

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA**



**TESIS DOCTORAL**

**Fallo ovárico precoz quimioinducido en pacientes con  
cáncer de mama en edad reproductiva. Valor pronóstico de  
los estimadores de reserva ovárica**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

**Elena Ceballos García**

DIRECTORES

**Luis Ortiz Quintana**  
**Miguel Martín Jiménez**  
**Federico Pérez Milán**

Madrid, 2018

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA



**FALLO OVÁRICO PRECOZ QUIMIOINDUCIDO EN  
PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA EN EDAD  
REPRODUCTIVA. VALOR PRONÓSTICO DE LOS  
ESTIMADORES DE RESERVA OVÁRICA**

TESIS DOCTORAL

**Elena Ceballos García**

Directores:

**Luis Ortiz Quintana  
Miguel Martín Jiménez  
Federico Pérez Milán**

Madrid, 2017



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA



**FALLO OVÁRICO PRECOZ QUIMIOINDUCIDO  
EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA EN  
EDAD REPRODUCTIVA. VALOR PRONÓSTICO  
DE LOS ESTIMADORES DE RESERVA OVÁRICA**

TESIS DOCTORAL

**Elena Ceballos García**

Madrid, 2017





UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE  
MADRID

D. FEDERICO PÉREZ MILÁN, Profesor Asociado del Departamento de Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado **“Fallo ovárico precoz quimioinducido en pacientes con cáncer de mama en edad reproductiva. Valor pronóstico de los estimadores de reserva ovárica”**, del que es autora **D<sup>a</sup>. Elena Ceballos García**, ha sido realizado bajo su dirección, y reúne las características necesarias para su presentación y defensa pública con el fin de optar al Grado de Doctor.

Y para que conste, firma el presente certificado en Madrid, a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2017.

Dr. F. Pérez Milán





UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE  
MADRID

D. LUIS ORTIZ QUINTANA, Director de la Cátedra Extraordinaria de Patología de la Mama Fundación Tejerina-Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado **“Fallo ovárico precoz quimioinducido en pacientes con cáncer de mama en edad reproductiva. Valor pronóstico de los estimadores de reserva ovárica”**, del que es autora **D<sup>a</sup>. Elena Ceballos García**, ha sido realizado bajo su dirección, y reúne las características necesarias para su presentación y defensa pública con el fin de optar al Grado de Doctor.

Y para que conste, firma el presente certificado en Madrid, a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2017.

Prof. Ortiz Quintana





UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE  
MADRID

D. MIGUEL MARTÍN JIMÉNEZ, Profesor Titular del Departamento de Medicina (Área de Oncología Médica) de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado **“Fallo ovárico precoz quimioinducido en pacientes con cáncer de mama en edad reproductiva. Valor pronóstico de los estimadores de reserva ovárica”**, del que es autora **D<sup>a</sup>. Elena Ceballos García**, ha sido realizado bajo su dirección, y reúne las características necesarias para su presentación y defensa pública con el fin de optar al Grado de Doctor.

Y para que conste, firma el presente certificado en Madrid, a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2017.

Prof. Miguel Martín



A Javi, porque desde hace cuatro años me complementa a la perfección, y me hace ver la vida de un color que no sabía que existía. Te quiero!

A mis padres, porque gracias a ellos soy como soy y estoy donde estoy. Por saber conducirme por el camino adecuado cuando me resistía a estudiar medicina y apoyarme siempre cuando me desesperaba con los exámenes y, en especial, durante el MIR. OS quiero mucho!!



Mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han hecho posible esta Tesis Doctoral:

- Al Dr. Federico Pérez Milán, en calidad de Director de Tesis por el apoyo y las facilidades recibidas.
- Al Profesor Ortiz Quintana, en calidad de Director de Tesis por el apoyo y las facilidades recibidas.
- Al Dr. Martín, en calidad de Director de Tesis por el apoyo y las facilidades recibidas.
- A mis compañeros de la Unidad de Reproducción por su apoyo, ayuda y ánimo en todo momento.
- Al equipo de enfermería de la Unidad de Reproducción, por su ayuda en el procesado de muestras, en el trato con las pacientes y su apoyo y cariño desde el primer día.
- A Bea, compañera del laboratorio de Reproducción, por su ayuda con el procesado y etiquetado de muestras, y por haber sido desde el principio una amiga de las que quedan para siempre.
- A mi equipo de guardia, Juan y Virginia, por su apoyo y ánimo en los buenos y en los malos momentos, por permitirme aprender de ellos en cada guardia y ser para mi un ejemplo a seguir.
- A los compañeros del Departamento de Ginecología y Obstetricia por su apoyo, paciencia y ayuda.
- A mis padres, por animarme como sólo ellos saben y hacerme ver las cosas siempre mas bonitas.
- A Javi, porque desde que empecé en esta tarea a sido un apoyo incondicional, como lo es para mi en todo, por su paciencia infinita en mi mundo de contradicciones y su forma de mimarme.
- A Fede, porque siempre ha sido y será un ejemplo para mi como profesional. Por enseñarme todo lo que sé en reproducción con una paciencia infinita, y dedicarme estas interminables horas siempre con buen carácter.

- A las pacientes que han participado y siguen participando en este estudio, por su entrega, su interés y su confianza en mí, porque sin ellas este trabajo no habría sido posible.





## ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>21</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>25</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>27</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>31</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>37</b>
<b>1.1. CANCER DE MAMA Y FERTILIDAD.....</b>	<b>37</b>
1.1.1. Aspectos epidemiológicos.....	37
1.1.2. Seguridad de la gestación tras cáncer de mama .....	38
1.1.3. Aspectos relacionados con las expectativas reproductivas de las pacientes .	39
1.1.4. Aspectos pronósticos en relación con la indicación de QT.....	40
1.1.5. Aspectos terapéuticos .....	41
<b>1.2. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A QUIMIOTERAPIA SOBRE LA RESERVA OVÁRICA..</b>	<b>46</b>
1.2.1. Mecanismos directos de toxicidad germinal.....	46
1.2.2. Mecanismos indirectos de toxicidad germinal.....	48
1.2.3. Fallo ovárico asociado a quimioexposición .....	51
<b>1.3. FACTORES ASOCIADOS AL RIESGO DE FALLO OVÁRICO QUIMIOINDUCIDO.....</b>	<b>53</b>
1.3.1. Régimen de QT .....	53
1.3.2. Edad.....	56
1.3.3. Estado basal de la reserva ovárica.....	61
<b>1.4. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO. ....</b>	<b>79</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>87</b>
<b>2.1. GENERAL.....</b>	<b>87</b>
<b>2.2. SECUNDARIOS .....</b>	<b>87</b>

## Índices

<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	<b>88</b>
<b>3.1. HIPÓTESIS RELACIONADA CON EL OBJETIVO PRINCIPAL</b> .....	<b>88</b>
3.1.1. Hipótesis conceptual: .....	88
3.1.2. Hipótesis operativa:.....	88
<b>3.2. HIPÓTESIS RELACIONADA CON EL OBJETIVO SECUNDARIO</b> .....	<b>89</b>
3.2.1. Hipótesis conceptual: .....	89
3.2.2. Hipótesis operativa:.....	89
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>93</b>
<b>4.1. DISEÑO</b> .....	<b>93</b>
<b>4.2. ÁMBITO</b> .....	<b>93</b>
<b>4.3. POBLACIÓN DE INTERÉS</b> .....	<b>93</b>
<b>4.4. POBLACIÓN DE ESTUDIO</b> .....	<b>93</b>
<b>4.5. CRITERIOS DE INCLUSIÓN</b> .....	<b>93</b>
<b>4.6. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN</b> .....	<b>94</b>
<b>4.7. FUENTES DE INFORMACIÓN CLÍNICA</b> .....	<b>94</b>
<b>4.8. DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES DEL ESTUDIO</b> .....	<b>94</b>
4.8.1. Variables independientes (explicativas) .....	94
4.8.2. Variables dependientes (de respuesta).....	94
4.8.3. Covariables .....	95
<b>4.9. MÉTODOS DE OBSERVACIÓN Y MEDIDA</b> .....	<b>97</b>
4.9.1. Criterios diagnósticos y unidades de medida .....	97
4.9.2. Métodos de cuantificación específicos .....	100
<b>4.10. PERIODO DE ACUMULACIÓN DE OBSERVACIONES</b> .....	<b>101</b>
<b>4.11. FASES DE OBSERVACIÓN</b> .....	<b>101</b>
4.11.1. Fase previa a la quimioterapia .....	101
4.11.2. Primer control postquimioterapia.....	102

## Índices

4.11.3. Fase de observación semestral .....	103
<b>4.12. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO MUESTRAL .....</b>	<b>103</b>
<b>4.13. MÉTODOS ESTADÍSTICOS .....</b>	<b>103</b>
4.13.1. Descripción de variables.....	103
4.13.2. Análisis de asociación .....	104
4.13.3. Análisis de magnitud de efecto .....	104
<b>4.14. ASPECTOS ÉTICOS Y LEGALES .....</b>	<b>106</b>
4.14.1. Autorización del estudio.....	106
4.14.2. Confidencialidad.....	106
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>109</b>
<b>5.1. DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES DEL ESTUDIO .....</b>	<b>109</b>
5.1.1. Características basales y antecedentes de las pacientes .....	111
5.1.2. Relativas a la reserva ovárica basal .....	114
5.1.3. Relativas a la enfermedad tumoral .....	119
5.1.4. Relativas al tratamiento quirúrgico .....	122
5.1.5. Relativas a la quimioterapia .....	123
5.1.6. Relativas a la inmunoterapia .....	124
5.1.7. Relativas a la hormonoterapia .....	124
5.1.8. Relativas a procedimientos de preservación de la fertilidad .....	125
5.1.9. Relativas a la reserva ovárica tras quimioexposición .....	126
5.1.10. Relativas al fallo ovárico tras quimioexposición.....	133
<b>5.2. ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN Y ESTIMACIÓN UNIVARIADA DE MAGNITUD DE EFECTO 138</b>	
5.2.1. Asociación variables explicativas y fallo ovárico clínico .....	138
5.2.2. Asociación entre variables explicativas y fallo ovárico oculto.....	151
5.2.3. Asociación entre variables explicativas y reserva ovárica severamente disminuida.....	157
5.2.4. Asociación entre covariables y variables de resultado.....	159

**Índices**

5.2.5. Asociación entre covariables y variables explicativas .....	162
<b>5.3. ANÁLISIS BIVARIADO .....</b>	<b>165</b>
5.3.1. Análisis bivariado según covariables del efecto de RFA preQT sobre restablecimiento de ciclos menstruales.....	165
5.3.2. Análisis bivariado según covariables del efecto de los niveles combinados de AMH y RFA preQT sobre restablecimiento de ciclos menstruales .....	167
<b>5.4. ANÁLISIS MULTIVARIADO .....</b>	<b>169</b>
5.4.1. Análisis multivariado con finalidad explicativa.....	169
5.4.2. Análisis multivariado con finalidad predictiva.....	173
<b>6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>177</b>
<b>6.1. RESULTADOS RELEVANTES .....</b>	<b>177</b>
6.1.1. Asociación de estimadores de reserva con fallo ovárico clínico .....	177
<b>6.2. FORTALEZAS .....</b>	<b>185</b>
6.2.1. Estimación de la reserva ovárica basal.....	185
6.2.2. Variables de resultado consideradas.....	187
6.2.3. Control del efecto potencial de las covariables.....	189
6.2.4. Definición y caracterización de la población de interés .....	191
<b>6.3. LIMITACIONES .....</b>	<b>192</b>
6.3.1. Variables de exposición y resultado .....	192
6.3.2. Tamaño muestral reclutado y duración del seguimiento.....	193
6.3.3. Frecuencia y origen de las pérdidas; potencia estadística real .....	194
<b>6.4. IMPLICACIONES PARA LA PRÁCTICA CLÍNICA.....</b>	<b>195</b>
<b>6.5. IMPLICACIONES PARA LA INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>196</b>
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>201</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>205</b>

## Índices

### **ÍNDICE DE ABREVIATURAS**

AC:	Adriamicina, ciclofosfamida
AMH:	Hormona Antimulleriana
AUC:	<i>Area under the curve</i>
BAX:	<i>BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator</i>
BRCA:	Breast Cancer Type susceptibility protein
BSGC:	Biopsia selectiva de ganglio centinela
CMF:	Ciclofosfamida, Metotrexate, 5-Fluoracilo
CT:	Ciclofosfamida, taxanos
E2:	Estradiol
FAC/FEC:	Fluorouracil, doxorubicin / epirubicin, ciclofosfamida
FOP:	Fallo ovárico prematuro
FSH:	Hormona Folículoestimulante
GnRH:	Hormona liberadora de gonadotropinas
HR:	Hazard ratio
IC:	Intervalo de confianza
IMC:	Índice de masa corporal
LH:	Hormona Luteinizante
Ng:	Nanogramos
OR:	Odds Ratio
PreQT:	Prequimioterapia
PostQT	Postquimioterapia
pg	Picogramos
PT:	Carboplatino, taxanos
QT:	Quimioterapia
RE:	Receptores estrógenos
RFA:	Recuento de folículos antrales
RP:	Receptores progesterona
RR:	Riesgo relativo
TAC:	Docetaxel, doxorubicin, ciclofosfamida
TCH:	Docetaxel, carboplatino, trastuzumab
TMX:	Tamoxifeno
TRA:	Técnicas de Reproducción Asistida
TUNEL:	<i>Terminal nucleotidyl transferase-mediated Nick end labeling</i>
UI:	Unidades internacionales

## Índices

### ÍNDICE DE TABLAS

	Páginas
Tabla 1: Características basales de las pacientes .....	111
Tabla 2: Concentraciones séricas preQT de FSH de estradiol y RFA, según fase del ciclo de cuantificación inicial.....	115
Tabla 3: Concentración sérica de AMH y RFA iniciales .....	116
Tabla 4: Distribución de AMH sérica prequimioterapia estratificada según diferentes puntos de corte.....	117
Tabla 5: Resultado de la estadificación ganglionar axilar .....	122
Tabla 6: Regímenes de quimioterapia neoadyuvante .....	123
Tabla 7: Regímenes de quimioterapia adyuvante .....	124
Tabla 8: Ovocitos preservados.....	125
Tabla 9: Evolución del RFA a lo largo de los tres primeros controles semestrales tras QT .....	127
Tabla 10: Evolución de la AMH sérica (ng/mL) a lo largo de los tres primeros controles semestrales tras QT .....	129
Tabla 11: Evolución de la FSH sérica (UI/L) a lo largo de los tres primeros controles semestrales tras QT .....	131
Tabla 12: Frecuencia acumulada de restablecimiento de ciclos menstruales tras finalización de quimioterapia .....	135
Tabla 13: Frecuencia de fallo ovárico oculto según diferentes criterios de definición basados en RFA postQT.....	136
Tabla 14: Frecuencia de reaparición de ciclos menstruales a los 6 meses de fin de QT según RFA estratificado .....	139
Tabla 15: Frecuencia de reaparición de ciclos menstruales a los 12 meses de fin de QT según RFA estratificado .....	139
Tabla 16: Frecuencia de reaparición de ciclos menstruales a los 18 meses de fin de QT según RFA estratificado .....	140
Tabla 17: Frecuencia de reaparición de ciclos menstruales al final del seguimiento según RFA estratificado.....	140
Tabla 18: Asociación y magnitud de efecto del RFA previo a QT sobre la probabilidad de restablecimiento de ciclos en función del tiempo .....	141
Tabla 19: Frecuencia de reaparición de ciclos menstruales a los 6 meses del fin de QT según niveles de AMH preQT estratificada.....	143

## Índices

Tabla 20: Frecuencia de reaparición de ciclos menstruales a los 12 meses del fin de QT según niveles de AMH preQT estratificada.....	143
Tabla 21: Frecuencia de reaparición de ciclos menstruales a los 18 meses del fin de QT según niveles de AMH preQT estratificada.....	144
Tabla 22: Frecuencia de reaparición de ciclos menstruales al final del periodo de seguimiento según niveles de AMH preQT estratificada .....	144
Tabla 23: Asociación y magnitud de efecto del nivel de AMH previo a QT sobre la probabilidad de restablecimiento de ciclos en función del tiempo .....	145
Tabla 24: Distribución de covariables estratificadas por exposición .....	149
Tabla 25: Distribución de covariables estratificadas por exposición .....	150
Tabla 26: Asociación y capacidad discriminativa del RFA previo a QT .....	151
Tabla 27: Asociación y capacidad discriminativa del AMH previo a QT.....	153
Tabla 28: Distribución de variables de resultado estratificadas por exposición .....	154
Tabla 29: Distribución de variables de resultado estratificadas por exposición .....	155
Tabla 30: Análisis de asociación y magnitud de efecto de características basales, antecedentes de la paciente y relacionadas con la reserva ovárica sobre restablecimiento de ciclos .....	159
Tabla 31: Análisis de asociación y magnitud de efecto de variables relacionadas con la enfermedad tumoral con el restablecimiento de ciclos .....	160
Tabla 32: Análisis de asociación y magnitud de efecto de características relativas al tratamiento quirúrgico y quimioterápico con el restablecimiento de ciclos.....	161
Tabla 33: Análisis de asociación entre características basales, antecedentes de la paciente y relacionadas con la reserva ovárica y el RFA preQT .....	163
Tabla 34: Análisis de asociación entre características basales, antecedentes de la paciente y relacionadas con la reserva ovárica y la concentración de AMH preQT .....	164
Tabla 35: Análisis bivariado del efecto del RFA previo a quimioterapia $\leq 12$ sobre la probabilidad de restablecimiento de ciclos menstruales según covariables asociadas .....	166
Tabla 36: Análisis bivariado del efecto de los niveles séricos de AMH $< 1,4$ ng/mL o el RFA $< 11$ folículos previos a QT sobre la probabilidad de restablecimiento de ciclos menstruales según covariables asociadas.....	167
Tabla 37: Análisis bivariado del efecto de los niveles séricos de AMH $\geq 4$ ng/mL o el RFA $\geq 16$ folículos previos a QT sobre la probabilidad de restablecimiento de ciclos menstruales según covariables asociadas.....	168
Tabla 38: Análisis multivariado explicativo del efecto del RFA $< 12$ .....	170
Tabla 39: Análisis multivariado explicativo del efecto de la AMH $\geq 4$ ng/mL o RFA $\geq 16$ .....	171

**Índices**

Tabla 40: Análisis multivariado explicativo del efecto de la AMH < 1,4 ng/mL o RFA <11 ..... 172

Tabla 41: Análisis multivariado de la capacidad predictiva del RFA ..... 173

Índices

**ÍNDICE DE FIGURAS**

	Páginas
Figura 1: Distribución cronológica del reclutamiento de pacientes durante el periodo de estudio.....	109
Figura 2: Distribución de las pacientes según estado menstrual a lo largo del seguimiento .....	110
Figura 3: Distribución por edad al inicio del seguimiento .....	111
Figura 4: Distribución del IMC por estratos ponderales de la OMS .....	112
Figura 5: Distribución por paridad .....	113
Figura 6: Antecedentes familiares de cáncer de mama .....	114
Figura 7: Distribución de la concentración sérica inicial de AMH.....	116
Figura 8: Distribución del RFA inicial.....	117
Figura 9: Distribución por subestadios TNM .....	119
Figura 10: Expresión tumoral de receptores hormonales ( A: estrógenos; B: progesterona).....	120
Figura 11: Expresión tumoral de proteína Her2 neu .....	120
Figura 12: Distribución de intensidad de expresión tumoral de proteína Ki67 .....	121
Figura 13: Número de pacientes con RFA por control de seguimiento y según exposición a aGnRH .....	126
Figura 14: Evolución del RFA tras la exposición a QT a lo largo del periodo de seguimiento en pacientes sin tratamiento con aGnRH (A: media con IC 95%; B: mediana con IC 95%)Las pacientes que recibieron hormonoterapia adyuvante con agonistas GnRH fueron un subgrupo minoritario en cada uno de los controles de seguimiento. Las distribuciones de los RFA obtenidos en cada control se resumen en la figura 15.....	127
Figura 15: Evolución del RFA tras la exposición a QT a lo largo del periodo de seguimiento en pacientes bajo tratamiento con aGnRH (A: media con IC 95%; B: mediana con IC 95%).....	128
Figura 16: Número de pacientes con AMH sérica por control de seguimiento y según exposición a aGnRH .....	128
Figura 17: Evolución de la concentración sérica de AMH tras la exposición a QT a lo largo del periodo de seguimiento en pacientes sin tratamiento aGnRH (A: media con IC 95%; B: mediana con IC 95%).....	129
Figura 18: Evolución de la concentración sérica de AMH tras la exposición a QT a lo largo del periodo de seguimiento en pacientes bajo tratamiento aGnRH (A: media con IC 95%; B: mediana con IC 95%) .....	130

## Índices

Figura 19: Número de pacientes con FSH sérica por control de seguimiento y según exposición a aGnRH .....	131
Figura 20: Evolución de la concentración sérica de FSH tras la exposición a QT a lo largo del periodo de seguimiento en pacientes sin tratamiento aGnRH (A: media con IC 95%; B: mediana con IC 95%) .....	132
Figura 21: Evolución de la concentración sérica de FSH tras la exposición a QT a lo largo del periodo de seguimiento en pacientes con tratamiento aGnRH (A: media con IC 95%; B: mediana con IC 95%) .....	132
Figura 22: Probabilidad acumulada de aparición de amenorrea en función del tiempo .	133
Figura 23: Probabilidad acumulada de restablecimiento de ciclos en pacientes en amenorrea quimioinducida .....	134
Figura 24: Capacidad discriminativa del RFA en relación con la reaparición de ciclos menstruales (Curva ROC).....	138
Figura 25: Capacidad discriminativa de la AMH preQT en relación con la reaparición de ciclos menstruales (Curva ROC).....	142
Figura 26: Distribución temporal de reaparición de ciclos menstruales en función de la reserva ovárica estimada (AMH $\geq 4$ ng/mL o RFA $\geq 16$ versus AMH $< 4$ ng/mL y RFA $< 16$ ).....	147
Figura 27: Distribución temporal de reaparición de ciclos menstruales en función de la reserva ovárica estimada (AMH $< 1,4$ ng/mL o RFA $< 11$ versus AMH $\geq 1,4$ ng/mL y RFA $\geq 11$ ).....	147
Figura 28: Riesgo relativo de fallo ovárico oculto, definido según distintos criterios, en el momento de restablecimiento de ciclos y al final del seguimiento en función del RFA preQT .....	152
Figura 29: Riesgo relativo de fallo ovárico oculto, definido según distintos criterios, en el momento de restablecimiento de ciclos y al final del seguimiento en función de la concentración de AMH preQT .....	153
Figura 30: Riesgo relativo de fallo ovárico oculto, definido según distintos criterios, en el momento de restablecimiento de ciclos y al final del seguimiento en función de la variable combinada AMH preQT $< 1,4$ ng/mL o RFA preQT $< 11$ . .....	156
Figura 31: Riesgo relativo de fallo ovárico oculto, definido según distintos criterios, en el momento de restablecimiento de ciclos y al final del seguimiento en función de la variable combinada AMH preQT $\geq 4$ ng/mL o RFA preQT $\geq 16$ .....	157

## Resumen

### **RESUMEN**

#### **TÍTULO DEL ESTUDIO**

Fallo ovárico precoz quimioinducido en pacientes con cáncer de mama en edad reproductiva. Valor pronóstico de los estimadores de reserva ovárica.

#### **ÁMBITO DEL ESTUDIO**

Sección de Reproducción. Hospital General Universitario Gregorio Marañón.  
C/ Odonnel nº 39-40 28009 Madrid.

#### **OBJETIVO PRINCIPAL**

Analizar el efecto de la reserva ovárica basal estimada por medio del recuento ecográfico de folículos antrales y de la concentración sérica de AMH, sobre el fallo ovárico clínico quimioinducido en pacientes en edad reproductiva con cáncer de mama tratadas con quimioterapia neoadyuvante o adyuvante.

#### **DISEÑO**

Estudio de cohortes prospectivo con análisis de supervivencia

#### **PALABRAS CLAVE**

Cáncer de mama, fallo ovárico quimioinducido, reserva funcional ovárica, preservación fertilidad, fallo ovárico oculto.

#### **MARCO CONCEPTUAL Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO**

El cáncer de mama es el tumor más frecuente en las mujeres del mundo occidental. Un 15% de estas mujeres se encuentran en edad reproductiva en el momento del diagnóstico, sin haber completado aun su deseo genésico. Un efecto colateral desfavorable de la quimioterapia es el fallo ovárico precoz, que produce en estas pacientes un estado postmenopáusico temporal o definitivo.

A día de hoy, son escasos en la literatura los estudios prospectivos y centrados en mujeres con cáncer de mama en edad reproductiva, que evalúen los marcadores de reserva ovárica para el cálculo de la probabilidad de recuperación de la función ovárica tras la quimioterapia. Una evaluación más precisa e individual del riesgo de infertilidad quimioinducida sería de gran ayuda para mejorar la información, consejo y orientación de las pacientes con cáncer de mama y deseo reproductivo.

#### **OBJETIVOS:**

Principal:

## Resumen

Evaluar la asociación de la reserva funcional ovárica y la utilidad pronóstica de sus principales estimadores –recuento de folículos antrales y AMH– en relación con la aparición de fallo ovárico clínico en pacientes premenopáusicas en edad reproductiva tratadas con quimioterapia por carcinoma epitelial de mama.

Secundarios:

- Estimar la frecuencia de fallo ovárico oculto en pacientes afectadas por cáncer de mama expuestas a regímenes actuales de quimioterapia
- Analizar la asociación de los estimadores de reserva ovárica clínicos, bioquímicos y ecográficos con el riesgo de aparición de fallo ovárico oculto quimioinducido.
- Analizar la asociación de los estimadores de reserva ovárica clínicos, bioquímicos y ecográficos con el riesgo de aparición de reducción severa de la reserva funcional ovárica, entiendo por tal la aparición de fallo ovárico oculto o clínico a lo largo del seguimiento.

## METODOLOGÍA:

Se ha realizado un estudio de cohortes prospectivo con análisis de supervivencia para evaluar el efecto de la reserva ovárica pre-quimioterapia, estimada por medio de RFA y AMH, sobre la probabilidad acumulada de restablecimiento de ciclos menstruales tras el tratamiento quimioterápico, evento complementario al fallo ovárico clínico, en pacientes en edad reproductiva diagnosticadas de cáncer de mama. Las variables de exposición se han considerado como continuas y se han dicotomizado por diferentes puntos de corte con relevancia clínica. Su asociación a lo largo del tiempo se ha evaluado mediante análisis de supervivencia aplicando modelos de Kaplan-Meier y regresión de Cox. La magnitud de efecto se ha estimado mediante el hazard ratio o el riesgo relativo en función de que se considerase o no el tiempo hasta el evento. Se ha realizado análisis bivariado de interacción-confusión y multivariado con intención explicativa y predictiva.

## RESULTADOS:

Se analiza una cohorte de 67 pacientes con cáncer de mama en edad reproductiva (mediana de edad 34 años) sometidas a quimioterapia neoadyuvante o adyuvante. La frecuencia de restablecimiento de ciclos fue del 64,8%, en su mayoría dentro los 12 meses posteriores a la finalización de la quimioterapia (94.5%). Sólo 17 pacientes (31,8%) permanecieron en amenorrea quimioinducida al final del seguimiento.

Se ha identificado una asociación significativa entre las pacientes con RFA pre-quimioterapia menor a 12 y el riesgo acumulado de amenorrea definitiva (HR: 0,38; IC 95%: 0,16; 0,92; p=0,03), sin embargo no se encontró asociación con los niveles de AMH pre-quimioterapia (HR: 1,04; IC 95%: 0,95; 1,13; p=0,34). Igualmente, se ha observado mayor riesgo acumulado de fallo ovárico clínico al estratificar la cohorte en pacientes con ‘mejor reserva ovárica’ (AMH superior a 4 ng/mL y/o RFA mayor de 16) o de ‘peor reserva’ (AMH menor a 1,4 ng/mL y/o RFA menor de 11) por medio del RFA combinado

## Resumen

con la concentración de AMH sérica preQT (HR: 0,45; IC 95%; 0,21: 0,98; p=0,04 y HR: 0,42; IC 95%;; 0,19: 0,93; p=0,03 respectivamente).

La edad y el IMC mostraron asociación con el RFA, así como la FSH basal y la quimioterapia basada en ciclofosfamida con las variables combinadas AMH-RFA. Con el restablecieron los ciclos mostraron asociación significativa positiva la edad menor de 32 años, el subtipo molecular luminal B, y la afectación axilar. Según el análisis bivariado el IMC y la afectación axilar resultaron variables potencialmente confusoras. En ningún caso la confusión detectada anuló la asociación estadística entre las variables explicativas y las de resultado. Todas las variables confusoras fueron introducidas en los modelos multivariados explicativos, comprobando la ausencia de modificación relevante del efecto de las variables explicativas sobre el restablecimiento de ciclos.

Por medio del análisis multivariado explicativo el RFA pre-quimioterapia resultó la única variable asociada con carácter independiente con el restablecimiento de ciclos, ajustando por las variables confusoras.

El modelo multivariado con finalidad predictiva con mejor balance entre sensibilidad y especificidad, fue el que incorporó el recuento de folículos antrales, la edad, IMC y la concentración de AMH sérica. Este modelo estimó una frecuencia de recuperación de ciclos del 87%, es decir, superior a la observada, y predijo correctamente el 66% de las observaciones y proporcionó una sensibilidad del 68%, una especificidad del 57,1% y valores predictivos positivo y negativo del 91% y 21% respectivamente.

En cuanto al fallo ovárico oculto, se ha definido con criterios de marcadores de reserva ovárica postquimioterapia según los umbrales aceptados para definir la elevada probabilidad de baja respuesta ovárica a la estimulación (RFA postQT < 5 y AMH sérica < 0,5 ng/mL). El efecto se ha estimado en el momento del restablecimiento de ciclos y al final del seguimiento. Según nuestros datos, el riesgo de aparición de los estados definidos como fallo ovárico oculto se asoció de forma significativa pero inconsistente a al RFA y concentración sérica de AMH pre-QT. El fallo ovárico oculto al final del seguimiento, definido como RFA menor de 5 y/o AMH menor de 0,5 ng/mL, resultó asociada con un RFA pre-QT inferior a 17 (RR: 1,3; IC: 1,03; 1,6; p=0,04), y con la variable combinada siendo la concentración de AMH preQT inferior a 4 ng/mL y/o RFA preQT menor de 16' (HR: 1,5; IC 95: 1,05; 2,4; p=0,03).

También se ha constatado asociación entre las variables explicativas y la frecuencia acumulada de desarrollar una reducción severa de la reserva ovárica al final del seguimiento, entendida como amenorrea persistente o fallo ovárico oculto. Esta condición también resultó significativamente asociada con el RFA preQT, estratificado por la mediana de 17 folículos. (RR 1,3 (IC 95% 1,05; 1,7) p= 0,02) y con la variable combinada AMH-RFA que define la reserva ovárica elevada (RR 1,28 (1,04;1,6) p=0,03).

## CONCLUSIONES:

La reserva folicular ovárica, estimada por medio del recuento de folículos antrales, determina la probabilidad de restablecimiento de ciclos tras exposición a quimioterapia en pacientes en edad reproductiva afectadas por cáncer de mama. El número de folículos antrales identificado como umbral de riesgo para amenorrea definitiva es

## Resumen

superior al propuesto para la identificación de pacientes con baja respuesta a la estimulación ovárica. La existencia de un RFA menor de 12 triplica el riesgo estimado de amenorrea definitiva tras QT, efecto que resulta tan intenso como el de la edad superior a 32 años.

El mejor modelo predictivo de restablecimiento de ciclos, basado según nuestro análisis en la edad, RFA, la AMH y el IMC, solo resulta adecuadamente fiable en la predicción del resultado positivo.

La reserva ovárica previa, estimada por medio del RFA aislado o en combinación con la AMH sérica, parece útil para evaluar el riesgo de fallo ovárico oculto al final del seguimiento en pacientes quimioexpuestas.

## Resumen

### **SUMMARY**

#### **TITLE**

Chemotherapy-induced ovarian failure in reproductive-aged breast cancer patients.  
Prognostic value of ovarian reserve markers.

#### **SETTING**

Reproduction Unit. Gregorio Marañón University Hospital.  
C/ O'Donnell nº 39-40 28009 Madrid.

#### **AIM**

To assess the effect of chemotherapy on ovarian reserve in reproductive-aged breast cancer patients and to identify prognostic factors associated with ovarian failure.

#### **DESIGN**

Prospective cohort study with a survival analysis.

#### **KEY WORDS**

Breast cancer, chemotherapy-induced amenorrhea, ovarian failure, ovarian reserve, fertility preservation.

#### **BACKGROUND**

Breast cancer is one of the most frequently diagnosed malignancies in young women worldwide. Approximately 15% of women will develop breast cancer during their reproductive age, before their family plan is complete. One of the possible long-term adverse effects of chemotherapy regimens is premature ovarian failure, which can be temporal or definitive.

Nowadays there are limited prospective studies, focusing on reproductive-aged breast cancer patients, evaluating ovarian reserve markers to predict the probability of ovarian function resumption after chemotherapy. More accurate and individualized assessment of risk of chemo-induced infertility could improve the information and advice given to breast cancer patients with reproductive desire.

#### **SPECIFIC OBJECTIVES**

##### **Main:**

To assess the association between pretreatment functional ovarian reserve and posterior development of premature ovarian failure, and to evaluate prognostic utility of its main markers – antral follicle count and antimüllerian hormone- in reproductive-aged breast cancer patients exposed to chemotherapy.

##### **Secondary**

- To evaluate the occurrence of subclinical ovarian failure in breast cancer patients exposed to current chemotherapy regimens.
- To assess the association between ovarian reserve markers and the risk of developing chemo-induced subclinical ovarian failure.
- To assess the association between ovarian reserve markers and the risk of severe ovarian function impairment, defined as subclinical ovarian failure or definitive amenorrhea developed over the follow up period.

#### **METHODS**

We performed a prospective cohort study to investigate the association between pre-treatment ovarian reserve, estimated by the antral follicle count (AFC) and the antimüllerian hormone (AMH) levels, and the cumulative probability of menses resumption after chemotherapy in reproductive-aged breast cancer patients. Exposure

## Resumen

variables were considered as continuous and also stratified by different clinically significant cut-off points. To evaluate this association over time, a survival analysis was performed, applying a Kaplan-Meier model and a Cox regression test. The effect magnitude has been estimated by a hazard ratio or a relative risk, depending on whether time to event was considered or not. An interaction- confusion bivariate analysis and a multivariate analysis with explanatory and predictive intention were also performed.

## RESULTS

A cohort of 67 breast cancer patients in their reproductive age (median of age of 34 years old) exposed to neoadjuvant or adjuvant chemotherapy was recruited. In this cohort, the relative frequency of menses resumption was 64.8%, mostly up to 12 months after ending chemotherapy (94.5%). Only 17 patients (31.8%) suffered persistent amenorrhea at the end of follow-up period.

A significant association between the a pretreatment AFC lesser than 12 and the cumulative risk of posterior definitive amenorrhea (HR=0,38; 95%CI: 0,16-0,92; p=0,03). However, we did not found the same association with the pretreatment AMH levels (HR=1,04; 95%CI: 0,95-1,13; p=0,34). Similarly, the greater cumulative risk of symptomatic ovarian failure was found when the cohort was stratified by two thresholds combining the AFC and the AMH levels pretreatment: the "high ovarian reserve" (AMH>4 ng/mL and/or AFC>16) and the "poor ovarian reserve" (AMH<1,4 ng/mL and/or AFC<11) (HR=0,45; 95%CI: 0,21-0,98; p=0,04; and HR=0,42; 95%CI: 0,19-0,93;p=0,03; respectively).

Age and BMI were found to be associated with AFC, and basal FSH level and the chemotherapy regimens based on cyclophosphamide with the combined variable AFC-AMH. The resumption of menses was positively associated with an age lesser than 32 years old, a luminal B cancer subtype, and absence of axillary involvement. In the bivariate analysis, BMI and axillary lymph node involvement were revealed as potential confounding variables; however, this interaction did not affect in any case the statistical association between the explanatory and response variables. All confounding variables were introduced in a multivariate explanatory analysis to confirm the absence of substantial changes in the effect of the explanatory variables on the resumption of menses.

After controlling for the confounding variables, pre-treatment AFC was the only variables independently associated with menses resumption in the multivariate analysis.

In the predictive model, the best balance between sensitivity and specificity was the one that included AFC, age BMI and AMH levels. This model predicted a menses resumption frequency of 87%, greater than the observed frequency, and was able to correctly predict 66% of observations with a 68% sensitivity and a 57,1% specificity, and 91 and 21% positive and negative predictive value, respectively.

## Resumen

Secondly, subclinical ovarian failure was defined using ovarian reserve makers after chemotherapy, according to the standard definition of poor ovarian response: a post-treatment AFC<5 or an AMH level< 0,5 mg/mL. These variables were measure at the time of menses resumption and at the end of the follow-up period. According to our date, the risk of development of subclinical ovarian failure was statistically significant but inconsistently associated to pre-treatment AFC and AMH levels. At the end of the follow-up, the risk of subclinical ovarian failure was found to be associated to a pretreatment AFC lesser than 17 (RR= 1,3; 95%CI: 1,03- 1,6; p=0,04), and to the combined variable "AMH< 4 ng/mL and/or AFC<16" (HR= 1,5; 95%CI 1,05-2,4; p=0,03).

Finally, a significant association was also found between the explanatory variables and the risk of severe impairment of ovarian reserve at the end of the follow-up period. This was negatively associated to the pretreatment AFC when it was stratified by the median (17 follicles) (RR= 1,3; 95%CI: 1,05-1,7; p=0,02) and to the combined variable AMH-AFC that referred to the high ovarian reserve (RR= 1,28; 95%CI: 1,04-1,6; p=0,03).

