✓ Idade ≥35 anos
Risco intermediário	Linfonodo negativo e pelo menos um dos seguintes critérios: ✓ pT >2 cm, ou ✓ Grau 2-3, ou ✓ Presença de extensa invasão vascular e peri-tumoral Ω , ou ✓ RE e RPg ausentes, ou ✓ HER2/neu gene superexpresso ou amplificado, ou ✓ Idade <35 anos
Alto risco	Linfonodo positivo (1 a 3 LN) e todos os seguintes critérios: ✓ RE e RPg positivos, ✓ HER2/neu gene negative Linfonodo positivo (1-3 LN) e pelo menos um dos seguintes critérios: ✓ RE and RPg ausente, ou ✓ HER2/neu gene super expresso ou amplificado Linfonodo positivo (4 ou mais envolvidos)

* Subtipos histológicos especiais também são considerados de Baixo Risco, desde que o diâmetro tumoral não exceda 3cm e não exista comprometimento de linfonodos axilares. Ω Êmbolos neoplásicos vistos em dois ou mais blocos de tumor. (Adaptado de acordo com a classificação de risco do Consenso de St. Gallen, 2007).

No caso das pacientes com risco moderado, existem alguns testes genéticos que podem ajudar na decisão de realizar ou não quimioterapia, como por exemplo o Oncotype DX^R, o qual pode ser aplicado em pacientes com receptores hormonais positivos e até três linfonodos axilares comprometidos. São avaliados 21 genes, e então atribuído um escore: acima de 31 mostra mais de 30% de risco de recorrência, sendo indicada quimioterapia; abaixo de 18 mostra baixo risco, não sendo necessário tratamento quimioterápico, e valores intermediários devem ser avaliados individualmente^{34, 35}. Outro teste genético semelhante é o Mamaprint^R, o qual avalia 70 genes com o mesmo propósito³⁶.

O câncer de mama apresenta-se sob várias formas, que são diferentes no que se refere à agressividade e ao prognóstico. Cerca de 70% dos carcinomas mamários são

positivos para receptores de estrogênio, e 50% de progesterona, e a presença ou não destes receptores (especialmente o de estrogênio) são de fundamental importância tanto para avaliação de prognóstico, tanto para a otimização do tratamento³⁷. Cerca de 20% de todos os cânceres de mama tem hiperexpressão de receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (HER2), proteína que tem importante papel no crescimento e proliferação celular e resultando em um fenótipo mais agressivo. Sua positividade é alvo para tratamento específico com trastuzumab³⁸. A proteína Ki67 é expressa no núcleo das células, exceto na fase G0. Seu estudo é de bastante importância para constatar o prognóstico de vários tipos de câncer, incluindo o de mama, sendo que a porcentagem de positividade do Ki67 é diretamente proporcional à taxa de proliferação do tumor³⁹. Os tumores de mama que entram na categoria chamada de luminal A são aqueles que apresentam receptor hormonal para estrogênio ou progesterona positivos, HER2 negativo e índice de proliferação celular determinado pelo Ki67 $\leq 14\%$. Quando o Ki67 for maior que 14%, o tumor é considerado luminal B⁴⁰. No subtipo luminal A de câncer de mama, cada vez mais opta-se por endocrinoterapia, já que a adição de quimioterapia prevê mínimo ou nenhum benefício nessas pacientes⁴¹. Infelizmente, o subtipo luminal A tem prevalência menor em pacientes jovens, as quais costumam apresentar subtipos moleculares mais agressivos como tumores triplo negativos ou com superexpressão de HER 2 quando comparado com pacientes de idade mais avançada⁴².

Nessas pacientes jovens, as quais ainda apresentam ciclo menstrual, uma das opções seria o tratamento com tamoxifeno associado a análogos agonistas do GnRH, o que ajuda a tornar a função reprodutiva viável após o término do tratamento⁴³. Trabalho publicado em 2016 compara a sobrevida global e livre de doença em mulheres na pré menopausa com tumores menores de 5cm sem comprometimento linfonodal axilar submetidas a quimioterapia com doxirrubicina e ciclofosfamida seguida de tamoxifeno ou submetidas apenas a endocrinoterapia com análogo de GnRH associado ao tamoxifeno, não sendo encontrada nenhuma diferença⁴⁴.

Na Europa e Canadá, trata-se esses tumores com hormonioterapia adjuvante, mas nos Estados Unidos frequentemente a quimioterapia é indicada⁴⁵.

Todos os casos devem ser individualizados e discutidos com o mastologista e oncologista, visando a melhor abordagem possível para a paciente.

Técnicas de preservação da fertilidade

As principais alternativas para preservar a fertilidade em pacientes com câncer de mama consistem na criopreservação de embriões, oócitos e tecido ovariano. Devem ser considerados, ainda, a opção de supressão da função ovariana com análogos do GnRH, concomitantemente à quimioterapia, além de medicamentos inibidores da apoptose.

Criopreservação de oócitos

Embora o primeiro relato de gravidez com embrião formado a partir de oócito criopreservado tenha mais de 20 anos, a técnica começou a ser mais comumente empregada há cerca de dez anos, com a introdução da injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI) para a fertilização de oócitos criopreservados^{46, 47}. Lee et al. registravam, em 2006, aproximadamente 120 nascimentos provenientes de oócitos criopreservados, o que, há pouco tempo, ainda classificava a técnica como de caráter experimental⁷. Atualmente, o congelamento pela técnica de vitrificação traz novas perspectivas para o procedimento, impondo-se como técnica de melhores resultados, em comparação ao congelamento lento⁴⁸. Entende-se por vitrificação a solidificação a uma temperatura abaixo da temperatura de transição vítrea da solução, não por cristalização de gelo, mas por extrema elevação da viscosidade, empregando-se taxas de resfriamento de -15.000 a -30.000 °C por minuto⁴⁹. Estudo de Cobo et al. registra taxa de sobrevivência de 96,7%, e taxas de gravidez, implantação e gravidez em evolução de 65,2%, 40,8% e 47,8% respectivamente⁵⁰. Outros estudos encontram sobrevivência de 44,7%, fertilização de 75,2% e 147 nascidos vivos de 929 embriões transferidos⁵¹. Tais resultados colocam a técnica de vitrificação de oócitos entre as mais importantes na preservação da fertilidade em pacientes jovens que serão submetidas a tratamento oncológico. Os avanços nas técnicas de criopreservação e as novas possibilidades trazidas pela técnica de vitrificação já fazem do congelamento de

oócitos um método eficiente para a preservação da fertilidade, que deve ser preferido ao congelamento de embriões, quando o objetivo é preservar a fertilidade⁵². Consideramos que a vitrificação oocitária deixa de ser técnica experimental e passa a ser procedimento bem estabelecido nas técnicas de reprodução assistida. A associação de vitrificação de oócitos e congelamento de tecido ovariano representa estratégia importante para essas pacientes⁵². O congelamento de oócitos apresenta vantagens em relação à criopreservação de embriões, tais como a não necessidade de haver um parceiro na ocasião do tratamento. Por outro lado, no caso de falência ovariana prematura, a criopreservação de oócitos não restaura a função endócrina das gônadas; tal fato também acontece na criopreservação de embriões. Questiona-se, igualmente, o fato de que para a obtenção de oócitos faz-se necessária a estimulação farmacológica dos ovários, o que requer tempo, podendo retardar a quimioterapia, e promove elevação nos níveis de estradiol que poderia ser deletéria em alguns tipos de cânceres na mulher. Na prática, porém, tais receios parecem ser infundados, pois a estimulação ovariana não retarda de modo significativo o início da quimioterapia e há métodos de se estimular a ovulação sem que os níveis de estradiol atinjam valores excessivamente altos⁵³⁻⁵⁵. Com relação à segurança, não parece haver maior incidência de anomalias em crianças nascidas após descongelamento de oócitos, independente do tempo de armazenamento⁵⁶⁻⁵⁸. O congelamento de oócitos imaturos, embora mais resistentes aos danos provenientes da criopreservação, é uma técnica que ainda não encontra suporte científico para ser oferecida às pacientes desejosas de preservar a fertilidade.

Criopreservação de embriões

Em 1983, Trounson e Mohr demonstraram pela primeira vez que o embrião humano, fertilizado e cultivado *in vitro* poderia ser congelado, descongelado, e capaz de produzir o nascimento de uma criança saudável⁵⁹. Desde então, diferentes tipos de protocolos de congelamento e descongelamento foram desenvolvidos, cada um específico para os diferentes estágios embrionários. Os embriões podem ser congelados no estágio de pronúcleo, clivados (2 a 8 células) ou na fase de blastocisto^{60, 61}. A exemplo do que ocorre com a criopreservação de oócitos,

resultados animadores vêm sendo obtidos com o uso da vitrificação, especialmente na criopreservação de blastocistos^{62, 51}.

A criopreservação de embriões, embora tenha sido considerado método de eleição na preservação da fertilidade a ser oferecido às pacientes com câncer, perde terreno com os progressos da vitrificação de oócitos⁵¹. Para a criopreservação de embriões, a paciente deve ter um parceiro, ou então recorrer a banco de sêmen. Os problemas éticos e legais que podem advir de embriões congelados também não podem ser relegados a segundo plano⁶³.

Criopreservação de tecido ovariano

A criopreservação de tecido ovariano pode constituir-se na única opção viável em meninas pré-púberes e mesmo em adolescentes e mulheres que não possam ser submetidas à estimulação ovariana para a coleta de oócitos. Até pouco tempo tido como de caráter experimental, as perspectivas se mostram promissoras; o desenvolvimento de novos crioprotetores, como o etilenoglicol, o DMSO e o propanediol, proporcionou resultados satisfatórios com gravidezes repetidas em várias espécies animais⁹. Ressalte-se, igualmente, que investigações realizadas em nosso meio por Almodin *et al.*, foram de grande importância para a consolidação das técnicas de criopreservação de tecido ovariano^{64, 65}. Fragmentos do córtex ovariano podem ser obtidos facilmente por laparoscopia. Em uma mulher de 30 anos de idade, 1,0 mm² de tecido cortical ovariano possui cerca de 35 folículos primordiais; dessa forma, 5 ou 6 fragmentos com uma área total de 110-120 mm², poderiam proporcionar cerca de 4.000 folículos primordiais⁶⁶. Após o tratamento e a cura do câncer, havendo desejo de gravidez, o tecido ovariano poderia ter, como destino, o xenotransplante e o autotransplante. Uma das principais preocupações com o autotransplante seria a possibilidade de reintrodução de células cancerosas no organismo da mulher. Deve ser enfatizado, entretanto, que a maior parte das neoplasias que acometem a mulher em idade reprodutiva, não metastiza para os ovários, com exceção de alguns tipos de leucemias, linfoma de Burkitt e tumores

avançados do cólon e da mama⁹. Oktay e Yih registram que técnicas de biologia molecular e imunoistoquímica devem ser empregadas para rastrear a presença de células cancerosas nos ovários⁶⁷. Essa preocupação levou à verificação da possibilidade do xenotransplante. Foi demonstrada a ocorrência de desenvolvimento folicular em tecido ovariano humano descongelado e transplantado em rato imunodeficiente, mas, além de natural aversão que a técnica pode suscitar, a possibilidade de transmissão de infecções cruzadas retrovirais ou alteração do genoma humano não podem ser totalmente afastadas⁹. As possibilidades existentes quanto ao autotransplante são duas: o transplante ortotópico e o heterotópico. No primeiro caso, o tecido é transplantado no próprio sítio ovariano. No segundo caso, o tecido ovariano pode ser transplantado para o tecido subcutâneo do antebraço ou do abdome, e embora tenham sido relatadas transferências de embriões, não há relatos de gestações em evolução. Digno de nota é o fato de que o desenvolvimento folicular em sítio heterotópico não parece ser completamente normal, pois a maioria dos folículos não ultrapassa 15 mm em seu maior diâmetro. Fatores como temperatura, ambiente e pressão locais no tecido subcutâneo podem ser responsáveis pela má qualidade oocitária⁶⁸. Atualmente, a retirada do córtex de ovário direito, e posterior reimplante em ovário esquerdo, parece ser a técnica que oferece os melhores resultados⁶⁹. Esta técnica se mostra bastante promissora, com resultados cada vez mais animadores⁷⁰. Até meados de 2015, foram registrados o nascimento de 60 crianças após criopreservação e posterior autotransplante⁷¹.

A preservação e o transplante do ovário inteiro, por meio de anastomose vascular, é motivo de muitos estudos em ovelhas; na espécie humana, embora haja relatos promissores, a técnica ainda é totalmente experimental e necessita de estudos adicionais⁷², tendo a vitrificação um papel importante também neste método⁷³.

A associação de criopreservação de tecido ovariano e de oócitos pode aumentar a eficiência da preservação da fertilidade. Ressalte-se que quando se faz tal associação de métodos, a retirada de tecido ovariano deve ser feita sempre antes da estimulação ovariana para coleta oocitária⁷⁴.

Emprego dos análogos do GnRH

O GnRH é o principal regulador hipotalâmico da função reprodutora e atua sobre os gonadotrofos da hipófise anterior, levando à liberação dos hormônios gonadotrópicos, que incluem o hormônio luteinizante – LH, e o hormônio folículo-estimulante – FSH. Algumas teorias tentam explicar o possível efeito benéfico da administração do análogo de GnRH (GnRH-a) dez dias antes do início e durante o tratamento quimioterápico¹⁴. Uma delas seria a diminuição do número de folículos primordiais recrutados, os quais são mais vulneráveis à quimioterapia. O bloqueio sobre os ovários, mantendo os folículos quiescentes, seria capaz de minimizar os danos promovidos pelos quimioterápicos. Além disso, o GnRH-a é capaz de levar a uma diminuição na irrigação sanguínea dos ovários, o que dificultaria a distribuição das drogas quimioterápicas nas gônadas. O GnRH também regula moléculas anti-apoptóticas intragonadais como a esfingosina-1-fosfato protegendo o folículo^{75, 76}.

Os ensaios clínicos que estudam o efeito do GnRH-a nos ovários durante o tratamento quimioterápico são bastante heterogêneos e com diferentes parâmetros de avaliação. Apesar das diversas revisões sistemáticas e metanálises sobre o assunto, os resultados variam dependendo de quais estudos foram incluídos ou não⁷⁷. Alguns estudos mostram que o seu uso pode ter efeitos benéficos na preservação da função ovariana e talvez na recuperação de menstruações regulares após o tratamento quimioterápico, mas faltam evidências conclusivas para comprovar a segurança e eficácia do seu uso para a preservação da fertilidade⁷⁸⁻⁸⁰. Outros sugerem que a supressão ovariana promovida pelo GnRH-a parece proteger não só contra a falência ovariana reduzindo o risco de menopausa precoce, mas também melhorar a fertilidade^{81, 82, 75}.

Devido às diferentes ações dos diversos quimioterápicos, considera-se que o uso do GnRH-a possa ter efeito benéfico na proteção ovariana em alguns esquemas e não funcionar ou até mesmo prejudicar os ovários em outros. A ciclofosfamida causa dano folicular direto, e o declínio do HAM acelera o recrutamento folicular, esgotando a reserva ovariana. Administrado com o GnRH, acontece menos apoptose folicular e

não há queda significativa do HAM e, conseqüentemente, menos recrutamento folicular, existindo um efeito protetor. A lesão vascular induzida pela doxorubicina causa a inibição transitória do crescimento folicular e resulta na elevação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) como parte do mecanismo de recuperação do ovário, manifestando-se posteriormente como neovascularização cortical. A co-administração de GnRH-a com doxorubicina, bloqueia a elevação do VEGF, comprometendo assim o processo de recuperação vascular do ovário e prolongando o comprometimento folicular⁸³.

As controvérsias continuam, mas, devido a sua natureza não invasiva, a facilidade de disponibilidade e na ausência de efeitos negativos dos análogos do GnRH sobre o tratamento quimioterápico, alguns autores sugerem que não há porque não empregá-los na tentativa de minimizar os efeitos nocivos dos quimioterápicos sobre os ovários⁸⁴.

Com relação aos análogos antagonistas do GnRH, há evidências de que não promovam quaisquer benefícios na preservação da função ovariana, havendo inclusive dados experimentais que discutem uma possível ação deletéria dos antagonistas sobre os folículos primordiais⁸⁵.

A questão dos análogos do GnRH permanece em aberto, seja no que diz respeito aos agonistas e, principalmente, aos antagonistas.

Contraceptivos orais

Em estudo retrospectivo incluindo mulheres jovens que passaram por quimioterapia gonadotóxica, foi encontrado um possível efeito protetor dos contraceptivos orais; porém, estes não foram totalmente eficazes em diminuir a incidência de falência ovariana, provavelmente porque o efeito supressor dos mesmos não promove o bloqueio completo do eixo hipotálamo-hipofisário, havendo recrutamento folicular no ovário sem dominância folicular e ovulação⁸⁶. Estudo que avaliou níveis de hormônio anti-mülleriano em pacientes submetidas à quimioterapia por linfoma de Hodgkin

associado à contraceptivos orais ou GnRH-a foi encerrado precocemente após a avaliação inicial não mostrar nenhuma proteção em nenhum dos dois grupos, com queda do HAM em todas as pacientes⁸⁷.

Não há, no momento, evidências que justifique a administração de contraceptivos como quimioprotetores ovarianos.

Inibidores apoptóticos

A apoptose é um fenômeno normal tanto nas células germinativas femininas quanto nas masculinas. A programação genética e inúmeras vias celulares estão envolvidas neste processo⁸⁸. Várias drogas quimioterápicas podem ativar estas vias apoptóticas, levando à depleção oocitária e à falência ovariana prematura. Os inibidores apoptóticos podem ser potencialmente utilizados como uma ferramenta farmacológica para parar a apoptose induzida pela quimioterapia ou radioterapia e proteger a paciente de uma falência ovariana prematura. Como muitos agentes quimioterápicos atuam por meio de apoptose no tumor, ulteriores estudos ainda são necessários para estabelecer a efetividade dos inibidores apoptóticos para a preservação da fertilidade e assegurar que as taxas de cura do câncer não serão comprometidas⁸⁹.

Estimulação ovariana em pacientes com câncer de mama

Para a coleta de oócitos destinados ou a criopreservação ou à formação de embriões para serem criopreservados, faz-se necessária a estimulação farmacológica da ovulação. Tal fato pode suscitar dúvidas em pacientes com câncer de mama, pelo tempo necessário à estimulação ovariana e nas pacientes que apresentam tumores com receptores estrogênicos positivos, pois a estimulação ovariana eleva os níveis de estradiol a valores suprafisiológicos. Com relação ao tempo necessário para a coleta de oócitos, verifica-se que as mulheres que são encaminhadas rapidamente a um

centro de reprodução humana não retardam de modo significativo o início do tratamento oncológico⁵³.

Não há evidências de que a estimulação ovariana empregada para coleta oocitária agrave o prognóstico do câncer de mama, e tal fato não deve se constituir em contra-indicação em mulheres jovens com doença inicial que desejem preservação da fertilidade, desde que sejam utilizados esquemas apropriados^{90, 91}. Esses esquemas de estimulação ovariana, para minimizar os possíveis riscos nessas mulheres, compreendem gonadotropinas associadas a agentes que diminuem as concentrações de estrogênios, como o tamoxifeno e os inibidores da aromatase⁹². Os inibidores da aromatase são de primeira escolha, pois levam a níveis de estradiol mais baixos quando comparados ao tamoxifeno⁹². Dessa forma, os inibidores da aromatase são as principais drogas coadjuvantes na estimulação ovariana em mulheres com câncer de mama, especialmente o letrozol, que tem o efeito de potencializar a resposta ovariana diminuindo significativamente os níveis de estradiol^{91, 93}. O letrozol deve ser empregado concomitantemente às gonadotropinas, na dose de 5,0 mg diários por via oral, até o dia da maturação folicular final⁹¹. Atualmente, no Centro de Referência da Saúde da Mulher – Hospital Pérola Byington, o letrozol e o tamoxifeno são associados em pacientes com indicação de quimioterapia neoadjuvante com receptor hormonal positivo, enquanto o letrozol é utilizado sempre, inclusive em nos tumores com receptor hormonal negativo. A estimulação ovariana pode ser feita empregando-se de 150 a 300 UI de FSH recombinante ou de hMG altamente purificado, em associação com 5,0 mg diários de letrozol por via oral, até o dia da maturação folicular final. A prevenção da liberação extemporânea de LH deve ser feita com antagonistas do GnRH. A estimulação ovariana pode ser iniciada em qualquer dia do ciclo menstrual, não sendo necessário aguardar o início da menstruação para o tratamento⁹⁴. Isso é possível, pois em mulheres em idade reprodutiva, duas ou três ondas de folículos antrais acontecem durante cada intervalo interovulatório no ciclo menstrual, e quando os folículos atingem a fase de antrais, se tornam susceptíveis as gonadotropinas⁹⁵.

OBJETIVOS

A presente investigação tem objetivo apresentar os resultados obtidos em pacientes com câncer de mama submetidas a programa de criopreservação de oócitos por meio de protocolos específicos de estimulação ovariana controlada.

Objetivos específicos

- 1- Avaliar o número de oócitos coletados e o número de oócitos criopreservados;
- 2- Avaliar a duração do tratamento de estimulação ovariana controlada;
- 3- Avaliar a dose total de gonadotropinas utilizada nos protocolos de EOC;
- 4- Avaliar os níveis séricos de estradiol no dia da maturação folicular final;
- 5- Comparar esses parâmetros de acordo coma fase do ciclo menstrual em que se iniciou a estimulação;
- 6- Realizar as mesmas avaliações, separadamente, nas pacientes submetidas a quimioterapia neoadjuvante

CASUÍSTICA E MÉTODO

Para o cálculo amostral, foi realizado um estudo de prevalência de variáveis explanatórias da amostra representativa.

Uma vez que os dados foram coletados em um centro de referência em reprodução assistida, e um dos poucos que oferecem gratuitamente a possibilidade de preservar o potencial reprodutivo da mulher que irá se submeter a tratamento citotóxico, supõe-se que o plano amostral tende a ser probabilístico.

Cerca de 6% dos cânceres de mama acontecem em mulheres abaixo dos 40 anos^{4, 96}. Admitindo que cerca de metade das pacientes cogitaria uma gestação após o tratamento de uma neoplasia maligna⁵, o valor de taxa de prevalência (P) para o calculo amostral é de 3%. Considerando o intervalo de confiança de 95% (IC95%) e erro determinístico (Erro) de 5%, calcula-se o tamanho mínimo de amostra com a seguinte equação^{97, 98}:

$$n = IC95\%^2 * \frac{P(1 - P)}{Erro^2}$$

O tamanho mínimo amostral é de 45.

Foram avaliadas 109 pacientes com câncer de mama e com desejo de manter a função reprodutiva após o tratamento oncológico, submetidas à criopreservação de oócitos por meio de protocolos específicos, que incluem:

1. Início aleatório, começando-se a estimulação em qualquer dia do ciclo menstrual, para se evitar demora indesejável no início da quimioterapia;
2. Associação de um inibidor de aromatase, o letrozol, para diminuir as altas concentrações de estradiol consequentes à EOC;
3. Associação de tamoxifeno e heparina de baixo peso molecular, nos casos de quimioterapia neoadjuvante;
4. Desencadeamento da maturação folicular final com análogo agonista do GnRH, visando a prevenção da síndrome da hiperestimulação ovariana.

Os protocolos utilizados para a EOC estão resumidos na tabela abaixo:

Figura 1 – Diferentes protocolos de EOC individualizados para cada paciente deste estudo:

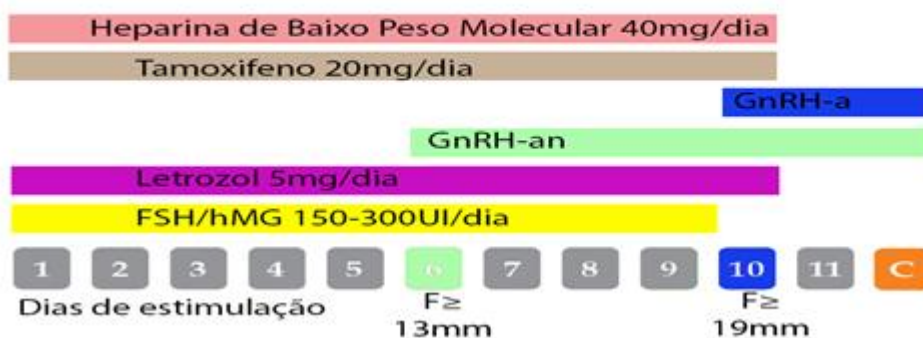
Fase Folicular Inicial



Fase Folicular Tardia



Fase Lútea



-  Análogo antagonista do GnRH - GnRH-an 0,25mg
-  Análogo agonista do GnRH - GnRH-a 0,2mg
-  Letrozol 5mg/dia
-  Hormônio Folículo Estimulante / Gonadotrofina Menopáusica Humana - FSH/hMG 150-300UI/dia
-  Captação de oócitos

Caso tumor responsivo a estrogênio presente no momento da indução:

-  Tamoxifeno 20mg/dia
-  Heparina de Baixo Peso Molecular 40mg/dia

Os parâmetros avaliados foram:

1. A duração, em dias, da EOC;
2. O número de oócitos coletados;
3. O número de oócitos maduros (metáfase II), que foram criopreservados;
4. A dose total de gonadotropinas utilizada;
5. Os níveis de estradiol no dia do desencadeamento da maturação folicular.

Esses resultados foram também avaliados comparando-se a fase do ciclo menstrual em que a EOC foi iniciada, a saber, fase folicular inicial, fase folicular tardia e fase lútea.

Além da análise de todos os 109 ciclos de EOC, foram avaliados separadamente os 40 casos de EOC na quimioterapia neoadjuvante, cujo protocolo prevê a administração do tamoxifeno associado ao letrozol, além da administração profilática de enoxaparina.

O método estatístico utilizado foi o modelo de regressão logística multinomial, considerando $p < 0.05$ para significância estatística.

COMITÉ DE ÉTICA

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética em pesquisa do Centro de Referência da Saúde da Mulher, tendo sido aprovado em 29 de outubro de 2014, sob o número 848.880 (ver anexo).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e a discussão são apresentados nos manuscritos submetidos à publicação, que se encontram no capítulo a seguir.

ARTIGO 1

A specific controlled ovarian stimulation (COS) protocol for fertility preservation in women with breast cancer undergoing neoadjuvant chemotherapy

Felipe Cavagna^{a,b}, Anagloria Pontes^b, Mario Cavagna^a, Artur Dzik^a, Nilka F. Donadio^a, Michelle T. Nagai^a, Rafael Portela^a, Luiz H. Gebrim^a.

^aWomen's Health Reference Center, Hospital Perola Byington, São Paulo, Brazil.

^bPost-Graduation Program in Gynecology, Obstetrics and Mastology, São Paulo State University (UNESP) - Botucatu, São Paulo, Brazil.

Corresponding author: Felipe Cavagna

E mail adress: cavfelipe@hotmail.com

Felipe Cavagna obtained his medical degree in 2005. He is specialist in Gynecology, Obstetrics and Mastology. Presently, he is Coordinator of the Residency Program in Mastology at the Women's Health Reference Center, in Sao Paulo, and is a PhD student at Botucatu Medical School of Sao Paulo State University, UNESP, (Botucatu, SP, Brazil).

Abstract

The authors present a novel and specific controlled ovarian stimulation protocol for fertility preservation in women with estrogen-positive receptor breast cancer undergoing neoadjuvant chemotherapy. The protocol foresees random start ovarian stimulation and the use of letrozole associated to tamoxifen, in order to protect the patient by two different mechanisms of action: diminishing estradiol levels with the aromatase inhibitor and competition in the estradiol receptors by tamoxifen. Aiming at preventing venous thromboembolism, a prophylactic dose of high molecular weight heparin was administered throughout ovarian stimulation. Forty breast cancer patients were included in the study. The mean age of patients was 30.43 ± 4.25 years. Nineteen women commenced COS in the luteal phase, eleven in the early follicular phase and ten in the late follicular phase. The mean number of collected oocytes was 11.78 ± 9.12 and the mean number of vitrified oocytes was 9.72 ± 7.36 . The mean duration of COS was 10.03 ± 1.33 days. The mean estradiol concentrations on the triggering day were 623.10 ± 441.27 , and the mean dose of gonadotropins administered was 2540 ± 713.10 . The authors suggest that the protocol is efficient and may be a good option for oocyte vitrification in these patients.