## CONCLUSION

According to our data, pretreatment ovarian reserve, estimated by the AFC, could predict the possibility of menses resumption after exposure to chemotherapy in reproductive-age breast cancer patients. The AFC cut-off identified to predict definitive amenorrhea was greater than the one commonly accepted to define a poor ovarian response to stimulation. An AFC lesser than 12 triplicated the risk of definitive amenorrhea after chemotherapy, as well as an age greater than 32 years old. Best model to predict menses resumption was the one including age, AFC, BMI and AMH. However, this only predicts correctly positive results. Finally, pretreatment ovarian reserve, estimated by the AFC alone or combined with AMH levels, was associated to the risk of subclinical ovarian failure at the end of the follow-up in patients exposed to chemotherapy.

## Resumen

# INTRODUCCIÓN



## Introducción

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. **CANCER DE MAMA Y FERTILIDAD**

### 1.1.1. **Aspectos epidemiológicos.**

A lo largo de las últimas décadas, se ha observado una notable modificación de las expectativas, aspiraciones y estilos de vida en la población femenina de los países desarrollados. El cambio más relevante en relación con el proyecto reproductivo personal, es su masiva incorporación al mundo laboral, lo que ha contribuido a generalizar el uso de métodos eficaces de control de la fertilidad. Este hecho ha devenido en un aumento de la edad de la primera maternidad, y una reducción del número de hijos por mujer en edad fértil, fenómenos demográficos que resultan especialmente acusados en países como España, donde se han registrado durante varios años los indicadores coyunturales de fertilidad cruda por mujer más bajos del mundo, lo que ha dado lugar a índices de fertilidad inferiores a la tasa de reposición [1].

En el año 2006 la incidencia anual ajustada a la edad del cáncer de mama en la Unión Europea fue de 110.3/100 000 y la mortalidad de 25.0/100 000 [2]. Durante la última década, la incidencia de cáncer de mama ha aumentado a un ritmo promedio anual del 0,5%, mientras que la tasa de mortalidad ha disminuido un 1,4% en el mismo periodo en mujeres menores de 50 años [3]. A este incremento en la incidencia han contribuido tanto la generalización y efectividad de las estrategias de cribado, capaces de detectar la enfermedad en fases de desarrollo temprano y a edades más precoces, como el envejecimiento de la población [2]. Estas circunstancias, junto con la mejora de los abordajes terapéuticos, ha redundado también en la mejora del pronóstico de supervivencia global y libre de enfermedad [4]. En la actualidad, más del 90% de los mismos se diagnostican en etapa local o loco-regional, y su supervivencia a los 5 años alcanza el 97 y 79% respectivamente [5, 6].

Según datos procedentes de Estados Unidos, alrededor de un 15% de las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama son premenopaúsicas, y de estas, el 2% son mujeres entre 20 y 34 años, y el 11% entre 35 y 45 años [7]. Por otro lado, el retraso en la edad de la maternidad determina que una proporción importante de mujeres con cáncer de mama, se encuentre en edad reproductiva y no hayan completado su deseo genésico en el momento del diagnóstico [8-10]. En España, la edad media de la primera

## Introducción

maternidad según la última actualización del Instituto Nacional de Estadística ha aumentado hasta 30,6 años en 2015, cifra que ha venido incrementándose de forma sostenida desde hace décadas [1].

En resumen, las pacientes premenopáusicas en edad reproductiva constituyen una proporción creciente entre la población afectada por cáncer de mama, presentan tumores diagnosticados en fases precoces y su pronóstico de respuesta completa al tratamiento ha mejorado de forma progresiva, y puede considerarse muy favorable. Este perfil de pacientes es el que se verá afectada por los efectos secundarios de los tratamientos frente al cáncer, que junto con el retraso de la edad de la gestación determinado además por la aplicación de tratamientos adyuvantes de larga duración, constituyen un reconocido factor de riesgo para la fertilidad [11, 12].

### 1.1.2. Seguridad de la gestación tras cáncer de mama

El concepto en vigor es la inexistencia de asociación entre embarazo y riesgo de recurrencia o de incremento de mortalidad en estas pacientes. En un metaanálisis publicado en 2011 por Azim et al. se analizaron conjuntamente 14 estudios primarios, que evaluaban un total 1244 casos y 18145 controles, concluyen la no existencia de evidencia sobre el ensombrecimiento del pronóstico asociado al embarazo tras el tratamiento del cáncer de mama, siendo el riesgo de muerte por la enfermedad significativamente inferior en pacientes que gestaron (RR: 0,59; IC 95%; 0,5;0,7) que en aquellas que no lo hicieron [13]. Este aumento de la supervivencia fue independiente del tipo de estudio analizado y de la afectación ganglionar. Además, se realizó un subanálisis comparando las pacientes con cáncer de mama que gestaron con las libres de recidiva que no gestaron, sin que se observasen diferencias significativas en la supervivencia (OR conjunta: 0,85; IC95%: 0,53-1,35).

El mismo autor en 2013 publica un estudio retrospectivo multicéntrico en el que compara 333 pacientes con gestaciones tras cáncer de mama con 874 controles sin gestaciones tras el cáncer de mama. No observaron diferencias en cuanto a supervivencia global ni libre de enfermedad según el estado de los receptores estrogénicos entre las pacientes que gestaron y aquellas que no lo hicieron [14].

Los resultados del análisis de una cohorte multipropósito de mas de 10.000 pacientes danesas con cáncer de mama y edad menor de 45 años son consistentes con las conclusiones del metaanálisis de Azim. En dicha cohorte, gestaron 371 pacientes tras el tratamiento de su cáncer de mama y a lo largo del periodo de observación. Los autores

## Introducción

observaron una disminución del riesgo de muerte en el grupo de pacientes que experimentaron una gestación a término comparadas con aquellas que no gestaron (RR: 0,73; IC 95% 0,54;0,99) [15].

Muchas de las pacientes diagnosticadas y tratadas por cáncer de mama en ocasiones experimentan esterilidad y precisan de técnicas de reproducción asistida para lograr gestación. Goldrat en 2015 publicó un estudio multicéntrico retrospectivo con 198 pacientes con cáncer de mama que gestaron tras el diagnóstico, el 90 % de las cuales fue tratada con quimioterapia, y más del 50% con hormonoterapia posterior. De estas pacientes, 25 precisaron técnicas de reproducción asistida. No observaron ninguna diferencia en cuanto al pronóstico de la enfermedad entre las pacientes que gestaron espontáneamente o mediante técnicas de reproducción asistida ( $p=0,54$ ) tras el seguimiento de 63 meses y 50 meses respectivamente. Las pacientes que precisaron TRA fueron mayores en el momento del diagnóstico (31,4 vs 33,7  $p= 0,009$ ) y de la concepción (38 vs 35 años  $p< 0,001$ ) [16].

### **1.1.3. Aspectos relacionados con las expectativas reproductivas de las pacientes**

Las mujeres jóvenes que se enfrentan al diagnóstico de cáncer de mama a menudo presentan inquietud acerca del potencial impacto que el tratamiento oncológico puede tener sobre su futura fertilidad. Las consecuencias emocionales derivadas de estas inquietudes pueden influir en las decisiones que toman acerca de sus tratamientos [17]. En un estudio realizado por Thewes et al. [18] se objetivó que de 228 mujeres menores de 40 años diagnosticadas de cáncer de mama el 71% consultaron en el momento del diagnóstico con algún profesional de la salud acerca de cuestiones relacionadas con la fertilidad [19].

Desde el punto de vista psicológico, algunos estudios han evaluado el impacto de la pérdida de la fertilidad tras el tratamiento del cáncer una vez superado el proceso [20]. Se han descrito niveles elevados de estrés psicológico, síntomas depresivos, ansiedad, ruptura de relaciones personales, y menor calidad de vida [21]. Desafortunadamente en muchos casos, este estrés no desaparece con el tiempo. En 2012 Canada y Schover trataron de evaluar el efecto de la infertilidad tras el tratamiento del cáncer sobre el estrés y la calidad de vida a los 10 años del diagnóstico. Para ello estudiaron una muestra de 240 mujeres (todas ellas diagnosticadas a una edad menor de 40 años). Se observó un mayor estrés psicológico en las mujeres sin hijos, que en aquellas con algún

## Introducción

hijo biológico, adoptado o en acogida. No encontraron diferencias según cual fuera el origen del proceso tumoral [22, 23].

Recientemente Shari B. Goldfarb et al. evalúa el grado de información y el interés de 57 pacientes con cáncer de mama por debajo de los 45 años sobre la repercusión que podría tener el tratamiento del cáncer sobre su fertilidad futura y las opciones de preservación de la fertilidad disponibles antes y después del tratamiento. Un 89% de estas pacientes declara conocer el riesgo de fallo ovárico tras el tratamiento, pero sólo un 9% refirió haber recibido información sobre las opciones de preservación de fertilidad. En este estudio concluyen sobre la importancia proporcionar información precoz sobre los aspectos relacionados con la fertilidad posterior al tratamiento de la enfermedad [24]. La supervivencia sería la mayor prioridad para estas pacientes [25, 26]; sin embargo la fertilidad tendría para ellas la suficiente importancia como para influir en las decisiones terapéuticas, sobretodo para las pacientes más jóvenes [17].

### 1.1.4. Aspectos pronósticos en relación con la indicación de QT

El tratamiento sistémico adyuvante en cáncer de mama precoz, tanto hormonal como con quimioterapia, reduce el riesgo de recidiva y de muerte de las pacientes pre y posmenopáusicas. No obstante, la decisión de ofrecer o no dicho tratamiento es a menudo difícil, ya que se trata de un tratamiento tóxico y de elevado coste, que se indica en relación con criterios cuestionables en un porcentaje considerable de pacientes.

Los tumores de cáncer de mama deben dividirse en bajo y alto riesgo de recurrencia, según los factores de mal pronóstico que tenga asociados, como afectación ganglionar, edad, grado de diferenciación, invasión linfovascular, expresión hormonal, amplificación de *Her2/neu* y proliferación. La administración de quimioterapia debe ser valorada según estos factores, evaluando también el riesgo de toxicidad y comorbilidad que implica su administración.

De las distintas clasificaciones existentes respecto al riesgo para la supervivencia global y libre de enfermedad, una de las más aceptadas es la definida en los Criterios de St. Gallen, actualizados en 2015 [27]. Este sistema de estratificación del riesgo, destinado a orientar la elección terapéutica, considera como factores pronósticos no sólo la afectación ganglionar y el tamaño tumoral –reconocidos clásicamente como el primer determinante pronóstico–, sino también aspectos relacionados con la biología tumoral, como la invasión linfovascular, el grado de diferenciación tumoral, la expresión de receptores a estrógenos y progesterona, la expresión del oncogen *Her2/neu* y la edad de

## Introducción

la paciente. La presencia de un perfil desfavorable respecto a algunos de estos marcadores determina un incremento del riesgo según la clasificación de Saint Gallen, y la indicación de tratamiento sistémico con quimioterapia en determinadas pacientes sin afectación ganglionar axilar y con tumores de pequeño tamaño.

Actualmente existen a disposición comercial y también dentro de distintos estudios clínicos varios perfiles que analizan la expresión de distinto número de genes en cada tumor; de esta forma se puede valorar el riesgo individual de cada sujeto de sufrir una recaída por su enfermedad. Esta información, aunque no está estandarizada puede ayudar en la toma de decisiones de casos seleccionados, fundamentalmente para indicar o no el tratamiento con quimioterapia adyuvante [28].

La contribución fundamental de los microarrays de DNA al estudio del cáncer de mama ha sido develar la complejidad de los tipos histológicos tradicionales. Estas técnicas han dado lugar a una clasificación más precisa del cáncer de mama basándose en su perfil de expresión génica, que se correlaciona mejor con el riesgo de recaída de la enfermedad. La clasificación molecular establece cuatro tipos de cáncer de mama: Luminal A, luminal B, HER2 y basal like. Los tumores luminales tiene receptores hormonales positivos, los HER2 expresión de *HER2/neu* y los basal like o triple negativos no expresan ni receptores hormonales ni HER2. El subtipo Luminal A es el de mejor pronóstico y el basal like el de peor pronóstico [29-33].

### 1.1.5. Aspectos terapéuticos

El estado del conocimiento actual respecto al pronóstico de la enfermedad y los datos clínicos sobre efectividad y seguridad de los tratamientos sistémicos han conducido a un incremento de las indicaciones de quimioterapia en pacientes afectas de cáncer de mama. A este hecho han contribuido tanto las mejoras en el conocimiento de la biología tumoral y de sus implicaciones pronósticas, como los avances en el desarrollo farmacológico de nuevos agentes y regímenes de quimioterapia.

#### 1.1.5.1. Criterios actuales de indicación de QT adyuvante

De los estudios publicados con quimioterapia en el tratamiento adyuvante del cáncer de mama se pueden extraer las siguientes conclusiones, que configuran los criterios actuales de uso clínico de este tratamiento:

## Introducción

- La administración de la poliquimioterapia es superior a la monoterapia [34].
- Los regímenes con Antraciclinas (FAC y FEC) son superiores a CMF, con una disminución del riesgo relativo de recaída y muerte por cáncer de mama del 11 y 16% respectivamente [35].
- En cuanto a la administración de regímenes con 2 o 3 fármacos, no existen comparaciones directas. No obstante, la administración de 4 ciclos de esquemas de tratamiento con dos fármacos incluyendo antraciclinas (AC/EC) es equivalente a la pauta CMF en términos de supervivencia global y libre de enfermedad [36] mientras que pautas con 3 fármacos (FAC/FEC) administrados durante 6 ciclos han demostrado superioridad frente a CMF tanto en términos de supervivencia global como libre de enfermedad.
- No está establecida la dosis ni la duración óptima del tratamiento con antraciclinas. La administración de 6 ciclos del régimen FEC es superior a 3 ciclos, aunque no existen comparaciones directas con la administración de 4 ciclos. Igualmente, la administración de FEC utilizando dosis de 100 mg/m<sup>2</sup> de epirrubicina es superior a la administración de 50 mg/m<sup>2</sup>, pero se desconoce si dosis intermedias (75 mg/m<sup>2</sup>) ofrecerían resultados equivalentes[37].
- La adición de taxanos (placitaxel [38] y docetaxel [4]) tanto de manera secuencial como concomitante ha demostrado un aumento en la supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global respecto al tratamiento con antraciclinas. El beneficio es independiente del tipo de taxano, del estado de los receptores hormonales, de la edad y de la afectación ganglionar [39], aunque el beneficio parece mayor en pacientes con ganglios positivos. En aquellas pacientes sin afectación ganglionar, el beneficio radica en la reducción de recidivas, no habiéndose demostrado aun la disminución en mortalidad. [4].
- No se han encontrado diferencias entre placitaxel y docetaxel, excepto la superioridad de la administración semanal de placitaxel con respecto a la administración cada 3 semanas, y en el caso del docetaxel la superioridad de la administración cada 3 semanas [40].

Los regímenes de poliquimioterapia adyuvante más utilizados en la actualidad incluyen pautas basadas en antraciclinas, que constituyen la opción más aplicada (FAC, FEC, TAC) y combinaciones que no incluyen de este grupo de agentes (CMF, CT, PT). Durante las últimas dos décadas, han surgido regímenes con asociación secuencial de taxanos a los regímenes con y sin antraciclinas.

## Introducción

### 1.1.5.2. Quimioterapia neoadyuvante

El éxito de la quimioterapia previa a la cirugía en los tumores de mama localmente avanzados e inflamatorios, ha hecho que se tienda a su implementación en tumores en estadios precoces. La administración de quimioterapia preoperatoria podría proporcionar no sólo una mejora de la probabilidad de respuesta completa, sino una vía para monitorizar la respuesta del tumor al tratamiento, y establecer qué marcadores patogénicos podrían relacionarse con la respuesta al mismo.

El tratamiento quimioterápico neoadyuvante es una opción para pacientes con tumores no susceptibles de una cirugía conservadora al diagnóstico, o con características biológicas que lo hagan especialmente sensible a la neoadyuvancia. La supervivencia libre de enfermedad y global de las pacientes tratadas con quimioterapia neoadyuvante es al menos igual que en las pacientes que reciben quimioterapia adyuvante, y además puede permitir rescatar ciertos casos para la indicación de cirugía conservadora [41].

Los regímenes de poliquimioterapia neoadyuvante son similares en composición y duración a los aplicados de forma adyuvante. Tras la generalización de los regímenes basados en antraciclinas, los ensayos de segunda generación se han centrado en la adición de taxanos, administrados de forma combinada o secuencial. El uso de estos últimos se ha asociado a mejoría en las respuestas patológicas completas y puede evitar la necesidad de quimioterapia adyuvante [4].

### 1.1.5.3. Esquemas de QT asociada a terapia biológica anti-HER2

La sobreexpresión o amplificación del receptor tipo 2 del factor de crecimiento epidérmico (HER2) se detecta en un 18-25 % de los cánceres de mama invasivos. Es un factor de riesgo reconocido de peor pronóstico y un factor predictivo de respuesta a tratamientos inmunológicos anti-HER2 como trastuzumab y lapatinib [35].

Numerosos estudios prospectivos confirman que la adición de un año de trastuzumab a la quimioterapia adyuvante con antraciclinas y/o taxanos aporta un beneficio sustancial para mujeres con cáncer de mama HER 2 positivo, en términos de supervivencia global y libre de enfermedad (30% de reducción de riesgo de muerte y 50% de recurrencias) [42, 43]. En estos estudios se observa también un aumento del riesgo de disfunción cardiaca ligado a la administración del trastuzumab, por lo que los pacientes deben someterse a una evaluación previa de la función cardiaca, así como durante y tras el tratamiento. En el estudio BCIRG006, se observaron menos eventos cardiacos en el grupo de pacientes

## Introducción

tratadas con Docetaxel-Carboplatino que en el grupo de pacientes tratadas con antraciclinas [44].

Existe cierta evidencia sobre que la sobreexpresión de HER2 es un factor predictivo de resistencia al tamoxifeno [45, 46]. En cuanto a su papel como predictor de respuesta a la quimioterapia, se ha observado que los tumores HER2 positivos son más resistentes a esquemas de tratamiento utilizados en adyuvancia, como el CMF [47], al tiempo que podría ser un factor favorable de respuesta a esquemas de quimioterapia basados en antraciclinas. Los esquemas de QT adyuvante en combinación con inmunoterapia más utilizados consisten en asociaciones de quimioterapia con o sin antraciclinas, seguida de administración secuencial de taxanos y de trastuzumab, y mantienen el uso del agente monoclonal durante un año.

Más recientemente se ha ensayado el uso de terapias biológicas asociadas a la QT neoadyuvante, como la adición de bevacizumab, cuya efectividad no parece superior a la de la combinación de antraciclinas con taxanos [48]. En pacientes con tumores HER2 positivos, la adición de trastuzumab a la quimioterapia logra mayores tasas de respuesta completa, sobretodo en combinación con antraciclinas y taxanos [49]. Con el uso de nuevas combinaciones de quimioterapia con trastuzumab en combinación con un segundo agente anti HER2 (lapatinib, pertuzumab) se ha descrito una mayor frecuencia de respuesta completa, lo que se traduce en una mayor supervivencia [50]. Este aumento de la efectividad podría incrementar el uso de QT neoadyuvante en pacientes con este perfil de susceptibilidad [51].

En 2012 la FDA aprobó el uso de pertuzumab para tratar el cáncer de mama metastásico en combinación con Trastuzumab y Docetaxel, basándose en el estudio CLEOPATRA, en el que se demostró que este régimen aumenta significativamente la supervivencia libre de enfermedad sin aumentar la cardiotoxicidad [52]. En la actualidad, numerosos estudios se llevan a cabo valorando el uso de pertuzumab.

### 1.1.5.4. Hormonoterapia adyuvante

La neutralización del efecto de los estrógenos sobre la proliferación de los tumores con receptores específicos se basa en el uso de moduladores selectivos de los receptores estrogénicos –representados por el tamoxifeno–, de inhibidores de la síntesis de estrógenos por interferencia reversible o irreversible con la acción de la aromatasa (letrozol, anastrozol, exemestano) y de agentes antigonadotropos de acción central, como los análogos agonistas de la GnRH.

## Introducción

Las pautas actuales de hormonoterapia comprenden el uso aislado o combinado de varios de estos agentes, cuya aplicación terapéutica ha experimentado cambios recientes derivados de la aparición de estudios muy relevantes respecto a su efectividad. Dichas modificaciones consisten en la prolongación de los regímenes, la indicación más frecuente de tratamientos con agonistas de la GnRH y el uso combinado de estos agentes con inhibidores de la aromatasa en pacientes con alto riesgo de recurrencia o de aparición de tumores *de novo*.

El uso del tamoxifeno como agente antiestrogénico aislado se consolidó tras la publicación del metaanálisis del EBCTCG [53]. Este estudio, basado en el análisis conjunto de 20 ensayos clínicos, concluyó que el tratamiento con 5 años de tamoxifeno se asocia a una reducción absoluta del  $11,8 \pm 1,3\%$  en la probabilidad de recidiva y una reducción del  $9,2 \pm 1,2\%$  en la probabilidad de muerte tras 15 años de seguimiento, en mujeres pre y postmenopáusicas con expresión tumoral de receptor estrogénico. Posteriormente, el estudio ATLAS puso de manifiesto que la prolongación durante cinco años adicionales del tratamiento con tamoxifeno en pacientes que habían recibido ya cinco años del mismo lograba una mejora significativa del riesgo de recurrencia y de aparición de nuevos tumores primarios [54]. En consecuencia, la conducta habitual es la prolongación durante al menos 10 años de la hormonoterapia con tamoxifeno en pacientes con indicación para el mismo [55].

El empleo de tamoxifeno o inhibidores de la aromatasa junto con supresión ovárica farmacológica con agonistas de la GnRH en mujeres premenopáusicas se viene generalizando, a pesar de que estas intervenciones no resultaron claramente superiores al uso aislado de tamoxifeno en los estudios comparativos disponibles [56, 57]. El hecho es que el uso de tamoxifeno o exemestano en combinación con agonistas GnRH, inhibidores reversibles del desarrollo folicular terminal en el ovario, se ha extendido desde hace años en las pacientes con alto riesgo de enfermedad estimado por los criterios de pronóstico actuales. Este subgrupo incluye, entre otras, a mujeres premenopáusicas con edad inferior a 35-40 años que recuperan la función ovárica tras la quimioterapia [58].

## Introducción

### 1.2. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A QUIMIOTERAPIA SOBRE LA RESERVA OVÁRICA

Los ovarios poseen al nacimiento un número limitado de folículos primordiales que constituyen la denominada 'reserva ovárica'. En el ovario postpuberal, los folículos primordiales constituyen el 90% del conjunto de folículos totales [59, 60].

En el contexto del tratamiento oncológico sistémico, la dosis acumulada y el tipo de quimioterapia administrada son los factores más importantes que determinan la probabilidad de fallo ovárico posterior.

#### 1.2.1. Mecanismos directos de toxicidad germinal

Existen múltiples mecanismos por los que los agentes quimioterápicos pueden producir daño a nivel ovárico, ya sea indirecto provocando la disfunción de la maduración folicular mediante la detención de la división celular, mediante toxicidad directa sobre los folículos primordiales, o bien mediante una combinación de ambos. El alcance del daño dependerá no sólo del tipo de agente quimioterápico o de las dosis acumuladas, sino también de la edad de la paciente y del estado de la reserva ovárica previa al tratamiento.

La atresia folicular, cuya acumulación conduce al fallo ovárico tras quimioexposición, es el resultado final de la muerte celular por apoptosis del ovocito. La apoptosis del ovocito es consecuencia a su vez de la acumulación de daño estructural no reparable del DNA. Las vías moleculares que regulan la reparación del DNA y la inducción de la apoptosis, cuando aquélla es ineficiente, están reguladas por modificaciones postranscripcionales de los productos de expresión génica, cuya actividad depende de la fase del ciclo celular. Por tanto, la quimiosensibilidad del ovocito está en dependencia, como la de cualquier otra célula, por la fase del ciclo celular en la que se halla en el momento de la quimioexposición [61, 62].

La detención de la meiosis en la profase de la primera división, que afecta a todos los ovocitos contenidos en los folículos desde primordiales hasta preovulatorios, constituye una situación especial que *a priori* podría representar un factor de protección. Sin embargo, estudios experimentales in vivo e in vitro sobre modelos animales han mostrado que la exposición a agentes citotóxicos durante el estado folicular antral puede suponer, cuando la fecundación se produce tras un corto periodo de tiempo tras la exposición, un peor pronóstico en cuanto a tasa de fecundación, tasa de aborto espontáneo, al igual que un aumento de malformaciones congénitas [63, 64].

## Introducción

Por otro lado, diversos agentes como los compuestos alquilantes, cisplatino, antraciclinas, alcaloides de la vinca, doxorubicina, antimetabolitos, y plactaxel, poseen también efectos mutagénicos sobre las células germinales [65]. Sin embargo, estudios clínicos con amplio seguimiento de supervivientes a cánceres quimiotratados no han descrito un aumento significativo de la tasa de malformaciones o abortos, ni un incremento de anomalías cromosómicas en los niños nacidos de pacientes afectadas por diversos procesos oncológicos comparadas con controles sanas [66, 67]. Se ha argumentado que la mayor parte de estas gestaciones se han producido años después de la exposición al agente citotóxico, lo que permite asumir que los ovocitos fecundados procedían de folículos en estadio primordial en el momento de la exposición. Estos hallazgos han sugerido la hipótesis de que el estadio del ovocito en el momento del tratamiento citotóxico es decisivo en términos de riesgo mutagénico [64]. Puesto que el ovocito humano tarda seis meses en completar su maduración, las gestaciones producidas a partir de seis meses tras la exposición serían fruto de la fecundación de ovocitos que se encontraban en estadio inactivo, lo que los habría preservado de la toxicidad y permitido permanecer genéticamente indemnes [68, 69].

El efecto apoptótico de los agentes quimioterápicos sobre los folículos en crecimiento y las vías específicas mediante las que se produce, han sido bien documentados y estudiados en profundidad [70]. La apoptosis inducida por los citotóxicos sobre los ovocitos maduros esta mediada por varios desencadenantes de la vía extrínseca, como ceramidas, BAX y el sistema de caspasas [71]. En cambio, los estudios sobre la toxicidad de estos agentes sobre el compartimento de folículos primordiales se han basado en modelos experimentales xenográficos. En un modelo in vivo de xenoinjerto de tejido ovárico humano a ratones, destinado a evaluar el efecto de una dosis única de ciclofosfamida, se observó un aumento de la apoptosis entre los folículos primordiales, determinada mediante TUNEL, y una reducción significativa de los folículos viables [72]. La validez de este modelo para la evaluación experimental de la toxicidad ejercida por agentes quimioterápicos ha sido cuestionada por diversos autores, que discuten el xenoinjerto como un modelo in vivo, basándose en que el trasplante supone un desplazamiento del tejido de su ambiente paracrino, que lo separa las influencias que regulan la maduración folicular, y que puede inducir por sí mismo la activación del reclutamiento y de la maduración folicular. En consecuencia, no podría descartarse que la apoptosis observada en el tejido xenotransplantado esté sucediendo en realidad en folículos que han abandonado la fase de quiescencia madurativa [73]. Sin embargo, en diseños experimentales más específicos basados en xenoinjertos de ovario humano en ratón, se ha identificado que la apoptosis sucede específicamente en los folículos primordiales cuya capacidad de reparación de las roturas de doble cadena del DNA por

## Introducción

la vía ATM (Ataxia-telangiectasia mutated DNA repair pathway) es insuficiente para evitar el desencadenamiento de la apoptosis, que sucede en la mayor parte de los folículos [74].

La apoptosis regulada por p53 no se ha considerado relevante en el ovocito, que no expresa esta proteína. No obstante, diversos estudios han identificado p63 en el núcleo ovocitario como el homólogo funcional de p53, y específicamente la isoforma TAp63- $\alpha$ , que sería el mediador de las vías de reparación del DNA de los ovocitos contenidos en folículos primordiales [75 , 76]. La actividad de esta vía de reparación de DNA en el ovocito en fase primordial está regulada por distintos sistemas de control, entre los que figuran el nivel de expresión de proteínas PUMA, NOXA, C-Abl, SIRT1, y SIRT6, y cuya relevancia en los procesos de reversión del daño del DNA se investiga en la actualidad [77].

El grado en el que los quimioterápicos afectan al conjunto de folículos ováricos, y en especial al compartimento de reserva representado por los folículos primordiales ha sido una cuestión de evidente interés desde hace años. Los resultados de estudios clínicos basados en evaluación histológica de corteza ovárica en pacientes tratadas con a quimioterapia han puesto de manifiesto que esta exposición se asocia a pérdida de folículos primordiales y atrofia del ovario. El grupo de Oktay publicó en 2007 un estudio preliminar sobre el efecto de la quimioterapia sobre la reserva ovárica en un grupo de 26 pacientes con diagnóstico de tumores sólidos y hematológicos que se sometieron a preservación de tejido ovárico previo al tratamiento quimioterápico. El análisis histológico comparando las 10 pacientes que habían recibido quimioterapia con las 16 restantes mostró un menor número de folículos primordiales, siendo aún menor en las que habían recibido quimioterapia basada en agentes alquilantes [72].

### **1.2.2. Mecanismos indirectos de toxicidad germinal**

#### **1.2.2.1. Acciones sobre el estroma y la vascularización ovárica**

Las primeras observaciones sobre el efecto de los citostáticos sobre el estroma y la vascularización ovárica en ovario humano fueron realizados sobre tejido ovárico procedente de pacientes expuestas a dosis no esterilizantes de poliquimioterapia, y describieron engrosamiento e hialinización de la cortical del estroma de los vasos sanguíneos, proliferación de vasos sanguíneos pequeños, inmaduros y desorganizados, neovascularización en la corteza ovárica, y fibrosis focal de la subcortical [78]

## Introducción

Los datos procedentes de estudios de vascularización ovárica en modelos animales han descrito que la administración de doxorubicina se sigue de descenso agudo y significativo del flujo vascular ovárico, así como un adelgazamiento de los vasos de pequeño calibre [79, 80]. Por medio de diseños similares, se ha evaluado el efecto de la toxicidad experimental con doxorubicina sobre la densidad vascular y la neoangiogénesis. El grupo de Soleimani comparó la densidad de vasos neoformados y maduros en fragmentos de ovario humano cultivados en presencia y ausencia del citostático. En comparación con el grupo control, las muestras cultivadas con doxorubicina presentaron una disminución dosis-dependiente de la densidad vascular de los neovasos y vasos maduros dosis-dependiente [74]. Estudios de validación in vitro del mismo grupo, y realizados mediante cultivo de xenoinjertos de ovario humano, también evidenciaron una reducción de la densidad vascular [81].

Las diferencias en el efecto que la esclerosis del estroma y la alteración vascular ovárica provocada por la quimioterapia podría tener en el compartimento de folículos primordiales y en crecimiento continúa siendo discutida. El concepto clásico es que los folículos en desarrollo son más sensibles que los primordiales a los cambios isquémicos agudos, como consecuencia de su mayor dependencia del aflujo vascular para mantener el trofismo de mayor cantidad de células de la granulosa. Sin embargo, estudios recientes del grupo de Oktay han cuestionado esta hipótesis, al haber hallado una correlación inversa entre la densidad vascular del estroma ovárico y el número de folículos primordiales apoptóticos [74].

### 1.2.2.2. Acciones sobre la activación folicular

Los folículos primordiales están constituidos por un escaso número de células granulosas, con muy baja o nula actividad mitótica. Cuando se inicia el proceso de proliferación y diferenciación folicular, y antes de la fase de crecimiento acelerado, comienza a incrementarse el número de células granulosas, como efecto del incremento de las mitosis. Dichas células, como todas las que inician la fase M del ciclo celular, son particularmente susceptibles al daño inducido por la mayor parte de agentes citostáticos. Los efectos de la apoptosis de las células granulosas podrían favorecer la atresia folicular mediada por la muerte del ovocito, así como limitar las capacidades funcionales de la granulosa folicular en la fase de crecimiento acelerado. Esta disfunción podría ser responsable de una producción deficiente de estrógenos y de mediadores paracrinos responsables de la activación ovocitaria, y de un desarrollo deficiente de los folículos que alcanzan la fase antral [74].

## Introducción

El conocimiento sobre la influencia de los mediadores paracrinicos no esteroideos procedentes de los folículos antrales sobre la activación funcional de los primordiales [82] indujo a proponer que la destrucción de los folículos en desarrollo causada por la quimioterapia podría reducir el nivel de factores inhibidores de la activación, y propiciar el inicio del desarrollo diferencial del compartimento folicular de reserva [83]. La AMH, capaz de intervenir en los procesos de activación, y de regular posteriormente la sensibilidad a la acción de la FSH, desciende sustancialmente tras la administración de la quimioterapia aplicada para el control del cáncer de mama [84-88] y de otros frecuentes en mujeres en edad reproductiva. El descenso de AMH secunente a la quimioterapia reduce su efecto inhibitorio basal, y en unión a la disminución de inhibina B y al aumento de la oferta de FSH, podría explicar el incremento de la activación folicular.

Un estudio reciente propone una nueva hipótesis sobre el mecanismo de daño ovárico quimioinducido, en el que intervendría un aumento en el reclutamiento folicular que provocaría la disminución de la reserva ovárica y como consecuencia, el fallo ovárico precoz [89]. La exposición a ciclofosfamida de una población de folículos primordiales en un modelo murino provocó la activación directa de la diferenciación de los mismos, por medio del incremento de la actividad de la vía de la fosfatidil-inositol-3-kinasa. En este mismo experimento, la administración de AS101, una molécula inmunomoduladora capaz de inhibir la acción protein-quinasa activadoras, produjo una protección parcial del conjunto de folículos expuestos a la acción de la ciclofosfamida. En el modelo murino, la activación folicular parece estar mediada por la vía PI3K/PTEN/Akt [90], así como en estudios in vitro con cortical del ovario humano [91 , 92]. Se cree que esta vía también regula la activación folicular in vivo en ovarios humanos en respuesta a la disrupción mecánica del tejido y el cultivo con estimulador Akt.

Las hipótesis generadas a partir de las observaciones sobre el efecto promotor de la activación folicular asociado a la quimioterapia no explican satisfactoriamente hechos como las diferencias en la quimiosensibilidad según la edad de la paciente, el origen de la apoptosis folicular o el aumento de las malformaciones en la descendencia [81]. Por otra parte, y en el ámbito estricto de los modelos experimentales animales, otros autores han detectado apoptosis en ovocitos de folículos primordiales que no han iniciado la diferenciación, por lo que cabe cuestionar que la activación funcional de los folículos constituya el verdadero desencadenante del daño ovocitario [77, 93].

Meirow ha defendido la compatibilidad de ambos modelos explicativos, considerando los hallazgos histológicos que describen tanto la ausencia de apoptosis en folículos

## Introducción

primordiales como su activación tras la exposición a quimioterapia, que suceden simultáneamente a la apoptosis de los folículos en desarrollo [65].

### 1.2.3. Fallo ovárico asociado a quimioexposición

El riesgo de fallo ovárico prematuro quimioinducido depende de la edad de la paciente y el tipo de quimioterapia. En mujeres menores de 40 años este riesgo se establece entre un 21 y un 61 %, mientras que en mujeres mayores de 40 años puede ascender hasta un 61-97% [94]. Además en mujeres que no entran en amenorrea tras la quimioterapia, o en aquellas que recuperan los ciclos menstruales espontáneos posteriormente, la menopausia natural aparecerá a una edad mas temprana comparada con mujeres que no han recibido quimioterapia [95, 96].

También es importante tener en cuenta que, incluso en las mujeres que recuperan los ciclos menstruales regulares tras la quimioterapia, la reserva ovárica puede estar disminuida, y la fertilidad dañada [97]

Históricamente la determinación de la reserva funcional ovárica postquimioterapia ha utilizado parámetros poco objetivos como puede ser la historia menstrual, en vez parámetros más objetivos como los niveles de FSH, estradiol (E2) e inhibina B en fases folicular precoz y la hormona antimulleriana (AMH), o marcadores ecográficos como el volumen ovárico o contaje de folículos ováricos antrales [98-100].

El hecho de utilizar la historia menstrual para esta valoración hace que, en muchos casos, consideremos el restablecimiento de los ciclos menstruales regulares postquimioterapia como un signo que descarta el fallo ovárico precoz, cuando sabemos que alrededor del 40% de estas pacientes serán infértiles [101], padeciendo lo conocido como fallo ovárico oculto, es decir, una disminución de la reserva folicular sin desaparición de ciclos menstruales regulares ni otras manifestaciones de la transición menopáusica.

Por tanto, es importante distinguir entre el término “reserva ovárica disminuida” del “fallo ovárico prematuro” y la “baja respuesta ovárica”. En 2015 Cohen et al. llevan a cabo una revisión de 121 artículos con el objetivo de definir la reserva ovárica disminuida. Encontraron 14 artículos donde se definía este concepto, encontrando 12 diferentes definiciones del mismo. Entre los diferentes parámetros utilizados, el RFA y los niveles de AMH sérica parecen ser los marcadores más relevantes. Los autores finalmente proponen la definición de reserva ovárica disminuida como mujer con factores de riesgo asociados y/o marcadores de reserva ovárica alterados (RFA <5-7 o AMH<0,5-1,1 ng/mL). Esta hipótesis requiere validación [102].

## Introducción

El término “*reserva folicular*” se usa para definir la cantidad y calidad de los folículos presentes en los ovarios en un momento dado [98]. A partir de los 37 años ocurre un descenso sustancial de la reserva ovárica hasta unos 25.000 folículos, aunque existe cierta variabilidad individual en la velocidad con que esto ocurre. Por tanto también la edad, junto a determinados tratamientos médicos y quirúrgicos y otras circunstancias pueden ejercer un impacto negativo sobre la reserva ovárica, aumentando el número de mujeres con problemas de fertilidad.

El marcador de reserva folicular ideal sería aquel capaz de predecir la posibilidad de embarazo tras TRA en aquellas pacientes en que su esterilidad fuese atribuible solo a disminución de reserva ovárica.

El metaanálisis publicado por Zhao ha evaluado el efecto del tipo de quimioterapia sobre el riesgo de amenorrea quimioinducida a partir de la muestra acumulada más amplia publicada [103]. Los rangos de frecuencias de amenorrea fueron del 71% para monoterapia con adriamicina, del 9-91% para la combinación antraciclina-ciclofosfamida, del 21-89% para el régimen CMF, del 21-93% para el esquema FEC, de un 29-100% para la asociación antraciclina-taxano. La poliquimioterapia basada en taxanos se asoció a una frecuencia de amenorrea del 89-95%. Los estudios primarios incluidos en el metaanálisis aplicaron distintos criterios para la definición de dicho resultado. Se consideró como tal la ausencia de menstruación de 3 meses o más de duración en 6 de los estudios incluidos, con duración mínima de 6 meses en 8 estudios, y de 12 o más meses en 8 de los trabajos. Otros dos estudios consideraron conjuntamente los tres umbrales o la aparición de ausencia de menstruación de cualquier duración a lo largo del periodo de observación. En siete casos los autores no definieron explícitamente la definición de amenorrea considerada como resultado principal. Ello podría explicar la gran dispersión de las frecuencias observadas, cuya interpretación es aún más compleja por la dificultad para clasificar por categorías de exposición ciertos regímenes compuestos por varios agentes con riesgo elevado de toxicidad germinal.

## Introducción

### 1.3. FACTORES ASOCIADOS AL RIESGO DE FALLO OVÁRICO QUIMIOINDUCIDO

#### 1.3.1. Régimen de QT

Los datos procedentes de los ensayos de toxicidad experimental han permitido formular una clasificación de los agentes quimioterápicos según su riesgo de producir gametotoxicidad. En 2006 Sonmezer y Oktay proponen la primera estratificación en tres niveles de riesgo [104]:

- Agentes de alto riesgo: ciclofosfamida, busulfán, melfalán, mostaza nitrogenada, clorambucil, procarbazona.
- Agentes de riesgo intermedio: cisplatino, adriamicina, plitaxel (pendiente de confirmación).
- Bajo o nulo riesgo: metotrexato, 5-fluorouracilo, vincristina, bleomicina, actinomicina-D.

Zhao publicó en 2014 la mencionada revisión sistemática seguida de metaanálisis, cuyo objetivo fue estimar la frecuencia de amenorrea inducida por la QT en función del régimen aplicado. Se realizó un metaanálisis de datos agregados procedentes de 46 estudios primarios publicados entre 1990 y 2013, trece de los cuales eran análisis secundarios de ensayos clínicos. Los estudios que estimaban específicamente la frecuencia de amenorrea quimioinducida en función del tipo de quimioterapia administrada fueron en su mayoría diseños de cohortes retrospectivas. Las observaciones consideradas se refieren a un total de 15916 pacientes [103]. La frecuencia de amenorrea fue significativamente superior tras exposición ciclofosfamida en comparación con los regímenes que no contenían este agente (OR conjunta: 2,25; IC 95%: 1,26; 4,04;  $p=0,006$ ). Los esquemas basados en taxanos también se asociaron a un incremento significativo de la frecuencia de amenorrea en relación con las pacientes no expuestas (OR: 1,24; IC 95%: 1,03; 1,5); la significación estadística de la diferencia se mantuvo además si se consideraba como resultado adverso tanto la amenorrea prolongada como los baches amenorreicos de al menos tres meses (OR: 1,51; IC 95%: 1,17; 1,95;  $p=0,001$ ) o al menos seis meses de duración (OR: 1,31; IC 95%: 1,06; 1,62;  $p=0,001$ ). La exposición a regímenes basados en epirrubicina/antraciclinas determinó también un aumento significativo de la frecuencia de amenorrea en comparación con las pacientes control (OR: 1,39; IC 95%: 1,15; 1,70). Finalmente, los regímenes que contuvieron ciclofosfamida y taxanos en combinación con epirrubicina u otras antraciclinas se asociaron a mayor frecuencia de amenorrea quimioinducida que las

## Introducción

pautas de poliquimioterapia que combinaban otros fármacos (OR: 1,41; IC 95%: 1,16; 1,73; p=0,0008).

El estudio de Zhao, que constituye la aproximación más amplia publicada sobre el efecto del tipo de quimioterapia sobre la función ovárica posterior a la misma, se ve afectado por limitaciones generadas por varias fuentes de sesgo potencial, que los autores han tratado de controlar por estimación de la heterogeneidad de los estudios comparados, con la aplicación de modelos metaanalíticos de riesgos aleatorios, y realizando análisis de sensibilidad. Además, en los 33 estudios que estimaban la frecuencia de amenorrea, las definiciones de este evento resultaron marcadamente dispares, como se ha descrito con anterioridad. A pesar de estas limitaciones, el estudio concluye que la presencia de los taxanos y de epirrubicina u otras antraciclina en los regímenes de poliquimioterapia se asocia a mayor riesgo de amenorrea quimioinducida, con independencia de la definición que se adopte para la misma. La inclusión de ciclofosfamida como parte de esquemas clásicos tipo CMF incrementa también el riesgo de fallo ovárico en comparación con regímenes carentes de este fármaco. Finalmente, los regímenes que constan de los tres fármacos de mayor riesgo presentan el mayor riesgo de amenorrea quimioinducida. Otro de los análisis del estudio concluye que el uso de tamoxifeno se asocia a mayor frecuencia de amenorrea postquimioterapia, analizando globalmente los estudios primarios, esto es, sin atender al tipo de quimioterapia administrada.

Petrek realizó un estudio de cohortes prospectivo, no incluido en el metaanálisis de Zhao, basado en la observación de 595 pacientes de 18 a 45 años con cáncer de mama, y con el objetivo de evaluar la función ovárica considerando como variable de resultado la reaparición de la hemorragia menstrual. Más del 55% de las pacientes recuperaron los ciclos a lo largo de los 15 meses primeros meses de observación tras quimioterapia. Durante el periodo comprendido entre el 16º mes de seguimiento y el final del mismo, la menstruación reaparición un 35% adicional de pacientes. La relación entre el régimen de quimioterapia y la recuperación de ciclos menstruales fue analizada en las 523 recibieron quimioterapia neoadyuvante o adyuvante. En las pacientes tratadas con la combinación de antraciclina y ciclofosfamida se observó una recuperación gradual de los ciclos, que se estabilizó a los 12 meses. En las pacientes tratadas con adición de taxanos, la frecuencia acumulada de reaparición de ciclos a los tres años de seguimiento fue similar con adición de docetaxel y plactaxel, y ligeramente inferior en ambos casos a la observada con antraciclina-ciclofosfamida. Sin embargo, la recuperación con plactaxel fue más precoz. La exposición a CMF se asoció a persistencia inicial de la menstruación en mayor número de pacientes (OR: 2,9; IC 95%: 1,7; 5), que sin embargo, fue reduciéndose a lo largo del seguimiento (OR: 0,27; IC 95%: 0,16; 0,47) [105].

## Introducción

Long publica en 2016 un estudio prospectivo adicional, realizado sobre 164 pacientes con cáncer de mama y edades comprendidas entre 25 y 39 años, categorizadas según el régimen de quimioterapia recibido: tegafur, pirarubicin e ifosfamida asociadas a tegafur o docetaxel. La frecuencia de fallo ovárico clínico a los 6 meses del tratamiento fue superior en el grupo que recibió el taxano (37,0% vs 57,3;  $p < 0,05$ ), en el que también se observó una menor frecuencia de ciclos menstruales regulares a los 6 meses del tratamiento (21,3% vs 10,7%;  $p < 0,05$ ), y mayor concentración de FSH sérica inmediatamente tras el fin del tratamiento, a los 6 meses y a los 12 (46,7, 31,3, 15,6 UI/L vs DTC 60,3, 46,7, 26,40;  $p < 0,05$ ). El estudio concluye que ambos tratamientos suponen un riesgo relevante de FOP, y que la adición de taxanos parece aumentar dicho riesgo [106].

Otros autores han abordado la estimación de la frecuencia de amenorrea postQT por medio de estudios descriptivos, cuyos objetivos, diseños y tamaños muestrales no pretendían o permitían el análisis de asociación entre el tipo de quimioterapia administrado y la frecuencia del fallo ovárico clínico quimioinducido [107-109].

Recientemente se publicó un nuevo metaanálisis y revisión sistemática llevada a cabo por el grupo de Silva en el que se revisan 60 estudios publicados de 1990 a 2015 de los cuales se incluyen para estudio 15, en los que se evalúan los factores asociados con la recuperación de la función ovárica tras la quimioterapia en pacientes premenopáusicas con cáncer de mama. Entre los factores basales de las pacientes, relacionados con el tratamiento o con la enfermedad, se evalúan cinco: la edad, la concentración de AMH basal previa a la quimioterapia, la quimioprevención con agonistas de la GnRH, la adición de taxanos a los regímenes de quimioterapia basados en antraciclinas y la hormonoterapia. El efecto de la exposición a taxanos, analizada a partir de las 132 pacientes expuestas de las 347 pacientes totales, supuso un efecto negativo en cuanto a la frecuencia de recuperación de ciclos menstruales (OR: 0,49; IC 95% 0,30;0,80;  $p = 0,004$ ). Sin embargo, el tratamiento con hormonoterapia tras la quimioterapia no resultó significativamente asociado con la recuperación de la función ovárica [110].

## Introducción

### 1.3.2. Edad

La edad de la mujer es uno de los mayores condicionantes de la fertilidad, entendiendo ésta en términos clínicos, como la tasa de hijo vivo nacido por cada 1000 mujeres-año. La extrapolación de las tasas crudas de fertilidad procedentes de poblaciones con un uso generalizado de métodos de regulación voluntaria de la natalidad, no es el método idóneo para la estimación del efecto de la edad femenina sobre la fertilidad. A pesar de ello, la consistencia de los datos procedentes de distintas fuentes epidemiológicas y demográficas, permite afirmar que la fertilidad natural es máxima al inicio de la segunda década de la vida, decae con el aumento de la edad, siendo ya perceptible su declive a los 30 años, y mucho más acusadamente a partir de los 35-38 [111].

Como hemos referido previamente, el ovario humano posee millones de folículos primordiales al nacimiento, produciéndose una disminución progresiva de estos a partir de los 5 meses de vida, y de forma continua hasta la menopausia, a la que se llega con alrededor de 1000 folículos primordiales [112]. De estos, sólo alrededor de 400-500 ovocitos serán ovulados durante la vida reproductiva.

Diversos estudios han estimado el promedio de folículos primordiales en diferentes estratos de edad, y han construido modelos matemáticos para calcular la depleción folicular fisiológica determinada por el envejecimiento germinal [113]. Los modelos de estimación más antiguos se basaban en datos directos procedentes de cuantificaciones histológicas [114, 115, 116], aunque la dificultad para la obtención de éstas limitaba su reproducibilidad. A partir de estas observaciones, se elaboraron modelos de declinación progresiva del número de folículos primordiales ováricos caracterizados por un perfil bifásico, con acentuación de la velocidad de descenso a partir de los 38 años.

El primer estudio que aplicó un procedimiento indirecto de estimación del tamaño de la reserva folicular que perdura a una determinada edad fue publicado en 1987 por Hansen [117]. Este autor utilizó procedimientos estereológicos para la cuantificación folicular automatizada en biopsias de tejido ovárico, y sus observaciones, si bien coincidentes con los estudios previos en cuanto a cantidad de folículos presentes, no objetivaron un incremento brusco de la velocidad de reducción del número de folículos, sino más bien una curva de descenso con incremento constante de la tasa de descenso por año transcurrido. Como han señalado diversos autores, este modelo de progresión continua hasta la depleción folicular completa es mucho más plausible, y concuerda mejor con las evidencias moleculares acumuladas con posterioridad [113, 118].

## Introducción

Como desarrollo de los modelos estereológicos, Kelsey generó un modelo matemático capaz de estimar el porcentaje la reserva folicular inicial presente en cada edad, desde la concepción hasta la menopausia [119]. Según este modelo, las mujeres de 30 años conservarían solo el 12% de la reserva folicular existente en el nacimiento, y a los 40 años solo quedaría el 3%.

La edad no sólo afecta al tamaño del pool folicular, sino también a la calidad de estas células germinales [120]. La principal causa del deterioro cualitativo de los ovocitos dependiente de la edad de la mujer es el incremento de las alteraciones de la disyunción meiótica, que causa a su vez incremento de la frecuencia de aneuploidías en los ovocitos postovulatorios [121, 122 , 123, 124]. Distintas observaciones clínicas, generadas en su mayoría del ámbito de la reproducción asistida, han evaluado el impacto clínico del proceso de pérdida de calidad ovocitaria. El estudio de Farr fue uno de los primeros en comparar la frecuencia de nacido vivo por estratos de edad obtenida con transferencia embrionaria a partir de gametos propios y tras recepción de ovocitos donados. Analizando los datos procedentes del *Registro de la Society for Assisted Reproductive Technology* (SART) los autores concluyeron que la frecuencia de gestación depende fundamentalmente de la edad de la donante de ovocitos. Además observó que la frecuencia de recién nacido en mujeres que habían recibido transferencias de embriones obtenidos a partir de ovocitos propios disminuía progresiva y crecientemente con la edad. Por el contrario, incluso en mujeres con edades avanzadas (>60 años) si la donante era joven (20-30 años) el número de nacidos vivos permanecía elevado [125].

Por otro lado, una prueba del descenso de la calidad de los ovocitos, como efecto del incremento de la edad, es el aumento de la frecuencia de aneuploidías, que es causa a su vez de su menor rendimiento reproductivo. Los datos procedentes de la evaluación embrionaria mediante diagnóstico preimplantacional han permitido estimar la frecuencia de embriones aneuploides, cuyo origen es mayoritariamente la aneuploidía ovocitaria. En mujeres hasta 35 años se ha descrito una frecuencia de aneuploidía del 53% de los embriones en tercer día de desarrollo, que asciende al 74 % en mujeres de 41-42 años y supera el 93% en pacientes de más de 42 años [126]. Este hecho es secundario al aumento de las alteraciones moleculares del proceso de disyunción meiótica de las cromátides del ovocito, fruto de defectos en los procesos de polimerización de los microtúbulos del huso y en el anclaje de los mismos a los centrómeros de las cromátides en la placa divisional [127, 128]. Otro de los mecanismos patogénicos probablemente implicados es la disfunción del aparato mitocondrial del ovocito. Esta hipótesis surgió tras la observación de alteraciones estructurales del huso y mayor frecuencia de división

## Introducción

cromosómica anormal en ovocitos con deficiencia del metabolismo del piruvato en mujeres de edad reproductiva avanzada [129].

Considerando la fuerte asociación entre la edad y la reserva folicular a lo largo de la vida reproductiva, varios autores han analizado la influencia de la primera en el efecto de la quimioexposición sobre la función ovárica posterior, como objetivo principal de los estudios, o como análisis adicional de cohortes analizadas con otros propósitos.

Algunos estudios han concluido que el efecto de la quimioterapia sobre la reserva folicular presenta clara dependencia de la edad. En una de las primeras revisiones al respecto, Bines describió que la recuperación de los ciclos menstruales observada en pacientes premenopáusicas afectadas por cáncer de mama y expuestas a diferentes regímenes de quimioterapia, entre los que predominaba el CMF, se produjo en el 22-56%, mientras que en mujeres de 40 años o más dicha frecuencia era inferior al 11% [130].

La posible asociación entre la edad y la modalidad de quimioterapia y hormonoterapia con la probabilidad de reaparición de ciclos menstruales fue también abordada en el estudio Davies, basado en el análisis retrospectivo de una cohorte de 159 pacientes premenopáusicas con una edad media de 40,8 años. La frecuencia de reanudación de los ciclos menstruales fue del 51%, y la única variable asociada de forma independiente con la misma fue la edad. La frecuencia de restablecimiento de ciclos fue en pacientes menores de 30 años del 100%, del 71,4% cuando la edad estuvo comprendida entre 31 y 40 años, y sólo el 32,6% de las mayores de 40 años ( $p < 0,001$  ; OR, 8,23; 95% CI 0,762-0,899) [131].

En la misma línea, Pérez-Fidalgo realizó un estudio retrospectivo sobre 305 pacientes pre o perimenopáusicas en el momento del diagnóstico de cáncer de mama. Según sus resultados, la edad fue el principal factor predictivo de amenorrea quimioinducida, que se manifestó en el 95% de las pacientes mayores de 45 años y tan solo en el 52% de las menores de 40 años ( $p < 0,0001$ ) [132].

La subpoblación de pacientes con cáncer de mama y mutaciones de los genes BRCA1 y BRCA2 fue específicamente estudiada por Valentini, que analizó una cohorte retrospectiva multicéntrica de 1594 pacientes con edades comprendidas entre 26 y 47 años a efectos de evaluar la influencia de la edad en la aparición de fallo ovárico clínico tras quimioterapia. Entre las 1456 pacientes que recibieron quimioterapia, la frecuencia global de amenorrea fue del 35,6%, mientras que en las pacientes no quimiotratadas, la

## Introducción

frecuencia de amenorrea espontánea fue del 5,3% ( $p < 0,001$ ). Las frecuencias estimadas de amenorrea quimioinducida por estratos de edad fueron del 7,2% en las pacientes menores de 30 años, 33% en pacientes con edades comprendidas entre los 31 y los 44 años, y un 79% en pacientes de 44 a 47 años. Por otro lado, también observaron diferencias significativas en la frecuencia de amenorrea postquimioterapia entre las portadoras de BRCA 2 y BRCA1 (46,8% v 32,7%;  $p < 0,001$ ). Se realizó otro análisis adicional sobre de 167 pacientes libres de mutación y procedentes de la misma cohorte multipropósito, de las que un 59% ( $n=100$ ) recibieron quimioterapia. La frecuencia de amenorrea en las pacientes quimioexpuestas sin mutaciones BRCA fue del 49% ( $n=49$ ). Tras ajustar por el efecto de la edad, no se observaron diferencias significativas en la frecuencia de amenorrea al comparar las pacientes portadoras de mutación BRCA con las no portadoras ( $p=0,18$ ). Tampoco resultaron significativas las comparaciones entre las frecuencias de amenorrea en pacientes libres de mutación y portadoras de mutación BRCA1 ( $p=0,1$ ) o BRCA2 ( $p < 0,5$ ) [133].

La edad fue también una de las variables explicativas consideradas por el estudio de Meng, basado en el análisis de 73 pacientes con cáncer de mama y con edades comprendidas entre los 27 y 55 años. La mediana de seguimiento fue de 27 meses, y la frecuencia de amenorrea tras quimioterapia fue del 83,6%. La edad superior a 40 años se asoció a un incremento significativo de la frecuencia de amenorrea ( $p < 0,0001$ ). De las pacientes que experimentaron amenorrea, 28 restablecieron ciclos menstruales durante el seguimiento, cuya mediana fue de 7 meses (IIC: 3-17 meses). La reaparición de la menstruación sucedió más frecuentemente en pacientes con edad no superior a 45 en comparación con las de más edad ( $p < 0,0001$ ) [134].

El estudio de Petrek, de publicación reciente e incluido en el metaanálisis de Zaho ya citado, evaluó prospectivamente la función ovárica a lo largo de cuatro años de seguimiento en 595 pacientes de 18 a 45 años con cáncer de mama tratadas con regímenes convencionales de cáncer de mama, de las cuales 523 recibieron quimioterapia neoadyuvante o adyuvante. Entre las menores de 35 años, la posibilidad de recuperar ciclos menstruales fue superior al 85% a los 6 meses del fin de la quimioterapia, mientras que las pacientes de 35 a 40 años solo entre el 45% y el 61% conservaban ciclos menstruales al final del periodo de observación [105]. El análisis multivariado identificó como variables independientes asociadas a la conservación de la menstruación la edad, el tipo de quimioterapia y el tratamiento con tamoxifeno.

Jacobson analizó un conjunto de 1043 pacientes premenopáusicas con cáncer de mama en estadios I a III aplicando un modelo de cohortes ambispectivo, cuyo seguimiento se

## Introducción

prolongó durante siete años. Todas las pacientes presentaban edades comprendidas entre 20 y 35 años en el momento del diagnóstico, que fue al menos 24 meses anterior al inicio del estudio. En relación con la edad, el estudio concluyó que la probabilidad acumulada de amenorrea a lo largo del seguimiento era superior en las pacientes de 30 a 35 años, en comparación con las de 20 a 24 años (OR ajustado: OR ajustado = 2,37; IC 95%: 1,3; 4,3). Otro resultado relevante fue que en el subgrupo de pacientes que permanecieron en amenorrea durante la quimioterapia, aquellas que recuperaron sus ciclos menstruales tras la misma (n=232), lo hicieron en su gran mayoría dentro del primer año tras el tratamiento, y sólo en el 11,4% reaparecieron posteriormente [135].

En 2017 Vriens et al. publicó un estudio retrospectivo en el que incluyeron 115 pacientes con cáncer de mama, con el objetivo de evaluar la incidencia de fallo ovárico quimioinducido. Al realizar un subanálisis por edad, los autores observaron una frecuencia global de amenorrea tras la quimioterapia del 98,3% del total de las pacientes, que resultó del 100% en mayores de 40 años y del 92% de las menores de esta edad ( $p=0,001$ ). A los dos años del tratamiento quimioterápico la frecuencia de amenorrea se había reducido a un 8,7% en las pacientes jóvenes, frente a un 82,6% en las mayores de 40 años ( $p>0,001$ ). El efecto de la edad sobre el fallo ovárico quimioinducido resultó nuevamente la única variable independiente asociada con el restablecimiento de ciclos (HR 12,26 (IC 95% 5,21;28,86;  $p< 0,001$ ) [136].

Tiong realizó un estudio analítico con un objetivo similar a los referidos, utilizando una cohorte constituida por 143 pacientes con cáncer de mama en estadios tempranos reclutadas para un ensayo clínico aleatorizado destinado a comparar dos regímenes de quimioterapia. Este análisis, que resultó finalmente ambispectivo, estimó la frecuencia de fallo ovárico clínico quimioinducido en función de diversos factores relacionados con la condición basal de la paciente, la enfermedad tumoral y el tratamiento aplicado. Tras analizar las 102 pacientes en las que los datos precisos fueron accesibles, la edad resultó la única variable asociada al fallo ovárico con carácter independiente ( $p=0,0001$ ): la proporción de amenorrea al año de seguimiento fue del 57% en pacientes menores de 35 años, frente al del 96,5% observado en pacientes de 35 a 45 años [108].

Otro estudio de cohortes realizado a partir de la muestra de un ensayo clínico, elaborado por el grupo de Ruddy, estudió a pacientes con cáncer de mama bajo quimioterapia basada en AC con taxanos secuenciales, fueron aleatorizadas para recibir bevacizumab durante dos diferentes periodos de tiempo. Del total de pacientes incluidas en el ensayo, se seleccionaron las 124 pacientes premenopáusicas para el análisis de cohortes, cuya edad media fue de 45 años. Se observó una asociación significativa de la edad con la

## Introducción

frecuencia de amenorrea a los 12 meses del tratamiento quimioterápico (OR 1,20 IC 95% 1,10;1,33 p=0,0003), así como a los 18 meses (OR 1,18; IC 95% 1,04;1,34; p=0,008). Por medio de un modelo de regresión, los autores calculan que por cada año de más edad, se incrementa en un 20% la probabilidad de desarrollar amenorrea quimioinducida al año de finalizar la quimioterapia, y un 18% a los 18 meses [137].

La creciente frecuencia de la indicación de quimioprotección y hormonoterapia ablativa con agonistas GnRH ha suscitado interés por conocer los determinantes del fallo ovárico en las pacientes que reciben este tratamiento. En una publicación de 2016, Meattini analizó retrospectivamente una cohorte de 63 pacientes menores de 45 años con cáncer de mama tratadas con quimioterapia y triptorelina. La frecuencia de recuperación de ciclos menstruales a los 6 meses fue del 33%, del 75% a los 12 meses, y a los 24 y 36 meses del 87,5%. La edad al diagnóstico resultó significativamente asociada a la frecuencia acumulada de reaparición de la menstruación (HR: 9,0; IC 95%; 2,6; 15,4; p=0,0001) [138].

Así mismo el metaanálisis de Silva previamente referido, analiza el efecto de la quimioprofilaxis con agonistas en 679 pacientes sometidas a dicho tratamiento del total de 1002 pacientes premenopaúsicas con cáncer de mama. Los autores observaron una mayor frecuencia de restablecimiento de ciclos menstruales entre las pacientes que recibieron quimiopreención con agonistas GnRH durante la quimioterapia (OR 2,03; IC 95%: 1,18;3,47; p=0,01) [110]. La edad menor de 40 años fue otro de los factores asociados positivamente al restablecimiento de ciclos tras el tratamiento quimioterápico (OR 6,07 IC 95% 2,70; 13,61; p< 0,001), evaluado a partir de una muestra de 616 pacientes.

### **1.3.3. Estado basal de la reserva ovárica.**

#### **1.3.3.1. Reserva ovárica basal valorada por medio de estimadores ecográficos**

El compartimento de folículos en fase de crecimiento está constituido por un conjunto de entre 20 y 250 folículos que han abandonado la quiescencia funcional iniciando su diferenciación desde la fase de folículos primordiales. Esta cohorte folicular comprende desde folículos primarios, muy similares a los primordiales en tamaño y características funcionales, hasta folículos antrales grandes, que están destinados a iniciar la fase de crecimiento acelerado o terminal, constituido por procesos sucesivos de reclutamiento, selección progresiva y consolidación de la dominancia monofolicular [68]. La mayor parte

## Introducción

de los folículos en desarrollo se hallan en la fase de crecimiento lento, presentan diámetros inferiores a 2 mm y carecen de antro, por lo que no son detectables por medio de ultrasonografía ovárica. Los folículos cuyo desarrollo progresa desarrollan el antro, lo que determina el aumento de su tamaño y la configuración de un área central sonoluciente. Ambos cambios morfológicos facilitan su discriminación ecográfica del estroma circundante, y permiten su localización y recuento [139]. Diversas evidencias morfofuncionales han demostrado la proporcionalidad entre la magnitud de la reserva de folículos ováricos primordiales restante y el número de los que activan su crecimiento, y también entre éste y los que alcanzan la fase de folículo terciario antral [140].

La cuantificación basal de folículos antrales suele referirse al recuento del número de sonolucencias con diámetros entre 2 -10 mm visibles mediante ecografía transvaginal de alta resolución durante la fase folicular precoz (días 2º-4º del ciclo tipo de 28 días). El número de folículos antrales visibles, que corresponden a folículos terciarios antrales en fase de selección, se correlaciona como se ha dicho con la amplitud del remanente de folículos primordiales, y es una determinación con adecuada reproducibilidad interciclo e interobservador [141]. Esta relación proporcional se ha visto corroborada por el valor predictivo del recuento basal de folículos antrales respecto de la respuesta ovárica a la estimulación del desarrollo folicular múltiple en FIV [142, 143], y en menor medida por su capacidad, más discutida, para la predicción de la edad de la menopausia [144, 145]. La cuantificación de folículos antrales se considera pues, un estimador de reserva ovárica razonablemente válido y preciso, y muestra además una buena correlación con la edad y por tanto, con la calidad cromosómica de los ovocitos disponibles. Sin embargo, y hasta el momento actual, su utilidad para la predicción de gestación y de nacido vivo no resulta comparable [146-148].

El RFA ha mostrado una fuerte correlación con otros estimadores de reserva ovárica [149], aunque parece bien establecida su mayor capacidad predictiva respecto a la respuesta ovárica a la estimulación para FIV que otros parámetros, como la FSH o el estradiol determinados en fase folicular precoz, el cociente entre ambos, la inhibina B [150] o el volumen ovárico [151].

En relación con la probabilidad de gestación espontánea en pacientes con función ovulatoria y fertilidad alterada, estudios recientes ha concluido que la adición de los estimadores de reserva a los modelos predictivos clásicos ya validados incrementan de forma significativa aunque muy leve la calidad de la predicción. Una publicación de Haadsma ha estimado que la modificación según el RFA y la concentración sérica de AMH del modelo de Hunault para la predicción de gestación espontánea modifica en

## Introducción

más de un 10% la probabilidad estimada del 3,8 de los pacientes [152]. Estas conclusiones han sido obtenidas también por otros investigadores evaluando la modificación de la eficacia predictiva de otros modelos tras su ajuste por el RFA y otras pruebas de reserva ovárica, que aunque resultan útiles en la predicción de la respuesta a la estimulación en FIV, no añadieron información con valor predictivo a la aportada por la edad [153].

La valoración del RFA como estimador de fertilidad natural en pacientes quimioexpuestas también ha sido el objetivo específico de cierto número de estudios. En uno de los primeros estudios con observación prospectiva de algunas de las variables, Lutchman evaluó parámetros bioquímicos y biofísicos de la reserva ovárica en mujeres jóvenes (22-42 años) que menstruaban regularmente diagnosticadas de cáncer de mama, comparadas con controles sanos de la misma edad. Se realizaron las mediciones de diversos biomarcadores y de parámetros ultrasonográficos (volumen ovárico, el recuento de folículos antrales, flujo sanguíneo ovárico, y dimensiones uterinas) antes y después del tratamiento con quimioterapia. El RFA fue el único estimador ecográfico de reserva ovárica tras quimioexposición que resultó significativamente menor al comparar las pacientes quimiotratadas con los controles sanos (media:  $7,8 \pm 0,9$  vs  $17,1 \pm 1,2$   $p < 0,001$ ; mediana:  $4,4 \pm 0,5$  vs  $8,5 \pm 0,6$   $p < 0,001$ ) [100].

Por medio de un diseño de casos y controles, Partridge analizó la asociación entre el RFA preQT y la situación final de la función ovárica, comparando la frecuencia de amenorrea tras quimioterapia entre los casos –20 pacientes supervivientes de cáncer de mama que conservaban ciclos menstruales regulares en los 6 meses previos a QT– con la observada en 24 controles sanas. A los 12 meses de finalizar la quimioterapia, el RFA resultó significativamente inferior en los casos (medias: 9,50 vs 6;  $p=0,004$ ) y además demostró una alta correlación con la concentración de la AMH sérica ( $Rho= 0,72$ ,  $p < 0,0001$ ) [97].

El estudio de cohortes prospectivo publicado por Anderson en 2006 analizó 56 pacientes premenopaúsicas con cáncer de mama categorizadas en un grupo expuesto a quimioterapia ( $n=42$ ) y otro tratado con goserelina–con o sin TMX– durante al menos 1 año, con el fin de analizar la evolución de los estimadores de reserva ovárica en función del tratamiento recibido. En ambos grupos de pacientes se realizaron controles hormonales (FSH, LH, E2, Inhibina B) y ecográficos (RFA y volumen ovárico) previos al inicio del tratamiento, durante el mismo y a su finalización. Un año después del inicio de la quimioterapia, el RFA había descendido significativamente en las pacientes

## Introducción

quimioexpuestas (medias:  $5,8 \pm 0,7$  a  $2,1 \pm 0,3$   $p < 0,0001$ ), en especial durante los seis primeros meses, así como el volumen ovárico ( $4,3 \pm 1,3$  a  $3,0 \pm 2,0$  ml;  $p = 0,047$ ). En cambio, en el grupo de pacientes tratadas con goserelina no se encontraron diferencias en ninguno de los dos parámetros ecográficos al comparar las determinaciones previas y posteriores al tratamiento [99].

El mismo grupo de investigadores publicó en 2010 un estudio de cohortes prospectivo con el objetivo de evaluar varios estimadores de reserva ovárica, incluyendo la edad, como predictores a largo plazo de función ovárica tras quimioterapia [154]. Con este fin, determinaron FSH, E2, Inhibina B y AMH séricas, RFA y volumen ovárico en fase previa a la quimioterapia adyuvante o neoadyuvante, y de forma anual durante los cinco años siguientes a administración de aquélla. Se analizó el curso de 45 pacientes incluidas, de las que 33 completaron el seguimiento, y se observó que el RFA a los 5 años de seguimiento fue similar entre pacientes en las que reaparecieron los ciclos menstruales y en las que permanecían en amenorrea al final del seguimiento. Sin embargo, el RFA previo a la quimioterapia fue significativamente mayor en aquellas pacientes que recuperaron los ciclos regulares tras la quimioterapia (medias:  $19,8 \pm 3,0$  vs  $8,7 \pm 1,2$   $p = 0,0004$ ). Por el contrario, el volumen ovárico resultó significativamente mayor en las pacientes que recuperan ciclos menstruales en comparación con las que permanecían en amenorrea a los 5 años del tratamiento (media:  $2,6 \pm 0,9$  vs  $0,8 \pm 0,1$  ml  $p = 0,002$ ), pero el valor del volumen preQT no se asoció con la recuperación de ciclos menstruales tras el tratamiento. Aunque el análisis univariado respaldó la asociación del RFA con la situación funcional ovárica a largo plazo, sólo la AMH resultó asociada con carácter independiente a la frecuencia de amenorrea y de recuperación de ciclos menstruales.

Otro de los estudios relevantes, publicado Dillon en 2013 y también con diseño de análisis prospectivo de cohortes, incluyó a 46 pacientes de 11 a 35 años diagnosticadas de diferentes procesos oncológicos con indicación de quimioterapia. Su objetivo principal era evaluar el efecto de la quimioterapia sobre la reserva ovárica, mientras que como objetivo secundario se pretendía identificar los factores asociados con los cambios en la en la reserva ovárica observados tras el tratamiento. Los autores determinaron trimestralmente parámetros hormonales (FSH, LH, E2, inhibina B, AMH) y ecográficos (RFA y volumen ovárico medio) a lo largo de un periodo de seguimiento cuya mediana fue 12 meses. La cohorte incluyó un 41% de pacientes diagnosticadas de cáncer de mama, y un 37% de neoplasias hematológicas, por lo que los regímenes quimioterápicos fueron heterogéneos. Respecto al RFA postQT, observaron una descenso global del 75% respecto a los niveles previos a la quimioterapia ( $p < 0,001$ ), y del 59% en el caso

## Introducción

concreto de la quimioterapia basada en agentes alquilantes ( $p=0,004$ ). El volumen ovárico también experimentó un descenso del 46% al final de la quimioterapia [155].

La identificación de marcadores de reserva ovárica que puedan predecir amenorrea u oligomenorrea fue abordado por D'Avila, que realizó un estudio de cohortes prospectivo evaluando el efecto sobre la función ovárica en 52 pacientes con edades comprendidas entre 32 y 40 años, y tratadas con regímenes que contenían ciclofosfamida. Entre las que conservaron las menstruaciones, los RFA resultaron superiores a los observados en pacientes amenorreicas tras quimioterapia (medianas; 3,5; IIC:11-16 vs 9; IIC:7,5-12;  $p=0,003$ ). La comparación entre las pacientes amenorreicas y aquellas que tenían ciclos irregulares, mostró que el RFA fue un factor de predicción significativo para amenorrea o oligomenorrea ( $p=0,001$ ), con independencia de la edad de la paciente. Los puntos de corte en el RFA para la discriminación entre conservación de ciclos regulares o aparición de amenorrea-oligomenorrea a los 6 meses del tratamiento con ciclofosfamida fueron menos de 13 folículos (AUC: 0,81; sensibilidad: 81%; especificidad: 62%) y menos de 9 para la predicción de amenorrea (AUC: 0,73; sensibilidad: 71%; especificidad: 78%) [156]. Considerando el punto de corte estimado para la predicción de amenorrea u oligomenorrea, el valor predictivo positivo del RFA fue del 78% y el negativo del 67%. No obstante, la estimación univariada de efecto no resultó significativa para el RFA (4,43, IC 95%; 0,94; 20,8,  $p=0,06$ ). Los autores consideran como resultados agrupables la aparición de amenorrea y de oligomenorrea, ya que ambas alteraciones menstruales entrañan un pronóstico reproductivo desfavorable aunque no hacen consideraciones específicas respecto a las pacientes que experimentan una depleción severa de la reserva folicular que no da lugar a expresión clínica.

El flujo vascular ovárico es otro de los parámetros biofísicos relacionados con la reserva ovárica cuya utilidad predictiva ha sido analizada en relación con el riesgo de fallo ovárico quimioinducido. Ben-Aharon en 2015 publicó un estudio prospectivo de cohortes, que incluyó 20 pacientes diagnosticadas de estadio I-III de cáncer de mama sometidas a quimioterapia adyuvante o neoadyuvante basada en régimen de antraciclinas o ciclofosfamida y seguida por taxanos, o basada en taxanos con trastuzumab en tumores HER 2 positivos. Su objetivo era evaluar riesgo de fallo ovárico quimioinducido y la posible implicación de la toxicidad vascular en el mismo. Al final del tratamiento quimioterápico, tanto el índice de pulsatilidad como el índice de resistencia vascular de la arteria ovárica descendieron significativamente, en comparación con los valores basales, si bien se observó una recuperación de los índices fluxométricos, iniciada desde el mes siguiente a la finalización de la quimioterapia, y que resultó parcial a los 6 y 12 meses desde el final del tratamiento. Entre las pacientes menores de 35 se observó una mayor

## Introducción

frecuencia de recuperación de los índices fluxométricos hasta alcanzar valores similares a los previos al tratamiento [80].