Keywords: breast cancer; fertility preservation; random-start ovarian stimulation; letrozole; tamoxifen.

Introduction

Breast cancer is the most common malignancy in adult women, and in the United States, 5%–7% of cases of invasive breast cancer (~11,000/year) occur in women who are under age 40 at diagnosis (Kim et al., 2011). Given the advent of early breast cancer diagnosis and effective cancer treatments, survival rates following breast cancer are increasing, with a 5-year survival rate over 80% (Hickey et al., 2009; Morgan et al., 2010). This fact justifies the concern about chemotherapy-related gonadal toxicity in women with reproductive wishes. Chemotherapy treatment may have deleterious effects on the ovarian reserve, by affecting the resting pool of primordial follicles or the growing follicle population (Morgan et al., 2010). Given that, it is important to consider early referral of breast cancer young patients to fertility specialists, in order to discuss fertility preservation procedures (von Wolff et al., 2015; Srikanthan et al., 2016). Among these, medical ovarian protection, ovarian tissue cryopreservation, oocytes or embryos cryopreservation are the most common fertility preservation strategies (Sonmezer and Oktay, 2006; de Pedro et al., 2015; Lambertini et al., 2016). As occurs in conventional in vitro fertilization (IVF) techniques, to obtain oocytes or embryos for cryopreservation, controlled ovarian stimulation (COS) is the first step to be considered. Performing COS in breast cancer patients prior to surgery may promote concerns about the risks of delaying chemotherapy treatment and exposing a breast cancer patient to high estradiol levels consequent to multiple follicle development, mainly in hormone-receptor positive tumors (Azim et al., 2008). To mitigate the effect of high estradiol levels, the use of aromatase inhibitors has been demonstrated to be safe and efficient (Reddy and Oktay, 2012; Checa-Vizcaino et al., 2012). In this serie of cases, we performed COS in estrogen-receptor positive breast cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy, and we proposed the concomitant administration of letrozole and tamoxifen with gonadotropins, which may be a safe approach in such type of cancers. It is possible that their different mechanisms of action would be complementary, with the aromatase inhibitor decreasing the estrogen level and thus allowing tamoxifen to function more effectively as a competitive inhibitor with estradiol. In order to mitigate thromboembolic event, which is a serious complication of cancer (Brand et al., 2016),

and which can be exacerbated by the use of tamoxifen (Anderson and Weitz, 2010) we proposed the prophylactic use of a low molecular weight heparin, enoxaparin, administered on a daily basis, throughout ovarian stimulation.

The present investigation has the intention to present the results obtained in those patients with estrogen positive breast cancer submitted to the specific protocol of controlled ovarian stimulation to oocyte cryopreservation.

Material and Methods

This is an observational cross sectional study of breast cancer patients undergoing COS for fertility preservation in a tertiary public hospital. Between November 2014 and December 2016, forty women with hormone-receptor positive breast cancer and indication of neoadjuvant chemotherapy underwent random start COS for fertility preservation, in a public IVF center in Sao Paulo, Brazil. The patients were divided in three groups, according to the phase of the menstrual cycle:

Initial Follicular Phase Group (IFP, n= 11): the COS was initiated in the beginning of the follicular phase, in which a dominant follicle (>10 mm) was not detected.

Late Follicular Phase Group (LFP, n=19): the COS was initiated in the late follicular phase, in the presence of a dominant follicle > 10 mm;

Luteal Phase Group (LP, n=10): the COS was initiated in the luteal phase, with ultrasound evidence of follicular rupture and (or) an endometrium of secretory pattern.

COS was performed either with recombinant FSH or hMG, in a daily dose of 150-300 IU. The gonadotropin starting dose was chosen according to the antral follicle count: 150 IU daily with ≥ 15 antral follicles, 225 IU daily with $<15 \leq 10$ antral follicles and 300 IU daily with < 10 antral follicles. When COS was initiated in the late follicular phase, with the presence of a follicle > 10 mm, a GnRH antagonist was introduced concomitantly with the gonadotropin; otherwise, the antagonist was introduced in the presence of a follicle ≥ 13 mm. Concomitantly with COS, letrozole in a dose of 5 mg and tamoxifen in a dose of 20 mg were given orally on a daily basis. Enoxaparin was given daily in a dose of 40 mg subcutaneously, as a prophylactic measure. The trigger was performed with 0.2 mg of triptorelin, in the presence of follicles ≥ 19 mm. Oocyte retrieval was scheduled 35-36 hours after triptorelin injection. After the oocyte retrieval, the patients discontinued any medication. Our main outcome measures were

the number of oocytes collected and number of oocytes vitrified, the length of ovarian stimulation, total dose of gonadotropins administered, and levels of estradiol on the day of the trigger. The secondary outcome measure was to determine whether there are differences in the outcomes according to the phase of the cycle in which COS was initiated.

Criteria of inclusion and exclusion

Patients diagnosed with hormone-positive breast cancer and indication of neoadjuvant chemotherapy were included in this investigation. Patients with advanced and metastatic disease, and with age > 40 years were not included in the fertility preservation program.

Ethics

This research was approved by the Committee of Ethics in Research of the Women's Health Reference Center, in Sao Paulo, on 29 October 2014, under the number 848.880.

Statistical analysis

The statistical model applied was the multinomial logistic regression. The level of statistical significance was considered to be a p-value of less than 0.05.

Results

This study included 40 patients with hormone receptor positive breast cancer undergoing neoadjuvant chemotherapy. The mean age of patients was 30.43 ± 4.25 years (range, 21-39). The average duration of COS was 10.03 ± 1.33 days (range, 8-13). In all 40 patients it was collected 459 oocytes. Of these, 399 (86.92%) were in

metaphase II and were vitrified. The remainder were in metaphase I or germinal vesicle stage, and were discarded. The mean number of collected oocytes was 11.78 ± 9.12 (range, 1-38) and the mean number of vitrified oocytes was 9.72 ± 7.36 (range, 0-34). The mean total dose of FSH administered was 2540.00 ± 713.10 IU, and the mean estradiol concentrations on the triggering day were 623.10 ± 441.27 pg/mL. Nineteen women commenced COS in the luteal phase (LP), eleven in the initial follicular phase (IFP) and ten in the late follicular phase (LFP). When comparing the outcomes according to the phase of the cycle in which COS was commenced, there were no significant differences in the number of oocytes collected and vitrified, ovarian stimulation length, total dose of gonadotropin administered and estradiol levels on the trigger day phase. The results are shown in Table 1. In figure 1, the box plots graphs show the overall mean values, standard deviation and outliers of the mean values.

Discussion

Embryo and oocyte cryopreservation are the most established methods of fertility preservation, although ovarian tissue cryopreservation has been demonstrated to be an useful option (van der Ven et al., 2016). Regarding oocyte cryopreservation, it was shown that women treated of breast cancer who have their oocytes vitrified before chemotherapy have good IVF performance and good obstetric outcomes, when compared to age-matched patients (Martinez et al., 2014). To perform embryos or oocytes cryopreservation, COS is the first step to be considered. Regarding this issue, some concerns may emerge, such as delaying chemotherapy treatment and exposing a breast cancer patient to high estradiol levels, particularly when the tumor is present, as occurs in the cases of neoadjuvant chemotherapy. The stimulation required for oocyte retrieval could delay oncologic treatment, given that the conventional COS may require up to 6 weeks to be concluded, if initiated in the beginning of the follicular phase. Random-start ovarian stimulation, which means initiating COS immediately, regardless of the patient's menstrual-cycle phase, has become a well-established approach in fertility preservation strategies, allowing oocyte retrieval in no more than two weeks, in the majority of the cases (Cakmak and Rosen, 2015; Mangili et al., 2016). Currently, random-start ovarian stimulation is routinely and successfully employed for emergency IVF (Rashidi et al., 2014; Kim et al., 2015; Robertson et al.,

2016), and the outcome of ovarian stimulation seems to be similar after stimulation initiation during any phase of the menstrual cycles (von Wolff et al., 2016). Recently, it was reported that the formation of euploid blastocyst does not depend on the phase of the cycle in which ovarian stimulation commences (Ubaldi et al., 2016). Even though we did not perform more than one ovarian stimulation in our study, random start leads to the possibility for some patients to undergo more than one COS cycles before chemotherapy, aiming at obtaining a greater number of cryopreserved oocytes. Another concern might be the high estradiol levels consequent to ovarian stimulation, particularly in hormone-positive breast cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy. In order to reduce estradiol concentrations, ovarian stimulation with aromatase inhibitors has been proved to be an efficient procedure (Reddy and Oktay, 2012). Recent publications also confirm that the adjuvant therapy with letrozole, throughout the duration of the COS, is a safe and efficient approach (Domingo e Garcia-Velasco, 2016; Kim et al., 2016; Pereira et al., 2016). The most employed aromatase inhibitor in ovarian stimulation protocols is letrozole, which has been proved to be more efficient than anastrozole for this purpose (Azim et al., 2007). Another option to decrease estradiol levels could be the protocol performing profound LH suppression by high and sustained GnRH antagonist dosis, which maintains estradiol levels around the physiological range (Adda-Herzog et al., 2014). This approach, however, has the inconvenient of the high cost due to the elevated daily dose of the GnRH antagonist. When the indication is neoadjuvant chemotherapy, and the cancer is hormone-receptor positive, the concerns about estradiol levels augment, because of the presence of the tumor during ovarian stimulation. In this study, we present a specific COS for patients undergoing neoadjuvant chemotherapy. Besides the use of letrozole, we also propose the administration of tamoxifen, which is a selective estrogen receptor modulator with antagonist effect on the breast. The use of letrozole together with tamoxifen may protect the patient by two different mechanisms of action: diminishing estradiol levels with the aromatase inhibitor and by competition in the estradiol receptors by tamoxifen. As well as letrozole, it was already demonstrated that tamoxifen can be safely employed to perform ovarian stimulation in breast cancer patients (Oktay et al., 2003). The risk of thromboembolic complications can be minimized by the prophylactic use of a low molecular weight heparin, enoxaparin, in a daily basis. Being so, the random start COS prevents the delay to start chemotherapy, and the concomitant use of letrozole and tamoxifen may

help to make the procedure safer. Furthermore, we propose the administration of enoxaparin to prevent venous thromboembolism. The use of GnRH agonist to trigger final oocyte maturation avoids the occurrence of hyperstimulation ovarian syndrome, which is an important complication of ovarian stimulation, making the procedure safer (Thomsen and Humaidan, 2015). There is no place for hCG trigger in COS for cryopreservation of oocytes or embryos. Our results showed an adequate number of oocytes retrieved and cryopreserved, with relative low concentrations of estradiol and without occurrence of any complications. The mean estradiol concentrations observed with this protocol (623.10 ± 44.27 pg/mL) was considerably lower than in conventional COS for IVF, considering that serum estradiol levels during COS are increased by 10-fold compared with those of natural cycles (Joo et al., 2010). Regarding the outcomes evaluated, it was not observed any statistically significant difference among the three groups studied (IFP, LFP and LP). In performing COS with this specific protocol, we observed a high rate of oocyte maturity (86.92%) even considering that in fertility preservation procedures we generally aspirate all follicles, including those very small which would be ignored in a conventional IVF treatment. It was also observed that some patients, although young, have a poor response to ovarian stimulation. In a 34-year-old patient, we retrieved only one immature oocyte, and vitrification was not possible. It was previously registered that the number of oocytes retrieved in breast cancer patients with BRCA1 mutations is significantly lower compared to BRCA negative and untested patients (Oktay et al., 2009). On the other hand, it was recently described that women with gynecological cancer have less number of retrieved mature oocytes compared with hematological diseases and breast cancer patients (Alvarez and Ramanathan, 2016). Interestingly, it was also recently reported that both healthy and cancer-affected BRCA mutation women have normal response to COS in IVF cycles (Shapira et al., 2015). However, the outcomes observed in this investigation were comparable to conventional IVF results, with significant lower estradiol levels. Obviously, women affected with BRCA mutations may have concerns about transmission of the mutation to offspring. In these cases, preimplantation genetic diagnosis to avoid the birth of affected offspring is ethically acceptable (The Ethics Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2005). We postulate that the administration of tamoxifen, concomitantly with letrozole, can also provide an additional safeness to the procedure, by competing with estrogen receptors. The results of this investigation

suggest that a specific protocol of ovarian stimulation for fertility preservation in women with hormone-receptor positive breast cancer undergoing neoadjuvant chemotherapy, may be an effective procedure.

References

Adda-Herzog E., Gallot V., Le Bras A., Hesters L., Fanchin R., 2014. Natural ovarian stimulation (NATOS): an innovative estradiol-sparing, multiple follicle protocol suitable for fertility preservation in women with breast cancer. *Hum. Reprod.* 29(suppl 1), i241.

Alvarez R.M., Ramanathan P., 2016. Fertility preservation in female oncology patients: the influence of the type of cancer on ovarian stimulation response. *Hum. Reprod.* doi: 10.1093/humrep/dew158

Anderson J.A., Weitz J.I., 2010. Hypercoagulable states. *Clin. Chest. Med.* 31:659–673.

Azim A.A., Costantini-Ferrando M., Lostritto K., Oktay K., 2007. Relative Potencies of Anastrozole and Letrozole to Suppress Estradiol in Breast Cancer Patients Undergoing Ovarian Stimulation before in Vitro Fertilization. *J.Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 2197-2200.

Azim AA, Costantini-Ferrando M, Oktay K., 2008. Safety of fertility preservation by ovarian stimulation with letrozole and gonadotropins in patients with breast cancer: a prospective controlled study. *J. Clin. Oncol.* 26, 2630-2635.

Brand J.S., Hedayati E., Bhoo-Pathy N., Bergh J., Hall P., Humphreys K., Ludvigsson J.F., Czene K., 2016. Time-dependent risk and predictors of venous thromboembolism in breast cancer patients: A population-based cohort study. *Cancer.* 123, 468-475.

Cakmak H., Rosen M.P., 2015. Random-start ovarian stimulation in patients with cancer. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 27, 215-221

Checa-Vizcaíno M.A., Corchado A.R., Cuadri M.E., Comadran M.G., Brassesco M., Carreras R., 2012. The effects of letrozole on ovarian stimulation for fertility preservation in cancer-affected women. *Reprod. Biomed. Online.* 24, 606-610.