### 1.3.3.1. Reserva ovárica basal valorada por medio de estimadores analíticos

#### 1.3.3.1.1. FSH y Estradiol basal:

La FSH constituye la principal fuente de estímulo de la proliferación y diferenciación de las células granulosas, así como de la producción de estradiol. Su amplia fluctuación fisiológica en respuesta a los mecanismos de retroalimentación negativa ejercida por los estrógenos, al efecto de hormonas peptídicas como inhibina B y AMH, y al de la progesterona en fase lútea, han determinado la estandarización de su determinación en fase folicular precoz con fines de evaluación pronóstica de la reserva funcional ovárica. La diferenciación folicular terminal, y con ella la ovulación y la función luteínica, dependen de la producción hipofisaria de gonadotropinas y de su fluctuación fisiológica. El incremento transitorio de la concentración sérica de FSH que se produce en la transición lúteo-folicular es capaz de reclutar para la diferenciación terminal una cohorte de folículos con mayor sensibilidad a la acción de la FSH, lo que lleva asociado el incremento de la síntesis de estradiol, y de inhibinas A y B en este conjunto de folículos [113]. El incremento de los niveles de estradiol e inhibina B es el principal responsable de la retroinhibición de la FSH hipofisaria, que resulta clave para la selección estricta de un único folículo dominante. Sin embargo, esta dinámica de retrocontrol endocrino se ve afectada por una variabilidad que depende de la aptitud funcional de las cohortes foliculares reclutadas en cada ciclo, y que determina la conocida variabilidad de la FSH basal [81].

La elevación de los niveles séricos de FSH fue uno de los primeros instrumentos de estimación de la reserva ovárica funcional, y su uso como predictor de respuesta a la estimulación en el contexto de la medicina reproductiva ha sido muy amplio [157]. Un gran número de estudios primarios, y varios metaanálisis han evaluado la relación entre los niveles de la FSH y los resultados terapéuticos en FIV, confirmando una correlación con la respuesta ovárica a la estimulación, y con menor solidez, con la probabilidad de éxito del ciclo [153, 158]. En términos de validez pronóstica, la elevación del nivel sérico basal de FSH tiene alta especificidad para predecir pobre respuesta a la estimulación, aunque su sensibilidad para identificar a estas mujeres es baja, y disminuye según el valor umbral utilizado [150].

## Introducción

Los niveles séricos de estradiol durante la fase folicular precoz presentan por sí mismos escaso valor respecto a la respuesta ovárica a la estimulación, pero pueden resultar útiles para la interpretación pronóstica de los niveles basales de FSH, especialmente cuando estos se encuentran en rango normal, ya que la elevación del estradiol basal, fruto de la foliculogénesis acelerada que caracteriza a las pacientes con baja reserva funcional ovárica, reduce los niveles de FSH, y con ello incrementa la frecuencia de falsos negativos en relación con la predicción de baja respuesta [150].

En mujeres con la reserva ovárica comprometida por la acción de la quimioterapia, el grado de depleción folicular se correlaciona con un incremento en los niveles séricos de FSH, como muestran diversos estudios [159-161], así como una asociación temporal secuencial.

La evolución de los niveles séricos de FSH durante y tras la quimioterapia fueron estudiados prospectivamente por Rosendahl, quien monitorizó los niveles hormonales de 17 pacientes oncológicas quimiotratadas y menores de 30 años, realizando determinaciones seriadas antes, durante y tras la exposición a quimioterapia, y prolongando el seguimiento durante el año siguiente a la administración de la misma. En sus resultados se observó un aumento significativo de los niveles de FSH a partir del cuarto ciclo, momento en el cual alcanzaron niveles postmenopaúsicos. A partir del 7º ciclo alcanza su pico máximo con una media de  $56 \pm 32$  UI/L. Tras la finalización del tratamiento, se produjo un descenso de los niveles de FSH séricos, pero no se encontraron diferencias entre los niveles de FSH de las pacientes que permanecieron en amenorrea y aquellas en las que se reiniciaron los ciclos menstruales dentro del primer año de seguimiento [161].

El grupo de Anders publicó en 2008 un estudio prospectivo previamente mencionado, en el que se evalúa la validez pronóstica de marcadores de reserva ovárica como FSH, E2, Inhibina A y B y AMH en 44 mujeres de 18 a 55 años afectadas por estadios precoces de cáncer de mama. Las observaciones se realizaron antes de recibir tratamiento quimioterápico, al final del mismo, a los 6 meses y al año, y la mayoría de estas pacientes recibieron regímenes de quimioterapia que incluían antraciclinas y taxanos. Al año del tratamiento, y con datos disponibles acerca de 21 pacientes, se observaron niveles de FSH significativamente mayores en las mujeres que permanecían en amenorrea, comparadas con aquellas que habían recuperado los ciclos menstruales (39,8 vs 5,0 mUI/mL;  $p=0,006$ ). Análogamente, los niveles séricos de estradiol fueron significativamente mayores en las mujeres que reiniciaron ciclos menstruales (108,3 vs 41,3 pg/mL,  $p=0,01$ ) [160].

## Introducción

Uno de los estudios de Anderson, al que se ha hecho referencia previamente, también evalúa el valor de los niveles séricos de FSH en 42 pacientes premenopaúsicas con cáncer de mama tratadas con quimioterapia [154]. Los niveles de FSH sérica se mantenían elevados a los 3 años de la misma ( $p < 0,01$ ) y a los 4-5 años ( $p < 0,001$ ) en comparación con los previos al tratamiento. Las concentraciones séricas de FSH fueron significativamente más bajas en las pacientes que mantenían ciclos regulares a los 4-5 años de la quimioterapia (15,8 vs 29,3  $p = 0,01$ ), así como menores niveles de FSH preQT en estas pacientes con ciclos menstruales mantenidos a los 4-5 años tras la quimioterapia (5,2 vs 13,1  $p = 0,0008$ ).

En 2010 Yu publicó un estudio prospectivo basado en el seguimiento de 26 mujeres menores de 40 años con cáncer de mama, con el propósito de analizar la función ovárica tras el tratamiento con quimioterapia en relación con la estimación previa de la reserva ovárica. Los estimadores de reserva se determinaron antes del inicio del tratamiento y 6, 12, 36, y 52 semanas tras el mismo, y fueron comparados con 134 controles sanos con fertilidad probada. Los niveles de FSH de las pacientes quimioexpuestas ascendieron significativamente desde los valores iniciales hasta rangos postmenopaúsicos a las 6 semanas de iniciar la quimioterapia (media: 5 vs 22 mUI/mL;  $p < 0,05$ ), y permanecieron elevados hasta semana 36 postQT (media: 43 mUI/mL). A partir de la semana 52 los niveles de FSH experimentan una disminución significativa (media 15 mUI/ml en semana 52,  $p < 0,05$ ) hasta alcanzar en un 48% de las pacientes niveles inferiores a 20 mUI/ml. Estos niveles de FSH previos a QT y en semana 52 tras la misma, fueron similares en el grupo de mujeres que permanecieron amenorreicas y aquellas que restablecieron ciclos menstruales (medias, 4,5 vs 6,8 mUI/ml previos a QT, 11 vs 24 mUI/ml al final del seguimiento,  $p > 0,05$  respectivamente) [162].

En cuanto a la capacidad de los niveles preQT de FSH para la predicción de la aparición de oligomenorrea o amenorrea tras tratamiento con ciclofosfamida, el referido estudio de D'ávila concluyó que los niveles de FSH preQT aislados no son estimadores pronósticos adecuados de la aparición de estos trastornos del ciclo. Sin embargo, el subgrupo de mujeres con edades iguales o superiores a 32 años o niveles de FSH  $\geq 6,6$  UI/mL sí presentaban una mayor probabilidad de desarrollar estas alteraciones a los 6 meses del tratamiento con ciclofosfamida (OR 6,36 (IC 95% 1,11-36,41  $p = 0,021$ ). Esta discriminación de la probabilidad de resultado ofrecía una sensibilidad del 60% y una especificidad del 82% [156].

## Introducción

En 2014 Su publica un nuevo estudio prospectivo de cohortes con los objetivos de identificar que índices de reserva ovárica podrían estar relacionados con el tiempo hasta restablecimiento de ciclos y la frecuencia de éste, así como elaborar una puntuación pronóstica para la recuperación de la función ovárica. A tal efecto, analizó 109 pacientes premenopáusicas con cáncer de mama, con 39 años de edad media, y cuyo seguimiento se prolongó durante una mediana de 163 días (rango: 4-1009). El 57% de las pacientes recuperaron los ciclos menstruales durante el seguimiento. Los niveles de FSH preQT menores o iguales a 10 UI/L se asociaron con mayor frecuencia acumulada de reaparición de ciclos a lo largo del seguimiento (HR 4,7 IC 95% 1,3-16,8: p= 0,003) [163].

### 1.3.3.1.2. **Hormona Antimülleriana:**

La AMH es una glicoproteína dimérica perteneciente a la familia del TNF- $\beta$  que presenta analogías estructurales con la inhibina y la activina, y que se produce en células de la granulosa de folículos preantrales, y antrales pequeños. Está involucrada en la regulación del reclutamiento de folículos primordiales, ya que reduce la sensibilidad folicular a la acción de la FSH y con ello previene la activación folicular prematura y regula la velocidad de depleción del conjunto de folículos primordiales de reserva. La producción de AMH se inicia a partir del abandono del estadio de folículo primordial, y su producción se mantiene hasta la fase antral precoz e intermedia del desarrollo folicular [164]. Las acciones reguladoras del desarrollo folicular mediadas por AMH tienen lugar a través de mecanismos autocrinos y paracrinos, aunque sus niveles séricos resultan mensurables en sangre periférica. Se ha postulado que la mayor parte de la AMH detectable en sangre se produce en los folículos antrales pequeños, que presentan un cierto desarrollo de su capa granulosa, y cuya vascularización tecal periférica es mayor [165, 166].

La concentración sérica de AMH se correlaciona con el número de folículos antrales, y estos a su vez con los primordiales, por lo que el descenso de AMH a medida que transcurre la vida reproductiva de la mujer puede ser interpretado como estimador cuantitativo de la reserva folicular, hasta la desaparición de la AMH sérica con la menopausia [167]. Estudios de muy reciente publicación han estimado que el promedio de descenso anual de la AMH a partir de los 21 años es de un 5,6% anual en la población general [168]. Conviene subrayar que la producción de AMH en los folículos antrales pequeños es independiente de la acción de las gonadotropinas, por lo que los niveles de AMH son notablemente constantes a lo largo de todas las fases del ciclo y entre distintos ciclos [169]. Esta baja variabilidad representa una importante ventaja en las pacientes oncológicas, ya que, en la mayoría de los casos, la necesidad de no

## Introducción

demorar el tratamiento quimioterápico obliga a iniciar la estimulación destinada a preservar ovocitos o a la extracción de tejido ovárico sin esperar el inicio de un ciclo ovárico subsiguiente, y por tanto no permite homogeneizar la fase del ciclo en la que se realizan las determinaciones hormonales [170, 171].

El interés por la evaluación de los niveles de AMH séricos en relación con el tratamiento quimioterápico deriva de la posibilidad de estimar fiablemente tanto el estado inicial de la reserva ovárica como el grado de deterioro achacable a la quimioexposición, con objeto de establecer un pronóstico adecuado acerca de la fertilidad y de la función endocrina en la paciente quimiotratada en la que se logre la remisión completa de la enfermedad [172]. La posibilidad de estimar fiablemente la reserva ovárica –e idealmente la fertilidad futura– de las pacientes quimiotratadas, o la respuesta a una eventual estimulación ovárica para tratar una esterilidad sobrevenida, resulta de evidente interés en pacientes en edad reproductiva diagnosticadas de cáncer [84]. En concreto, la AMH se viene considerando útil para el diseño de la estimulación ovárica, ya que presenta una elevada especificidad para identificar mujeres con baja reserva ovárica, y su capacidad predictiva en relación con la probabilidad de gestación, aunque menor, puede resultar prometedora [173].

Aunque la AMH es un buen predictor de la cantidad remanente de folículos en reserva, no aporta información sobre la calidad nuclear y citoplasmática de los ovocitos que contienen, y que está en dependencia más estrecha de la edad. Se ha sugerido que las pacientes jóvenes quimiotratadas y supervivientes del cáncer con niveles séricos de AMH disminuidos están en riesgo de pérdida acelerada de unidades foliculares, aunque la calidad de los restantes sería similar a la que le corresponda por su edad una vez depurado el potencial efecto mutagénico [174].

Por otro lado, el efecto gametotóxico de la quimioterapia podría superponerse a un posible efecto deletéreo intrínseco de la enfermedad tumoral sobre la reserva folicular. Para contrastar esta hipótesis, Su realizó analizó los niveles hormonales de 108 pacientes jóvenes con cáncer de mama comparándolas con 99 pacientes sanas. Tras ajustar por edad, IMC, paridad, raza, patrón menstrual previo y consumo de tabaco, no halló diferencias significativas entre los niveles de AMH de ambos grupos (0,85 vs 0,76 ng/mL;  $p=0,60$ ). Al realizar subanálisis por grupos de edad, en el estrato de mujeres mayores de 37 años, el nivel de AMH entre pacientes con cáncer de mama sí fue inferior al observado en las mujeres sanas (Diferencia de medias= -0,85, IC 95%: - 1,48, -0,22,  $p=0,009$ ) [175]. En la interpretación de sus resultados, los autores postulan que las pacientes de mayor edad podrían presentar mayor susceptibilidad al afecto nocivo de la

## Introducción

enfermedad tumoral sobre el conjunto de sus folículos de reserva, aunque señalan que se precisan estudios adicionales cuyo objetivo específico sea discernir si la edad actuaría como sesgo confusor o como verdadero factor de interacción, y que estén dotados de potencia estadística para contrastar esta hipótesis. Reconocen además que el procedimiento de determinación de la AMH fue homogéneo en el caso de las pacientes con cáncer de mama, pero no en las mujeres control, en las que se utilizó un procedimiento de cuantificación de AMH de primera generación en unos casos y otro de mayor fiabilidad en otros.

Otro estudio de interés destinado a estimar el efecto de la quimioexposición sobre la AMH en pacientes con cáncer de mama con controles sanos fue publicado por el grupo de Partridge en 2010, que comparó 20 pacientes con remisión al año de tratamiento con 24 pacientes sanas. Como se ha mencionado en referencia a la FSH y al RFA, todos los estimadores de reserva ovárica analizados presentaron valores más favorables en los controles respecto a las pacientes quimiotratadas, incluyendo la AMH (1,35 vs 0,43,  $p=0,0004$ ). La AMH, que mostró asociación con el RFA ( $Rho=0,72$ ;  $p<0,0001$ ) fue el estimador con mayor capacidad discriminativa (OR 7,63); la adición a los modelos predictivos del resto de los estimadores con asociación estadística no mejoró la capacidad predictiva del modelo basado en AMH [97].

Recientemente Bala ha publicado un estudio de observacional de casos controles, con 30 pacientes con diagnóstico confirmado de cáncer de mama que fueron evaluadas antes y después de la exposición a cuatro ciclos de régimen FEC, seguido de terapia secuencial con cuatro ciclos de docetaxel, y comparadas en cada fase con 30 controles sanos [176]. Las concentraciones séricas de AMH de las pacientes con cáncer de mama antes de la exposición a quimioterapia resultaron significativamente menores que las observadas en los controles sanos (1,67 vs 1,9 ng/dL;  $p<0,05$ ). Además, la AMH decreció significativamente en las pacientes con cáncer de mama después del tratamiento (1,67 vs 1,03  $p<0,001$ ).

La utilidad pronóstica de la AMH respecto al efecto de la quimioexposición en la función ovárica de pacientes con cáncer de mama fue también objeto de evaluación por los sucesivos estudios del grupo de Anderson que han sido previamente mencionados. Según su estudio prospectivo de 2006, en el que comparó un grupo de pacientes tratadas con goserelina y otro que recibió quimioterapia, las pacientes de este último que experimentaron amenorrea inducida por quimioterapia se caracterizaron por presentar menores niveles séricos de AMH previos al tratamiento ( $p=0,0007$ ), y también por mayor edad ( $p<0,0001$ ), y mayores concentraciones basales de FSH ( $p=0,0007$ ), en

## Introducción

comparación con las que restablecieron los ciclos menstruales, sin que se apreciaran diferencias significativas en las concentraciones de estradiol y de inhibina B. Por otro lado, se apreciaron diferencias entre las pacientes quimioexpuestas y las tratadas con agonista GnRH en la evolución temporal de los diferentes estimadores de reserva analizados. Entre las primeras, se produjo un descenso gradual de las concentraciones séricas de FSH, LH, inhibina B y estradiol, y una disminución muy rápida de la AMH sérica [99]. En contraposición, las pacientes tratadas con goserelina se caracterizaron por un descenso acelerado de las gonadotropinas, del estradiol y de la inhibina B, y más paulatino para la AMH.

Anders realizó un análisis prospectivo por medio de un diseño de cohortes sobre la utilidad pronóstica de los estimadores de reserva ovárica en la predicción de los efectos de la quimioterapia sobre la función ovárica, que fue citado en relación con la FSH. Las mayoría de las pacientes fueron tratadas con regímenes de quimioterapia que incluían antraciclinas y taxanos. Las pacientes que habían desarrollado amenorrea persistente al año de tratamiento presentaban niveles de AMH sérica más bajos antes del mismo (0,16 vs 1,09 ng/mL  $p=0,02$ ). La frecuencia de amenorrea quimioinducida fue superior en las pacientes con AMH preQT inferior a la mediana por estrato de edad 92% vs 52% ; RR 1,83  $p=0,05$ ) [160].

Los resultados respecto a la AMH del estudio de Anderson publicado en 2011 sobre la utilidad de los estimadores de reserva ovárica en la predicción de la afectación funcional del ovario por la quimioterapia en pacientes con cáncer de mama en estadios I a III concluyeron que el nivel de esta hormona era significativamente mayor en pacientes que conservaban ciclos regulares a los 5 años del tratamiento (0,16 vs 0,06 ng/mL;  $p=0,004$ ). Las pacientes con ciclos menstruales presentaron también niveles de AMH pre-tratamiento significativamente mayores que aquellas que permanecieron en amenorrea (2,5 vs 0,7  $p<0,0001$ ), y todas las pacientes con niveles de AMH previa a la quimioterapia menores de 1,9 ng/mL quedaron en amenorrea. Por otra parte, en las pacientes tratadas con taxanos se registró mayor frecuencia de amenorrea y menores concentraciones AMH durante los seis primeros meses del seguimiento postquimioterapia, así como del resto de estimadores de reserva ovárica analizados [154].

Estos mismos investigadores reprodujeron su estudio inicial por medio de un nuevo análisis de cohortes prospectivo publicado en 2013, con el objetivo de evaluar qué marcadores de reserva ovárica pueden contribuir a mejorar la calidad de la predicción de amenorrea quimioinducida en pacientes con cáncer de mama precoz. El estudio se

## Introducción

realizó sobre una muestra de 59 pacientes, con una media de edad de 42,5 años, y observadas a lo largo de dos años tras el tratamiento con quimioterapia. Los niveles de AMH previos al tratamiento y los determinados tras el primer ciclo de quimioterapia mostraron una correlación positiva ( $Rho= 0,76$   $p<0,0001$ ). En cambio, tras dos o más ciclos de quimioterapia, o tras un año del fin de la misma, los niveles de AMH eran indetectables o muy cercanos al umbral de detección, y no presentaban relación con la edad ni con la densidad de dosis de ciclofosfamida administrada. A los 2 años, en las 39 mujeres susceptibles de evaluación (excluyendo de las 52 pacientes iniciales a las que se encontraban bajo tratamiento con agonistas de la GnRH), las concentraciones de AMH presentaron de nuevo asociación con la edad y los niveles de AMH previos al tratamiento. Tras realizar análisis multivariado, se determinó que los niveles de AMH pretratamiento resultaron el único factor predictivo independiente de amenorrea quimioinducida (OR: 0,013; IC 0,001-0,227  $p=0,005$ ). Comparando diversos modelos univariados con finalidad predictiva, la AMH fue mejor predictor de amenorrea por quimioexposición que la edad. No obstante, la combinación de la edad y del nivel de AMH pretratamiento mejoró la capacidad predictiva de la AMH aislada. Adoptando como punto 38,9 años en la edad y una doble estratificación en la AMH por 3,8 y 20,3 pmol/L, los autores logran predecir amenorrea quimioinducida con una sensibilidad del 98,2% y una especificidad del 80% [87].

El valor de la AMH para estimar la afectación de la reserva ovárica tras quimioexposición fue analizado por Tamura sobre una cohorte de 19 pacientes con cáncer de mama que recibieron quimioterapia basada en antraciclinas y taxanos. De las 17 pacientes en las que se produjo amenorrea durante el tratamiento, 10 recuperaron los ciclos menstruales en 1 año tras el fin de la quimioterapia (59%), y 13 (78%) al cabo de los 2 años. No hallaron asociación significativa entre los niveles de AMH y la frecuencia de amenorrea ni el tiempo hasta el restablecimiento de los ciclos menstruales, lo que interpretan como resultado del número de observaciones y de la consiguiente insuficiencia de la potencia estadística [177].

El efecto de la duración del seguimiento en la frecuencia de aparición de la expresión clínica de la reducción de la reserva folicular y en la validez predictiva de los estimadores de la misma ha sido destacado por algunos autores. Rosendhal ha publicado los resultados del seguimiento prospectivo de una cohorte de 30 pacientes premenopáusicas con edad media de 30 años e indicación de quimioterapia por cáncer de mama: las evaluaciones iniciales comprendieron determinaciones de FSH, LH, Inhibina A y B y AMH, así como estimación del RFA y del volumen ovárico mediante ecografía transvaginal. Estas cuantificaciones fueron repetidas de forma seriada durante

## Introducción

la quimioterapia y después de la misma, con un tiempo medio de seguimiento de 12 meses. Ocho de las pacientes realizaron criopreservación de tejido ovárico previo a la quimioexposición por lo que se les realizó una ooforectomía y representaron un grupo con pérdida yatrógena de reserva folicular que fue considerado de forma específica en algunas comparaciones. Una semana después de la administración del primer ciclo de quimioterapia, los niveles de AMH ya habían experimentado un descenso dramático y progresivo de respecto a los iniciales (2,6 vs 1,1 ng/mL;  $p < 0.001$ ). Las pacientes con dos ovarios presentaban niveles de AMH sin diferencias con las que habían sido sometidas a la ooforectomía unilateral. Sin embargo, a partir de la reiteración de ciclos de quimioterapia, en las pacientes con dos ovarios se observaron niveles de AMH superiores a las que conservaban un ovario único (1,40 vs 0,59 ng/mL  $p = 0.039$ ). En el conjunto de la cohorte, la oligomenorrea o amenorrea apareció en el 81% de las pacientes. En la fase posterior al tratamiento, que se prolongó durante una media de nueve meses, se objetivó un ascenso de la AMH, Inhibina B, RFA y volumen ovárico ( $p < 0,001$ ) y descenso paralelo de FSH y LH ( $p < 0.001$ ), aunque ninguno de los estimadores llegó a alcanzar los niveles previos al tratamiento. Las pacientes con niveles séricos de AMH previos al inicio de la quimioterapia superiores a la media de la distribución (2,2 ng/mL) se caracterizaron por concentraciones séricas significativamente más elevadas de AMH y de RFA tras el tratamiento ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ). A los 15 meses de finalizar la quimioterapia, el 56% de las pacientes ( $n = 9$ ) habían presentado ciclos regulares durante tres o más meses, pero en la mayor parte de las mismas los niveles de AMH y de inhibina B eran indetectables. En este punto del seguimiento, no se hallaron diferencias significativas en los niveles de AMH, FSH o RFA en función de la recuperación de los ciclos menstruales. Por medio de análisis multivariado, los niveles séricos de AMH pre-tratamiento fueron identificados como predictor independiente de los regímenes de quimioterapia, de forma que presentar AMH pre-QT más elevada constituyó un factor de protección independiente de la edad, de la conservación de los dos ovarios y del tipo de quimioterapia administrado ( $p = 0.04$ ). A pesar del limitado tamaño de la cohorte analizada, resulta de interés la hipótesis, sugerida tras el análisis crítico de los resultados por los autores, de que la evolución temporal de los estimadores de reserva tras la quimioexposición puede determinar los resultados de los estudios de asociación y capacidad pronóstica [161].

El análisis prospectivo de Dillon, ya mencionado en relación con la evaluación de la capacidad predictiva de la FSH, valoró también la utilidad de la AMH sérica como estimador del efecto de la quimioterapia sobre la reserva ovárica en una cohorte en la que predominaban las pacientes con cáncer de mama, pero que incluía también neoplasias hematológicas. Todos los marcadores de reserva estudiados experimentaron

## Introducción

modificaciones significativas durante la quimioterapia, que en el caso de la AMH supuso un descenso promedio del 89% respecto a los valores iniciales. Al final del seguimiento solo un 9% de las pacientes recuperaron niveles de AMH similares a los previos al tratamiento, mientras que un 26% de las pacientes recuperaron niveles de FSH dentro del rango pretratamiento. Es destacable que en el 20% de las pacientes los niveles de AMH estaban por debajo del umbral de detección al final del seguimiento [155].

El grupo del *Edinburgh University Centre for Reproductive Health* ha aportado muy recientemente un estudio sobre la utilidad pronóstica de AMH respecto a la función ovárica postQT que añade dos fortalezas adicionales. Por una parte, utiliza una cohorte para la generación de los modelos de predicción y otro conjunto de observaciones para su validación (56 y 42 pacientes respectivamente). Además, compara los resultados derivados de la cuantificación de la AMH con un procedimiento analítico de primera generación con un sistema de segunda generación, caracterizado por un umbral de sensibilidad diez veces menor (7,5 pg/mL). Las pacientes de la primera cohorte fueron evaluadas anualmente durante cinco años tras del tratamiento, y las incluidas en la cohorte de validación al año y a los tres años de aquél. En la primera cohorte, recibieron quimioterapia el 70% de las pacientes, y entre éstas, la AMH fue detectable en todas las pacientes que volvieron a menstruar salvo en una, mientras que entre aquellas que permanecían en amenorrea, los niveles eran indetectables a los 2 años del fin del tratamiento en el 81% de los casos (medias: 522±169 pg/mL vs 8,9±1,3 pg/mL;  $p < 0,0001$ ). La concentración media de AMH fue superior en el grupo de pacientes en las que no desapareció la menstruación en comparación con las que experimentaron amenorrea transitoria ( $p < 0,05$ ), y similar a la observada en pacientes no tratadas con quimioterapia. En el grupo de pacientes con ciclos regulares, el porcentaje de muestras con AMH detectable fue mayor que por el método de cuantificación analítica convencional ( $p < 0,004$ ). El valor discriminativo de la AMH para determinar el futuro estado menstrual de pacientes con cáncer de mama tratadas con quimioterapia fue superior al del resto de estimadores de reserva analizados, y se caracterizó por un AUC elevada (0,99 95% IC 0,97; 1,01  $p < 0,0001$ ) cuando se adoptó un punto de corte de 16,1 pg/mL. La sensibilidad y la especificidad resultantes fueron, respectivamente, del 96% y del 90% para la predicción del estatus menstrual a los 2 años del tratamiento [178]. En sus conclusiones, los autores subrayan que la determinación de AMH por medio de técnicas analíticas con umbrales bajos de detección contribuye a mejorar la capacidad de este estimador para predecir la amenorrea quimioinducida. La AMH preQT cuantificada por medio de procedimientos de segunda generación permitió elaborar un modelo de predicción de la amenorrea cuya validez fue analizada en una cohorte, por

## Introducción

primera vez hasta el momento de la publicación del estudio, en una cohorte distinta, en la que mostró una capacidad de discriminación del resultado muy adecuada.

Hamy et al. en 2014 realizó un estudio de cohortes retrospectivo sobre 134 pacientes con cáncer mama, con el objetivo de describir las modificaciones de los niveles séricos de AMH previos al tratamiento quimioterápico, durante la quimioterapia, después de la misma y a largo plazo, y de analizar su asociación con la probabilidad de amenorrea y de gestación. El descenso de los niveles de AMH respecto de los basales no mostró asociación con la aparición de amenorrea a los 6 meses del tratamiento, pero sí a los 12 meses del mismo (-46%; IC 95% -20; -62% p=0,002). Tras la quimioterapia, se observó un incremento significativo de los niveles de AMH, cuyo promedio mensual fue del 1,2% (IC 95%: 0,7-1,6), y su magnitud fue menor en pacientes de edad superior a 38 años, así como en las que permanecieron amenorreicas durante más de 12 meses [179]. Posteriormente esta misma autora, publicó un estudio retrospectivo sobre el pronóstico reproductivo de las pacientes tratadas con quimioterapia por cáncer de mama [180]. Para ello analizó la relación entre los niveles séricos de AMH (previos al tratamiento y durante el mismo y la frecuencia de gestación en estas pacientes. De las 134 pacientes, 17 experimentaron 28 gestaciones espontáneas (12,5%) a lo largo de los 59 meses del seguimiento. Los niveles de AMH durante la quimioterapia fueron indetectables en el 65% de las pacientes que gestaron, al igual que en el grupo de mujeres que no gestaron. Ni la concentración de AMH basal ni al final del tratamiento quimioterápico resultaron significativamente asociadas con la frecuencia de gestación (HR=2,43 IC 95% 0,53 ;11,3). Sólo la administración regímenes quimioterápicos basados en antraciclinas mostraron asociación significativa con la mayor probabilidad de gestación frente a los regímenes basados en taxanos (HR=4,75, IC 95% 1,76; 12,8 p=0,002). Con respecto a los resultados gestacionales, el estudio no aporta datos respecto al deseo gestacional de las pacientes en las que no se produjo el embarazo.

También en 2014, Henry et al. realizaron un estudio prospectivo que incluye a 27 pacientes entre 25 y 50 años diagnosticadas de cáncer de mama con indicación de quimioterapia adyuvante o neoadyuvante, con el fin de determinar si los niveles de AMH e Inhibina B previos a quimioterapia podrían predecir la función ovárica tras la misma. El umbral de sensibilidad del procedimiento de determinación analítica de la AMH utilizado fue 0,16 ng/mL. Solo la edad menor 40 años en el momento de recibir la quimioterapia (OR 0.72 (IC 95%: 0.53;0.97), p=0.032) y los niveles detectables de AMH basales (OR 108 (IC 95%: 5.8;>2), p<0.002) se asociaron significativamente a la recuperación de la función ovárica, definida como recuperación de ciclos menstruales o niveles de estradiol>10pg/mL [181].

## Introducción

El trabajo ya mencionado de Rudy, basado en el análisis de una cohorte procedente de un ensayo clínico, evaluó la asociación de los niveles de AMH previos al tratamiento quimioterápico con el riesgo de amenorrea quimioinducida en pacientes con cáncer de mama con edades comprendidas entre 25 y 55 años. Los niveles de AMH basales fueron 0,11 ng/mL (0,01-8,63). El 82% de las pacientes se mantenían amenorreicas a los 12 meses de la quimioterapia, y el 81% a los 18 meses. La edad (36,5 vs 46 años  $p < 0,0001$ ), los niveles séricos de AMH (1,3 vs 0,08 ng/mL  $p < 0,0001$ ) y administración de bevacizumab (17% vs 82%;  $p = 0,03$ ), resultaron asociados a mayor probabilidad de amenorrea postQT. En el análisis multivariado, sólo la edad permaneció como variable asociada de forma independiente con la frecuencia de amenorrea a un año (OR 1,20 IC 95% 1,10-1,33  $p = 0,0003$ ). Respecto a la probabilidad de amenorrea a los 18 meses, tanto la edad (OR 1,18 IC 95% 1,04;1,34,  $p = 0,008$ ) como los niveles de AMH (OR 0,41 IC 95% 0,18;0,95  $p = 0,04$ ) se asociaron de forma independiente. Por cada año de edad adicional, la probabilidad estimada de amenorrea al año de finalizar la quimioterapia se incrementó en un 20%. Análogamente, por cada incremento en 1 ng/mL en los niveles de AMH basales, hubo un 59% de disminución en la probabilidad de permanecer en amenorrea a los 18 meses de la QT [137].

El estudio de Su, realizado con objetivos y metodología similares, en una muestra de 109 pacientes con cáncer de mama. La edad media fue de 39 años (rango: 23-45 años) y la mediana de seguimiento de 163 días. La AMH sérica preQT superior a 0.7 ng/mL (HR 2,9 IC95% 1,5-5,6) y FSH menor de 10 IU/L (HR 4,7 IC 95% 1,3-16,8) se asoció a menor probabilidad de aparición de amenorrea tras quimioterapia. El análisis multivariado conservó la edad ( $< 40$  vs  $\geq 40$  años, HR 3,39 IC 95% 1,74-6,60,  $p < 0,001$ ), el nivel de AMH ( $> 0,7$  vs  $\leq 0,7$  ng/mL HR 2,90 IC 95% 1,51-5,56,  $p = 0,002$ ) y el IMC ( $\geq 25$  vs  $< 25$  HR 5,07 IC 95% 2,44-10,54,  $p < 0,001$ ) como predictores independientes de recuperación de los ciclos menstruales. La combinación de estas tres variables con diferentes coeficientes permitió generar tres clasificaciones del riesgo de amenorrea [163].

En 2015 Ben-Aharon añadió a los disponibles, nuevo estudio prospectivo, sobre 20 pacientes diagnosticadas de estadio I-III de cáncer de mama tratadas mediante dos regímenes de quimioterapia diferentes, y cuyas edades eran más cercana al espectro de la edad reproductiva de la población general, ya que todas eran menores de 43 años. La concentración de AMH sérica resultó indetectable ( $< 0,1$  ng/mL) en la mayoría de las pacientes en la determinación inmediatamente posterior a la quimioterapia y permanecieron así también a los 6 meses de la misma. A los 12 meses tras la finalización de la quimioterapia, la AMH fue detectable en 8 pacientes menores de 35

## Introducción

años y en 2 pacientes mayores, de 36 a 40 años ( $p < 0.01$ ). Estos patrones fueron similares en pacientes tratadas y no tratadas con agonistas de la GnRH. Respecto a la asociación con amenorrea, todas las pacientes con AMH detectable a los 12 meses presentaron ciclos regulares, que sólo estuvieron presentes en 2 de las pacientes con AMH aun indetectable ( $p < 0,05$ ) [80].

El primer metaanálisis sobre el resultado de la quimioexposición sobre la función ovárica en pacientes premenopáusicas y la utilidad predictiva de la AMH acerca de la misma fue el de Banabei, en el que analizó conjuntamente cuatro estudios originales cuyos resultados individuales hemos resumido previamente [87, 137, 161, 181] y que analizaban datos procedentes de un total acumulado de 176 pacientes de 23 a 55 años. Los niveles de AMH basal fueron mayores en pacientes que recuperaron actividad ovárica tras la quimioterapia o que mantuvieron ciclos regulares durante la misma, que en aquellas con amenorrea tras un año del fin del tratamiento ( $p = 0,00017$ ). Además, el nivel de AMH tuvo mayor poder discriminativo en pacientes menores de 40 años que en aquellas de más edad (AUC 0.75 vs 0.67;  $p < 0,05$ ). La edad y los niveles de AMH resultaron marcadores independientes y significativos para predecir la probabilidad de actividad ovárica residual (Edad (años): -0,019; error estándar: 0,004;  $p = 0,0001$ ; AMH (ng/mL): 0,06; error estándar: 0,02;  $p = 0,004$ ). A partir de la probabilidad estimada, crearon un nomograma que permite predecir la probabilidad de mantener actividad ovárica residual un año después de finalizar la quimioterapia basándose en los niveles séricos de AMH basal y la edad de la paciente al inicio del tratamiento [86].

Se ha mencionado ya el trabajo de D'Avila, destinado a identificar los marcadores de reserva ovárica que puedan predecir amenorrea u oligomenorrea a los 6 meses del tratamiento con ciclofosfamida en pacientes con cáncer precoz de mama. Con este fin, realizaron determinaciones basales y a los seis meses a 52 pacientes con el perfil de la población de interés. Según sus resultados, la edad superior a 32 años predijo la aparición de amenorrea u oligomenorrea con un 96% de sensibilidad y un 39% de especificidad (AUC; 0,77; OR 15,9; IC; 95% 1-145,  $p = 0,03$ ). El nivel de AMH preQT, dicotomizada por 3,32 ng/mL proporcionó una sensibilidad del 85% y especificidad del 75% (AUC: 0,87; OR: 10,3 IC 95%: 2,14; 50,37;  $p = 0,04$ ), un valor predictivo positivo del 79% y un negativo del 75%. Para la predicción específica de la amenorrea a los 6 meses, el punto de corte en los de AMH sérica fue 1,87 ng/mL, y proporcionó una sensibilidad 82%, especificidad 83% (AUC 0,84) [156].

## Introducción

### 1.4. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.

El diagnóstico temprano de la enfermedad tumoral mamaria en pacientes en edad reproductiva que no han iniciado o completado sus deseos genésicos es una realidad creciente, en clara relación con el aumento del diagnóstico del tumor en fases preclínicas y con el retraso voluntario de la maternidad en la población femenina de los países desarrollados. Por otro lado, la efectividad del tratamiento del cáncer de mama ha experimentado un notable incremento a lo largo de las décadas más recientes, explicable no sólo por la mayor precocidad en el diagnóstico, sino principalmente por el uso de tratamientos como quimioterapia sistémica, hormonoterapia y terapias biológicas orientado por criterios dependientes de nuevos marcadores moleculares de pronóstico y susceptibilidad tumorales.

Estas circunstancias han generado un interés creciente por la calidad de vida posterior a la enfermedad de la paciente en la que se logra su remisión completa, desde la perspectiva de que el cuidado de las pacientes no termina con la constatación del buen resultado oncológico, sino que incluye la minimización del impacto que el tratamiento pueda producir en su estado de salud y en su proyecto de vida.

La creciente convicción acerca de la seguridad de la gestación en pacientes con cáncer de mama con perfil pronóstico favorable y buena respuesta al tratamiento, ha inducido a incluir en las recomendaciones de las guías de práctica clínica más acreditadas el asesoramiento reproductivo con fines informativos y preventivos de las pacientes en edad reproductiva. Puede afirmarse que la mayor parte de las pacientes premenopáusicas presentará tumores con pronóstico molecular no desfavorable, y que en ellas el uso de la quimioterapia es ya frecuente. También que el uso de taxanos como parte de los esquemas es ya mayoritario en muchos programas de oncología mamaria, y que la hormonoterapia incluirá de manera frecuente el uso de agonistas de la GnRH y de tamoxifeno o inhibidores de la aromatasa durante periodos de duración no inferior a 5-10 años en términos generales. El resultado de este enfoque terapéutico será la remisión completa de la enfermedad en más de la mitad de las pacientes premenopáusicas, que no habrán rebasado en muchos casos la edad compatible con una maternidad razonablemente segura.