De Pedro M., Otero B., Martin B., 2015. Fertility preservation and breast cancer: a review. *Ecancermedicalscience.* 9, 1-20.

Domingo J., Garcia-Velasco J.A., 2016. Oocyte cryopreservation for fertility preservation in women with cancer. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 23, 465-469.

Hickey M., Peate M., Saunders C.M., Friedlander M., 2009. Breast cancer in young women and its impact on reproductive function. *Hum. Reprod. Update.* 15, 323-39.

Joo B.S., Park S.H., An B.M., Kim K.S., Moon S.E., Moon H.S., 2010. Serum estradiol levels during controlled ovarian hyperstimulation influence the pregnancy outcome of in vitro fertilization in a concentration-dependent manner. *Fertil. Steril.* 93, 442-446

Kim J., Turan V., Oktay K., 2016. Long-term safety of letrozole and gonadotropin stimulation for fertility preservation in women with breast cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 101, 1364-1371

Kim J.H., Kim S.K., Lee H.J., Lee J.R., Jee B.C., Suh C.S., Kim S.H., 2015. Efficacy of random-start controlled ovarian stimulation in cancer patients. *J. Korean Med. Sci.* 30, 290-295.

Kim S.S., Klem J., Fabian C., 2011. Breast cancer and fertility preservation. *Fertil. Steril.* 95, 1535-1543.

Lambertini M., Cinquini M., Moschetti I., Peccatori F.A., Anserini P., Valenzano-Menada M., Tomirotti M., Del Mastro L., 2016. Temporary ovarian suppression

during chemotherapy to preserve ovarian function and fertility in breast cancer patients: A GRADE approach for evidence evaluation and recommendations by the Italian Association of Medical Oncology. *Eur. J. Cancer.* 8, 25-33.

Mangili G., Papaleo E., Sigismondi C., Masciangelo R., Sarais V., Giorgione V., Nale R., Privitera L., Carnelli L., Di Mattei V., Candiani M., 2016. Timing should no longer be an obstacle to oocyte cryopreservation in patients with cancer. *Tumori.* doi: 10.5301/tj.5000586.

Martinez M., Rabadan S., Domingo J., Cobo A., Pellicer A., Garcia-Velasco J.A., 2014. Obstetric outcome after oocyte vitrification and warming for fertility preservation in women with cancer. *Reprod. Biomed. Online.* 29, 722-728.

Morgan S., Anderson R.A., Gourley C., Wallace W.H., Spears N., 2012. How do chemotherapeutic agents damage the ovary? *Hum. Reprod. Update.* 18, 525-535.

Oktay K., Buyuk E., Davis O., Yermakova I., Veeck L., Rosenwaks Z., 2003. Fertility preservation in breast cancer patients: IVF and embryo cryopreservation after ovarian stimulation with tamoxifen. *Hum. Reprod.* 18, 90-95.

Oktay K., Kim J., Barad D., Gleicher N., Babayev S., 2009. Association of BRCA1 mutations with diminished ovarian reserve: A common genetic mechanism for breast/ovarian cancer, and infertility? *J. Clin. Oncol.* 20, (15_suppl):11039.

Pereira N., Hancock K., Cordeiro C.N., Lekovich J.P., Schattman G.L., Rosenwaks Z., 2016. Comparison of ovarian stimulation response in patients with breast cancer undergoing ovarian stimulation with letrozole and gonadotropins to patients undergoing ovarian stimulation with gonadotropins alone for elective cryopreservation of oocytes. *Gynecol. Endocrinol.* 32, 823-826

Rashidi B.H., Tehrani E.S., Ghaffari F., 2014. Ovarian stimulation for emergency fertility preservation in cancer patients: A case series study. *Gynecol. Oncol. Rep.* 10, 19-21.

Reddy J, Oktay K., 2012. Ovarian stimulation and fertility preservation with the use of aromatase inhibitors in women with breast cancer. *Fertil. Steril.* 98, 1363-1369.

Robertson D.M., Gilchrist R.B., Ledger W.L., Baerwald A., 2016. Random start or emergency IVF/in vitro maturation: a new rapid approach to fertility preservation. *Womens Health (Lond).* 12, 339-349.

Shapira M., Raanani H., Feldman B., Srebnik N., Dereck-Haim S., Manela D., Brenghausen M., Geva-Lerner L., Friedman E., Levi-Lahad E., Goldberg D., Perri T., Eldar-Geva T., Meirow D., 2015. BRCA mutation carriers show normal ovarian response in in vitro fertilization cycles. *Fertil. Steril.* 104, 1162-1167.

Sonmezer M., Oktay K., 2006. Fertility preservation in young women undergoing breast cancer therapy. *Oncologist.* 11, 422-434.

Srikanthan A., Amir E., Warner E., 2016. Does a dedicated program for young breast cancer patients affect the likelihood of fertility preservation discussion and referral? *Breast.* 27,22-26.

The Ethics Committee of the American Society for Reproductive Medicine. 2005. Fertility preservation and reproduction in cancer patients. *Fertil. Steril.* 83, 1622-1628.

Thomsen L., Humaidan P., 2015. Ovarian hyperstimulation syndrome in the 21st century: the role of gonadotropin-releasing hormone agonist trigger and kisspeptin. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 27, 210-214.

Ubaldi F.M., 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.

van der Ven H., Liebenthron J., Beckmann M., Toth B., Korell M., Krüssel J., Frambach T., Kupka M., Hohl M.K., Winkler-Crepaz K., Seitz S., Dogan A., Griesinger G., Häberlin F., Henes M., Schwab R., Sütterlin M., von Wolff M., Dittrich R., 2016. Ninety-five orthotopic transplantations in 74 women of ovarian tissue after cytotoxic treatment in a fertility preservation network: tissue activity, pregnancy and delivery rates. Hum. Reprod. 31, 2031-2041.

von Wolff M., Dittrich R., Liebenthron J., Nawroth F., Schüring A.N., Bruckner T., Germeyer A., 2015. Fertility-preservation counselling and treatment for medical reasons: data from a multinational network of over 5000 women. Reprod. Biomed. Online. 31, 605-12.

von Wolff M., Capp E., Jauckus J., Strowitzki T., Germeyer A.; FertiPROTEKT study group., 2016. Timing of ovarian stimulation in patients prior to gonadotoxic therapy: an analysis of 684 stimulations. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 199,146-149.

Table 1. Outcomes in 40 breast cancer patients undergoing COS for fertility preservation prior to neoadjuvant chemotherapy

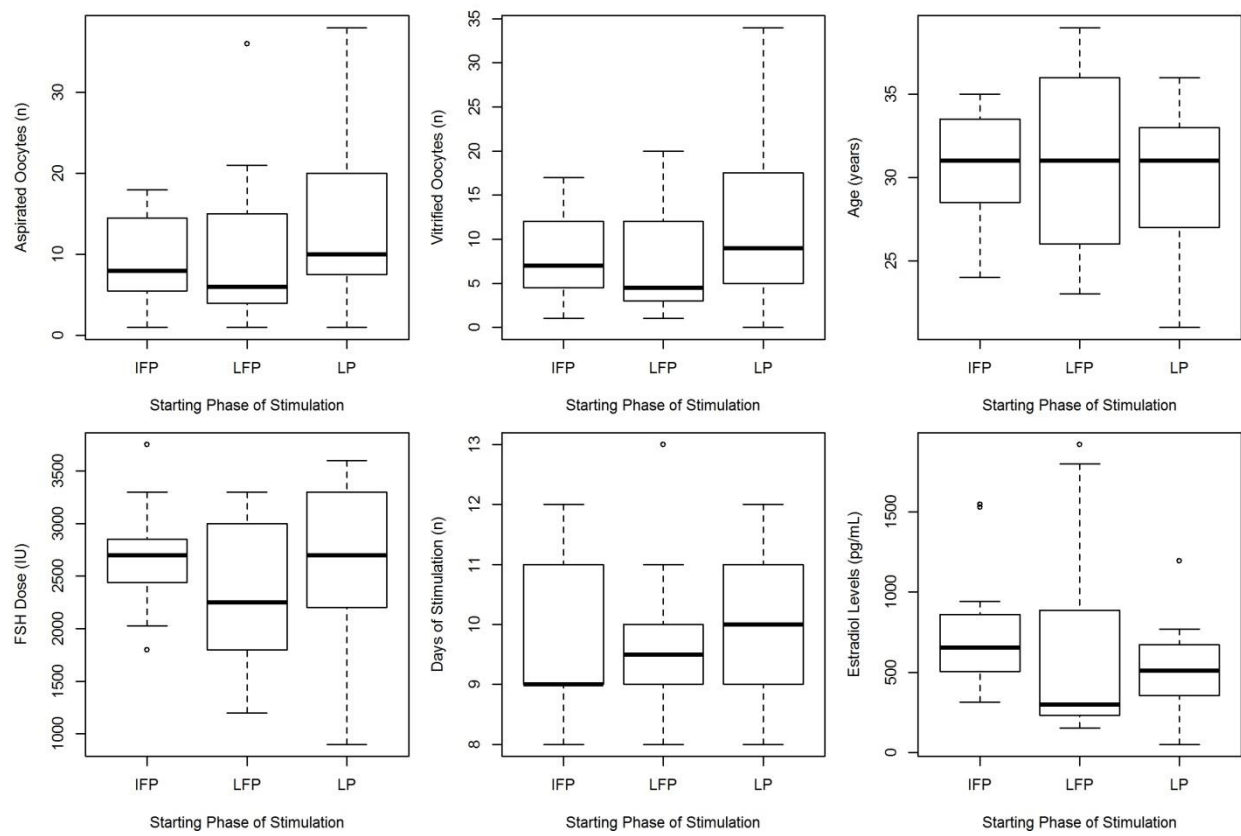
	All patients (n = 40)	IFP (n = 11)	LFP (n = 10)	LP (n = 19)	P-value
Age (years)	30.43 ± 4.25	30.73 ± 3.52	31 ± 5.25	29.95 ± 4.24	NS
Collected oocytes	11.78±9.12	9.18±6.0	10.90±10.77	13.74±9.67	NS
Vitrified Oocytes	9.72 ±7.36	8.27 ±5.37	7.90 ±6.44	11.53 ±8.61	NS
Days of stimulation	10.03±.33	10.00±1.41	9.70±.49	10.21±1.23	NS
FSH/hMG total dose (IU)	2,540 ±713.1	2,677 ±544.3	2,260 ±706.6	2608 ±792.2	NS
Estradiol Levels (pg/mL)	623.1 ±441.2	783.0 ±411.7	661.7 ±666.7	510.2 ±274.8	NS

Data are expressed as mean±SD.

IFP: initial follicular phase. LFP: late follicular phase. LP: luteal phase.

The limit of significance is a P value ≤ 0.05

Figure 1. Box plot graph showing the results of random-start ovarian stimulation. The graph illustrates the median (inner black line), the upper and lower quartiles (the box) and outliers.



ARTIGO 2

Artigo original

Specific protocols of controlled ovarian stimulation for oocyte cryopreservation in breast cancer patients

Protocolos específicos de estimulação ovariana controlada para criopreservação de oócitos em pacientes com câncer de mama

Felipe Cavagnaⁱ, Anagloria Pontesⁱⁱ, Mario Cavagnaⁱⁱⁱ, Artur Dzik^{iv}, Nilka Donadio^v, Michelle Teixeira Nagai^{vi}, Rafael Portela^{vii}, Luiz Henrique Gebrim^{viii}.

Division of Human Reproduction. Women's Health Reference Center, Hospital Perola Byington, São Paulo (SP), Brazil, and Department of Gynecology and Obstetrics, Botucatu Medical School, University of the State of São Paulo, Botucatu (SP), Brazil

ⁱ MD. Attending physician at Perola Byington Hospital, Women's Health Reference Center, São Paulo (SP), Brazil. MsC student at Botucatu Medical School, Botucatu (SP), Brazil.

ⁱⁱMD, PhD. Post-Graduation Program in Gynecology, Obstetrics and Mastology, São Paulo State University (UNESP) - Botucatu, São Paulo, Brazil.

ⁱⁱⁱMD, PhD. Director of Human Reproduction Division, Perola Byington Hospital, Women's Health Reference Center, São Paulo (SP), Brazil.

^{iv}MD, PhD. Director of the Sterility Service, Perola Byington Hospital, Women's Health Reference Center, São Paulo (SP), Brazil.

^vMD, PhD. Director of the Cryopreservation Laboratory, Perola Byington Hospital, Women's Health Reference Center, São Paulo (SP), Brazil.

^{vi}MD. Attending physician at Perola Byington Hospital, Women's Health Reference Center, São Paulo (SP), Brazil.

^{vii}BSc. Embryologist of the Cryopreservation Laboratory, Perola Byington Hospital, Women's Health Reference Center, São Paulo (SP), Brazil.

^{viii}MD, PhD. Director of Health Department, Perola Byington Hospital, Women's Health Reference Center, São Paulo (SP), Brazil.

Adress for correspondence: Felipe Cavagna, MD.

Centro de Referência da Saúde da Mulher- Hospital Pérola Byington

Av. Brig. Luis Antonio, 683

01317-001 – São Paulo – SP – Brasil

Tel. +55 11 3112-1210.

e-mail: cavfelipe@hotmail.com

Abstract

Context and objective: Breast cancer is the most common malignancy in adult women. Given the advent of early breast cancer diagnosis and effective cancer treatments, survival rates following breast cancer are increasing, with over 80% of patients alive at 5 years. In order to preserve quality of life of these women, fertility preservation procedures should be offered to young women with reproductive wishes. Oocyte cryopreservation is the most preferred method of fertility preservation, and controlled ovarian stimulation is the first step to be considered. Being so, some concerns may emerge, such as delaying chemotherapy treatment and exposing a breast cancer patient to high estradiol levels consequent to multiple follicle development. The present investigation has the purpose to present a specific protocol of controlled ovarian stimulation (COS) for fertility preservation in breast cancer patients.

Design: Observational cross sectional study in a public in vitro fertilization center of a tertiary hospital.