La mayoría de los rangos de edad de los estudios que han analizado el efecto de la quimioterapia en la función ovárica en pacientes premenopáusicas han incluido observaciones sobre pacientes en la quinta década de la vida, en las que la búsqueda de

## Introducción

gestación sería excepcional y quizá inviable *per se*. Sólo algunos los estudios de más reciente publicación han considerado la necesidad de seleccionar a pacientes premenopáusicas con edades máximas en el entorno de los 40 años, con objeto de generar y validar instrumentos de predicción de la pérdida reserva folicular aplicables a la estimación de la fertilidad posterior.

La necesidad de proporcionar a las pacientes una orientación pronóstica fiable sobre el grado de reducción previsible de su reserva folicular ha suscitado el interés por su estimación entre los investigadores procedentes del ámbito de la oncología clínica y de la medicina reproductiva. La mayor parte de los estudios publicados hasta mediados de la pasada década consideraron la amenorrea quimioinducida como evento central para estimar la pérdida de función ovárica resultante de la quimioexposición. Las repercusiones de la pérdida de reserva folicular por debajo del límite necesario para el mantenimiento de los ciclos son evidentes, tanto por sus implicaciones sobre la fertilidad como en relación con la función endocrina del ovario.

El mejor conocimiento de la relación entre los eventos clínicos de la vida reproductiva de la mujer y su dotación folicular residual, de la influencia de ésta sobre la efectividad de los tratamientos de reproducción asistida, y de la capacidad de los estimadores de reserva ovárica para inferir ambas, viene desplazando el interés exclusivo por el fallo ovárico clínico. La aparición de amenorrea irreversible tras la quimioexposición representa la forma de afectación más severa de la reserva folicular, que queda reducida hasta hacer inviable la reproducción con gametos propios. Sin embargo, la reaparición de los ciclos menstruales no equivale a la restitución de la probabilidad de gestación determinada por la edad y los antecedentes reproductivos, puesto que la mayor parte de los estudios recientes han destacado que la pérdida de reserva funcional es comparable a la que conllevaría la reducción fisiológica por envejecimiento germinal fisiológico durante un periodo de 5-10 años. La mayoría de los estudios publicados cuantifican el descenso en la reserva ovárica a través de la modificación de sus estimadores más comunes, asumiendo la correlación de éstos con la probabilidad de lograr gestación por medio de reproducción natural cuando la paciente lo desee y la situación oncológica lo permita. Este proceso no deja de ser una estimación indirecta –y por ello, quizá más imprecisa– de la fertilidad, ya que los estimadores de reserva reciben esta denominación por su asociación con ésta, y no han mostrado el mismo grado de validez en la predicción de la probabilidad de gestación y nacido vivo. Los estudios más idóneos para la estimación de la fertilidad postquimioterapia, que comienzan a publicarse tras el análisis de series de casos, son indudablemente más útiles, pero también más escasos y limitados con fines de estimación de frecuencias.

## Introducción

El concepto de fallo ovárico clínico se fundamenta en la aparición de amenorrea tras quimioterapia en un contexto hormonal propio de hipogonadismo hipergonadotropo. El criterio diagnóstico aplicado por los estudios disponibles no es completamente unánime, pero resulta razonablemente uniforme en términos de duración mínima de la amenorrea, de número de determinaciones de FSH elevadas necesarias para la constatación del diagnóstico, así como en cuanto a valores umbrales para estas determinaciones. Además, la mayor parte de las definiciones adoptadas por los estudios previos están en consonancia con los consensos internacionales recientes sobre caracterización de la insuficiencia funcional ovárica. Por el contrario, se carece en la actualidad de una definición del fallo ovárico oculto ampliamente aceptada. La Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología recomienda la adopción de los Criterios de Bolonia con fines de diseño de estudios de intervención en el tratamiento de la baja respondedora. Estos criterios, que pretenden primar la sensibilidad a la especificidad en la clasificación de las pacientes respecto al riesgo de baja respuesta a la estimulación del desarrollo folicular múltiple en FIV, comprenden antecedentes asociados a la reserva –como la edad avanzada u otros antecedentes asociados al incremento del riesgo, la baja respuesta a ciclos previos, o la existencia de valores bajos de estimadores válidos de respuesta–. Respecto a estos últimos, la propuesta es utilizar como criterio de clasificación un rango de valores umbral, comprendido entre 5 y 7 para el RFA y entre 0,5 y 1,1 ng/mL en el caso de la AMH sérica. Asumiendo, como se ha argumentado, que la reserva ovárica disminuida es un factor de riesgo para la baja respuesta a la estimulación y no su equivalente, la variabilidad con la que puede delimitarse la definición operativa del fallo ovárico oculto, aun dentro del margen que ofrece el mencionado consenso de Bolonia, necesita ser mejor perfilada por estudios apropiados.

A las dificultades que entraña la generación de un modelo de predicción clínica se suman en el caso de fallo ovárico las derivadas de la amplitud de los límites conceptuales de este estado. Aún así, parece clara la necesidad estimar con la mayor fiabilidad posible qué pacientes con posible deseo reproductivo posterior quedarán en la categoría de mayor riesgo de fallo ovárico quimioinducido, y cuáles presentan un pronóstico de afectación de la reserva menos severa. Esta categorización no solo persigue el asesoramiento de la paciente respecto al curso previsible de la enfermedad y de los efectos secundarios del tratamiento, sino que puede ser muy útil en la elección de las medidas preventivas. La aplicación, aún en condiciones experimentales, de la preservación de tejido ovárico con fines de uso reproductivo posterior, ha reactualizado la necesidad de identificar a las pacientes con alto riesgo de fallo ovárico clínico, en las que la resección y criopreservación de tejido ovárico podría estar justificada.

## Introducción

Otro aspecto que limita la validez externa de un buen número de estudios disponibles es la heterogeneidad de los regímenes de quimioterapia aplicados, que dificulta la comparabilidad de los datos en el caso de los estudios multicéntricos y de los metaanálisis, y puede constituir también fuente de heterogeneidad en lo referido a las determinaciones analíticas de biomarcadores de reserva ovárica, o a parámetros ecográficos. La direccionalidad retrospectiva o el carácter de subanálisis de cohortes generadas para estudios de intervención que revisten algunos de los estudios analíticos prospectivos puede limitar sus conclusiones en términos de validez externa.

Una fuente adicional de variabilidad que se ha propuesto como origen potencial de sesgos de clasificación es el umbral de sensibilidad y la variabilidad de los procedimientos analíticos utilizados para la cuantificación de la AMH. Los dos sistemas comerciales de determinación de AMH mediante enzimoimmunoensayo quimioluminiscente de primera generación se basaban en el uso de dos anticuerpos diferentes, y ofrecían notables diferencias en las cuantificaciones, que llegaban a alcanzar el 40%. Los sistemas de determinación de segunda generación, disponibles comercialmente en la actualidad utilizan un anticuerpo estable, están calibrados en relación con un estándar fijo, presentan un umbral de detección mínima que representa la mitad de los de primer generación, y no se ven afectados por inmunorreactividad cruzada frente a otras hormonas. Además, su variabilidad intraensayo es la habitual en las determinaciones inmunoanalíticas con finalidad de diagnóstico clínico.

Por todo ello, el presente estudio pretende contribuir a la ampliación de los conocimientos disponibles sobre la influencia que la reserva ovárica previa a la administración de quimioterapia puede tener sobre el efecto de reducción de la reserva ovárica ejercido por la quimioterapia aplicada para el tratamiento actual en cáncer de mama. Este análisis se ha realizado con la intención de superar algunas de las limitaciones que afectan a los estudios disponibles, aplicando un diseño y un abordaje metodológico cuyas pretensiones generales son las siguientes:

- Definir como población de estudio la de mujeres premenopáusicas con cáncer de mama cuya edad en el momento de la quimioexposición resulte compatible con una eventual gestación futura.
- Evaluar la asociación entre la reserva ovárica previa a la quimioterapia y la probabilidad de fallo ovárico clínico, y la utilidad pronóstica de los estimadores de reserva ovárica más acreditados en la población de pacientes en edad reproductiva
- Explorar la asociación entre la reserva folicular estimada y la probabilidad de fallo ovárico oculto, definido por medio de criterios acordes con los conocimientos

## Introducción

actuales sobre depleción de la reserva ovárica, con una orientación eminentemente preventiva.

- Obtener un alto grado de control de sesgos, por medio de una direccionalidad prospectiva, y aplicando análisis multivariado de la implicación explicativa de los estimadores de reserva ovárica, con control de la posible influencia de las covariables relevantes.



# OBJETIVOS E HIPÓTESIS



## Objetivos e Hipótesis

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. GENERAL

Evaluar la asociación de la reserva funcional ovárica y la utilidad pronóstica de sus principales estimadores –recuento de folículos antrales y AMH– en relación con la aparición de fallo ovárico clínico en pacientes premenopáusicas en edad reproductiva tratadas con quimioterapia por carcinoma epitelial de mama.

### 2.2. SECUNDARIOS

- Estimar la frecuencia de fallo ovárico oculto en pacientes afectadas por cáncer de mama expuestas a regímenes actuales de quimioterapia
- Analizar la asociación de los estimadores de reserva ovárica clínicos, bioquímicos y ecográficos con el riesgo de aparición de fallo ovárico oculto quimioinducido.
- Analizar la asociación de los estimadores de reserva ovárica clínicos, bioquímicos y ecográficos con el riesgo de aparición de reducción severa de la reserva funcional ovárica, entendiendo por tal la aparición de fallo ovárico oculto o clínico a lo largo del seguimiento.

## Objetivos e Hipótesis

### 3. HIPÓTESIS

#### 3.1. HIPÓTESIS RELACIONADA CON EL OBJETIVO PRINCIPAL

##### 3.1.1. Hipótesis conceptual:

Las pacientes en edad reproductiva quimiotratadas por cáncer de mama en estadios precoces y con menor reserva funcional ovárica presentan mayor riesgo acumulado de fallo ovárico clínico inducido por la exposición a quimioterapia

##### 3.1.2. Hipótesis operativa:

*Hipótesis alternativa ( $H_1$ ):*

Las pacientes en edad reproductiva con cáncer epitelial mama en estadios I a III y tratadas quimioterapia neoadyuvante-adyuvante que presentan menor reserva funcional ovárica, estimada por medio del recuento ecográfico de folículos antrales y de la concentración sérica de AMH, presentan un riesgo acumulado de fallo ovárico clínico quimioinducido que resulta superior en al menos un 20 % al observado en pacientes con reserva folicular normal, ajustando por edad y otras covariables relacionadas.

*Hipótesis nula ( $H_0$ ):*

Las pacientes en edad reproductiva con cáncer de mama expuestas a quimioterapia neoadyuvante-adyuvante que presentan baja reserva funcional ovárica, estimada por medio del recuento ecográfico de folículos antrales y de la concentración sérica de AMH, no presentan un riesgo acumulado de fallo ovárico clínico quimioinducido superior en el 20 % al observado en pacientes con reserva folicular normal, ajustando por edad y otras covariables relacionadas.

## Objetivos e Hipótesis

### 3.2. HIPÓTESIS RELACIONADA CON EL OBJETIVO SECUNDARIO

#### 3.2.1. Hipótesis conceptual:

Las pacientes en edad reproductiva quimiotratadas por cáncer de mama en estadios precoces y con menor reserva funcional ovárica presentan mayor riesgo de fallo ovárico oculto y/o reserva ovárica severamente disminuida inducido por la exposición a quimioterapia.

#### 3.2.2. Hipótesis operativa:

##### *Hipótesis alternativa ( $H_1$ ):*

Las pacientes en edad reproductiva con cáncer epitelial de mama expuestas a quimioterapia neoadyuvante-adyuvante que presentan baja reserva funcional ovárica, estimada por medio del recuento ecográfico basal de folículos antrales y de la concentración sérica de AMH, presentan un riesgo de fallo ovárico oculto y/o reserva ovárica severamente disminuida tras quimioterapia que resulta superior en al menos un 20% al observado en pacientes con reserva folicular normal, ajustando por edad y otras covariables relacionadas.

##### *Hipótesis nula ( $H_0$ ):*

Las pacientes en edad reproductiva con cáncer epitelial de mama expuestas a quimioterapia neoadyuvante-adyuvante que presentan baja reserva funcional ovárica, estimada por medio del recuento ecográfico basal de folículos antrales y de la concentración sérica de AMH, no presentan un riesgo acumulado de fallo ovárico oculto y/o reserva ovárica severamente disminuida tras quimioterapia superior en al menos un 20% al observado en pacientes con reserva folicular normal, ajustando por edad y otras covariables relacionadas.



# MATERIAL Y MÉTODOS



## **Material y Métodos**

### **4. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **4.1. DISEÑO**

Estudio de cohortes prospectivo con análisis de supervivencia

#### **4.2. ÁMBITO**

El estudio se ha desarrollado en el ámbito de la Sección de Reproducción Asistida del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, centro terciario de referencia para tratamientos de reproducción asistida de las Áreas Sanitarias 1 y 2 de Madrid, y para técnicas de preservación de fertilidad del Servicio Madrileño de Salud.

El periodo de acumulación de observaciones se ha extendido entre enero de 2011 a diciembre de 2016.

#### **4.3. POBLACIÓN DE INTERÉS**

Pacientes en edad reproductiva con cáncer de mama en estadios I a III de la AJCC-UICC (American Joint Committee on Cancer; Union Internacional Contra Cancer) tratadas con quimioterapia sistémica según los protocolos vigentes a lo largo del periodo de observación.

#### **4.4. POBLACIÓN DE ESTUDIO**

Se ha estudiado una muestra acumulativa constituida por pacientes pertenecientes a la población de interés, que han acudido a la Unidad de Reproducción del Hospital General Universitario Gregorio Marañón para recibir información sobre preservación de la fertilidad a lo largo del periodo de acumulación de observaciones

#### **4.5. CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

- Diagnóstico de carcinoma epitelial de mama en estadios I a III en pacientes con indicación de tratamiento quimioterápico neoadyuvante o adyuvante.
- Edad comprendida entre 18 y 40 años en el momento del diagnóstico de cáncer de mama.

## **Material y Métodos**

- Ciclos menstruales conservados en el momento del diagnóstico del proceso neoplásico. Se ha definido la conservación de la menstruación como la presencia de ciclos menstruales regulares o irregulares, o al menos la aparición de tres ciclos menstruales de inicio espontáneo durante los 180 días previos al diagnóstico de cáncer de mama.
- Consentimiento informado firmado

### **4.6. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

- Pacientes en Estadio tumoral IV de la AJCC-UICC.
- Edad superior a los 40 años.
- Pacientes en amenorrea primaria o secundaria.
- Pacientes que han recibido quimioterapia por proceso neoplásico previo.
- Imposibilidad de determinar la exposición o el efecto en los términos definidos por el estudio.
- Denegación del consentimiento.

### **4.7. FUENTES DE INFORMACIÓN CLÍNICA**

La información analizada en el estudio está constituida por los datos clínicos y de laboratorio generados por la intervención asistencial en las pacientes que hayan accedido a participar en el estudio, y registrados en la historia clínica.

### **4.8. DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES DEL ESTUDIO**

#### **4.8.1. Variables independientes (explicativas)**

- Recuento ecográfico de folículos antrales previo a exposición a quimioterapia
- Concentración sérica de AMH previa a la exposición a quimioterapia
- Variables resultantes de la combinación de ambas

#### **4.8.2. Variables dependientes (de respuesta)**

- Principal: Frecuencia acumulada de restablecimiento de ciclos menstruales en pacientes tras exposición a quimioterapia, evento complementario de la amenorrea quimioinducida irreversible (fallo ovárico clínico).

## Material y Métodos

- Secundarias:
  - Frecuencia de fallo ovárico oculto en el momento de restablecimiento de ciclos menstruales
  - Frecuencia de fallo ovárico oculto al final del seguimiento

### 4.8.3. Covariables

- Relativas a la condición basal de la paciente:
  - Edad
  - Índice de masa corporal
  - Consumo de tabaco
  - Número de cigarrillos consumidos al día
  - Edad de la menarquia
  - Regularidad de los ciclos menstruales
  - Paridad
  - Antecedentes familiares de cáncer de mama
  - Condición de portadora de mutación BRCA
- Relativas a la reserva ovárica basal:
  - FSH sérica previa a quimioterapia
  - Estradiol sérico previa a quimioterapia
  - Recuento de folículos antrales previos a quimioterapia
  - AMH sérica inicial previa a quimioterapia
- Relativas a la enfermedad tumoral:
  - Estadío TNM (AJCC-UICC)
  - Tipo histológico
  - Grado histológico
  - Expresión de receptores de estrógenos
  - Expresión de receptores de progesterona
  - Expresión de Ki67
  - Expresión de Her2 *neu*
  - Clasificación pronóstica basada en la clasificación molecular
- Relativas al tratamiento quirúrgico:
  - Técnica quirúrgica de exéresis tumoral

## Material y Métodos

- Biopsia selectiva de ganglio centinela
  - Número total de ganglios biopsiados
  - Número de ganglios biopsiados positivos
  - Linfadenectomía axilar
  - Número total de ganglios obtenidos mediante linfadenectomía
  - Número de ganglios positivos obtenidos mediante linfadenectomía
  - Número total de ganglios axilares positivos
- Relativas a la quimioterapia
- Secuencia neoadyuvante o adyuvante
  - Régimen de quimioterapia de primera elección basado en ciclofosfamida
  - Régimen de quimioterapia de primera elección basado en carboplatino
  - Régimen de quimioterapia de primera elección con administración de taxanos secuenciales
  - Número de ciclos de quimioterapia de primera elección administrados
  - Régimen de quimioterapia de segunda elección o rescate
  - Número de ciclos de quimioterapia de segunda elección administrados
- Relativas la inmunoterapia
- Tratamiento con trastuzumab
  - Tratamiento con pertuzumab
- Relativas a la hormonoterapia
- Agente de primera elección
  - Hormonoterapia con tamoxifeno
  - Hormonoterapia con análogos agonistas de la GnRH
  - Hormonoterapia con exemestano
- Relativas a procedimientos de preservación de fertilidad
- Criopreservación de ovocitos

## Material y Métodos

### 4.9. MÉTODOS DE OBSERVACIÓN Y MEDIDA

#### 4.9.1. Criterios diagnósticos y unidades de medida

- Recuento ecográfico de folículos antrales previo a exposición a quimioterapia: número de imágenes sonolucetas intraováricas con características morfológicas compatibles con folículos ováricos antrales visibles mediante ecografía transvaginal de alta resolución en cualquier fase del ciclo menstrual. Se denominó 'basal' al RFA determinado durante la fase folicular precoz. En pacientes sin menstruación clínica, se consideró válido dicho recuento en cualquier exploración.
- Concentración sérica de AMH previa a la exposición a quimioterapia: nivel sérico de AMH antes de la exposición al primer ciclo de quimioterapia (ng/mL).
- Variables combinadas basadas en RFA y AMH:
  - RFA o AMH preQT elevados: Presencia de un RFA previo a quimioterapia mayor o igual a 16, o de una concentración sérica de AMH previa a quimioterapia mayor o igual 4 ng/mL.
  - RFA o AMH preQT bajos: Presencia de un RFA previo a quimioterapia menor a 11, o de una concentración sérica de AMH previa a quimioterapia menor a 1,4 ng/mL.
- Fallo ovárico clínico: amenorrea secundaria de cuatro o más meses de duración asociada a la administración de quimioterapia, en presencia de al menos dos determinaciones de FSH sérica con valores superiores a 25 UI/L separadas al menos 4 semanas, según criterios del Consenso sobre Insuficiencia Ovárica Precoz de la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología 2016 [182].
- Reparación de ciclos menstruales: restablecimiento de ciclos menstruales regulares o irregulares tras amenorrea secundaria de cuatro o más meses de duración asociada a la administración de quimioterapia.
- Tiempo hasta reparación de ciclos menstruales: número de meses transcurridos desde la finalización del último ciclo de quimioterapia administrado hasta el restablecimiento de ciclos menstruales regulares o irregulares, en pacientes con amenorrea secundaria asociada a la quimioterapia.

## Material y Métodos

- Fallo ovárico oculto: reducción severa de la reserva ovárica sin expresión clínica, definida con arreglo a los siguientes criterios:
  - RFA menor de 5, según el umbral definido para estimadores de riesgo de baja respuesta a la estimulación ovárica contemplado por los Criterios de Bolonia de la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología [183].
  - AMH sérica menor de 0,5 ng/mL según el umbral definido para estimadores de riesgo de baja respuesta a la estimulación ovárica contemplado por los Criterios de Bolonia de la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología [183].
  - Presencia uno de los criterios basados en RFA o AMH.
- Edad: medida en años completos.
- Índice de masa corporal: cociente entre el peso corporal en kg y la talla en metros ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )
- Consumo de tabaco: variable dicotómica (sí/no).
- Número de cigarrillos consumidos al día: recuento referido por la paciente
- Edad la menarquia: edad de aparición de la primera menstruación en años completos.
- Regularidad de los ciclos menstruales: patrón menstrual cíclico o acíclico.
- Antecedentes reproductivos: número de gestaciones clínicas previas.
- Antecedentes familiares de cáncer de mama: historia de afectación por cáncer de mama en familiares de primer grado (madres, hermanas, hermanos e hijos) o con menor grado de proximidad y relevancia pronóstica (abuelos, tíos y tías, sobrinos y sobrinas, nietos y primos).
- Condición de portadora de mutación BRCA: antecedente de diagnóstico molecular de mutaciones de los genes BRCA1 o BRCA2.
- Fase del ciclo en la que se inicia la observación: fase folicular precoz (1° a 4° días del ciclo) y resto del ciclo.
- FSH: concentración sérica de FSH (UI/L). Se denominó 'basal' la FSH determinada durante la fase folicular precoz.
- Estradiol: concentración sérica de estradiol (pg/mL). Se denominó 'basal' el estradiol determinado durante la fase folicular precoz.
- Recuento de folículos antrales postQT: recuento de imágenes sonolucientes intraováricas con características morfológicas compatibles con folículos ováricos antrales visibles mediante ecografía transvaginal de alta resolución.
- Concentración sérica de AMH: nivel sérico de AMH (ng/mL)
- Estadio tumoral TNM: Estadificación de la enfermedad tumoral mamaria en estadios I a III, según el sistema propuesto por la *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) y la *Union for International Cancer Control* (UICC) [184].

## Material y Métodos

- Tipo histológico: clasificación histopatológica del tumor, establecida con arreglo a los criterios de la Organización Mundial de la Salud [185].
- Grado histológico: clasificación del grado de diferenciación de los carcinomas ductales en tres categorías, según los criterios de Scarff-Bloom-Richardson modificados por Elston y Ellis [186].
  - Grado bajo o I: bien diferenciados
  - Grado intermedio o II: moderadamente diferenciados
  - Grado alto o III: escasamente diferenciados
- Expresión de receptores de estrógenos: Variable dicotómica (positivo/negativo). Se consideró positiva la expresión de receptores de estrógenos ante cualquier nivel de detección inmunohistoquímica en células tumorales.
- Expresión de receptores de progesterona: Variable dicotómica (positivo/negativo). Se consideró positiva la expresión de receptores de progesterona ante cualquier nivel de detección inmunohistoquímica en células tumorales.
- Expresión de Ki67: Nivel de detección de la expresión inmunohistoquímica del antígeno ki-67.
- Expresión de Her2 *neu*: Nivel de detección de sobreexpresión de la proteína Her2*neu*.
- Biopsia selectiva de ganglio centinela: Biopsia escisional selectiva del ganglio que constituye la primera estación de drenaje linfático de la lesión tumoral, identificado por la detección gammagráfica de la concentración del radiotrazador inyectado en la lesión tumoral.
- Número total de ganglios obtenidos mediante biopsia selectiva: Número de ganglios obtenidos mediante biopsia quirúrgica selectiva y analizados para la detección de micro y macrometástasis.
- Número de ganglios biopsiados positivos: Número de ganglios obtenidos mediante biopsia quirúrgica selectiva con presencia de micro o macrometástasis identificadas por medio de análisis histopatológico y/o molecular.
- Técnica quirúrgica de exéresis tumoral: variable dicotómica que diferencia entre cirugía conservadora de la mama y mastectomía radical.
- Linfadenectomía axilar: Variable dicotómica (sí/no)
- Número total de ganglios obtenidos mediante linfadenectomía: Número de ganglios obtenidos mediante linfadenectomía axilar y analizados para la detección de micro y macrometástasis.
- Número de ganglios positivos obtenidos mediante linfadenectomía: Número de ganglios obtenidos mediante linfadenectomía axilar con presencia de micro o macrometástasis identificadas por medio de análisis histopatológico y/o molecular.

## Material y Métodos

- Secuencia neoadyuvante o adyuvante: administración de quimioterapia previa o posterior a la exéresis quirúrgica de la lesión tumoral.
- Régimen de quimioterapia de primera elección: Régimen de quimioterapia neoadyuvante o adyuvante utilizado.
- Número de ciclos de quimioterapia de primera elección administrados: Número de ciclos de quimioterapia de primera elección administrados a la paciente.
- Régimen de quimioterapia de segunda elección o rescate: Tras la administración del régimen de quimioterapia de primera elección cuando esta no da lugar a una remisión completa de la enfermedad.
- Número de ciclos de quimioterapia de segunda elección administrados: Número de ciclos de quimioterapia de rescate administrados a la paciente.
- Inmunoterapia con Trastuzumab: Variable dicotómica (sí/no)
- Inmunoterapia con Pertuzumab: Variable dicotómica (sí/no)
- Agente hormonoterápico de primera elección: Agente de primera elección utilizado para la ablación de la función ovárica en pacientes con receptores hormonales positivos.
- Hormonoterapia con tamoxifeno: Variable dicotómica (sí/no)
- Hormonoterapia con análogos agonistas de la GnRH: Variable dicotómica (sí/no). Se ha considerado tratada con análogos cualquier paciente expuesta a estos agentes de forma concurrente o secuencial a la quimioterapia.
- Hormonoterapia con exemestano: Variable dicotómica (sí/no)
- Criopreservación de ovocitos: Estimulación ovárica controlada para la obtención de ovocitos maduros para su posterior vitrificación.

### 4.9.2. Métodos de cuantificación específicos

- Diagnóstico por imagen ultrasonográfico: ecografía endovaginal realizada mediante equipos Voluson 730 Expert (General Electric, Boston; Estados Unidos de América), y Famio 8 (Toshiba Medical Systems; Tokyo, Japón), dotados con sondas multifrecuencia de alta resolución (6,5-12,5 MHz)
- Cuantificación analítica prospectiva de parámetros séricos:
  - AMH: Determinación cuantitativa automatizada mediante inmunoensayo de quimioluminiscencia en suero y plasma humanos (Access AMH; Beckman-Coulter, Francia), con intervalo de medición comprendido entre el límite inferior de detección (0,02 ng/mL) y el valor de calibración más alto (24 ng/mL), con una desviación máxima de linealidad del 2,45% para concentraciones > 0,16 ng/mL y <0,00 ng/mL para concentraciones <0,16 ng/mL, y con coeficiente de variación cercano al 3%.

## Material y Métodos

- Estradiol: Determinación cuantitativa automatizada mediante inmunoensayo de quimioluminiscencia directa suero y plasma humanos (Estradiol-6 III, Siemens ADVIA Centaur®, Alemania), con intervalo de medición comprendido entre el límite inferior de detección (7,0 ng/L) y el valor de calibración más alto (1000 ng/mL), y con coeficiente de variación promedio para concentraciones del intervalo de medición de 9,7%, y comprendido entre el 7,1 y el 12,3%.
- FSH: Determinación cuantitativa automatizada mediante inmunoensayo de quimioluminiscencia directa suero y plasma humanos (FSH; Siemens ADVIA Centaur®, Alemania), con intervalo de medición comprendido entre el límite inferior de detección (0,3 UI/L) y el valor de calibración más alto (200 UI/L), y con coeficiente de variación promedio para concentraciones del intervalo de medición de 2,8%, y comprendido entre el 2,2 y el 3,9%.

### 4.10. PERIODO DE ACUMULACIÓN DE OBSERVACIONES

La cohorte analizada está constituida por una muestra de las pacientes en edad reproductiva con cáncer de mama que acudían a nuestro centro para recibir información sobre preservación de fertilidad y cumplían los criterios de selección entre 2011 y diciembre 2016.

Con el objeto del registro de las variables de interés, la observación prospectiva de las pacientes incluidas se inició de forma previa a la administración del tratamiento quimioterápico, reevaluándose una vez concluido, y cada 6 meses, hasta el momento del fin de seguimiento al objeto del presente análisis (30 de noviembre de 2016). Con el objetivo de realizar futuros análisis, la incorporación de pacientes y el seguimiento continúan activos.

### 4.11. FASES DE OBSERVACIÓN

#### 4.11.1. Fase previa a la quimioterapia

Las pacientes afectadas por cáncer epitelial de mama y remitidas al Programa de Preservación de Fertilidad de nuestro centro durante el periodo de acumulación de observaciones fueron atendidas en su primera visita con arreglo a los protocolos asistenciales en vigor. Tras la realización de la historia clínica, las pacientes susceptibles de inclusión en el estudio fueron informadas acerca del objetivo y de la metodología del

## Material y Métodos

mismo. Aquéllas que accedieron a participar fueron registradas prospectivamente en una base de datos en soporte electrónico en el momento de la firma del consentimiento informado.

La información sobre las variables relativas a las características basales y antecedentes familiares y personales, las características de la enfermedad tumoral y el tratamiento previsto fueron registradas simultáneamente en la historia clínica y en la base de datos del estudio.

Las pacientes que autorizaron su inclusión en el estudio, con independencia de la realización o no tratamientos de preservación de fertilidad, fueron sometidas a los siguientes procedimientos:

- Ecografía transvaginal para el recuento de folículos ováricos antrales, que se efectuó en el día de la primera atención de las pacientes. En todos los casos se registró el día del ciclo menstrual en el que tenía lugar la exploración.
- Extracción de 10 mL de sangre venosa periférica mediante venopunción con destino a la cuantificación de AMH. La muestra hemática fue conservada a 4°C hasta el momento de su centrifugación, que se efectuó dentro de las 4-6 horas siguientes a la extracción. Tras centrifugación 1200 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante fue dividido en alícuotas de 1 mL y conservado mediante ultracongelación a -80 °C.
- Extracción de 10 mL de sangre venosa periférica mediante venopunción con destino a la cuantificación de FSH, LH y estradiol mediante procedimientos automatizados de diagnóstico bioquímico convencional en el Servicio de Bioquímica de nuestro centro.
- Determinación analítica de AMH a partir del suero congelado con anterioridad, mediante procedimientos automatizados de diagnóstico bioquímico convencional en el Servicio de Bioquímica de nuestro centro.

### 4.11.2. Primer control postquimioterapia

- Recopilación de los datos relativos al tratamiento quimioterápico y quirúrgico efectuado.
- Determinación del estado menstrual
- Determinación analítica de AMH, FSH, LH y estradiol, según el procedimiento descrito.
- Ecografía transvaginal para realizar recuento de folículos antrales de ambos ovarios.

## Material y Métodos

### 4.11.3. Fase de observación semestral

- Recopilación de los datos relativos al tratamiento quimioterápico y quirúrgico efectuado.
- Determinación del estado menstrual.
- Determinación analítica de AMH, FSH, LH y estradiol, según el procedimiento descrito.
- Ecografía transvaginal para realizar recuento de folículos antrales de ambos ovarios.
- Interrogatorio sobre tratamiento aplicado hasta el control y sobre resultado de las revisiones oncológicas.

## 4.12. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO MUESTRAL

Para detectar diferencias con una potencia del 80% en el contraste de la hipótesis nula  $H_0$  de igualdad de las curvas de supervivencia entre grupos mediante una prueba Log-rank bilateral para dos muestras independientes, asumiendo un nivel de confianza del 95%, una probabilidad de supervivencia a los 12 meses de seguimiento del 70% en el grupo de exposición y del 90% en el grupo no expuesto, y una ratio entre expuestos y no expuestos de 0,6, se precisan 24 sujetos de observación en el grupo de exposición y 40 en el grupo de referencia, que con una corrección por pérdidas del 5% totalizan 68 observaciones.

## 4.13. MÉTODOS ESTADÍSTICOS

### 4.13.1. Descripción de variables

Se ha estudiado la normalidad de la distribución de las variables cuantitativas, analizando su media, mediana y desviación típica, así como su histograma. En caso de duda, se han aplicado pruebas de contraste de normalidad. Las variables cuantitativas en las que asumió la distribución normal se describen por medio de su media y desviación estándar, y aquellas con distribución de tendencia no normal a través de su mediana y su rango intercuartílico. Las variables cualitativas se describen mediante su distribución de frecuencias.

## Material y Métodos

### 4.13.2. Análisis de asociación

Se ha evaluado la asociación entre las variables de exposición y de variables de resultado, así como entre covariables y variables explicativas y de resultado.

Los contrastes de las variables en las que no intervenía el tiempo se han realizado con pruebas estadísticas apropiadas a la naturaleza de mismas:

- Los contrastes de diferencias de medias se han efectuado por medio de la prueba t de Student en caso de variables con distribución normal. Para el contraste de la diferencia de distribuciones de variables no normales se han aplicado pruebas no paramétricas como la U de Mann-Whitney, la prueba de la mediana o la de Kruskal-Wallis.
- Las diferencias de proporciones se han analizado por medio de la prueba  $\chi^2$ , aplicando la corrección de Yates o el test exacto de Fischer en caso necesario. Si no podía asumirse la normalidad de las variables explicativas o de las covariables, se han aplicado pruebas de comparación de proporciones bajo supuestos no paramétricos.
- Para los análisis de correlación se han estimado los coeficientes de correlación de Spearman.

Para análisis de la asociación entre variables con consideración del tiempo, se ha aplicado el modelo de análisis de supervivencia de Kaplan-Meier, realizando el contraste de las diferencias por medio la prueba Log-Rank.

### 4.13.3. Análisis de magnitud de efecto

#### 4.13.3.1. Análisis univariado

Las variables categóricas y continuas han sido dicotomizadas mediante punto de corte oportunos, seleccionado según la morfología de las distribuciones o con criterios de relevancia clínica. La estimación univariada de magnitud de efecto se ha realizado por a través del Hazard Ratio (HR) con su correspondiente intervalo de confianza al 95%, estimado por medio de la regresión de Cox. Para la estimación de magnitud de efectos sin consideración del tiempo, se ha estimado el Riesgo Relativo (RR) con su correspondiente intervalo de confianza. La significación de la magnitud del RR estimado se ha realizado por medio del estadístico de Mantel-Haenzel, y valorando la distancia del límite inferior del intervalo de confianza respecto del valor neutro 1.

## Material y Métodos

### 4.13.3.2. Análisis bivariado

La posible influencia de variables modificadoras de efecto se ha estudiado por medio de regresión de Cox, valorando el efecto de la introducción de la variable de interacción en el HR final estimado. Se concluyó la existencia de interacción cuando la supresión de la variable de interacción generó una modificación de la capacidad explicativa del modelo, estimada por la correspondiente prueba de contraste. En caso de detectarse ésta, la magnitud del efecto se expresa por medio del HR por estrato. Si no se detectó interacción, se ha evaluado la existencia de confusión. Las covariables se han considerado confusoras cuando la diferencia entre el HR crudo y el ajustado por la covariable ha resultado superior al 10 % del valor del HR crudo.

### 4.13.3.3. Análisis multivariado

Se han elaborado modelos de regresión de Cox con finalidad explicativa, que resultará de la elaboración sucesiva de modelos iniciales construidos con la variable explicativa principal más las posibles variables asociadas, que incluyeron necesariamente las generadoras de interacción o confusión. A partir del modelo completo, constituido por todas las variables susceptibles de análisis, se ha procedido a la eliminación sucesiva de las que presentaron menor fuerza de asociación en cada paso. Los modelos explicativos conservaron la totalidad de las variables con significación estadística independiente, valorada por medio de la significación del cambio en la capacidad explicativa en caso de supresión de dicha variable. La elección de modelo explicativo más adecuado se adoptó en función del criterio de información de Akaike.

Los modelos predictivos se elaboraron con un criterio similar, partiendo de la variable predictiva principal a la que se añadieron en el modelo inicial las asociadas con carácter independiente en el modelo explicativo, más todas las que contribuyeron a mejorar la calidad del modelo. La elección del modelo predictivo más adecuado se realizó considerando el balance sensibilidad-especificidad.

Para los contrastes de las hipótesis nulas de igualdad se asumirá un nivel de confianza del 95 %, lo que determinó un umbral crítico de 0,05 en el valor p de las pruebas de contraste. Los análisis estadísticos han realizado con el paquete informático IBM SPSS Statistics versión 21 para Windows (licencia corporativa del Hospital General Universitario Gregorio Marañón; 2015).

## **Material y Métodos**

### **4.14. ASPECTOS ÉTICOS Y LEGALES**

#### **4.14.1. Autorización del estudio**

El presente estudio fue autorizado, en fase de proyecto, por el Comité Ético de Investigación Clínica de Hospital General Universitario Gregorio Marañón, centro del que proceden los registros clínicos a partir de los cuales se han generado las observaciones del estudio.

#### **4.14.2. Confidencialidad**

El tratamiento de los datos clínicos se ha realizado manteniendo los máximos niveles de confidencialidad y de rigor en el secreto médico, y cumpliendo estrictamente la normativa legal en materia de protección de datos de carácter personal y clínico, y en particular lo establecido por la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal.