Methods: From November 2014 to December 2016, we studied 109 COS to retrieve oocytes for fertility preservation in breast cancer patients. The specific protocols presented in this study foresee the random-start ovarian stimulation, the use of an aromatase inhibitor and the trigger of final oocyte maturation with a GnRH agonist analog. The endpoints were number of oocytes retrieved and number of mature oocytes cryopreserved, total number of days of ovarian stimulation, total dose of gonadotropin administered, and estradiol levels on the day of the trigger. The outcomes were also analysed according to the phase of the cycle in which COS had commenced.

Results: The mean age of patients was 31.27 ± 4.22 years. The average duration of COS was 10.0 ± 1.39 days. The mean number of collected oocytes was 11.62 ± 7.96 and the mean number of vitrified oocytes was 9.60 ± 6.87 . The mean estradiol concentrations on the triggering day was 706.30 ± 450.48 pg/mL, and the mean dose of FSH administered was 2610.00 ± 716.51 IU. When comparing the outcomes according to the phase of the cycle in which COS was commenced, there were no significant differences in the number of oocytes collected and vitrified, ovarian stimulation length and estradiol levels on the trigger day. The reference for the outcomes was the initial follicular phase, which is the phase for conventional ovarian stimulation. It was

observed a statistically decrease of the total FSH/hMG dose administered in the groups starting COS in the late follicular phase and in the luteal phase, when compared to the initial follicular phase

Conclusions: the results of our investigation suggest that oocyte or embryos cryopreservation with a specific protocol for breast cancer patients, based in random start ovarian stimulation, is effective and safe, and may be offered to young women undergoing oncologic treatment who have concerns related to their reproductive future.

Keywords

Fertility preservation. Breast neoplasms. Drug therapy. Ovulation induction. Cryopreservation.

Resumo

Contexto e objetivo: O câncer de mama é a neoplasia maligna mais comum na mulher adulta. Com o advento do diagnóstico precoce e de tratamentos eficazes, as taxas de sobrevivência superam 80% em cinco anos, o que leva a questionamentos sobre preservação da fertilidade nas mulheres em idade reprodutiva. A criopreservação de embriões e oócitos são os métodos mais utilizados de preservação da fertilidade, e a estimulação ovariana controlada é o primeiro passo a ser considerado. O atraso na quimioterapia e os altos níveis de estradiol consequentes ao desenvolvimento folicular múltiplo podem ser motivos de preocupação. A presente investigação tem por objetivo apresentar um protocolo específico de estimulação ovariana controlada (EOC) para preservação da fertilidade em pacientes com câncer de mama.

Tipo de estudo e local: Estudo observacional transversal em um centro público de fertilização “in vitro” de um hospital terciário.

Métodos: Entre novembro de 2014 e dezembro de 2016 foram estudados 109 ciclos de EOC para coleta de oócitos em mulheres com câncer de mama. O protocolo específico apresentado considera o início aleatório, o uso de um inibidor da aromatase e o desencadeamento da ovulação com um análogo agonista do GnRH. Os parâmetros avaliados foram o número de oócitos coletados e o número de oócitos criopreservados, a duração da estimulação ovariana, a dose total de gonadotropinas empregada e os níveis de estradiol no dia do desencadeamento da ovulação. Os resultados foram analisados em função da fase do ciclo em que se iniciou a estimulação.

Resultados: A média da idade das pacientes foi 31.27 ± 4.22 anos. A duração média da EOC foi 10.0 ± 1.39 dias. O número médio de oócitos coletados foi 11.62 ± 7.96 e o número médio de oócitos vitrificados foi 9.60 ± 6.87 . A média das concentrações de estradiol no dia do desencadeamento da ovulação foi 706.30 ± 450.48 pg/mL, e a dose média de gonadotropinas administrada foi de 2610.00 ± 716.51 UI. Comparando-se os resultados de acordo com a fase do ciclo em que EOC foi iniciada, não se observou diferenças estatisticamente significantes no número de oócitos coletados e vitrificados, duração da EOC e níveis de estradiol no dia do desencadeamento da ovulação. A fase de referência para comparação dos resultados foi a fase folicular inicial, como ocorre na estimulação ovariana convencional. Observou-se uma

diminuição estatisticamente significativa na dose total de FSH/hMG administrada nos grupos em que se iniciou a EOC nas fases folicular final e fase lútea, quando comparadas à fase folicular inicial.

Conclusões: Os resultados desta investigação sugerem que a criopreservação de oócitos ou embriões empregando um protocolo específico para pacientes com câncer de mama é procedimento eficaz, e pode ser oferecido para mulheres jovens que serão submetidas a tratamento oncológico e desejam um futuro reprodutivo.

Palavras chave

Preservação da fertilidade. Neoplasias da mama. Estimulação ovariana. Quimioterapia. Criopreservação.

Introduction

With improved cure rates of cancer in young patients, a greater attention has been focused in fertility preservation procedures. Hematologic cancers and other malignancies that strike young people may be in the 90% to 95% range of five-year survival rate¹. Breast cancer is the most common malignancy in adult women. In Brazil, the National Cancer Institute (INCA) estimates that in 2016 there were 57,960 new cases of breast cancer². In the United States, 5%–7% of cases of invasive breast cancer (~11,000/year) occur in women who are under age 40 at diagnosis³. Given the advent of early breast cancer diagnosis and effective cancer treatments, survival rates following breast cancer are increasing, with over 80% of patients alive at 5 years^{4,5}. This fact justifies the concern about chemotherapy-related gonadal toxicity in women with reproductive wishes. Chemotherapy treatment may have deleterious effects on the ovarian reserve, by affecting the resting pool of primordial follicles or the growing follicle population^{4,6}. Moreover, about two-thirds of women under 40 present with a hormone-positive receptor cancer, and are candidates to receive a ten-year treatment regimen with tamoxifen⁷. In order to preserve quality of life of these women, fertility preservation procedures should be offered to them. Given that, it is important to

consider early referral of breast cancer young patients to fertility specialists, in order to discuss fertility preservation procedures^{8,9}. Among these, medical ovarian protection, ovarian tissue cryopreservation, oocytes or embryos cryopreservation are the most common fertility preservation strategies^{7,10}. Embryo and oocyte cryopreservation are the most preferred methods of fertility preservation, although ovarian tissue cryopreservation has been demonstrated to be an useful option¹¹. To perform embryos or oocytes cryopreservation, controlled ovarian stimulation (COS) is the first step to be considered. Regarding COS, some concerns may emerge, such as delaying chemotherapy treatment and exposing a breast cancer patient to high estradiol levels consequent to multiple follicle development. COS is required for oocyte retrieval, which could delay oncologic treatment, given that the conventional COS, initiated in the beginning of the follicular phase, may require up to 6 weeks to be concluded. Random start ovarian stimulation, which means initiating COS immediately, independently of menstrual cycle day, has become a well established approach in fertility preservation strategies, allowing oocyte retrieval in no more than two weeks, in the majority of the cases. Moreover, the outcome of random-start ovarian stimulation seems to be similar after stimulation initiation during any phase of the menstrual cycles^{12,13}. Another concern might be the estradiol levels consequent to ovarian stimulation. In order to decrease estradiol concentrations, it is recommended the adjuvant therapy with an aromatase inhibitor, letrozole, throughout the length of the COS. Ovarian stimulation with aromatase inhibitors has been proved to be an efficient procedure¹⁴⁻¹⁶. In neoadjuvant chemotherapy for hormone-receptor positive cancers, besides the use of letrozole, we propose the administration of tamoxifen during ovarian stimulation. In order to prevent thromboembolic complications, patients are given a prophylactic dose of low molecular weight heparin. Aiming at preventing ovarian hyperstimulation syndrome, which is an important complication of ovarian stimulation, it is mandatory to avoid hCG for triggering final follicular maturation, and employ routinely a GnRH agonist for this purpose^{17,18}. These approaches regarding ovarian stimulation for breast cancer patients could make the procedure more efficient and safer aiming at cryopreservation of oocytes or embryos. In this serie of cases we report the outcome of specific protocols of COS for breast cancer patients and compare the outcomes of random start approach according to the phase of the cycle of initiation of stimulation.

Material and Methods

This is an observational cross sectional study including breast cancer patients undergoing COS for fertility preservation in a tertiary public hospital. From November 2014 to December 2016, we studied 109 random start COS to retrieve oocytes for fertility preservation in cancer patients. The cycles of COS were divided in three groups, according to the phase of the menstrual cycle: Initial Follicular Phase Group (IFP, n= 42): the COS was initiated in the beginning of the follicular phase, in which was not observed a dominant follicle > 10mm; Late Follicular Phase Group (LFP, n=20): the COS was initiated in the late follicular phase, in the presence of a dominant follicle > 10 mm; Luteal Phase Group (LP, n=47): the COS was initiated in the luteal phase, with ecographic evidence of follicular rupture and (or) an endometrium of secretory pattern.

The specific COS in the patients with breast cancer was performed either with recombinant FSH or urinary hMG, in a daily dose of 150-300 IU. The gonadotropin starting dose was chosen according to the antral follicle count: 150 IU daily with ≥ 15 antral follicles, 225 IU daily with $<15 \geq 10$ antral follicles and 300 IU daily with < 10 antral follicles. Letrozole was started concomitantly with gonadotropins, in the dose of 5 mg in a daily basis, independently of immunohistochemistry of the tumor. Pituitary suppression to prevent a premature LH surge was carried out with a daily dose of 0.25 mg of a GnRH antagonist. When COS was initiated in the late follicular phase, with the presence of a follicle > 10 mm, the GnRH antagonist was introduced concomitantly with the gonadotropin; otherwise, the antagonist was administered in the presence of a follicle ≥ 13 mm. In cases of neoadjuvant chemotherapy, we associate tamoxifen 20 mg orally in a daily basis, and we perform the prevention of thromboembolic complications with a prophylactic dose of low molecular weight heparin, enoxaparin 40 mg administered subcutaneously in a daily basis. During ovarian stimulation, ultrasound scans were performed every 48 hours. Final follicular maturation was performed with 0.2 mg of triptorelin, in the presence of follicles ≥ 19 mm, and oocyte retrieval was carried out transvaginally under ultrasound guidance, 35-36 hours later. The endpoints of the study were number of oocytes retrieved and number of mature oocytes cryopreserved, total number of days of ovarian stimulation, total dose of gonadotropin administered, and estradiol levels on the day of the trigger.

The outcomes were also analysed according to the phase of menstrual cycle in which ovarian stimulation was initiated.

Criteria of inclusion

Patients diagnosed with breast cancer and probable indication of neoadjuvant or adjuvant chemotherapy;

Patients with reproductive wishes after cancer treatment;

Age $\leq$ 40 years.

Criteria of exclusion

Patients with advanced and methastatic disease, and with age $>$ 40 years were not included in the fertility preservation program.

Ethical Aspects

This research was approved by the Committee of Ethics in Research of the Women's Health Reference Center, in Sao Paulo, on 29 October 2014, under the number 848.880.

Statistical analysis

The statistical model applied was the multinomial logistic regression. The level of statistical significance was considered to be a p-value of less than 0.05.

Results

This study included 109 breast cancer patients undergoing ovarian stimulation for oocyte cryopreservation. 42 women commenced COS in the luteal phase (LP), 20 in the initial follicular phase (IFP) and 47 in the late follicular phase (LFP). The mean age of patients was 31.27 ± 4.22 years. The average duration of COS was 10.0 ± 1.39 days. The mean number of collected oocytes was 11.62 ± 7.96 and the mean number of vitrified oocytes was 9.60 ± 6.87 . The mean estradiol concentrations on the triggering day was 706.30 ± 450.48 pg/mL, and the mean dose of FSH administered was 2610.00 ± 716.51 IU. The results are shown in Table 1. When comparing the outcomes according to the phase of the cycle in which COS was commenced, there were no significant differences in the number of oocytes collected and vitrified, ovarian stimulation length and estradiol levels on the trigger day. The reference for the outcomes was the initial follicular phase, which is the phase for conventional ovarian stimulation. It was observed a statistically decrease of the total FSH dose

administered in the groups starting COS in the late follicular phase and in the luteal phase, when compared to the initial follicular phase. Prevalence ratio and multinomial logistic regression analysis results regarding general characteristics of the cycles are shown in table 2. In figure 1, the box plots graphs show the overall mean values, standard deviation and outliers of the mean values.