# RESULTADOS



## Resultados

### 5. RESULTADOS

#### 5.1. DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES DEL ESTUDIO

El estudio se ha realizado sobre un total de 67 pacientes expuestas a quimioterapia neoadyuvante/adyuvante, que constituyeron el 95,7 % de las pacientes que satisfacían los criterios de inclusión y a las que se les ofreció la participación en el estudio a lo largo del periodo de acumulación de observaciones. La mediana del periodo de seguimiento fue de 18 meses, y su rango de 49 meses. La mediana de seguimiento las pacientes que no recuperan ciclos menstruales a lo largo de todo el seguimiento fue de 12 meses (amplitud de rango 46). Para las pacientes que restablecieron ciclos la mediana de seguimiento fue de 21 meses (amplitud de rango 47).

La distribución cronológica del reclutamiento de las pacientes a lo largo del periodo de observación se muestra en la figura 1.

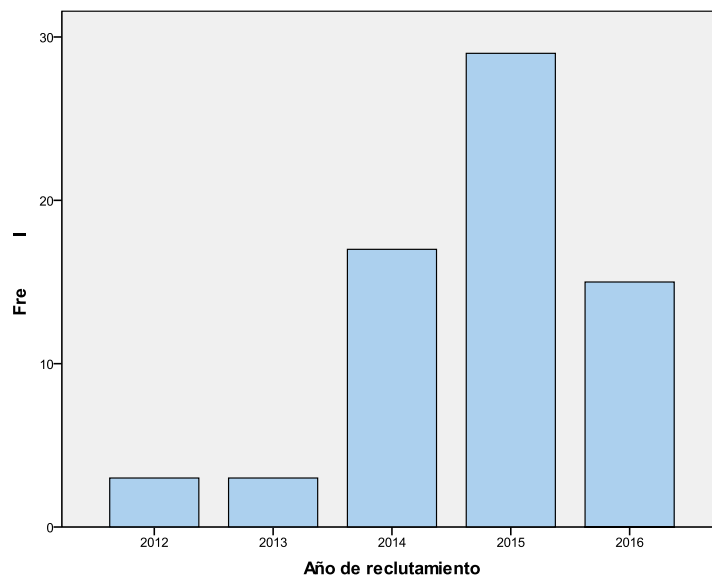


Figura 1: Distribución cronológica del reclutamiento de pacientes durante el periodo de estudio

## Resultados

La distribución de las pacientes según su estado menstrual en cada control se muestra en diagrama de flujo a continuación (figura 2). La frecuencia de pacientes en amenorrea va disminuyendo según avanza el tiempo de seguimiento, inversamente van aumentando las paciente con ciclos menstruales presentes así como las pacientes que se encuentran bajo tratamiento con agonista de la GnRH.



Figura 2: Distribución de las pacientes según estado menstrual a lo largo del seguimiento

## Resultados

### 5.1.1. Características basales y antecedentes de las pacientes

#### 5.1.1.1. Edad

La tabla 1 muestra las características basales de las pacientes. Su edad estuvo comprendida entre 21 y 39 años, con una media de 33,5 años y una DE de 3,5 años. El 50% de las pacientes presentaron edades inferiores a 35 años en el momento del tratamiento, mientras que el 75% de las pacientes de la cohorte presentaron edades comprendidas entre 30 y 40 años (figura 3).

Tabla 1: Características basales de las pacientes

	Media	DE	Mínimo	Máximo	Percentiles		
					25	50	75
Edad (años)	33,5	3,5	21	39	31	34	36
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	24,0	4,9	16,8	41,3	20,5	23,0	26,7
Edad de la menarquia	12,3	1,2	10	16	11	13	13

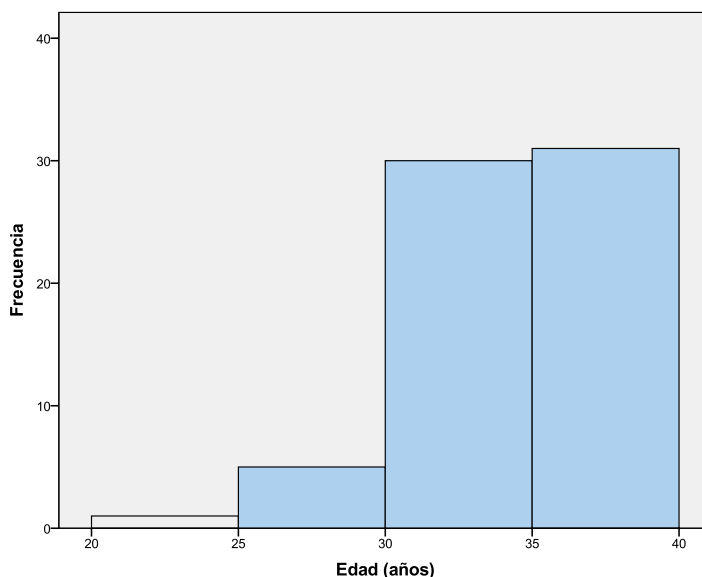


Figura 3: Distribución por edad al inicio del seguimiento

## Resultados

### 5.1.1.2. Índice de masa corporal

El índice de Quetelet varió entre 16 y 41.3 kg/m<sup>2</sup>(tabla 1). El 59,7% de las pacientes se hallaban en el estrato de normalidad ponderal al inicio del seguimiento, mientras que un 26,9% presentaba sobrepeso (figura 4). Las frecuencias de bajo peso para la talla y de obesidad resultaron ligeramente superiores al 6%.

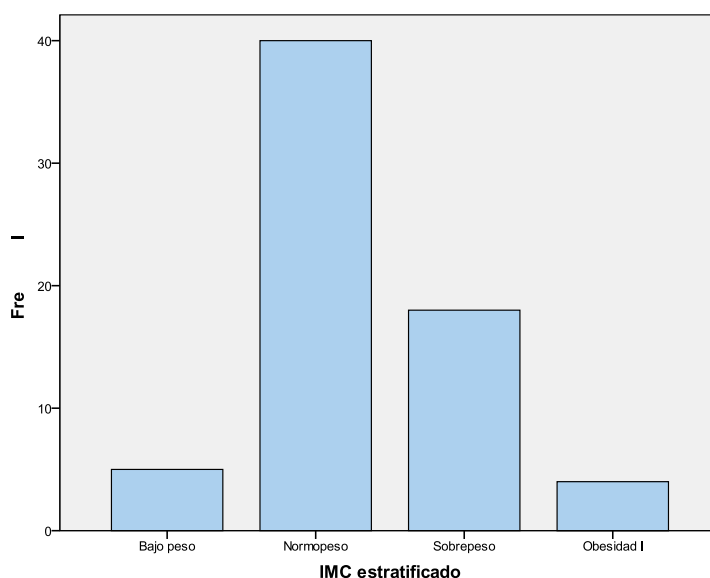


Figura 4: Distribución del IMC por estratos ponderales de la OMS

### 5.1.1.3. Consumo de tabaco

El 11,9% de las pacientes refirió consumo habitual de tabaco. Entre las pacientes fumadoras, el número medio de cigarrillos diarios consumidos fue de 4,5 (DE: 3,3 cigarrillos). El intervalo intercuartil estuvo comprendido entre 1 y 7 cigarrillos/día.

### 5.1.1.4. Edad de la menarquía

La edad media de aparición de la menarquía fue 12,3 años, y su DE 1,2 años. Los valores mínimo y máximo de su distribución fueron 11 y 16 años respectivamente (tabla 1).

## Resultados

### 5.1.1.5. Regularidad de los ciclos menstruales

El 98,5% de las pacientes (66 de 67) refirieron ciclos menstruales regulares, con duración normal del intervalo intermenstrual.

### 5.1.1.6. Paridad

El 74,6% de las pacientes eran nulíparas. Entre las pacientes con partos previos, sólo el 7,5% había tenido más de un hijo (figura 5).

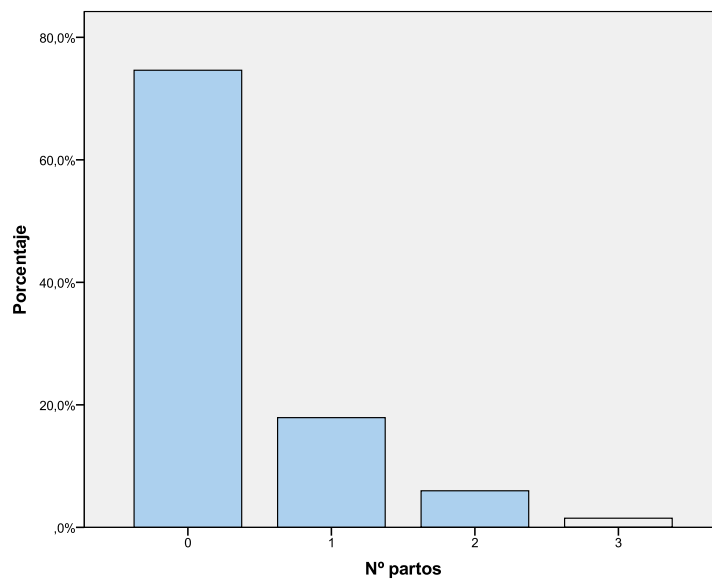


Figura 5: Distribución por paridad

### 5.1.1.7. Antecedentes familiares de cáncer de mama

El 9% de las pacientes presentaron antecedentes de cáncer de mama en familiares de primer grado, y el 19,4% refirieron afectación de algún familiar de segundo grado por este proceso (figura 6).

## Resultados

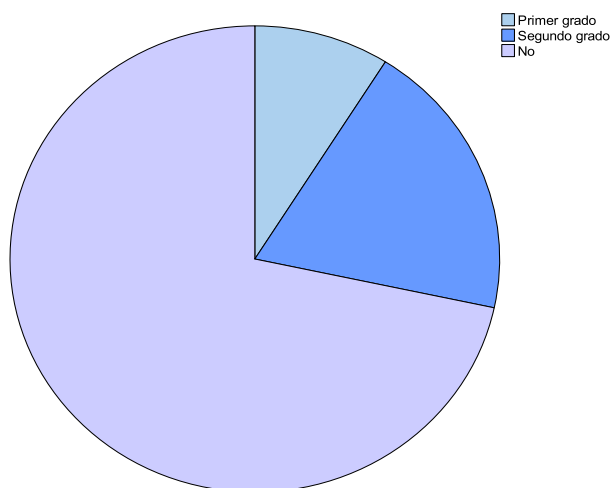


Figura 6: Antecedentes familiares de cáncer de mama

### 5.1.1.8. Condición de portadora de mutaciones del gen BRCA

El 12% de las pacientes de la cohorte resultaron ser portadoras de alguna mutación de riesgo del gen BRCA 1 o BRCA2. En el momento del análisis el resultado de este test genético se encontraba pendiente en un 5 % de los casos.

### 5.1.1.9. Fase del ciclo en el que se inicia la observación

Las determinaciones hormonales y ecográficas de folículos antrales se realizaron en la fase del ciclo en la que se encuentra la paciente el día de la primera consulta. El 55% de las pacientes se encontraban en fase folicular precoz, y en un 40% en otra etapa del ciclo. Una paciente realizó la determinación inicial tras la administración de 3 dosis de antagonistas de la GnRH y en 2 de las pacientes la observación se inició en el postparto inmediato.

### 5.1.2. Relativas a la reserva ovárica basal

#### 5.1.2.1. FSH sérica previa a quimioterapia

En las pacientes que fueron evaluadas en fase folicular precoz, la concentración sérica de FSH promedio fue de 6,6 UI/L (DE: 3,0UI/L). El 50% de las observaciones quedó comprendido entre 5 y 8 UI/L (tabla 2). Las pacientes cuya observación inicial se produjo en fases del ciclo distintas de la folicular precoz presentaron un valor medio de FSH

## Resultados

preQT de 5,0 UI/L con una DE de 2,2 UI/L; su intervalo intercuartil se extendió entre 3 y 6 UI/L.

Tabla 2: Concentraciones séricas preQT de FSH de estradiol y RFA, según fase del ciclo de cuantificación inicial

	n	Media	DE	Mínimo	Máximo	Percentiles		
						25	50	75
FSH inicial (UI/L)								
Fase folicular precoz	31	6,6	3,0	2	16	5	6	8
Otra fase del ciclo	27	5,0	2,2	2	10	3	5	6
Estradiol inicial (pg/mL)								
Fase folicular precoz	33	53	45	10	275	33	49	60
Otra fase del ciclo	26	127	82,7	24	413	65	126	156

No se dispuso de esta determinación en el 8,9% de las pacientes.

### 5.1.2.2. Estradiol sérico previo a quimioterapia

La tabla 2 muestra las distribuciones de estradiol sérico en la evaluación inicial del periodo de seguimiento, estratificada por la fase del ciclo en la que se realizó la determinación hormonal (fase folicular precoz y cualquier otra fase del ciclo).

El valor medio de estradiol fue 53 pg/mL (DE: 45 pg/mL) entre las pacientes con estradiol cuantificado en fase folicular precoz, y de 127 pg/mL (DE: 82,7 pg/mL) en pacientes cuya determinación se realizó en otra fase del ciclo. La concentración sérica de estradiol al inicio del periodo de seguimiento no estuvo disponible en el 8,3% de las pacientes de la cohorte.

Se careció de determinación del estradiol sérico inicial en el 11,9% de las pacientes.

### 5.1.2.3. AMH sérica previa a quimioterapia

Los valores de AMH inicial se distribuyeron en torno a una media de 4,1 ng/mL (DE: 4,2 ng/mL) y una mediana de 3 ng/mL (rango intercuartil: 4,3 ng/mL) (tabla 3).

**Resultados**

Tabla 3: Concentración sérica de AMH y RFA iniciales

	n	Media	DE	Mínimo	Máximo	Percentiles						
						5	10	25	50	75	90	95
AMH (ng/mL)	67	4,1	4,2	0,47	24,8	0,59	0,73	1,4	3,0	5,7	9,2	11,3
RFA (n°)												
Global	67	18,6	3,1	8	49	5	6	11	17	25	34	38
F. folicular precoz	39	18,8	9,6	6	49	6	7	12	17	23	33	42
Otra fase del ciclo	27	17,6	10,3	3	38	3	4	8	16	26	35	36

La figura 7 muestra la distribución de concentraciones iniciales de AMH comprendidas entre 0 y 10 ng/mL estratificada por intervalos de 1 ng/mL de amplitud. En el 50% de las pacientes se detectaron valores de AMH inicial por debajo de 3 ng/mL, mientras que en otro 30 % de las mismas, los niveles séricos de AMH al inicio de la observación estuvieron comprendidos entre 3 y 7,99 ng/mL. El 20% restante presentaron valores de AMH previos a la quimioexposición de entre 8 y 24,8 ng/mL.

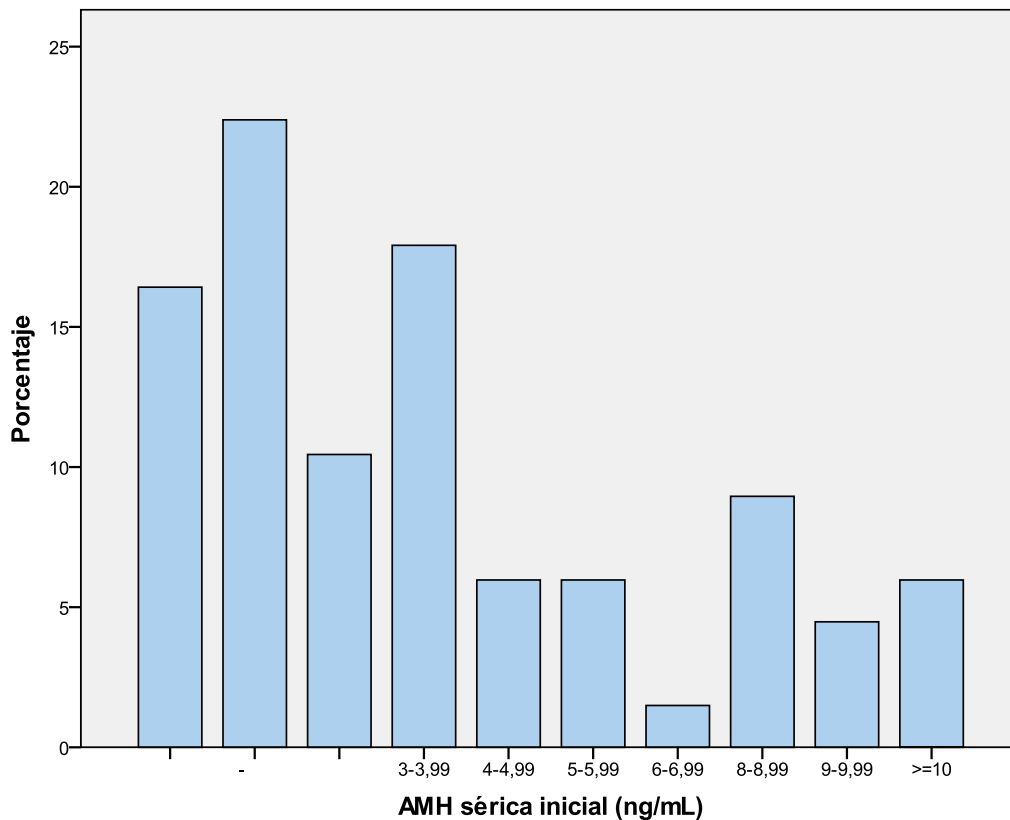


Figura 7: Distribución de la concentración sérica inicial de AMH

## Resultados

La estratificación de la distribución de AMH sérica inicial con arreglo a diferentes puntos de corte se muestra en la tabla 4. El porcentaje de determinaciones preQT inferiores a 1,1 ng/mL fue del 17,9% (IC 95%: 7,9; 27,8), mientras que sólo un 3% de las pacientes presentaban concentraciones séricas de AMH prequimioterapia menores de 0,5 ng/mL (IC 95%: 0,3; 10,3).

Tabla 4: Distribución de AMH sérica prequimioterapia estratificada según diferentes puntos de corte

	n	Frecuencia (%)	IC 95%
< 0,5 ng/mL	2	3	0,3; 10,3
< 0,7 ng/mL	6	9	1,3; 16,5
< 1,1ng/mL	12	17,9	7,9; 27,8

### 5.1.2.4. RFA previo a quimioterapia

El recuento de folículos antrales se distribuyó según un patrón no normal, caracterizado por una mediana de 17 y un rango intercuartil de 14 (tabla 3). El 21% de las pacientes presentaron recuentos foliculares menores de 10, mientras en el 44% se hallaron más de 20 folículos (figura 8). Las distribuciones de RFA obtenidas en cada fase del ciclo (folicular precoz y cualquier otra) resultaron similares entre sí y con respecto a la global (tabla 3).

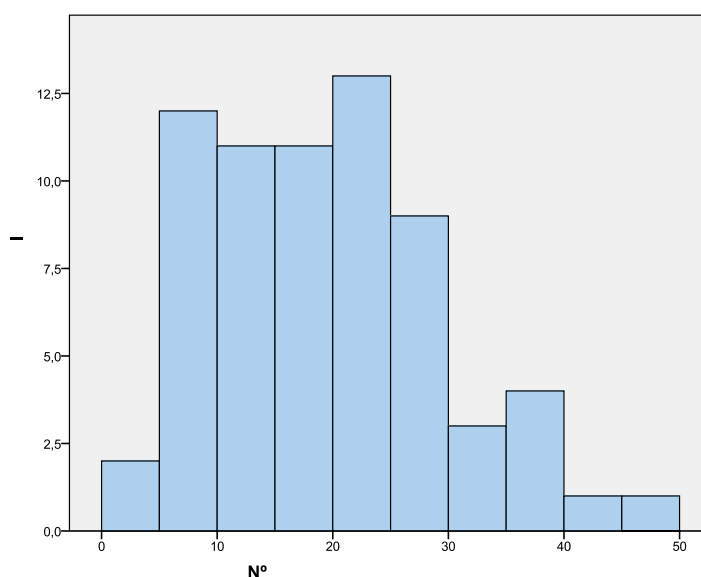


Figura 8: Distribución del RFA inicial

## Resultados

### 5.1.2.5. Variable combinada AMH-RFA previa a quimioterapia

Se ha analizado la asociación conjunta de AMH y RFA preQT por medio de la creación de dos variables combinadas que estratifiquen adecuadamente la muestra en pacientes con alta y baja reserva ovárica basal estimada, en las que cabría esperar, respectivamente, un mejor y peor pronóstico en relación con la reaparición de ciclos menstruales.

Se ha definido la variable combinada RFA-AMH para las pacientes con mejor pronóstico en cuanto a la recuperación de ciclos menstruales como aquellas con un RFA  $\geq$  de 16 o una concentración de AMH  $\geq$  de 4 ng/mL. De las 54 pacientes con datos disponibles, 30 (55,6%) cumplirían los criterios de buen pronóstico definidos previamente.

Para definir a las pacientes con un peor pronóstico en relación con la recuperación de los ciclos menstruales se han establecido los límites de la concentración de AMH por debajo de 1,4 ng/mL o el RFA menor a 11. De las 54 pacientes con datos disponibles, 21 (38,9%) cumplirían los criterios de peor pronóstico definidos previamente.

## Resultados

### 5.1.3. Relativas a la enfermedad tumoral

#### 5.1.3.1. Estadio TNM

La enfermedad tumoral se hallaba en estadio I de la AJCC-UICC en el 30,2 % de las pacientes en el momento inicial del seguimiento. Los casos encuadrados dentro de los estadios II y III constituyeron, respectivamente, el 56,6% y el 13,2%. La figura 9 detalla esta distribución por subestadios pronósticos.

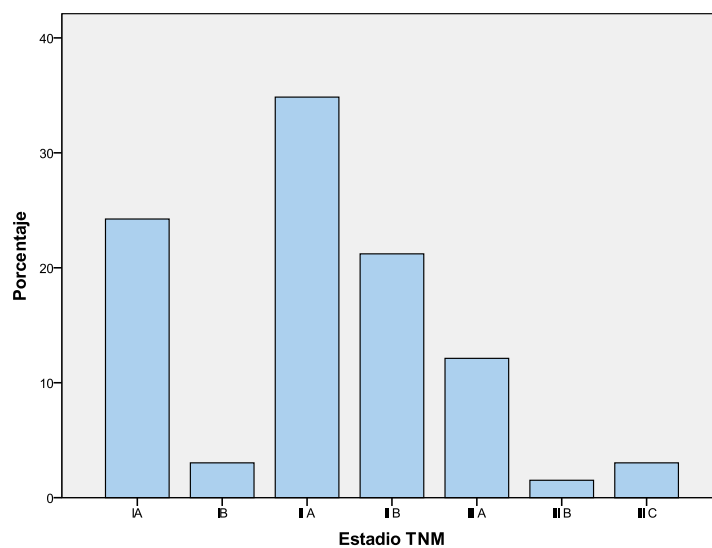


Figura 9: Distribución por subestadios TNM

#### 5.1.3.2. Tipo histológico

El 95,5% de los tumores era de tipo ductal infiltrante genérico (n=64). Los tres tumores restantes se adscribían a los subtipos ductal medular (n=1) y lobulillar (n=2).

#### 5.1.3.3. Grado histológico

El grado de diferenciación tumoral fue moderado (G2) en el 62,7% de los casos (n=42) y bajo en el 32,8% (n=22). En los tres tumores restantes, el grado de diferenciación no pudo ser determinado o la información no fue accesible.

## Resultados

### 5.1.3.4. Expresión de receptores hormonales esteroideos

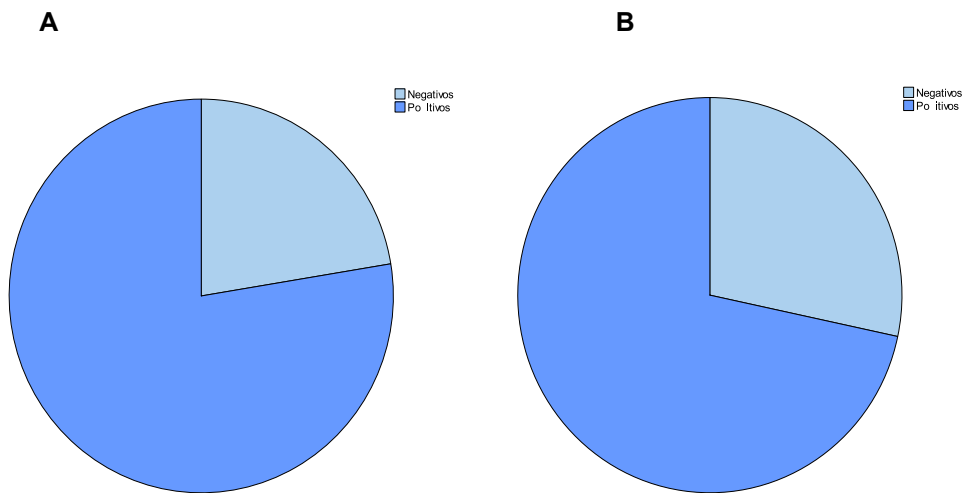


Figura 10: Expresión tumoral de receptores hormonales ( A: estrógenos; B: progesterona)

Las expresiones de receptores a estrógenos y progesterona se resumen en las figura 10 Ay B. El 22,4% de los tumores no expresaron RE y el 28,4% resultaron negativos para RP.

### 5.1.3.5. Expresión de Her2 neu

Se detectó expresión de Her2 neu en el 35,8% de los tumores de la cohorte.

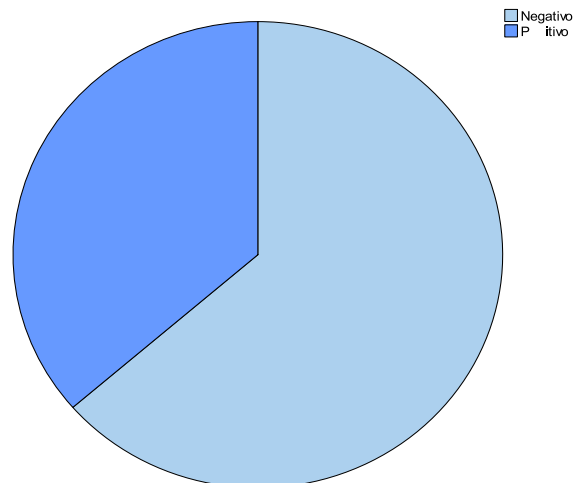


Figura 11: Expresión tumoral de proteína Her2 neu

## Resultados

### 5.1.3.6. Expresión de Ki67

El antígeno tumoral Ki67 fue negativo en el 4,5% de los tumores, y presentó diferentes grados de positividad en el resto de las pacientes (figura 12)

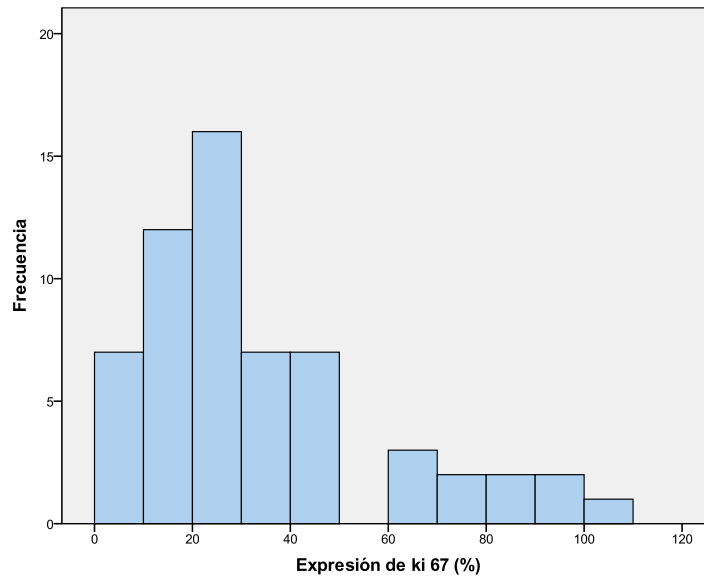


Figura 12: Distribución de intensidad de expresión tumoral de proteína Ki67

### 5.1.3.7. Clasificación pronóstica molecular

Los perfiles moleculares más frecuentes entre los tumores de las pacientes de la cohorte fueron los tipos luminal B (46,3%) y luminal A (28,4%). Los tipos *basal like* y *Her2/neu* representaron el 16,9% y el 6,2% respectivamente. En dos casos, los tumores no resultaron clasificables.

## Resultados

### 5.1.4. Relativas al tratamiento quirúrgico

#### 5.1.4.1. Técnica de exéresis tumoral

La exéresis tumoral se realizó por medio de mastectomía radical modificada en el 38,8% de los casos, y mediante diferentes procedimientos de cirugía conservadora en el 59,7% de las pacientes.

#### 5.1.4.2. Técnica de estadificación ganglionar axilar

El abordaje primario para la estadificación ganglionar fue la linfadenectomía axilar en el 32% de los casos (n=21) y la biopsia selectiva de ganglio centinela en el 67,7 % (n=44). La biopsia selectiva hubo de completarse mediante linfadenectomía en 11 pacientes (16,9%).

#### 5.1.4.3. Resultado de la estadificación ganglionar axilar

Los ganglios centinela biopsiados resultaron negativos para afectación metastásica en el 45,5% de los casos. En los restantes casos, se aislaron entre 1 y 4 ganglios positivos. En las pacientes sometidas a linfadenectomía axilar primaria o tras biopsia de ganglio centinela, se extrajo una media de 13 ganglios (DE: 6,5) (tabla 5). El análisis histológico reveló la negatividad de la totalidad de los ganglios biopsiados en el 28,1% de las intervenciones.

Tabla 5: Resultado de la estadificación ganglionar axilar

	Media	DE	Mínimo	Máximo	Percentiles		
					25	50	75
<b>BSCG</b>							
Ganglios biopsiados	2,1	0,9	1	5	1	2	3
Ganglios positivos	0,4	0,7	0	4	0	0	1
<b>Linfadenectomía (primaria o tras BSGC)</b>							
Ganglios biopsiados	13	6,5	0	31	9	14	17
Ganglios positivos	2,7	3,5	0	15	0	1	4

## Resultados

El estudio histológico de la afectación axilar tras BSCG o linfadenectomía demostró infiltración ganglionar en 33 de los 67 casos (49,3%).

### 5.1.5. Relativas a la quimioterapia

#### 5.1.5.1. Secuencia neoadyuvante/adyuvante

La administración de neoadyuvancia con quimioterapia como primera medida terapéutica se produjo en el 28,3% de las pacientes. El 64,2% de las pacientes recibió la quimioterapia de primera elección como adyuvancia al tratamiento quirúrgico. En el 7,5% de los casos se administró neoadyuvancia seguida de cirugía más quimioterapia adyuvante. En una de las pacientes se carecía de este dato.

#### 5.1.5.2. Régimen de quimioterapia de primera elección y número de ciclos

El régimen de quimioterapia neoadyuvante más aplicado fue una combinación de taxano (docetaxel) más compuesto de platino (carboplatino), que se indicó en el 40,9% de las pacientes tratadas con neoadyuvancia. El resto de los regímenes incluyeron un taxano (docetaxel o placitaxel) (tabla 6).

Tabla 6: Regímenes de quimioterapia neoadyuvante

	n	%	Estándar nº ciclos	Reducción ciclos (n)
Docetaxel+carboplatino	9	40,9	6	1
Docetaxel+ciclofosfamida	4	18,2	6	--
Docetaxel+doxorubicina	1	4,5	6	--
Adriamicina+ciclofosfamida+placitaxel	3	13,6	4	--
Adriamicina+carboplatino+docetaxel	1	4,5	4	--
Fluoracilo-Epirubicina-ciclofosfamida+placitaxel	4	18,2	4	1

Todos los regímenes adyuvantes contenían un taxano tanto combinado con otro agente, como en monoterapia consecutiva a la combinación de dos agentes durante 8-12 ciclos (tabla 7). El régimen de quimioterapia adyuvante más indicado fue la combinación de adriamicina y ciclofosfamida (4 ciclos) seguidas de placitaxel (12 ciclos) (39.1%).

**Resultados**

Tabla 7: Regímenes de quimioterapia adyuvante

	n	%	Estándar nº ciclos	Reducción ciclos (n)
Adriamicina+ciclofosfamida+placitaxel	18	39.1	4-12	--
Docetaxel+ciclofosfamida	11	23,9	6	4
Adriamicina+ciclofosfamida+docetaxel	6	13	4-8	--
Docetaxel+carboplatino	5	7,5	6	--
Adriamicina+ciclofosfamida	4	8,7	4	--
Placitaxel	1	2,2	12	--
Ciclofosfamida+5-fluorouracilo+docetaxel	1	2,2	4	1

**5.1.5.3. Régimen de quimioterapia de segunda elección y número de ciclos**

En el 6,2% de los casos se administró neoadyuvancia seguida de cirugía más quimioterapia adyuvante, por no conseguir la remisión completa de la enfermedad con la primera línea terapéutica. En estos casos, la quimioterapia neoadyuvante administrada se basó en docetaxel y ciclofosfamida en el 4,47 % de las pacientes (n=3) y en docetaxel y carboplatino en el 1,49 % (n=1), durante 6 ciclos. La quimioterapia adyuvante complementaria aplicada en estos casos fue en todas las pacientes una combinación de adriamicina y ciclofosfamida durante 6 ciclos adicionales.

**5.1.6. Relativas a la inmunoterapia****5.1.6.1. Inmunoterapia con Trastuzumab y/o Pertuzumab**

Todas las pacientes con expresión de la proteína *Her2/neu* (35,8%) recibieron tratamiento con Trastuzumab, durante una media de 8,43 ciclos (DE 4,6). En un 12,3 % de las pacientes se administró de forma simultánea inmunoterapia con Pertuzumab.

**5.1.7. Relativas a la hormonoterapia****5.1.7.1. Hormonoterapia con tamoxifeno**

En el 74.6 % de las pacientes (n=50) se realizó hormonoterapia concurrente o posterior a la quimioterapia. El agente más frecuentemente utilizado fue el tamoxifeno (85,7%),

## Resultados

mientras que el exemestano se indicó en el 14,3% de las pacientes de la cohorte, acompañado siempre de la supresión de la función ovárica inducida por un agonista de depósito de la GnRH.

### 5.1.7.2. Hormonoterapia con agonistas de la GnRH

La supresión de la actividad ovárica mediante análogos agonistas de la GnRH se administró al 43,1% de las pacientes. Su administración dio comienzo durante la quimioterapia (n=7), al reinicio de la menstruación (n=16) o al observar aumento de los niveles de estradiol sérico (n=5).

### 5.1.8. Relativas a procedimientos de preservación de la fertilidad

#### 5.1.8.1. Criopreservación de ovocitos

Un 88,1% de las pacientes de la cohorte (n=59) realizaron preservación de la fertilidad mediante vitrificación de ovocitos. La mediana de ovocitos maduros obtenidos para vitrificación fue de 7, y el intervalo intercuartil quedó comprendido entre 4 y 13 ovocitos (tabla 8). En el 8,2% de las pacientes no se obtuvo ningún ovocito maduro, y en el 40% se obtuvieron 6 o menos.

Tabla 8: Ovocitos preservados

	Media	DE	Mínimo	Máximo	Percentiles		
					25	50	75
Ovocitos totales	10,4	6,2	0	27	6	9	14
Ovocitos MII	8,98	6,7	0	27	4	7	13

## Resultados

### 5.1.9. Relativas a la reserva ovárica tras quimioexposición

#### 5.1.9.1. Recuento de folículos antrales postquimioterapia

El número de pacientes con observaciones acerca del RFA en los sucesivos controles estratificado según exposición a agonistas de la GnRH se refleja en la figura 15.

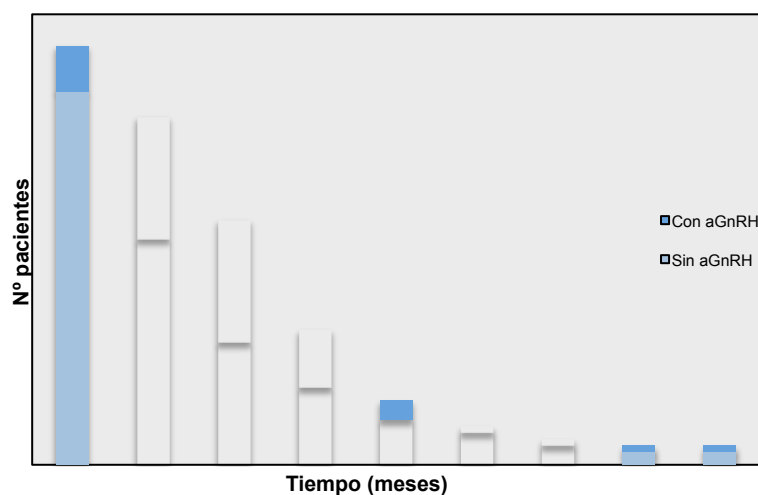


Figura 13: Número de pacientes con RFA por control de seguimiento y según exposición a aGnRH

El RFA obtenido a lo largo de los primeros controles de seguimiento tras quimioterapia se resume en la tabla 9.

La media de folículos antrales detectados en las pacientes con y sin tratamiento con agonista al finalizar la quimioterapia fue de 3,5 (DE: 3,1 folículos) y de 5,4 (DE: 3,8 folículos) respectivamente. A los 18 meses de la finalización de la quimioterapia, estas medias, estimadas sobre un menor número de observaciones, fueron 4,7 (DE: 3,4 folículos) y 5,2 (DE: 4,6 folículos).

## Resultados

Tabla 9: Evolución del RFA a lo largo de los tres primeros controles semestrales tras QT

	n	Media	DE	Mínimo	Máximo	Percentiles		
						25	50	75
<b>Pacientes sin tratamiento con aGnRH</b>								
Primer control tras QT	58	3,5	3,1	0	15	1	3	6
Tras 6 meses postQT	36	4,8	3,1	0	13	3	5	7
Tras 12 meses postQT	21	4,3	3,1	0	11	2	4	7
Tras 18 meses postQT	14	4,7	3,4	1	12	2	3	6
<b>Pacientes en tratamiento con aGnRH</b>								
Primer control tras QT	7	5,4	3,8	2	13	2	5	7
Tras 6 meses postQT	19	3,6	2,0	0	8	3	4	5
Tras 12 meses postQT	19	4,4	2,9	0	12	2	4	7
Tras 18 meses postQT	10	5,2	4,6	0	17	2	4	5

La evolución del RFA tras la exposición a quimioterapia a lo largo de todo el periodo de seguimiento queda reflejada en las figuras 15 y 16. En las pacientes que no recibieron agonista GnRH la media y la mediana del RFA siguen un patrón similar, con leve tendencia al descenso desde el control a los seis meses de la finalización de la quimioterapia hasta el final del periodo de seguimiento (figura 15).