Discussion

The modern cancer treatments, including surgery, chemotherapy and radiotherapy, have improved cure rates, and the decline in mortality is more remarkable in women aged < 50 years¹⁰. Nevertheless, gonadal toxicity consequent to cancer therapy may lead to impaired reproductive function in younger patients, so that procedures aiming at preserving the reproductive potential are desired. Quality of life is an important issue to be considered in cancer survivors, and the compromise of fertility is a concern, particularly among young women. Presently, we can stress that reproductive concerns are not meaningless for young women diagnosed with breast cancer, and the demand for fertility preservation techniques amongst these patients has increased with improved cure rates. The techniques employed with the purpose of fertility preservation include reducing the impact of chemotherapy in the ovaries, cryopreservation of oocytes and embryos, and cryopreservation of ovarian tissue¹⁰. Given that protection of ovarian function with GnRH agonist is controversial and cryopreservation of ovarian tissue is still an experimental procedure, cryopreservation of oocytes and embryos are the most important procedures indicated for this purpose¹⁹. Considering IVF as a technique to treat infertile couples, embryo cryopreservation has become a very efficient procedure, and there are studies suggesting a “freeze all policy” even in conventional cycles of IVF²⁰. As many young patients do not have a male partner in the moment of the treatment, and there may be concerns regarding the destiny of the embryos in cases of progression of the disease, oocyte cryopreservation has become the option of choice, even because the IVF outcome with vitrified oocytes are comparable to fresh oocytes²¹. The method called vitrification, which implies an ice-free cryopreservation, resulted in a significant progress in oocyte cryopreservation, allowing satisfactory rates of pregnancy²². It was postulated that among established methods, in postpubertal women, oocyte cryopreservation is the preferred option, whereas ovarian tissue cryopreservation is

the only possibility for prepubertal girls²³. Anyway, COS is mandatory for optimization of embryos or oocytes cryopreservation, and normally require two to six weeks, depending on the day of the menstrual cycle, so that it may lead to an undesirable delay in initiating chemotherapy. Given that it is not necessary to achieve a receptive endometrium, random start stimulation is an interesting option in fertility preservation cycles. Our specific protocol foresees random start ovarian stimulation, and our results demonstrate that the outcomes are comparable to those obtained in conventional IVF cycles, agreeing with other observations^{12,13}. Currently, random-start ovarian stimulation is routinely and successfully employed for emergency IVF²⁴⁻²⁶. In this investigation, we demonstrate that outcome of ovarian stimulation is similar after stimulation initiation during any phase of the menstrual cycles, in consonance with other recent studies²⁷. We have obtained similar results in all of the three phases of initiation of stimulation, regarding number of days of stimulation, and maturity rate of the oocytes collected. Our results showed a statistically significant lower dose of FSH administered in the groups LFP and LP. This result is in disagree with that obtained by von Wolff et al.¹³, who have reported a significant increase in the total dose of gonadotropin when COS is initiated in the luteal phase. We can hypothesize that in a large number of patients, such difference could lose statistical significance, but this fact can be considered of little importance in the clinical context of the study. Our data confirm that the concomitant use of an aromatase inhibitor during ovarian stimulation is efficient in order to prevent high estradiol levels, commonly observed in conventional COS. The most employed aromatase inhibitor in ovarian stimulation protocols is letrozole, which has been proved to be more efficient than anastrozole for this purpose²⁸. Ovarian stimulation with letrozole, in a daily dose of 5 mg has been proved to be an efficient procedure to avoid high estradiol concentrations¹⁴. On the other hand, there are reports stating that the concomitant use of letrozole with gonadotropins significantly reduces the number of oocytes available for cryopreservation²⁹. In our investigation, the mean number of oocytes collected and cryopreserved (11.62 ± 7.96 and 9.60 ± 6.87 , respectively) were considered adequate, given that recent data suggest that at least 8-10 metaphase II vitrified oocytes are necessary to achieve reasonable success²². Recent publications also corroborate that the adjuvant therapy with letrozole, throughout the lenght of the COS, is a safe and efficient approach^{15,16,30}. In our serie of cases, the mean estradiol concentrations on the triggering day was 760.30 ± 450.48 pg/mL, with a median of 655 pg/mL. Given

that serum estradiol levels during COS are increased by 10-fold compared with those of natural cycles³¹, it is expected that estradiol concentrations on triggering day reach 2,500 pg/mL, much higher than those observed in our study. If the COS is performed in the presence of the cancer, as occurs when the indication is neoadjuvant chemotherapy, we have proposed to associate tamoxifen together with letrozole. It is possible that their different mechanisms of action would be complementary, with the aromatase inhibitor decreasing the estrogen level and thus allowing tamoxifen to function more effectively as a competitive inhibitor with estradiol. Given that venous thromboembolism is a major concern in cancer patients³², and considering the risk of administering tamoxifen together with letrozole, we propose, in our protocol for women undergoing neoadjuvant chemotherapy, the association of enoxaparin, in a prophylactic dose daily. Regarding the triggering of final oocyte maturation, we consider that there is no place for hCG trigger in COS for fertility preservation. The use of GnRH agonist to trigger final oocyte maturation is mandatory to prevent the occurrence of hyperstimulation ovarian syndrome¹⁸, which would be an undesirable complication of ovarian stimulation in cancer patients. Our data confirm that random start ovarian stimulation is effective and produce mature oocytes in the same proportion of conventional stimulation. This fact is important to reassure patients that it is possible to undergo oocyte vitrification procedure with no delay in oncologic treatment. Moreover, the concomitant utilization of letrozole, an aromatase inhibitor, in breast cancer patients, provides a safe option for these women, with lower estradiol levels than in conventional stimulation¹⁵. The efficacy of COS is not altered by concomitant use of letrozole and there is no evidence of increased risk of malformations in newborns conceived on aromatase inhibitors³³. Considering the emotional stress of the diagnosis and treatment of cancer in a young age, it is important to reassure patients, familiars and oncologists that the procedure is safe and effective, reducing the burden to which the patient is exposed. With regard of the efficacy and safety of cryopreserved oocytes to produce a normal pregnancy, there are reports in medical literature confirming that the procedure is safe and efficient in women with cancer. Cancer patients who have their oocytes cryopreserved before chemotherapy have good assisted IVF performance and good perinatal outcome³⁴. As a reason for caution, it is important to note that the majority of the reports assessing safety and efficacy of oocyte cryopreservation come from healthy women, undergoing conventional IVF or participants of ovidonation programs. Whether these results may

be extrapolated to cancer patients remains to be better elucidated, even if the data obtained so far are reassuring^{22,29}. We conclude that the results of our investigation suggest that oocyte or embryos cryopreservation with a specific protocol for breast cancer patients, based in random start ovarian stimulation, is effective and performed with a low chance of complications that could delay the cancer treatment, and may be offered to young women undergoing oncologic treatment who have concerns related to their reproductive future.

References

- 1.The Ethics Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Fertility preservation and reproduction in cancer patients. *Fertil Steril*. 2005; 83(6): 1622-8..
- 2.INCA – Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva. Availabe from http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/cancer_ma+. Accessed in 2016 (Dec 28)..
- 3.Kim SS, Klem J, Fabian C. Breast cancer and fertility preservation. *Fertil Steril*. 2011; 95(5):1535-43.
- 4.Morgan S, Anderson RA, Gourley C, Wallace WH, Spears N. How do chemotherapeutic agents damage the ovary? *Hum. Reprod. Update*. 2012; 18(5): 525-35.
- 5.Murk W, Seli E. Fertlity preservation as a public health issue: An epidemiological perspective. *Curr Opin Obatet Gynecol* 2011; 23(3):143-50.
6. Reh A, Oktem O, Oktay K. Impact of breast cancer chemotherapy on ovarian reserve: a prospective observational analysis by menstrual history and ovarian reserve markers. *Fertil Steril*. 2008; 90(5):1635-1639.
7. De Pedro M, Otero B, Martin B. Fertility preservation and breast cancer: a review. *Ecancermedicalscience*. 2015; 9:1-20.
8. von Wolff M, Dittrich R, Liebenthron J, Nawroth F, Schüring AN, Bruckner T, Germeyer A. Fertility-preservation counselling and treatment for medical reasons: data from a multinational network of over 5000 women. *Reprod. Biomed. Online*. 2015;31(5): 605-12.

9. Srikanthan A, Amir E, Warner E. Does a dedicated program for young breast cancer patients affect the likelihood of fertility preservation discussion and referral? *Breast*.2016; 27:22-6.
10. Sonmezer M, Oktay K. Fertility preservation in young women undergoing breast cancer therapy. *Oncologist*. 2006; 11(5): 422-34.
11. van der Ven H, Liebenthron J, Beckmann M, Toth B, Korell M, Krüssel J, et al. Ninety-five orthotopic transplantations in 74 women of ovarian tissue after cytotoxic treatment in a fertility preservation network: tissue activity, pregnancy and delivery rates. *Hum Reprod* 2016; 31(9): 2031-41.
12. Cakmak H, Rosen MP. Random-start ovarian stimulation in patients with cancer. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol*. 2015; 27(3):215-21.
13. von Wolff M, Capp E, Jauckus J, Strowitzki T, Germeyer A; FertiPROTEKT study group. Timing of ovarian stimulation in patients prior to gonadotoxic therapy: an analysis of 684 stimulations. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2016;199:146-9.
14. 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): 1363-9.
15. Kim J, Turan V, Oktay K. Long-Term Safety of Letrozole and Gonadotropin Stimulation for Fertility Preservation in Women With Breast Cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2016; 101(4): 1364-71
16. Pereira N, Hancock K, Cordeiro CN, Lekovich JP, Schattman GL, Rosenwaks Z. Comparison of ovarian stimulation response in patients with breast cancer undergoing ovarian stimulation with letrozole and gonadotropins to patients undergoing ovarian stimulation with gonadotropins alone for elective cryopreservation of oocytes. *Gynecol. Endocrinol*. 2016; 32(10): 823-6.

17. Humaidan P, Nelson SM, Devroey P, Coddington CC, Schwartz LB, Gordon K, et al. Ovarian hyperstimulation syndrome: review and new classification criteria for reporting in clinical trials. *Hum Reprod.* 2016;31(9):1997-2004.
18. Thomsen L, Humaidan P. Ovarian hyperstimulation syndrome in the 21st century: the role of gonadotropin-releasing hormone agonist trigger and kisspeptin. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 2015; 27(3): 210-4.
19. Vu JV, Llarena NC, Estevez SL, Moravek MB, Jeruss JS. Oncofertility program implementation increases access to fertility preservation options and assisted reproductive procedures for breast cancer patients. *J Surg Oncol.* 2017; 115(2): 116-21
20. Roque M, Valle M, Guimarães F, Sampaio M, Geber S. Freeze-all policy: fresh vs. frozen-thawed embryo transfer. *Fertil Steril.* 2015; 103(5):1190-3.
21. Argyle CE, Harper JC, Davies MC. Oocyte cryopreservation: where are we now? *Hum Reprod Update.* 2016; 22(4):440-9.
22. Cobo A, García-Velasco JA, Coello A, Domingo J, Pellicer A, Remohí J. Oocyte vitrification as an efficient option for elective fertility preservation. *Fertil Steril.* 2016;105(3):755-64.
23. Martínez F, Devesa M, Coroleu B, Tur R, González C, Boada M, Solé M, Veiga A, Barri PN. Cancer and fertility preservation: Barcelona consensus meeting. *Gynecol Endocrinol.* 2013; 29(4):285-91.
24. Rashidi BH, Tehrani ES, Ghaffari F. Ovarian stimulation for emergency fertility preservation in cancer patients: A case series study. *Gynecol Oncol Rep.* 2014; 10:19-21.

25. Kim JH, Kim SK, Lee HJ, Lee JR, Jee BC, Suh CS, Kim SH. Efficacy of random-start controlled ovarian stimulation in cancer patients. *J Korean Med Sci.* 2015; 30(3) 290-5.
26. Robertson DM, Gilchrist RB, Ledger WL, Baerwald A. Random start or emergency IVF/in vitro maturation: a new rapid approach to fertility preservation. *Womens Health (Lond).* 2016; 12(3) 339-49.
27. Grynberg M, Poulain M, le Parco S, Sifer C, Fanchin R, Frydman R. Similar in vitro maturation rates of oocytes retrieved during the follicular or luteal phase offer flexible options for urgent fertility preservation in breast cancer patients. *Hum Reprod.* 2016; 31(3):623–9.
28. Azim AA, Costantini-Ferrando M, Lostritto K, Oktay K. Relative Potencies of Anastrozole and Letrozole to Suppress Estradiol in Breast Cancer Patients Undergoing Ovarian Stimulation before in Vitro Fertilization. *J.Clin. Endocrinol. Metab.* 2007; 92(6):2197-200.
29. Revelli A, Porcu E, Levi Setti PE, Delle Piane L, Merlo DF, Anserini P. Is letrozole needed for controlled ovarian stimulation in patients with estrogen receptor-positive breast cancer? *Gynecol Endocrinol.* 2013;29(11):993-6.
30. Domingo J, Garcia-Velasco JA. Oocyte cryopreservation for fertility preservation in women with cancer. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 2016; 23(6):465-9.
31. Joo BS, Park SH, An BM, Kim KS, Moon SE, Moon HS. Serum estradiol levels during controlled ovarian hyperstimulation influence the pregnancy outcome of in vitro fertilization in a concentration-dependent manner. *Fertil Steril.* 2010; 93(2):442-6.
32. Brand JS, Hedayati E, Bhoo-Pathy N, Bergh J, Hall P, Humphreys K, Ludvigsson JF, Czene K., 2016. Time-dependent risk and predictors of

venous thromboembolism in breast cancer patients: A population-based cohort study. *Cancer*. 2017; 123(3):468-75.

33. Sharma S, Ghosh S, Singh S, Chakravarty A, Ganesh A, Rajani S, Chakravarty BN. Congenital malformations among babies born following letrozole or clomiphene for infertility treatment. *PLoS One*. 2014; 9(10):1-7.

34. Martinez M, Rabadan S, Domingo J, Cobo A, Pellicer A, Garcia-Velasco JA. Obstetric outcome after oocyte vitrification and warming for fertility preservation in women with cancer. *Reprod. Biomed. Online*. 2014; 29(6):722-8.

Table 1. Outcomes in 109 breast cancer patients undergoing COS for fertility preservation.

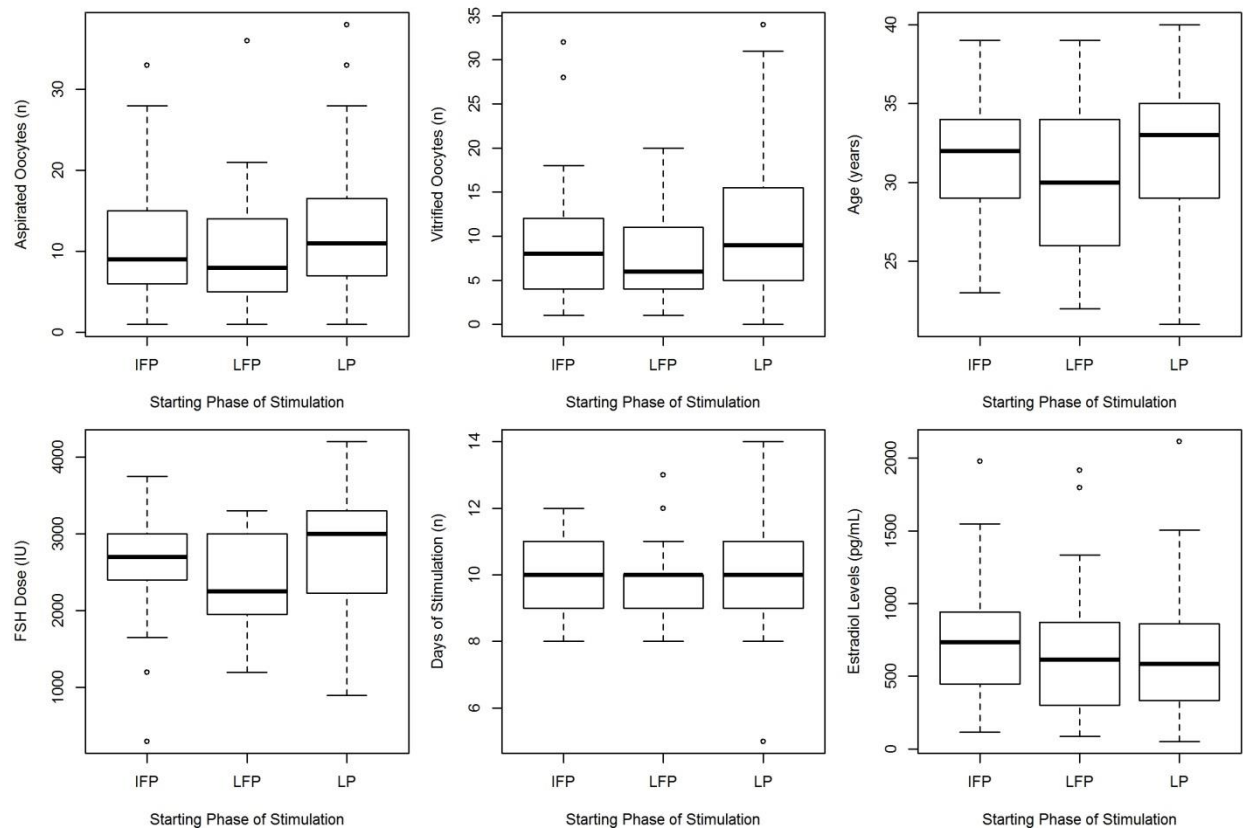
Outcome	Mean and standard deviation	Median	Range
Oocytes aspirated	11.62 (7.96)	10	1-38
Oocytes vitrified	9.60 (6.87)	8	0-34
Age (years)	31.27 (4.22)	32	21-40
Dose.of FSH administered (IU)	2,610 (716.51)	2,650	900-4,200
Days of stimulation	10.0 (1.39)	10	5-14
Estradiol.levels (pg/mL)	706.30(450.48)	655	52-2,114

Table 2. Prevalence ratio and Multinomial logistic regression analysis results regarding general characteristics of the cycles for fertility preservation in 109 patients with breast cancer, with IFP group as a reference category for the outcomes.

Response Variable	Explanatory Variable	Reference Group	Prevalence Ratio	<i>P</i> -value
Starting Phase of Stimulation	Aspirated Oocytes	IFP	$\frac{P_{LP}}{P_{IFP}} = 1.03$	0.30
			$\frac{P_{LFP}}{P_{IFP}} = 0.99$	0.77
	Vitrified Oocytes	IFP	$\frac{P_{LP}}{P_{IFP}} = 1.04$	0.19
			$\frac{P_{LFP}}{P_{IFP}} = 0.97$	0.55
	Age	IFP	$\frac{P_{LP}}{P_{IFP}} = 0.58$	1.03
			$\frac{P_{LFP}}{P_{IFP}} = 0.16$	0.92
	FSH Dose	IFP	$\frac{P_{LP}}{P_{IFP}} = 1.01$	<0.001
			$\frac{P_{LFP}}{P_{IFP}} = 0.99$	<0.001
	Days of Stimulation	IFP	$\frac{P_{LP}}{P_{IFP}} = 1.24$	0.17
			$\frac{P_{LFP}}{P_{IFP}} = 0.93$	0.70
	Estradiol Levels	IFP	$\frac{P_{LP}}{P_{IFP}} = 1$	0.35
			$\frac{P_{LFP}}{P_{IFP}} = 1$	0.50

IFP (initial follicular phase); LFP (late follicular phase); LP (luteal phase)

Figure 1. Box plot graph showing the results of random-start ovarian stimulation. The graph illustrates the median (inner black line), the upper and lower quartiles (the box) and outliers.



CONCLUSÕES

Os protocolos específicos de EOC em pacientes com câncer de mama mostraram-se eficientes e não retardaram o início do tratamento oncológico:

1 - O número de oócitos coletados e criopreservados mostrou-se adequado, compatível com as estimulações convencionais para tratamentos de infertilidade com técnicas de reprodução assistida.

2 - A duração da estimulação ovariana, com uma mediana de 10 dias, não retarda o tratamento oncológico.

3 - A dose total de gonadotropinas utilizadas na EOC é comparável às estimulações ovarianas convencionais.

4 - Os níveis de estradiol no dia da maturação folicular final mostram-se reduzidos em comparação à EOC convencional, mostrando a eficácia do emprego dos inibidores de aromatase.

5 - Não há diferenças clinicamente significantes nos parâmetros avaliados com o início da EOC em diferentes fases do ciclo menstrual, comprovando-se a eficácia do início aleatório do tratamento.

6 - Nos casos de indicação de tratamento quimioterápico neoadjuvante, o protocolo específico utilizado mostrou-se eficiente, rápido e sem complicações.

Não houve nenhum caso de trombose, síndrome do hiperestímulo ovariano ou qualquer outra complicação relacionada à estimulação e captação dos oócitos.

Conclui-se que a EOC em pacientes com câncer de mama, utilizando-se os protocolos específicos aqui apresentados, é procedimento eficaz, o qual pode ser oferecido às mulheres jovens com preocupação com o futuro reprodutivo após o tratamento do câncer.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Berg C, Hayashi RJ. Participation and Self-Management Strategies of Young Adult Childhood Cancer Survivors. OTJR: Occupation, Participation and Health. 2013; 10.3928/15394492-20120607-01
2. Meirrow D, Nugent D. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. Hum Reprod Update. 2001; 7:535–43.
3. Instituto Nacional de Câncer – INCa. Estimativa. 2016
4. Assi HA, Khoury KE, Dbouk H, Khalil LE, Mouhieddine TH, E Saghir NS. Epidemiology and prognosis of breast cancer in young women. J Thorac Dis. 2013; 5 Suppl 1:S2-8.
5. Goldfarb SB, Kamer SA, Oppong BA, Eaton A, Patil S, et al. Fertility Preservation for the Young Breast Cancer Patient. Ann Surg Oncol. 2016; 23(5):1530-6.
6. Vadaparampil ST, Christie J, Quinn GP, Fleming P, Stowe C, Bower B, et al. A pilot study to examine patient awareness and provider discussion of the impact of cancer treatment on fertility in a registry-based sample of African American women with breast cancer. Support Care Cancer. 2012 ;20(10):2559-64.
7. Lee SJ, Schover LR, Partridge AH, Patrizio P, Wallace WH, Hagerty K, Beck LN, Brennan LV, Oktay K. American Society of Clinical Oncology Recommendations on Fertility Preservation in Cancer Patients. J Clin Oncol. 2006; 24:2917-31.
8. Carter J, Rowland K, Chi D, Brown C, Abu-Rustum N, Castiel M. Gynecologic cancer treatment and the impact of cancer-related infertility. Gynecol Oncol. 2005;97:90-5.
9. Sonmezer M, Oktay K. Fertility preservation in female patients. Human Reproduction Update. 2004; 10: 251-66.
10. Grundy R, Gosden RG, Hewitt M, Larcher V, Leiper A, Spoudeas HA, Walker D, Wallace WH. Fertility preservation for children treated for cancer: scientific advances and research dilemmas. Arch Dis Child. 2001; 8:355-59.

11. Soleimani R, Heytens E, Darzynkiewicz Z, Oktay K. Aging (Albany NY). Mechanisms of chemotherapy-induced human ovarian aging: double strand DNA breaks and microvascular compromise. 2011;3:782-93.
12. Arnon J, Meirow D, Lewis-Roness LH, Ornoy A. Genetic and teratogenic effects of cancer treatments on gametes and embryos. Hum Reprod Update. 2001;7:394-403.
13. Kenney LB, Laufer MR, Grant FD, Grier H, Diller L. High risk of infertility and long term gonadal damage in males treated with high dose cyclophosphamide for sarcoma during childhood. Cancer. 2001;91:613-21.
14. Maltaris T, Weigel M, Mueller A, Schmidt M, Seufert R, Fischl F, Koelbl H, Dittrich R. Cancer and fertility preservation: fertility preservation in breast cancer patients. Breast Cancer Res. 2008;10:206.
15. Dow KH, Kuhn D. Fertility options in young breast cancer survivors: a review of the literature. Oncol Nurs Forum. 2004;31:E46-53.
16. Del Mastro L, Venturini M, Sertoli MR, Rosso R. Amenorrhea induced by adjuvant chemotherapy in early breast cancer patients: prognostic role and clinical implications. Breast Cancer Res Treat. 1997;43(2):183-90.
17. Morgan S, Anderson RA, Gourley C, Wallace WH, Spears N. How do chemotherapeutic agents damage the ovary? Hum Reprod Update. 2012; 18:525-35
18. Meirow D, Biederman H, Anderson RA, Wallace WH. Toxicity of chemotherapy and radiation on female reproduction. Clin Obstet Gynecol. 2010;53:727-39.
19. Lee CJ, Park HH, Do BR, Yoon Y, Kim JK. Natural and radiation-induced degeneration of primordial and primary follicles in mouse ovary. Anim Reprod Sci. 2000;59:109-17.
20. Lo Presti A, Ruvolo G, Gancitano RA, Cittadini E. Ovarian function following radiation and chemotherapy for cancer. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2004;113 Suppl 1:S33-40.

21. Adams E, McCann L, Armes J, Richardson A, Stark D, et al. The experiences, needs and concerns of younger women with breast cancer: a meta-ethnography. *Psychooncology*. 2011 20:851-61.
22. Zavos A, Valachis A. Risk of chemotherapy-induced amenorrhea in patients with breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Acta Oncol*. 2016 Jun;55(6):664-70.
23. Guerrero A, Gavilá J, Folkerd E, Ortiz B, Martínez F, García A, Climent MA, Guillem V, Ruíz A. Incidence and predictors of ovarian function recovery (OFR) in breast cancer (BC) patients with chemotherapy-induced amenorrhea (CIA) who switched from tamoxifen to exemestane. *Ann Oncol*. 2013 Mar;24(3):674-9..
24. Goodwin PJ, Ennis M, Pritchard KI, Trudeau M, Hood N. Risk of menopause during the first year after breast cancer diagnosis. *J Clin Oncol*. 1999; 17(8):2365-70.
25. Fréour T, Barrière P, Masson D. Anti-müllerian hormone levels and evolution in women of reproductive age with breast cancer treated with chemotherapy. *Eur J Cancer*. 2017;74:1-8.
26. Ives A, Saunders C, Bulsara M, Semmens J. Pregnancy after breast cancer: population based study. *BMJ* 2007;334:166-7.
27. Largillier R, Savignoni A, Gligorov J, Chollet P, Guilhaume M, Spielmann M, Luporsi E, Asselain B, Coudert B, Namer M. Prognosis role of pregnancy occurring before or after treatment of early breast cancer patients aged <35 years. *Cancer* 2009;115: 5155-65.
28. Raphael J, Trudeau ME, Chan K. *Curr Oncol*. Outcome of patients with pregnancy during or after breast cancer: a review of the recent literature. 2015; Suppl 1:S8-S18.
29. Velentgas P, Daling JR, Malone KE, Weiss NS, Williams MA, Self SG, Mueller BA. Pregnancy after breast cancer: outcomes and influence on mortality. *Cancer* 1999;85:2424-32.

30. Sankila R, Heinavaara S, Hakulinen T. Survival of breast cancer patients after subsequent term pregnancy: “healthy mother effect”. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 170:818-23.
31. Cardonick E, Iacobucci A. Use of chemotherapy during human pregnancy. *Lancet Oncol* 2004;5:283-91.
32. Aviles A, Neri N. Hematological malignancies and pregnancy: a final report of 84 children who received chemotherapy in utero. *Clin Lymphoma* 2001;2:173-7.
33. Manual de Condutas da Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica, 2011
34. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, Pritchard KI, Albain KS, Hayes DF, Geyer CE Jr, Dees EC, Perez EA, Olson JA Jr, Zujewski J, Lively T, Badve SS, Saphner TJ, Wagner LI, Whelan TJ, Ellis MJ, Paik S, Wood WC, Ravdin P, Keane MM, Gomez Moreno HL, Reddy PS, Goggins TF, Mayer IA, Brufsky AM, Toppmeyer DL, Kaklamani VG, Atkins JN, Berenberg JL, Sledge GW. Prospective Validation of a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2015; 373(21):2005-14.
35. Rutter CE, Yao X, Mancini BR, Aminawung JA, Chagpar AB, Saglam O, Hofstatter EW, Abu-Khalaf M, Gross CP, Evans SB. Influence of a 21-Gene Recurrence Score Assay on Chemotherapy Delivery in Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*. 2016; 16(1):59-62.
36. Mook S, Van't Veer LJ, Rutgers EJ, Piccart-Gebhart MJ, Cardoso F. Individualization of therapy using Mammprint: from development to the MINDACT Trial. *Cancer Genomics Proteomics*. 2007; 4(3):147-55.
37. Effi AB, Aman NA, Kouï BS, Koffi KD, Traoré ZC, Kouyate M. Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptors in breast cancer: relationship with clinicopathologic factors in 302 patients in Ivory Coast. *BMC Cancer*. 2017; 17(1):115
38. Hao S, Tian W, Gao B, Jiang Y, Zhang X, Zhang S, Guo L, Zhao J, Zhang G, Hu C, Yan J, Luo D. Does dual HER-2 blockade treatment increase the risk of severe

toxicities of special interests in breast cancer patients: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Oncotarget*. 2017; doi: 10.18632

39. Ács B, Kulka J, Kovács KA, Teleki I, Tőkés AM, Meczker Á, Györffy B, Madaras L, Krenács T, Szász AM. Comparison of five Ki67 antibodies regarding reproducibility and capacity to predict prognosis in breast cancer: Does the antibody matter? *Hum Pathol*. 2017; pii: S0046-8177(17)30032-1.

40. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, Watson M, Davies S, Bernard PS, Parker JS, Perou CM, Ellis MJ, Nielsen TO. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101:736-50.

41. Diessner J, Wischnewsky M, Blettner M, Häusler S, Janni W, et al Do Patients with Luminal A Breast Cancer Profit from Adjuvant Systemic Therapy? A Retrospective Multicenter Study. *PLoS One*. 2016 ;11:e0168730.

42. Keegan TH, DeRouen MC, Press DJ, Kurian AW, Clarke CA. Occurrence of breast cancer subtypes in adolescent and young adult women. *Breast Cancer Res*. 2012;14:R55.