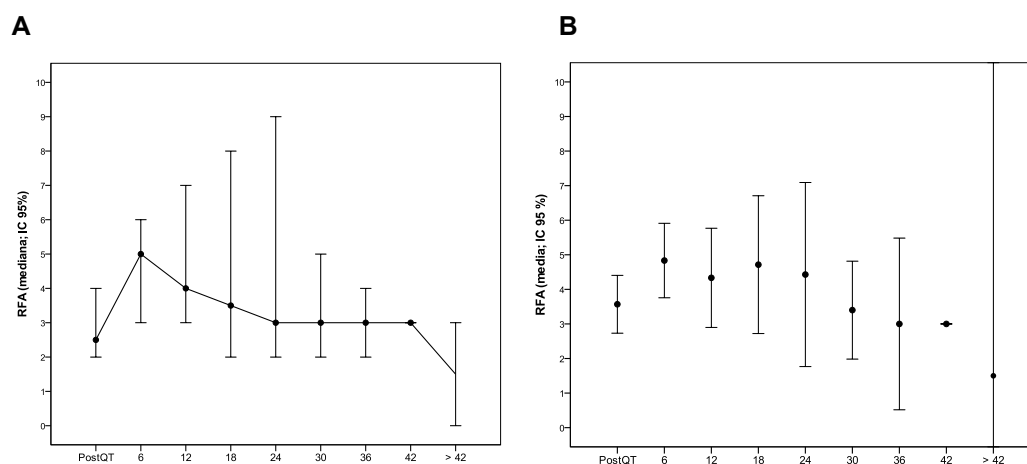


Figura 14: Evolución del RFA tras la exposición a QT a lo largo del periodo de seguimiento en pacientes sin tratamiento con aGnRH (A: media con IC 95%; B: mediana con IC 95%). Las pacientes que recibieron hormonoterapia adyuvante con agonistas GnRH fueron un subgrupo minoritario en cada uno de los controles de seguimiento. Las distribuciones de los RFA obtenidos en cada control se resumen en la figura 15.

## Resultados

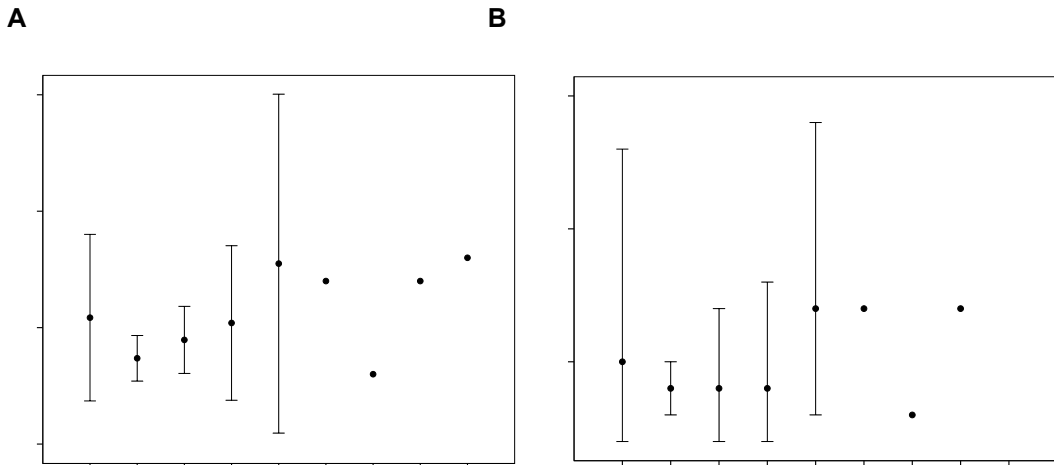


Figura 15: Evolución del RFA tras la exposición a QT a lo largo del periodo de seguimiento en pacientes bajo tratamiento con aGnRH (A: media con IC 95%; B: mediana con IC 95%)

### 5.1.9.2. AMH sérica postquimioterapia

El número de observaciones sobre la concentración sérica de AMH en cada control sucesivo se muestra en la figura 16, estratificada según exposición a GnRH. Las pacientes que se hallaban bajo tratamiento de supresión funcional ovárica con agonista representan casi el 50% de las observaciones en algunos de los intervalos de seguimiento.

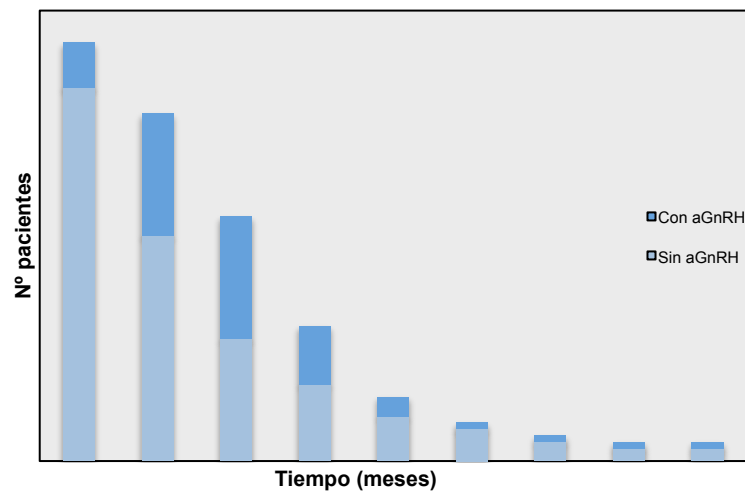


Figura 16: Número de pacientes con AMH sérica por control de seguimiento y según exposición a aGnRH

## Resultados

La distribución de AMH sérica en el control inmediatamente posterior a la finalización de la QT y en el último control de seguimiento se resume en la tabla 10.

Tabla 10: Evolución de la AMH sérica (ng/mL) a lo largo de los tres primeros controles semestrales tras QT

	n	Media	DE	Mínimo	Máximo	Percentiles		
						25	50	75
Pacientes sin tratamiento con aGnRH								
Primer control tras QT	58	0,07	0,19	0	1,14	0,01	0,02	0,04
Tras 6 meses postQT	35	0,18	0,4	0	2,16	,01	0,02	0,15
Tras 12 meses postQT	19	0,18	0,31	0	1,06	,01	0,04	0,18
Tras 18 meses postQT	12	0,21	0,33	0	0,98	,04	0,05	0,23
Pacientes en tratamiento con aGnRH								
Primer control tras QT	7	0,4	0,04	0,01	0,13	0,01	0,03	0,05
Tras 6 meses postQT	19	0,17	0,3	0	1,21	0,01	0,02	0,27
Tras 12 meses postQT	19	0,18	0,39	0,01	1,67	0,02	0,04	0,13
Tras 18 meses postQT	9	0,48	0,75	0,01	2,17	0,02	0,08	0,93

La figura 17 muestra la evolución de las concentraciones de AMH sérica, resumidas por su mediana y su media, a lo largo del periodo de seguimiento y en pacientes sin tratamiento con agonista GnRH. La mediana, menos sensible al efecto de los valores extremos, experimenta escasa variación a lo largo del periodo de observación.

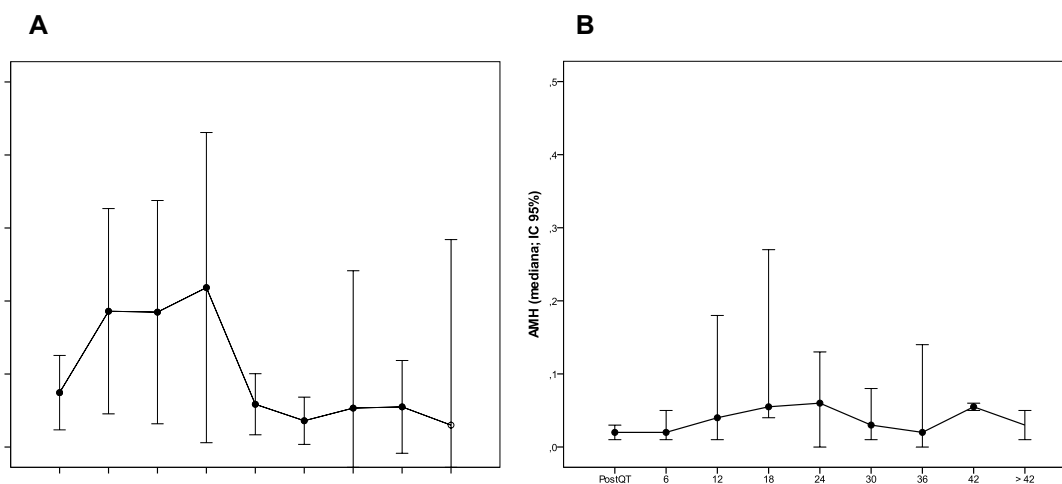


Figura 17: Evolución de la concentración sérica de AMH tras la exposición a QT a lo largo del periodo de seguimiento en pacientes sin tratamiento aGnRH (A: media con IC 95%; B: mediana con IC 95%)

**Resultados**

Las pacientes que recibieron tratamiento con agonista de la GnRH generaron la evolución de concentraciones séricas de AMH que muestra la figura 18 A a partir de la sexta visita de seguimiento, este subgrupo queda reducido a una única paciente, por lo que no se representan los intervalos de confianza de la estimación de media y mediana.

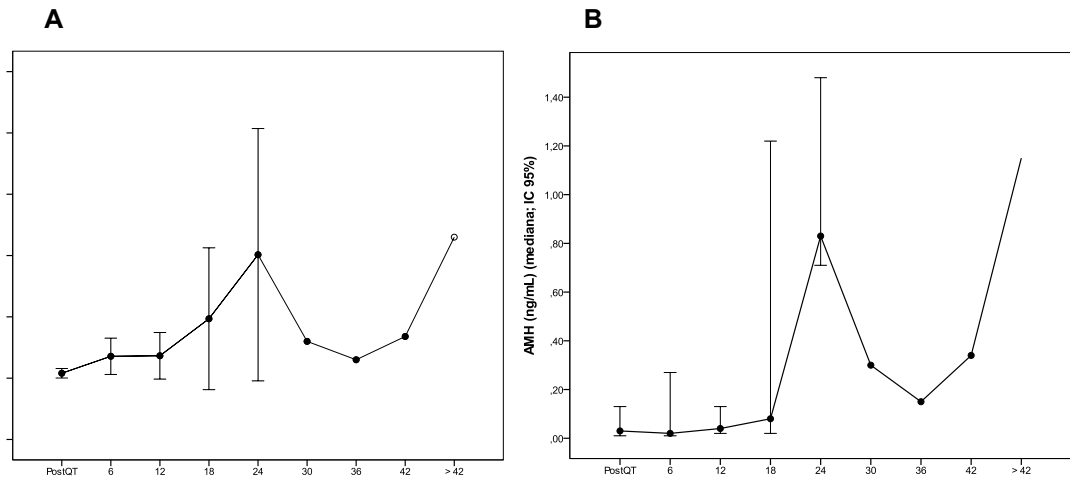


Figura 18: Evolución de la concentración sérica de AMH tras la exposición a QT a lo largo del periodo de seguimiento en pacientes bajo tratamiento aGnRH (A: media con IC 95%; B: mediana con IC 95%)

**5.1.9.3. FSH sérica postquimioterapia**

El número de observaciones semestrales sobre concentración sérica de FSH se representa en la figura 19. La proporción de pacientes bajo tratamiento con agonista en cada uno de los controles resultó lógicamente muy similar a la observada en las distribuciones de controles semestrales de RFA y AMH, y varió entre el 7 y el 52%.

## Resultados

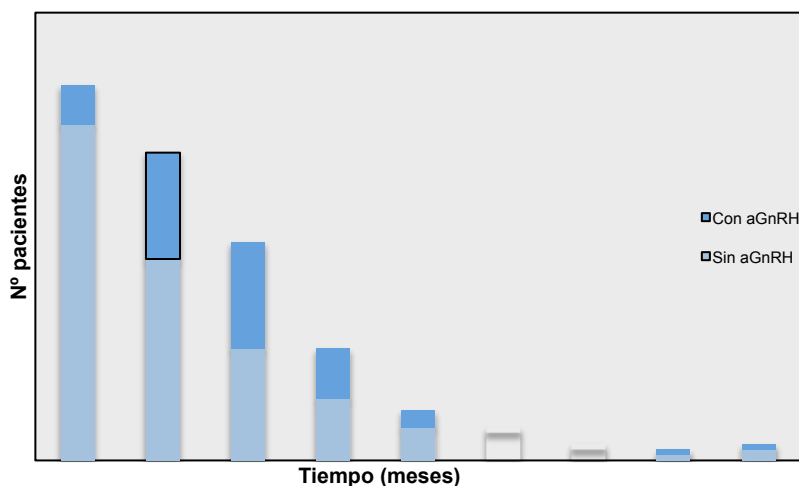


Figura 19: Número de pacientes con FSH sérica por control de seguimiento y según exposición a aGnRH

La mediana de la concentración sérica de FSH en la finalización de la QT fue de 81,5 UI/L (IIC: 46,2; 114 UI/L) en el subgrupo de pacientes no tratadas con agonistas GnRH, y de 5 UI/L (IIC: 3; 8,5 UI/L) en las que recibían este tratamiento. A los 18 meses de la finalización de la quimioterapia, las pacientes sin tratamiento con agonista GnRH presentaron una mediana de la FSH sérica de 23 UI/L (IIC: 7; 46 UI/L), que fue de 5 UI/L (IIC: 3; 8,5 UI/L) en las tratadas con agonista en esta fase del seguimiento (tabla11).

Tabla 11: Evolución de la FSH sérica (UI/L) a lo largo de los tres primeros controles semestrales tras QT

	n	Media	DE	Mínimo	Máximo	Percentiles		
						25	50	75
Pacientes sin tratamiento con aGnRH								
Primer control tras QT	60	82,4	43,5	4	176	46,2	81,5	114
Tras 6 meses postQT	36	46,8	37,5	3	140	14	44	64,7
Tras 12 meses postQT	20	33,3	36,5	3	127	6,5	17	53
Tras 18 meses postQT	11	26,8	18,9	6	61	7	23	46
Pacientes en tratamiento con aGnRH								
Primer control tras QT	5	5,6	2,8	2	9	3	5	8,5
Tras 6 meses postQT	19	3,4	2	0,5	8	2	3	5
Tras 12 meses postQT	19	10	31,4	1	140	2	3	4
Tras 18 meses postQT	12	4,6	2,8	2	11	2	4	6

**Resultados**

La evolución temporal completa a lo largo del seguimiento en pacientes sin y con hormonoterapia adyuvante con agonista GnRH se representa en las figuras 20 y 21. En las pacientes que no recibieron tratamiento con agonista se aprecia un claro descenso de la concentración media y mediana de FSH hasta los 12-24 meses, seguida de una meseta a partir de esta fase. En las pacientes que fueron tratadas con agonista se observa un descenso claro y mantenido durante todo el seguimiento de la concentración media y mediana de FSH.

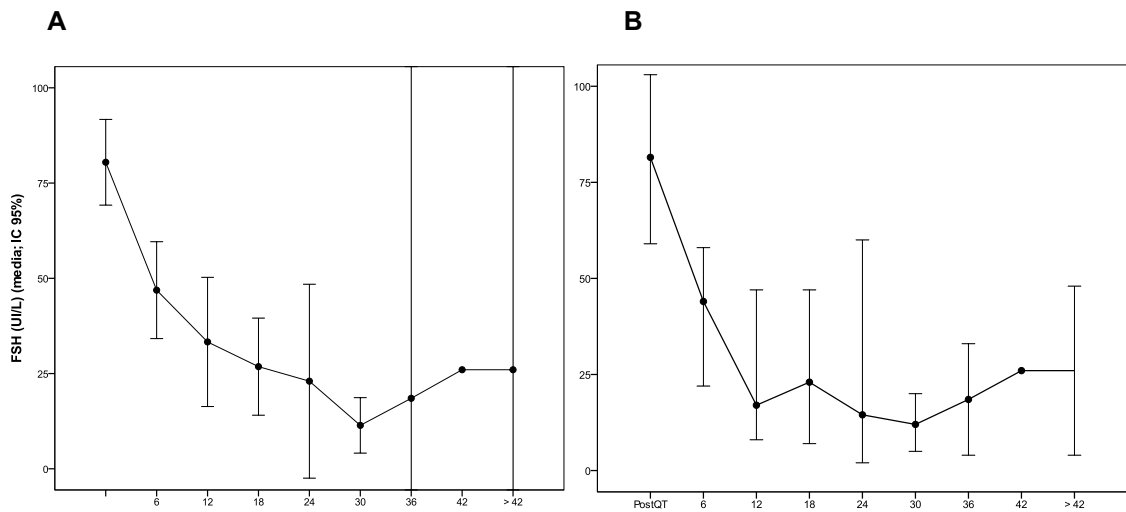


Figura 20: Evolución de la concentración sérica de FSH tras la exposición a QT a lo largo del periodo de seguimiento en pacientes sin tratamiento aGnRH (A: media con IC 95%; B: mediana con IC 95%)

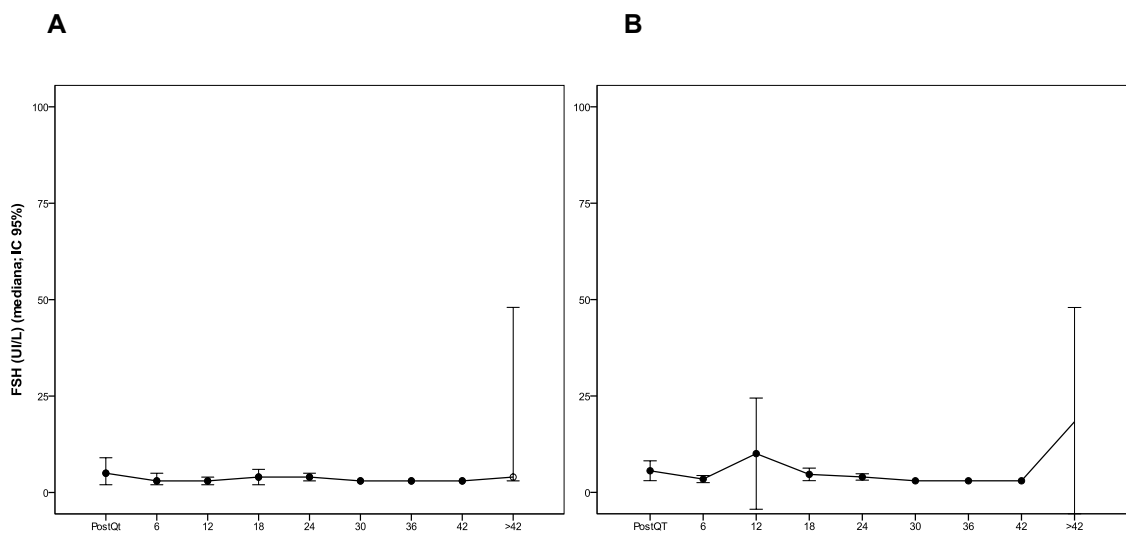


Figura 21: Evolución de la concentración sérica de FSH tras la exposición a QT a lo largo del periodo de seguimiento en pacientes con tratamiento aGnRH (A: media con IC 95%; B: mediana con IC 95%)

## Resultados

### 5.1.10. Relativas al fallo ovárico tras quimioexposición

#### 5.1.10.1. Fallo ovárico clínico (amenorrea quimioinducida)

El fallo ovárico clínico, definido como amenorrea secundaria de al menos cuatro meses de evolución y en el contexto hormonal adecuado, se manifestó en el 80,6 % de las pacientes (n=54). Un 10,4% adicional permanecían en amenorrea al final de la quimioterapia bajo tratamiento con agonista GnRH. Finalmente, un 9% de las pacientes conservaban ciclos menstruales regulares o irregulares (n=6).

La amenorrea asociada a administración de quimioterapia fue irreversible en 17 de las pacientes (31,4%). Por el contrario, la amenorrea fue transitoria –por restablecimiento espontáneo de ciclos menstruales– en el 68,5% de las que no recibían tratamiento a largo plazo con agonista GnRH (37 de 54 pacientes). En dos pacientes, no pudo evaluarse el restablecimiento de la menstruación ya que recibieron la primera dosis mensual de agonista depot ante el incremento progresivo del estradiol sérico.

La frecuencia acumulada de aparición de amenorrea quimioinducida (transitoria y definitiva) a lo largo del periodo de observación se representa en la figura 22. La desaparición de los ciclos menstruales se fue acumulando desde el inicio de la administración de quimioterapia con tendencia de distribución progresiva uniforme a lo largo de siete meses.

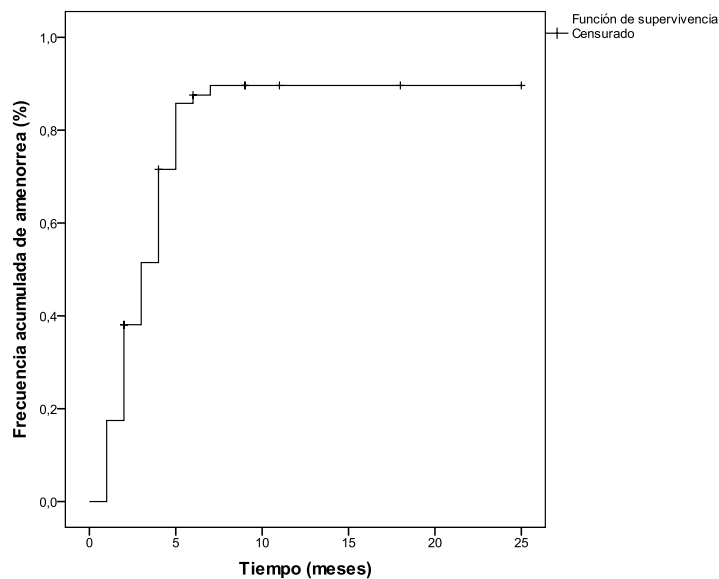


Figura 22: Probabilidad acumulada de aparición de amenorrea en función del tiempo

## Resultados

Según las observaciones referidas a las pacientes de la cohorte en las que este evento resultó valorable, la probabilidad observada de aparición de amenorrea a 3 meses del inicio de la quimioterapia fue del 48% (error estándar: 6%) y a 6 meses del 87% (error estándar: 12%) (Figura 23).

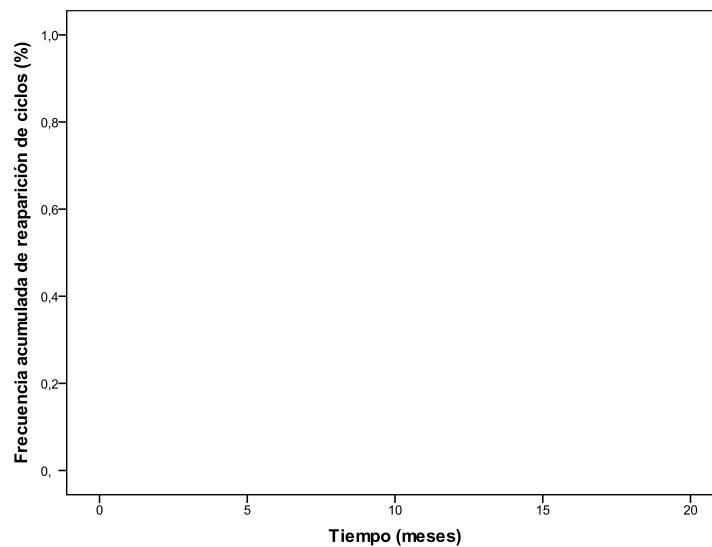


Figura 23: Probabilidad acumulada de restablecimiento de ciclos en pacientes en amenorrea quimioinducida

La distribución temporal de la reaparición de los ciclos menstruales en las pacientes que la experimentaron se representa en la figura 23. La frecuencia acumulada de restablecimiento de menstruaciones cíclicas mostró un patrón de crecimiento uniforme hasta alcanzar a los 12 meses postQT el 94,6% de las pacientes en amenorrea y sin tratamiento con agonistas GnRH.

## Resultados

Considerando la totalidad de las pacientes en amenorrea quimioinducida, la frecuencia de reaparición de ciclos menstruales a los seis meses fue del 40,7% (IC 95%: 22,7; 54,7), y ascendió hasta el 64,8% a los 12 meses (IC 95%: 51,1; 78,4) La frecuencia promedio de reaparición de la menstruación fue por tanto del 6,78% durante los 6 primeros meses, y del 5,4% dentro del primer año (tabla 12). A lo largo de los 12 meses siguientes, el incremento de la frecuencia de restablecimiento de ciclos representó tan solo un 3,7%.

Tabla 12: Frecuencia acumulada de restablecimiento de ciclos menstruales tras finalización de quimioterapia en pacientes con amenorrea quimioinducida según estratos temporales

	N	Probabilidad (%)	IC 95%
Tras 6 meses	22	40,7	22,7; 54,7
Tras 12 meses	35	64,8	51,1; 78,4
Tras 18 meses	36	66,6	53,1; 80,1
Tras 24 meses	37	68,5	52,2; 81,8

**Resultados****5.1.10.2. Fallo ovárico oculto**

La tabla 13 resume la frecuencia de aparición de reducción de la reserva ovárica en pacientes que conservaron los ciclos menstruales durante la quimioterapia, o en las que se restablecieron tras la misma y no fueron tratadas con agonistas de la GnRH, con arreglo a los diferentes criterios de definición relativos al RFA, a la concentración sérica de AMH o a la combinación de ambos parámetros en el momento en el que se produjo la recuperación de la menstruación y al final del seguimiento.

Tabla 13: Frecuencia de fallo ovárico oculto según diferentes criterios de definición basados en RFA postQT

Al reinicio de la menstruación	n	Frecuencia (%)	IC 95 %
Basados en RFA			
RFA < 5	13	32,5	4,2; 40,1
Basados en AMH			
AMH < 0,5 ng/mL	23	54,8	36; 68,6
Basados en combinación de parámetros			
AMH < 0,5 ng/mL o RFA < 5	23	54,7	38,5; 71
Al final del seguimiento			
Basados en RFA			
RFA < 5	25	59,5	23,2; 70,1
Basados en AMH			
AMH < 0,5 ng/mL	22	52,3	33; 65,6
Basados en combinación de parámetros			
AMH < 0,5 ng/mL o RFA < 5	37	88,1	58,5; 91

## Resultados

Al reinicio de la menstruación, las pacientes con RFA menores de 5 representaron el 35,5% de las que conservaron o recuperaron los ciclos menstruales. La distribución de AMH sérica determinó que la frecuencia de pacientes con concentraciones postQT inferiores a 0,5 ng/mL fuera del 54,8%; IC 95%: 36; 68. La definición de reserva ovárica disminuida basada en las dos combinación de criterios relativos a AMH y RFA fueron 54,7% (pacientes con AMH < 0,5 ng/mL o RFA < 5).

La determinación de la frecuencia de fallo ovárico oculto al final del seguimiento, definido como un RFA inferior a 5 representó al 59,5% de las pacientes con ciclos conservados en ese momento, cuando se define como concentraciones de AMH menores de 0,5 ng/mL representa el 52,3% de la muestra, y cuando lo hace por la variable que combina el RFA y la concentración de AMH alcanza el 88,1% (tabla 13)

### 5.1.10.3. Reserva ovárica severamente disminuida

Definimos reserva ovárica severamente disminuida como aquella que ensombrece el pronóstico reproductivo de forma drástica. La frecuencia de las pacientes que experimentan esta disminución extrema de la reserva ovárica será la suma de las pacientes que experimentan amenorrea o fallo ovárico oculto (definido como la combinación de RFA < 5 o AMH < 0,5 ng/mL) al final del seguimiento y no se encuentran bajo tratamiento con agonistas, en nuestra muestra fue del 89,7%.

## Resultados

### 5.2. ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN Y ESTIMACIÓN UNIVARIADA DE MAGNITUD DE EFECTO

#### 5.2.1. Asociación variables explicativas y fallo ovárico clínico

##### 5.2.1.1. Asociación entre RFA previo a QT y fallo ovárico clínico

La exploración de la asociación entre el RFA previo a la QT y reaparición de ciclos sin atender al tiempo hasta la misma se ha realizado estimando el área bajo la curva ROC (figura 24), que no sugirió capacidad discriminativa significativa (AUC: 0,51; IC 95%: 0,34; 0,68;  $p=0,66$ ).

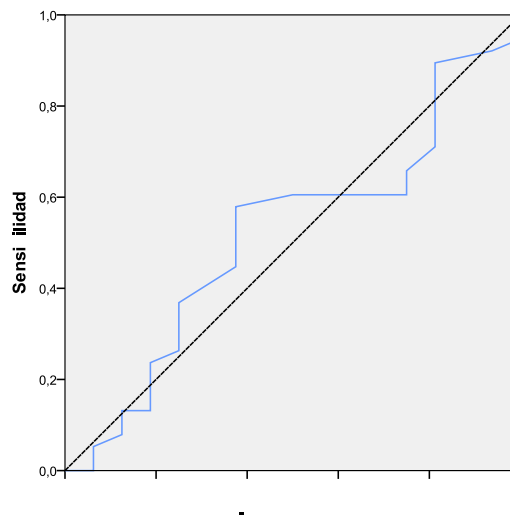


Figura 24: Capacidad discriminativa del RFA en relación con la reaparición de ciclos menstruales (Curva ROC)

La frecuencia de reaparición de ciclos según estratos de RFA preQT a los 6, 12 y 18 meses de la finalización de la QT, así como al final del seguimiento, se muestran en las tablas 14, 15, 16 y 17 respectivamente.

Ninguna de las comparaciones de frecuencias de restablecimiento de ciclos menstruales reveló diferencias significativas en función de los distintos niveles dicotomizados de RFA y a lo largo de los sucesivos periodos de observación.

**Resultados**

Tabla 14: Frecuencia de reaparición de ciclos menstruales a los 6 meses de fin de QT según RFA estratificado

RFA	Nº expuestos	Reaparición de ciclos (%)		p*
		Expuestos	No expuestos	
<6	4	50,0	58,6	1
<8	11	57,1	57,6	1
<10	9	44,4	62,5	0,44
<12	12	58,3	57,1	1
<14	15	60,0	55,5	1
<16	18	66,6	46,6	0,3
<18	18	66,6	46,6	0,3
<20	18	66,6	46,6	0,3
<22	11	58,3	57,1	1

\* Valor p de la prueba Chi<sup>2</sup>

Tabla 15: Frecuencia de reaparición de ciclos menstruales a los 12 meses de fin de QT según RFA estratificado

RFA	Nº expuestos	Reaparición de ciclos (%)		p*
		Expuestos	No expuestos	
<6	2	50,0	37,5	1
<8	2	50,0	37,5	1
<10	6	33,3	41,6	1
<12	6	42,8	36,8	1
<14	6	42,8	36,8	1
<16	6	60,0	12,5	0,06
<18	6	60,0	12,5	0,06
<20	6	60,0	12,5	0,06
<22	7	42,8	36,3	1

\* Valor p de la prueba Chi<sup>2</sup>

**Resultados**

Tabla 16: Frecuencia de reaparición de ciclos menstruales a los 18 meses de fin de QT según RFA estratificado

RFA	Nº expuestos	Reaparición de ciclos (%)		p*
		Expuestos	No expuestos	
<6	2	50,0	30,0	1
<8	5	60,0	20,0	0,25
<10	6	50,0	22,2	1
<12	7	42,8	25,0	0,6
<14	7	42,8	25,0	0,6
<16	10	0,0	50,0	0,1
<18	10	0,0	50,0	0,1
<20	10	0,0	50,0	0,1
<22	7	42,8	25,0	0,6

\* Valor p de la prueba Chi<sup>2</sup>

Tabla 17: Frecuencia de reaparición de ciclos menstruales al final del seguimiento según RFA estratificado

RFA	Nº expuestos	Reaparición de ciclos (%)		p*
		Expuestos	No expuestos	
<6	4	75	68	0,62
<8	9	66	68	0,59
<10	13	77	66	0,35
<12	17	70	67	0,54
<14	22	63	72	0,36
<16	26	57	78	0,08
<18	29	62	76	0,21
<20	29	62	76	0,21
<22	17	70	67	0,54

\* Valor p de la prueba Chi<sup>2</sup>

## Resultados

El RFA preQT no mostró asociación con el tiempo hasta reaparición de la menstruación (HR: 1,02; IC 95%: 0,99; 1,06; p=0,12).

Seguidamente, hemos analizado asociación del RFA estratificado por diferentes puntos de corte con el tiempo hasta reaparición de ciclos menstruales espontáneos. La estratificación del RFA previo a quimioterapia que consideró como punto de corte 12, 16 y 22 folículos determinó diferencias significativas en el tiempo hasta reaparición de la menstruación (tabla 18).

Tabla 18: Asociación y magnitud de efecto del RFA previo a QT sobre la probabilidad de restablecimiento de ciclos en función del tiempo

Nº folículos	Nº expuestos	Reaparición de ciclos (%)		HR	IC 95%	p*
		CR	CB			
<6	4	86	75	1,15	0,3; 3,81	0,8
<8	9	85	75	0,41	0,15; 1,1	0,07
<10	13	84	82	0,7	0,32; 1,53	0,38
<12	17	85	81	0,38	0,16; 0,92	0,03
<14	22	88	80	0,46	0,21; 1,03	0,06
<16	26	84	70	0,45	0,21; 0,98	0,04
<18	29	82	70	0,60	0,9; 1,23	0,16
<20	29	82	71	0,60	0,9; 1,23	0,16
<22	17	85	81	0,38	0,16; 0,92	0,03

\* Valor p de la prueba Log-rank<sup>2</sup>, CR: Condición de riesgo, CB: Condición Basal; HR: Hazard Ratio

## Resultados

### 5.2.1.2. Asociación entre AMH previa a QT y fallo ovárico clínico

La curva ROC de la figura 25 muestra la relación sensibilidad/especificidad de las concentraciones séricas de AMH preQT en relación con la reaparición de ciclos menstruales. El área obtenida no permite rechazar la hipótesis nula de no asociación (AUC: 0,57; IC 95%: 0,39; 0,75;  $p=0,39$ ).

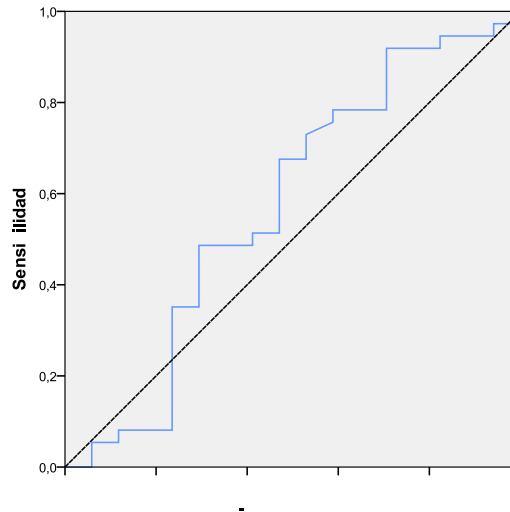


Figura 25: Capacidad discriminativa de la AMH preQT en relación con la reaparición de ciclos menstruales (Curva ROC)

Las tablas 19 a 22 resumen las comparaciones de frecuencias de reaparición de ciclos menstruales en función del nivel de AMH previa a la quimioterapia, estratificada según intervalos de 0,5 ng/mL de amplitud, y a lo largo de los periodos comprendidos entre el final de la QT y los 6, 12 y 16 meses de seguimiento, así como al final de éste.

Sólo se han observado diferencias significativas entre las proporciones de recuperación de ciclos menstruales a los 12 meses del fin de la QT al comparar las pacientes con AMH preQT menor y mayor o igual a 1 ng/mL (80,0% vs 23,0%;  $p=0,04$ ; tabla 20).

**Resultados**

Tabla 19: Frecuencia de reaparición de ciclos menstruales a los 6 meses del fin de QT según niveles de AMH preQT estratificada

AMH(ng/mL)	Nº expuestos	Reaparición de ciclos (%)		p*
		Expuestos	No expuestos	
< 0,5	1	100	50,8	1
< 1	9	55,5	58,3	1
< 1,5	12	66,6	52,3	0,68
< 2	15	66,6	57,0	0,30
< 2,5	17	64,7	50,0	0,49
< 3	17	64,7	50,0	0,49
< 3,5	20	70,0	38,4	0,14
<4	20	68,1	36,3	0,13

\* Valor p de la prueba Chi<sup>2</sup>

Tabla 20: Frecuencia de reaparición de ciclos menstruales a los 12 meses del fin de QT según niveles de AMH preQT estratificada

AMH(ng/mL)	Nº expuestos	Reaparición de ciclos (%)		p*
		Expuestos	No expuestos	
< 0,5	1	100	35,5	0,38
< 1	5	80,0	23,0	0,04
< 1,5	6	66,6	25,0	0,14
< 2	8	50,0	30,0	0,63
< 2,5	8	50,0	30,0	0,63
< 3	8	50,0	30,0	0,63
< 3,5	11	54,5	14,2	0,15
<4	12	50,0	16,6	0,31

\* Valor p de la prueba Chi<sup>2</sup>

**Resultados**

Tabla 21: Frecuencia de reaparición de ciclos menstruales a los 18 meses del fin de QT según niveles de AMH preQT estratificada

AMH(ng/mL)	Nº expuestos	Reaparición de ciclos (%)		p*
		Expuestos	No expuestos	
< 0,5	1	100	28,5	0,33
< 1	6	50,0	22,2	0,32
< 1,5	7	42,8	25,0	0,6
< 2	8	37,5	28,5	1
< 2,5	8	37,5	28,5	1
< 3	8	37,5	28,5	1
< 3,5	10	40,0	20,0	0,6
<4	11	36,3	25	1

\* Valor p de la prueba Chi<sup>2</sup>

Tabla 22: Frecuencia de reaparición de ciclos menstruales al final del periodo de seguimiento según niveles de AMH preQT estratificada

AMH(ng/mL)	Nº expuestos	Reaparición de ciclos (%)		p*
		Expuestos	No expuestos	
< 0,5	2	50	68	0,54
< 1	12	58	71	0,3
< 1,5	18	55	75	0,12
< 2	23	60	73	0,2
< 2,5	25	64	72	0,3
< 3	27	66	70	0,5
< 3,5	31	61	78	0,15
<4	35	65	73	0,38

\* Valor p de la prueba Chi<sup>2</sup>

## Resultados

La concentración sérica de AMH previa a la quimioterapia no mostró asociación con el tiempo hasta reaparición de menstruaciones espontáneas en las pacientes que recuperaron los ciclos según el resultado del modelo de riesgos proporcionales de Cox (HR: 1,04; IC 95%: 0,95; 1,13; p=0,34).