43. Franco Jr. JG, Oliveira JBA, Petersen CG, Mauri AL, Baruffi RLR, Cavagna M. Adjuvant therapy with GnRH agonists/tamoxifen in breast cancer could be a good council for patients with hormone receptor-positive tumors and wish to preserve fertility. *Med Hypotheses*. 2012;78:442-5.

44. Sohn G, Ahn SH, Kim HJ, Son BH, Lee JW, et al. Survival Outcome of Combined GnRH Agonist and Tamoxifen Is Comparable to That of Sequential Adriamycin and Cyclophosphamide Chemotherapy Plus Tamoxifen in Premenopausal Patients with Lymph-Node-Negative, Hormone-Responsive, HER2-Negative, T1-T2 Breast Cancer. *Cancer Res Treat*. 2016; 48:1351-1362.

45. Arvold ND, Taghian AG, Niemierko A, Abi Raad RF, Sreedhara M, Nguyen PL, Bellon JR, Wong JS, Smith BL, Harris JR. Age, breast cancer subtype approximation, and local recurrence after breast-conserving therapy. *J Clin Oncol*. 2011; 29:3885-91.

46. Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet*. 1986; 1:884–6.

47. Porcu E, Fabbri R, Seracchioli R, Ciotti PM, Magrini O and Flamigni C. Birth of a healthy female after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. *Fertil Steril*. 1997; 68:724–6.
48. Rienzi L, Gracia C, Maggiulli R, LaBarbera AR, Kaser DJ, et al. Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance. *Hum Reprod Update*. 2016; Epub ahead of print
49. Liebermann J, Dietl J, Vanderzwalmen P, Tucker MJ. Recent developments in human oocyte, embryo and blastocyst vitrification: where are we now? *Reprod Biomed Online*. 2003;7:623-33.
50. Cobo A, Kuwayama M, Pérez S, Ruiz A, Pellicer A, Remohí J. Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method. *Fertil Steril* 2008;89:1657-64.
51. Rienzi L, Cobo A, Paffoni A, Scarduelli C, Capalbo A, Vajta G, Remohí J, Ragni G, Ubaldi FM. Consistent and predictable delivery rates after oocyte vitrification: an observational longitudinal cohort multicentric study. *Hum Reprod*. 2012; 27(6):1606-12.
52. González C, Devesa M, Boada M, Coroleu B, Veiga A, Barri PN. Combined strategy for fertility preservation in an oncologic patient: vitrification of in vitro matured oocytes and ovarian tissue freezing. *J Assist Reprod Genet*. 2011 Sep 2.
53. Madrigano A, Westphal L, Wapnir I. Egg retrieval with cryopreservation does not delay breast cancer treatment. *Am J Surg*. 2007;194:477-81.
54. 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.
55. Oktay K, Hourvitz A, Sahin G, Oktem O, Safro B, Cil A, Bang H. Letrozole reduces estrogen and gonadotropin exposure in women with breast cancer undergoing ovarian stimulation before chemotherapy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:3885-90.

56. Stigliani S, Moretti S, Anserini P, Casciano I, Venturini PL, Scaruffi P. Storage time does not modify the gene expression profile of cryopreserved human metaphase II oocytes. *Hum Reprod.* 2015; 30(11):2519-26.
57. Levi Setti PE, Albani E, Novara PV, Cesana A, Morreale G. Cryopreservation of supernumerary oocytes in IVF/ICSI cycles. *Hum Reprod.* 2006; 21(2):370-5.
58. Porcu E, Fabbri R, Damiano G, Giunchi S, Fratto R, Ciotti PM, Venturoli S, Flamigni C. Clinical experience and applications of oocyte cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol.* 2000;169:33-7.
59. Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature.* 1983;305:707-9.
60. Capalbo A, Rienzi L, Buccheri M, Maggiulli R, Sapienza F, Romano S, Colamaria S, Iussig B, Giuliani M, Palagiano A, Ubaldi F. The worldwide frozen embryo reservoir: methodologies to achieve optimal results. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1221:32-9.
61. Herrero L, Martínez M, Garcia-Velasco JA. Current status of human oocyte and embryo cryopreservation. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2011; 23:245-50.
62. Grifo JA, Noyes N. Delivery rate using cryopreserved oocytes is comparable to conventional in vitro fertilization using fresh oocytes: potential fertility preservation for female cancer patients. *Fertil Steril.* 2010;93(2):391-6.
63. Ethics Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Fertility preservation and reproduction in cancer patients. *Fertil Steril.* 2005; 83:1622-8.
64. Almodin CG, Minguetti-Câmara VC, Meister H, Ceschin AP, Kriger E, Ferreira JO. Recovery of natural fertility after grafting of cryopreserved germinative tissue in ewes subjected to radiotherapy. *Fertil Steril.* 2004 ;81:160-4.

65. Almodin CG, Minguetti-Câmara VC, Meister H, Ferreira JO, Franco RL, Cavalcante AA, Radaelli MR, Bahls AS, Moron AF, Murta CG. Recovery of fertility after grafting of cryopreserved germinative tissue in female rabbits following radiotherapy. *Hum Reprod*. 2004;19:1287-93.
66. Meirow D, Fasouliotis SJ, Nugent D, Schenker JG, Gosden RG, Rutherford AJ. A laparoscopic technique for obtaining ovarian cortical biopsy specimens for fertility conservation in patients with cancer. *Fertil Steril*. 1999; 71:948-51.
67. Oktay KH, Yih M. Preliminary experience with orthotopic and heterotopic transplantation of ovarian cortical strips. *Semin Reprod Med*. 2002;20:63-74.
68. Demeestere I, Simon P, Emiliani S, Delbaere A, Englert Y. Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation. *Hum Reprod Update*. 2009; 15:649-65.
69. Sánchez M, Novella-Maestre E, Teruel J, Ortiz E, Pellicer A. The Valencia Programme for Fertility Preservation. *Clin Transl Oncol*. 2008; 10:433-8.
70. Van der Ven H, Liebenthron J, Beckmann M, Toth B, Korell M, Krüssel J, Frambach T, Kupka M, Hohl MK, Winkler-Crepaz K, Seitz S, Dogan A, Griesinger G, Häberlin F, Henes M, Schwab R, Sütterlin M, von Wolff M, Dittrich R; FertiPROTEKT network. Ninety-five orthotopic transplantations in 74 women of ovarian tissue after cytotoxic treatment in a fertility preservation network: tissue activity, pregnancy and delivery rates. *Hum Reprod*. 2016 Sep; 31(9):2031-41.
71. Donnez J, Dolmans MM. Ovarian cortex transplantation: 60 reported live births brings the success and worldwide expansion of the technique towards routine clinical practice. *J Assist Reprod Genet*. 2015; 32:1167-70.
72. Bedaiwy MA, Hussein MR, Biscotti C, Falcone T. Cryopreservation of intact human ovary with its vascular pedicle. *Hum Reprod* 2006;21:3258–69.
73. Torre A, Vertu-Ciolino D, Mazoyer C, Selva J, Lornage J, et al. Safeguarding Fertility With Whole Ovary Cryopreservation and Microvascular Transplantation: Higher Follicular Survival With Vitrification Than With Slow Freezing in a Ewe Model. *Transplantation*. 2016; 100:1889-97

74. Huober-Zeeb C, Lawrenz B, Popovici RM, Strowitzki T, Germeyer A, Stute P, von Wolff M. Improving fertility preservation in cancer: ovarian tissue cryobanking followed by ovarian stimulation can be efficiently combined. *Fertil Steril*. 2011;95:342-4
75. Blumenfeld Z, Haim N. Prevention of gonadal damage during cytotoxic therapy. *Ann Med*. 1997;29:199–206.
76. Osborne SE, Detti L. GnRH-analogues for ovarian protection in childhood cancer patients: how adult hypotheses are relevant in prepubertal females. *Curr Drug Targets*. 2013; 14(8):856-63.
77. Falcone T, Moore HC. GnRH agonist for gonadal protection during chemotherapy. *Hum Reprod*. 2015 Dec; 30(12):2711-2
78. Munhoz RR, Pereira AA, Sasse AD, Hoff PM, Traina TA, et al. Gonadotropin-Releasing Hormone Agonists for Ovarian Function Preservation in Premenopausal Women Undergoing Chemotherapy for Early-Stage Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol*. 2016; 2(1):65-73
79. Yang B, Shi W, Yang J, Liu H, Zhao H, et al. Concurrent treatment with gonadotropin-releasing hormone agonists for chemotherapy-induced ovarian damage in premenopausal women with breast cancer: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Breast*. 2013; 22(2):150-7
80. Elgindy E, Sibai H, Abdelghani A, Mostafa M. Protecting Ovaries During Chemotherapy Through Gonad Suppression: A Systematic Review and Meta-analysis. *Obstet Gynecol*. 2015; 126(1):187-95.
81. Moore HC, Unger JM, Phillips KA, Boyle F, Hitre E, et al. Goserelin for ovarian protection during breast-cancer adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med*. 2015; 372:923-32.
82. Blumenfeld Z, Zur H, Dann EJ. Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist Cotreatment During Chemotherapy May Increase Pregnancy Rate in Survivors. *Oncologist*. 2015; 20(11):1283-9.

83. Hasky N, Uri-Belapolsky S, Goldberg K, Miller I, Grossman H, Stemmer SM, Ben-Aharon I, Shalgi R. Gonadotrophin-releasing hormone agonists for fertility preservation: unraveling the enigma? *Hum Reprod.* 2015; 30(5):1089-101
84. Garrido-Oyarzún MF, Castelo-Branco C. Controversies over the use of GnRH agonists for reduction of chemotherapy-induced gonadotoxicity. *Climacteric.* 2016; 19(6):522-525.
85. Danforth DR, Arbogast LK, Friedman CI. Acute depletion of murine primordial follicle reserve by gonadotropin-releasing hormone antagonists. *Fertil Steril.* 2005;83:1333-8.
86. Behringer K, Breuer K, Reineke T, May M, Nogova L, Klimm B, Schmitz T, Wildt L, Diehl V, Engert A. Secondary amenorrhea after Hodgkin's lymphoma is influenced by age at treatment, stage of disease, chemotherapy regimen, and the use of oral contraceptives during therapy: a report from the German Hodgkin's Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol.* 2005;23:7555–64.
87. Behringer K, Wildt L, Mueller H, Mattle V, Ganitis P, van den Hoonaard B, Ott HW, Hofer S, Pluetschow A, Diehl V, Engert A, Borchmann P; German Hodgkin Study Group. No protection of the ovarian follicle pool with the use of GnRH-analogues or oral contraceptives in young women treated with escalated BEACOPP for advanced-stage Hodgkin lymphoma. Final results of a phase II trial from the German Hodgkin Study Group. *Ann Oncol.* 2010; 21(10):2052-60.
88. Morita Y, Perez GI, Paris F, Miranda SR, Ehleiter D, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Xie Z, Reed JC, Schuchman EH, Kolesnick RN, Tilly JL. Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy. *Nat Med.* 2000;6:1109-14.
89. Georgescu E, Goldberg J, Plessis S, Agarwal A. Present and future fertility preservation strategies for female cancer patients. *Obstet Gynecol Surv.* 2008;63:725-32.

90. 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.
91. 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
92. 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;23:4347-53.
93. Oktay K, Hourvitz A, Sahin G, Oktem O, Safro B, Cil A, Bang H. Letrozole reduces estrogen and gonadotropin exposure in women with breast cancer undergoing ovarian stimulation before chemotherapy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:3885-90.
94. Sönmezer M, Türkçüoğlu I, Coşkun U, Oktay K. Random-start controlled ovarian hyperstimulation for emergency fertility preservation in letrozole cycles. *Fertil Steril*. 2011;95:2125.e9-11.
95. Vanden Brink H1, Chizen D, Hale G, Baerwald A. Age-related changes in major ovarian follicular wave dynamics during the human menstrual cycle. *Menopause*. 2013; 20(12):1243-54.
96. Kim SS, Klemp J, Fabian C. Breast cancer and fertility preservation. *Fertil Steril*. 2011;95(5):1535-43
97. Luiz RR, Magnanini MMF. O tamanho da amostra em investigações epidemiológicas. In: Medronho RA, Bloch KV, Luiz RR, Werneck GL, organizadores. *Epidemiologia*. São Paulo: Editora Atheneu; 2009. p. 415-27
98. Lwanga SK, Lemeshow S. Sample size determination in health studies: a practical manual. Geneva, World Health Organization, 1991.

ANEXO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Protocolos de estimulação ovariana controlada (EOC) para criopreservação de oócitos em pacientes com câncer de mama.

Pesquisador: Felipe Andreotta Cavagna

Área Temática: Reprodução Humana (pesquisas que se ocupam com o funcionamento do aparelho reprodutor, procriação e fatores que afetam a saúde reprodutiva de humanos, sendo que nessas pesquisas serão considerados "participantes da pesquisa" todos os que forem afetados pelos procedimentos delas):
(Reprodução Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 36589514.0.0000.0069

Instituição Proponente: Centro de Referência da Saúde da Mulher

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 848.880

Data da Relatoria: 28/10/2014

Apresentação do Projeto:

O presente Estudo prevê a avaliação dos resultados de 100 estimulações ovarianas para coleta e vitrificação de oócitos em pacientes com câncer de mama com desejo de preservação de fertilidade, de acordo com os protocolos assistenciais do programa de oncofertilidade do CRSM.

Objetivo da Pesquisa:

Apresentar os resultados dos esquemas utilizados no Centro de Referência da Saúde da Mulher, e propor protocolos específicos para pacientes com câncer de mama, visando a eficácia, rapidez e segurança do procedimento.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Por já se tratar de um Protocolo Assistencial deste CRSM em andamento, as questões relacionadas à riscos e como principal benefício podemos citar a possibilidade da mulher com câncer de mama engravidar após procedimentos oncológicos

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: 848.880

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Protocolo factível de execução, elaborado adequadamente

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

os termos obrigatórios foram apresentados e encontram-se em conformidade com a resolução 466/12

Recomendações:

Nenhuma recomendação específica. Estudo factível de realização nesta Instituição Hospitalar

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma pendência ou inadequação

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com o parecer do relator

SAO PAULO, 29 de Outubro de 2014

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: dircient@ig.com.br