La asociación estadística y de la magnitud de efecto de la AMH sérica previa a la quimioterapia sobre la reinstauración de ciclos menstruales también se ha evaluado estratificando la variable explicativa según distintos puntos de corte, escogidos tras la exploración de la frecuencia del resultado (tabla 23).

Tabla 23: Asociación y magnitud de efecto del nivel de AMH previo a QT sobre la probabilidad de restablecimiento de ciclos en función del tiempo

AMH (ng/mL)	Nº expuestos	Reaparición de ciclos (%)		HR	IC 95%	p*
		CR	CB			
<0,5	2	0,06	86	0,03	0,0; 7,8	0,22
<1	12	78	90	0,63	0,26; 1,53	0,31
<1,5	18	80	94	0,57	0,26; 1,24	0,16
<2	23	88	93	0,66	0,32; 1,32	1,24
<2,5	25	86	88	0,69	0,35; 1,35	0,28
<3	27	86	87	0,81	0,4; 1,56	0,53
<3,5	31	83	93	0,7	0,35; 1,37	0,3
<4	35	82	88	0,48	0,23; 1,03	0,06

\* Valor p de la prueba Log-rank<sup>2</sup>, CR: Condición de riesgo, CB: Condición Basal; HR: Hazard Ratio

Ninguna de las estratificaciones basadas en los valores de AMH considerados determinó asociación significativa con la frecuencia de restablecimiento de ciclos en función del tiempo.

## Resultados

### 5.2.1.3. Asociación entre variables combinadas AMH-RFA previos a QT y fallo ovárico clínico

La asociación conjunta de AMH y RFA preQT se ha analizado por medio de la creación de dos variables combinadas que estratifican la muestra en pacientes con alta y baja reserva ovárica basal estimada, en las que cabría esperar, respectivamente, un mejor y peor pronóstico en relación con la reaparición de ciclos menstruales.

Las pacientes con menor riesgo hipotético de fallo ovárico clínico se han definido como aquellas que previamente a la administración de quimioterapia tenían niveles séricos de AMH por encima de 4 ng/mL o un RFA superior a 16 folículos antrales. Por el contrario, como pacientes con mayor riesgo hipotético de fallo ovárico clínico se han considerado las que presentan niveles séricos de AMH por debajo de 1,4 ng/mL o un RFA inferior a 11 folículos antrales con carácter previo a la quimioexposición.

La asociación entre el tiempo hasta reaparición de ciclos menstruales y la categoría respecto de esta variable pronóstica ('reserva ovárica basal elevada') se ha analizado por medio de la función de supervivencia actuarial de Kaplan-Meier (figura 26), cuya representación gráfica permite apreciar la diferencia, estadísticamente significativa ( $p=0,028$ ) en la distribución temporal del momento de reaparición de los ciclos entre pacientes con mayor y menor reserva ovárica, según la definición establecida por medio de esta variable combinada. Este efecto presentó un HR de 0,45 (IC 95%: 0,21; 0,98;  $p=0,04$ ), que indica que la probabilidad estimada de restablecimiento de la menstruación a lo largo del tiempo es menor de la mitad en las pacientes con una nivel sérico de AMH < 4 ng/mL o un RFA previo a quimioexposición menor de 16.

## Resultados

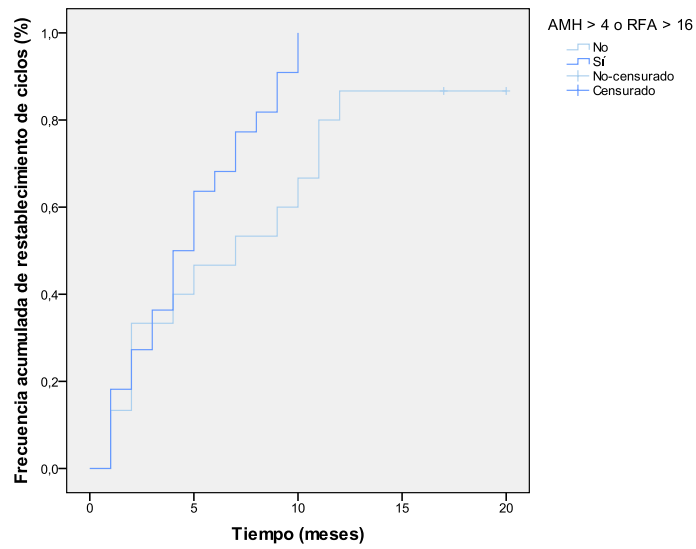


Figura 26: Distribución temporal de reaparición de ciclos menstruales en función de la reserva ovárica estimada (AMH  $\geq 4$  ng/mL o RFA  $\geq 16$  versus AMH  $< 4$  ng/mL y RFA  $< 16$ )

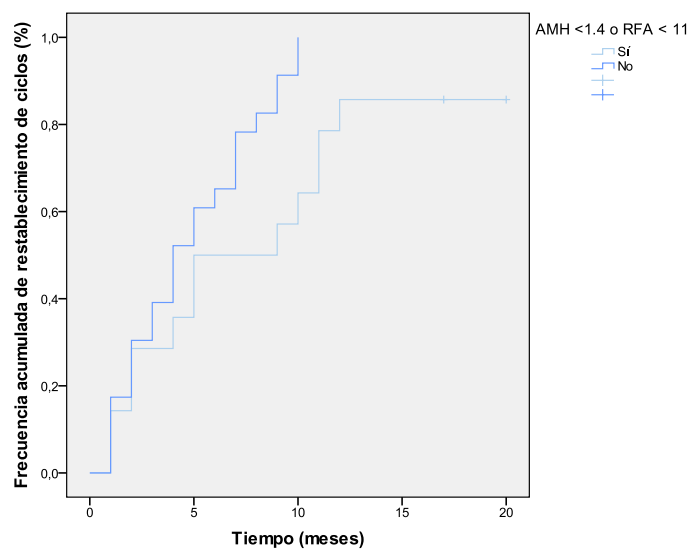


Figura 27: Distribución temporal de reaparición de ciclos menstruales en función de la reserva ovárica estimada (AMH  $< 1,4$  ng/mL o RFA  $< 11$  versus AMH  $\geq 1,4$  ng/mL y RFA  $\geq 11$ )

## Resultados

Las pacientes con mayor riesgo *a priori* de fallo ovárico clínico, por presentar 'reserva ovárica basal reducida', se han definido como aquellas que previamente a la administración de quimioterapia tenían niveles séricos de AMH por debajo de 1,4 ng/mL o un RFA inferior a 11 folículos antrales. La distribución temporal de la reaparición de ciclos menstruales mostró diferencias significativas al comparar las pacientes de la muestra pertenecientes a uno y otro estrato ( $p=0,012$ ) (figura 27). Según la magnitud de efecto estimada, la frecuencia acumulada de reaparición de la menstruación en las pacientes con niveles séricos de AMH menores de 1,4 o RFA menor de 11 resulta menor de la mitad de la que esperable en pacientes con estimadores superiores a dichos umbrales (HR: 0,42; IC 95% 0,19;0,93;  $p=0,03$ ).

Escogiendo estos dos umbrales de exposición en la variable combinada 'AMH <1.4 ng/mL o RFA < 11 ovocitos', las distribuciones resultantes de las covariables y de las variables de resultado se resumen en la tabla 24, al igual que el contraste estadístico inicial de las mismas. El análisis bivariado completo de asociación entre covariables y variables explicativas y de resultado se expone en el apartado correspondiente.

Considerando la estatificación por la variable 'AMH < 1,4 ng/mL o RFA < 11 ovocitos', se han apreciado diferencias significativas en la edad, que resultó significativamente más baja en las pacientes con mayor nivel de AMH-RFA (medianas: 34 vs 35 años;  $p=0,025$ ). El resto de las covariables no mostró diferencias significativas al comparar a las pacientes con mayor y menor reserva ovárica, catalogada en función del umbral que define esta variable combinada (tabla 24).

Considerando como umbral de exposición la segunda variable combinada contemplada en nuestro estudio (AMH  $\geq 4$  ng/mL o RFA  $\geq 16$  ovocitos), se han apreciado diferencias significativas en las distribuciones de la edad, del IMC y de la FSH sérica preQT, que resultaron más elevadas en el grupo de pacientes con menor reserva ovárica estimada (tabla 25). Con respecto a las covariables relativas al tratamiento, la frecuencia de exposición a QT basada en ciclofosfamida resultó superior en pacientes con mayor reserva ovárica (58,3% vs 83,3%;  $p=0,04$ ) (tabla 25).

**Resultados**

Tabla 24: Distribución de covariables estratificadas por exposición (AMH &lt; 1,4 ng/mL o RFA &lt; 11 ovocitos)

Covariable	AMH < 1,4 ng/mL o RFA < 11 ovocitos (n=21)	AMH ≥ 1,4 ng/mL y RFA ≥ 11 ovocitos (n=33)	p
	Mediana (RIC); %	Mediana (RIC); %	
Edad (años)	35 (33;38)	34 (31;35,5)	0,025
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	24 (20,6;29,8)	22,9 (20,4;26,5)	0,26
Edad de la menarquía (años)	12 (10,5;13)	11 (11;13)	0,17
Consumo de tabaco	4 (19)	3(9,1)	0,25
Ciclos menstruales regulares	21 (100)	33 (100)	1
FSH basal (UI/L)	6,5 (3,5;9,5)	6 (4,7;7,2)	0,65
Estradiol basal	53 (36;76)	45 (32,2; 56,7)	0,24
Estadio TNM			
I	5 (23,8)	11 (34,4)	0,3
II	12 (57,1)	18 (56,3)	0,58
III	4 (19)	3 (9,4)	0,27
Grado histológico tumoral G2	10 (50)	23 (74)	0,07
Receptores estrogénicos	13 (61,9)	27 (81,8)	0,09
Receptores de progesterona	13 (61,9)	24 (72,7)	0,29
Expresión de Her2/neu	7 (33)	11 (34)	0,58
Expresión de Ki67	19 (85,9)	28 (100)	0,15
Clasificación pronóstica molecular			
Luminal A	3 (14)	12 (38,7)	0,05
Luminal B	10 (47,6)	13 (41,9)	0,45
Basal-like	5 (23,8)	6 (19,4)	0,48
Her2/neu	3 (14,3)	0	0,06
Cirugía conservadora	11 (52,4)	23 (71,9)	0,12
Estadificación ganglionar			
Biopsia selectiva de GC + Afectación ganglionar axilar	3 (28) 8 (72,8)	8 (30,8) 8 (57,1)	0,51 0,35
QT neoadyuvante	4 (19)	10 (32,3)	0,14
QT adyuvante primaria	16 (76,2)	18 (58,1)	0,23
QT adyuvante secundaria	1 (4,8)	3 (9,7)	0,46
QT basada en ciclofosfamida	14 (66,7)	25 (75,8)	0,33
QT basada en carboplatino	5 (23,8)	8 (24,2)	0,61
QT secuencial con taxanos	11 (52,4)	17 (51,5)	0,58
Hormonoterapia con tamoxifeno	9 (42,9)	10 (30,3)	0,25

RIC: Rango intercuartil

\*Valor p de la prueba U de Mann-Whitney

\*\*Valor p de la prueba Chi<sup>2</sup>

**Resultados**Tabla 25: Distribución de covariables estratificadas por exposición (AMH  $\geq 4$  ng/mL o RFA  $\geq 16$  ovocitos)

Covariable	AMH <4 ng/mL o RFA < 16 ovocitos (n=24)	AMH $\geq 4$ ng/mL y RFA $\geq 16$ ovocitos (n=30)	p
	Mediana (RIC); %	Mediana (RIC); %	
Edad (años)	35 (33;38)	33 (31;35)	0,024
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	24,7 (21,1;30,2)	22,2 (20,4;25)	0,034
Edad de la menarquía (años)	12 (11;13)	13 (12;13)	0,12
Consumo de tabaco	4 (19,0)	3 (9,1)	0,25
Ciclos menstruales regulares	100	100	1
FSH basal (UI/L)	9 (6;10)	6 (4;6)	0,002
Estradiol basal	53,6 (44;68)	41(27;56)	0,61
Estadio TNM			
I	5 (20,8)	11 (37,9)	0,14
II	14 (58,3)	16 (55,2)	0,52
III	5 (20,8)	2 (6,9)	0,22
Grado histológico tumoral G2	13 (54,2)	20 (74,1))	0,11
Receptores estrogénicos	16 (66,7)	24 (80)	0,21
Receptores de progesterona	16 (66,7)	21 (70)	0,51
Expresión de Her2/neu	8 (34,8)	10 (33,3)	0,57
Expresión de Ki67	18 (90)	27 (100)	0,17
Clasificación Oncotype			
Luminal A	4 (17,4)	11 (37,9)	0,09
Luminal B	11 (47,8)	12 (41,4)	0,42
Basal-like	5 (21,7)	6 (20,7)	0,59
Her2/neu	3 (13)	0 (0)	0,08
Cirugía conservadora	12 (52,2)	22 (73,3)	0,09
Estadificación ganglionar			
Biopsia selectiva de GC	5 (35,7)	6 (25)	0,36
Afectación ganglionar axilar	9 (69,5)	7 (58,3)	0,44
QT neoadyuvante	5 (21,7)	9 (31)	0,33
QT adyuvante primaria	17 (73,9)	17 (58,6)	0,19
QT adyuvante secundaria	1 (4,3)	3 (10,3)	0,39
QT basada en ciclofosfamida	14 (58,3)	25 (83,3)	0,04
QT basada en carboplatino	7 (29,2)	6 (20)	0,32
QT secuencial con taxanos	12 (50)	6 (53)	0,51
Hormonoterapia con tamoxifeno	14(58,3)	21 (70)	0,27

RIC: Rango intercuartil

\*Valor p de la prueba U de Mann-Whitney

\*\*Valor p de la prueba  $\chi^2$

## Resultados

### 5.2.2. Asociación entre variables explicativas y fallo ovárico oculto

#### 5.2.2.1. Asociación entre RFA preQT y fallo ovárico oculto

La relación del RFA previo a quimioterapia con la aparición de fallo ovárico oculto definido por el número de folículos antrales visibles en el periodo postQT, por medio de niveles de AMH en esta misma fase, o a través de variables combinadas de resultado, se ha analizado tanto en el momento de restablecimiento de los ciclos menstruales como al final del seguimiento

En el momento de la reaparición de los ciclos menstruales, el RFA preQT mostró capacidad discriminativa para la identificación de las pacientes con fallo ovárico oculto definido como RFA menor de 5 o como su combinación con AMH menor de 0,5 ng/mL (tabla 26). El RFA preQT también fue capaz de discriminar con capacidad significativa la aparición de fallo ovárico oculto al final del seguimiento cuando este resultado se definió como AMH sérica menor de 0,5 ng/mL, así como cuando la definición resultó de la combinación de esta con un RFA menor de 5.

Tabla 26: Asociación y capacidad discriminativa del RFA previo a QT respecto a la aparición de fallo ovárico oculto definido por distintos criterios

Criterio de definición	Restablecimiento ciclos			Fin de seguimiento		
	ÁUC	IC 95%	p*	ÁUC	IC 95%	p*
RFA < 5	0,75	0,53; 0,96	0,029	0,57	0,4; 0,74	0,4
AMH < 0,5 ng/mL	0,66	0,50; 0,83	0,06	0,83	0,71; 0,95	0,006
RFA < 5 o AMH < 0,5 ng/mL	0,68	0,52; 0,84	0,03	0,80	0,66; 0,93	0,03

\* Valor p del contraste no paramétrico

**Resultados**

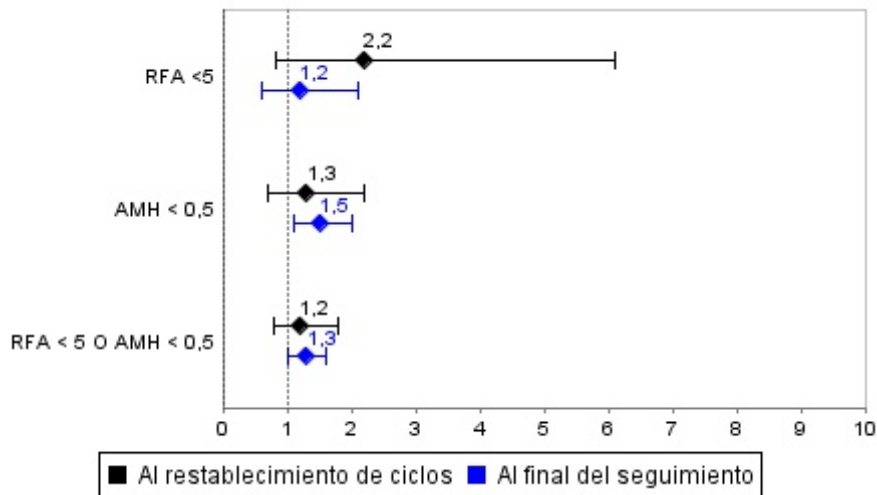


Figura 28: Riesgo relativo de fallo ovárico oculto, definido según distintos criterios, en el momento de restablecimiento de ciclos y al final del seguimiento en función del RFA preQT

La probabilidad de fallo ovárico oculto en el momento de restablecimiento de los ciclos y no difirió al comparar las pacientes en función de su RFA preQT estratificado la mediana de la distribución (17 folículos). En cambio el RR de fallo ovárico oculto en función del RFA preQT superior o inferior a 17 folículos al final del seguimiento resultó significativo para la concentración de AMH sérica < 0,5 ng/mL y para su combinación con el RFA <5 folículos (RR 1,5 (IC 95% 1,1;2) p=0,009 y RR 1,3 (IC 95% 1,03;1,6) p=0,04 respectivamente) (figura 28).

**Resultados**

**5.2.2.2. Asociación entre AMH preQT y fallo ovárico oculto**

La asociación de la AMH sérica previa a QT con la aparición de fallo ovárico oculto se ha analizado a través de la estimación de las áreas bajo la curva ROC para cada definición del evento fallo ovárico oculto (tabla 27). La concentración de AMH preQT aparece en asociación con la presentación de fallo ovárico oculto definido como RFA postQT menor de 5 y como AMH postQT menor de 0,5 ng/mL. Sin embargo, el AUC que expresa la capacidad discriminativa de la variable combinada 'RFA < 5 o AMH < 0,5 ng/mL" no resultó sugestiva de asociación significativa.

Tabla 27: Asociación y capacidad discriminativa del AMH previo a QT respecto a la aparición de fallo ovárico oculto definido por distintos criterios

	Restablecimiento ciclos			Fin de seguimiento		
	ÁUC	IC 95%	p*	ÁUC	IC 95%	p*
RFA < 5	0,79	0,56; 1	0,01	0,56	0,38; 0,73	0,50
AMH < 0,5 ng/mL	0,59	0,42; 0,76	0,3	0,77	0,6; 0,95	0,02
RFA < 5 o AMH < 0,5 ng/mL	0,63	0,46; 0,79	0,13	0,68	0,48; 0,89	0,17

\* Valor p del contraste no paramétrico

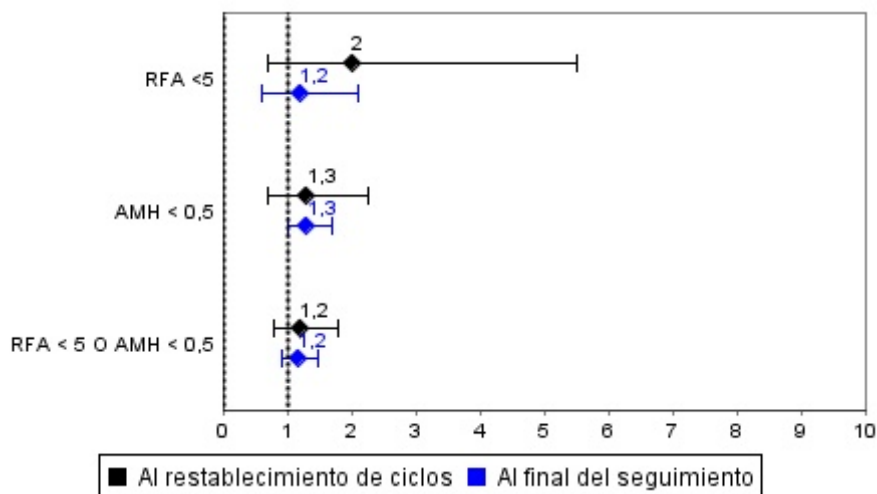


Figura 29: Riesgo relativo de fallo ovárico oculto, definido según distintos criterios, en el momento de restablecimiento de ciclos y al final del seguimiento en función de la concentración de AMH preQT

La probabilidad de fallo ovárico oculto definido como la concentración de AMH al final del seguimiento menor de 0,5 ng/mL resultó significativamente asociada a la concentración de AMH preQT menor de 3 ng/mL (RR 1,3 (IC95% 1,03;1,7) p=0,04). Para el resto de

## Resultados

definiciones de fallo ovárico oculto en el momento de restablecimiento de los ciclos y al final del seguimiento no difirió al comparar las pacientes en función de la concentración de AMH preQT estratificada por la mediana de la distribución (3 ng/mL) (figura 29).

### 5.2.2.3. Asociación entre variables combinadas AMH-RFA y fallo ovárico oculto

En la tabla 28 y 29 se presentan los resultados de los estudios de asociación entre las variables combinadas de exposición y las frecuencias de aparición de fallo ovárico oculto en el momento del restablecimiento de los ciclos menstruales y al final del seguimiento. La frecuencia de fallo ovárico oculto definido por niveles de AMH sérica postQT < 0,5 ng/mL en el momento del reinicio de la menstruación resultó superior en pacientes expuestas según la definición de la variable 'AMH < 1,4 ng/mL o RFA < 11 ovocitos' (tabla 28). En cambio, no resultaron significativamente diferentes las frecuencias de fallo ovárico oculto definidas por RFA post QT <5 o su combinación con una AMH postQT < 0,5 ng/mL tanto en el momento del reinicio de los ciclos como al final del seguimiento en pacientes expuestas (Tabla 28).

Tabla 28: Distribución de variables de resultado estratificadas por exposición  
(AMH < 1,4 ng/mL o RFA < 11 ovocitos)

	AMH < 1,4 ng/mL o RFA < 11 ovocitos (n=21)	AMH ≥ 1,4 ng/mL y RFA ≥ 11 ovocitos (n=33)	p
	Mediana (RIC); %	Mediana (RIC); %	
AMH postQT en pacientes con reinicio de ciclos menstruales			
Al reinicio de ciclos	0,15	0,11	0,05
Al final del seguimiento	0,04	0,13	0,17
RFA postQT en pacientes con reinicio de ciclos menstruales			
Al reinicio de ciclos	5,0	5,0	0,57
Al final del seguimiento	4,5	7	0,15
Fallo ovárico oculto al reinicio de ciclos menstruales			
RFA <5	5 (31,3)	2 (7,7)	0,06
AMH < 0,5 ng/mL	11 (68,8)	12 (46,2)	0,13
AMH < 0,5 ng/mL o RFA < 5	11 (68,8)	12 (46,2)	0,13
Fallo ovárico oculto al final del seguimiento			
RFA <5	9 (56,3)	13 (50)	0,47
AMH < 0,5 ng/mL	16 (100)	19 (73,3)	0,02
AMH < 0,5 ng/mL o RFA < 5	16 (100)	21 (80)	0,07

RIC: Rango intercuartil

\*Valor p de la prueba U de Mann-Whitney

\*\*Valor p de la prueba Chi<sup>2</sup>

**Resultados**

Estratificando por la variable AMH  $\geq 4$  ng/mL o RFA  $\geq 16$ , resultaron más frecuentes recuentos foliculares postQT menores de 5 (33,3% vs 4,2%;  $p=0,01$ ), niveles séricos de AMH menores de 0,5 ng/mL (72,2% vs 41,7%;  $p=0,04$ ), así como la aparición de uno y otro fenómeno entre las pacientes con menor reserva ovárica estimada (tabla 29). Analizando las frecuencias de fallo ovárico oculto al final del seguimiento, se observó que las pacientes con menor reserva ovárica (AMH  $< 4$  ng/mL o RFA  $< 16$  ovocitos) también presentaron más frecuentemente niveles de AMH postQT inferiores a 0,5 ng/mL, de forma aislada o en combinación con RFA postQT menor de 5 (tabla 29).

Tabla 29: Distribución de variables de resultado estratificadas por exposición

(AMH  $\geq 4$  ng/mL o RFA  $\geq 16$  ovocitos)

Covariable	AMH $< 4$ ng/mL o RFA $< 16$ ovocitos (n=21)	AMH $\geq 4$ ng/mL y RFA $\geq 16$ ovocitos (n=33)	p
	Mediana (RIC); %	Mediana (RIC); %	
Fallo ovárico clínico	15 (62,5)	22 (73,3)	0,28
AMH postQT en pacientes con reinicio de ciclos menstruales			
Al reinicio de ciclos	0,11	0,15	0,36
Al final del seguimiento	0,05	0,15	0,08
RFA postQT en pacientes con reinicio de ciclos menstruales			
Al reinicio de ciclos	5	6	0,06
Al final del seguimiento	5	8	0,04
Fallo ovárico oculto al reinicio de ciclos menstruales			
RFA $< 5$	6 (33,3)	1 (4,2)	0,018
AMH $< 0,5$ ng/mL	13 (72,2)	10 (41,7)	0,04
AMH $< 0,5$ ng/mL o RFA $< 5$	13 (72,2)	10 (41,7)	0,04
Fallo ovárico oculto al final del seguimiento			
RFA $< 5$	12 (50)	10 (55,6)	0,48
AMH $< 0,5$ ng /mL	18 (100)	17 (70,8)	0,013
AMH $< 0,5$ ng/mL o RFA $< 5$	18 (100)	19 (79,2)	0,05

RIC: Rango intercuartil

\*Valor p de la prueba U de Mann-Whitney

\*\*Valor p de la prueba  $\chi^2$

## Resultados

En relación con el riesgo de desarrollar fallo ovárico oculto, definido con arreglo a diferentes puntos de corte de estimadores de reserva ovárica, fue similar al comparar las pacientes según los estratos de la variable combinada 'AMH  $\leq 1,4$  ng/mL o RFA  $\leq 11$ ', tanto en el momento del restablecimiento de los ciclos como al final del seguimiento (figura 30).

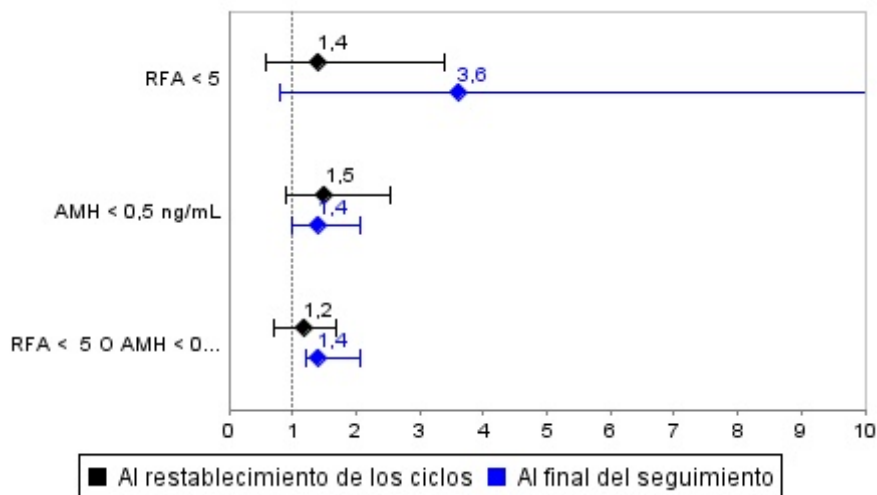


Figura 30: Riesgo relativo de fallo ovárico oculto, definido según distintos criterios, en el momento de restablecimiento de ciclos y al final del seguimiento en función de la variable combinada AMH preQT < 1,4 ng/mL o RFA preQT < 11.

En la figura 31 se muestran los resultados del RR de aparición de fallo ovárico oculto en función de la variable combinada AMH-RFA preQT para 'reserva ovárica elevada'. Para la definición de fallo ovárico oculto como niveles de AMH inferiores a 0,5 ng/mL tanto al restablecimiento de los ciclos como al final del seguimiento, el riesgo fue significativamente mayor en las pacientes expuestas (1,7(1,03;3);  $p=0,03$  y 1,5 (1,05;2,4);  $p=0,03$ , respectivamente). También se observó mayor riesgo para desarrollar fallo ovárico oculto definido por una AMH postQT < 0,5 ng/mL o un RFA < 5 al final del seguimiento en las pacientes con una menor reserva ovárica.

## Resultados

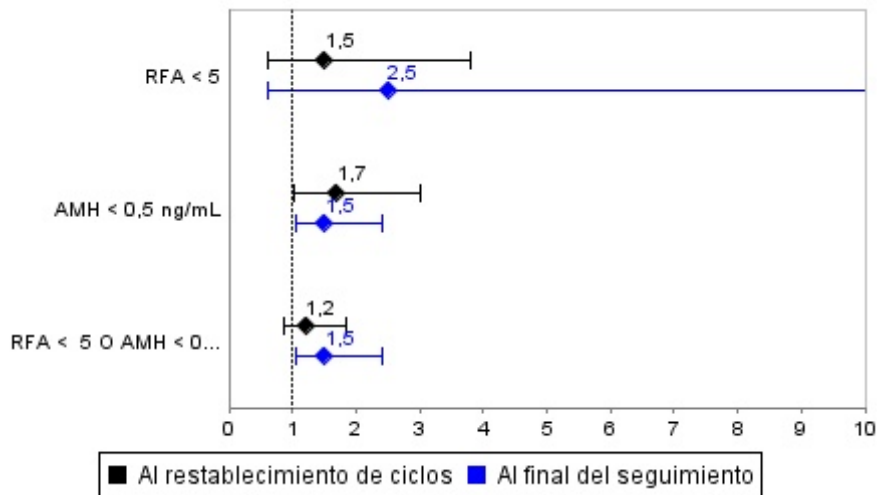


Figura 31: Riesgo relativo de fallo ovárico oculto, definido según distintos criterios, en el momento de restablecimiento de ciclos y al final del seguimiento en función de la variable combinada AMH preQT  $\geq 4$  ng/mL o RFA preQT  $\geq 16$

### 5.2.3. Asociación entre variables explicativas y reserva ovárica severamente disminuida

#### 5.2.3.1. Asociación entre RFA preQT y reserva ovárica severamente disminuida

La exploración de la asociación entre el RFA previo a la QT y la reserva ovárica disminuida drásticamente al final del seguimiento se ha realizado estimando el área bajo la curva ROC, mostrando capacidad discriminativa significativa (AUC: 0,82; IC 95%: 0,69; 0,95;  $p=0,03$ ).

En cuanto al RR de desarrollar reserva ovárica severamente disminuida resultó significativamente asociado con RFA preQT, estratificando por la mediana de 17 folículos (RR 1,3 (IC 95% 1,05; 1,7)  $p= 0,02$ ).

## Resultados

### 5.2.3.2. Asociación entre AMH preQT y reserva ovárica severamente disminuida

La concentración de AMH preQT no mostró capacidad discriminativa significativa para la determinación de la reserva ovárica severamente disminuida al final del seguimiento (AUC 0,75 (IC95% 0,55;0,94)  $p=0,1$ ).

La AMH preQT tampoco se mostró asociada significativamente al aumento del RR de desarrollar la condición de reserva ovárica severamente disminuida al final del seguimiento, estratificando la misma por la mediana de la distribución 3 ng/mL (RR 1,15 (IC95% 0,91;1,47)  $p=0,3$ ).

### 5.2.3.3. Asociación entre variables combinadas AMH-RFA y reserva ovárica severamente disminuida

El grupo de pacientes con 'mejor reserva ovárica preQT' definidas por concentración de AMH  $\geq 4$  ng/mL o un RFA  $\geq$  a 16 folículos resultaron tener un RR significativamente menor de desarrollar una reserva ovárica severamente disminuida al final del seguimiento (RR 1,28 (1,04;1,6)  $p=0,03$ ). En cambio cuando se estratificaba a las pacientes por la variable que definía 'peor reserva ovárica' como concentraciones de AMH  $< 1,4$  ng/mL y RFA  $< 11$  no resultó significativamente asociado al RR de desarrollar esta condición (RR 1,22 (1,04;1,48)  $p=0,11$ ).

**Resultados****5.2.4. Asociación entre covariables y variables de resultado****5.2.4.1. Asociación entre covariables y fallo ovárico clínico**

Entre las variables relativas a las características basales de las pacientes, solo la edad mostró asociación significativa con el tiempo hasta reaparición de ciclos menstruales, al estratificar por el umbral del percentil 25 de la distribución (tabla 30). Por tanto, las pacientes con menos de 32 años presentaron mayor probabilidad de reaparición de ciclos menstruales a lo largo del tiempo, según los resultados del análisis univariado.

Tabla 30: Análisis de asociación y magnitud de efecto de características basales, antecedentes de la paciente y relacionadas con la reserva ovárica sobre restablecimiento de ciclos

Covariable	Nº expuestos (%)	HR	IC 95%	p*
Edad (años)	--	0,091	0,83; 1,0	0,06
Edad estratificada				
< 32 años (P25)	41 (76)	0,40	0,18; 0,89	0,02
< 34 años (P50)	33 (61)	0,5	0,24; 1,01	0,05
<36 años (P75)	18 (33,3)	0,51	0,24; 1,11	0,09
Edad menarquía (años)	--	1,04	0,8; 1,35	0,76
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	--	0,96	0,89; 1,04	0,37
IMC estratificado(kg/m <sup>2</sup> )				
<18	1 (1,8)	3,2	0,45; 25,0	0,26
<25	30 (55,5)	1,8	0,87; 3,78	0,1
<30	47 (87)	0,9	0,31; 2,61	0,85
<35	51 (94,4)	0,52	0,12; 2,23	0,37
Nuliparidad (Sí/no)	40 (74,1)	1,73	0,7; 4,3	0,23
Consumo de tabaco (Sí/No)	7 (13)	1,57	0,59; 4,12	0,36
Portadora de mutación BRCA	7 (29,1)	2,5	0,48; 13,0	0,27
FSH basal (UI/L)	--	0,91	0,81; 1,04	0,19
Estradiol(ng/L)	--	0,99	0,99;1, 04	0,62
Cociente FSH/E2	--	0,45	0,08; 2,43	0,35

**Resultados**

En cuanto a las variables relativas a la enfermedad tumoral, ninguna de ellas demostró asociación con el tiempo hasta recuperación de ciclos menstruales, excepto la condición pronóstica molecular 'Luminal B', por lo que estas pacientes tendrían una menor probabilidad de reaparición de ciclos menstruales a lo largo del tiempo, según los resultados del análisis univariado (tabla 31).

Tabla 31: Análisis de asociación y magnitud de efecto de variables relacionadas con la enfermedad tumoral con el restablecimiento de ciclos

Covariable	Nº expuestos (%)	HR	IC 95%	p*
<b>Estadio TNM</b>				
I	16 (30,2)	1	--	--
II	30 (56,6)	2,83	0,83;9,6	0,97
III	7 (13,2)	1,48	0,49; 4,4	0,48
<b>Tipo histológico (ductal vs lobulillar)</b>				
	2 (4)	0,88	0,21; 3,37	0,86
<b>Grado histológico (G2 vs G3)</b>				
	18 (33,3)	1,04	0,52; 2,09	0,89
<b>Expresión Receptores Hormonales</b>				
RE(+)	40 (74)	2,03	0,91;4,5	0,08
RP(+)	37 (68,5)	1,75	0,85;3,6	0,12
<b>Expresión Her2 neu</b>				
	18 (33,3)	1,17	0,57;2,4	0,65
<b>Expresión Ki-67</b>				
	45 (95)	3,8	0,49; 29,4	0,19
<b>Pronóstico molecular</b>				
Luminal A	15 (28,8)	1	--	--
Luminal B	23 (44,2)	3,6	1,12;11,6	0,031
Basal Like	11 (21)	1,9	0,69;5,2	0,2
Her-2	3 (5,7)	1,5	0,35;6,4	0,57

En la tabla 32 se resumen los análisis de asociación y magnitud de efecto sobre el tiempo hasta reaparición de ciclos de las características relativas al tratamiento. Sólo se encontró asociación significativa entre el tiempo hasta restablecimiento de los ciclos menstruales y las pacientes con ganglio centinela positivo.

**Resultados**

En cuanto a las variables relativas al tratamiento quimioterápico, no se encontraron diferencias significativas con el restablecimiento de ciclos en función del tiempo. Tampoco mostraron diferencias significativas la inmunoterapia ni la administración de tamoxifeno (tabla 32). Se encontró una asociación significativa con las pacientes en las que la biopsia selectiva de ganglio centinela resultó positiva ( $p=0.031$ ).

Tabla 32: Análisis de asociación y magnitud de efecto de características relativas al tratamiento quirúrgico y quimioterápico con el restablecimiento de ciclos

Covariable	Nº expuestos (%)	HR	IC 95%	p*
Cirugía (conservadora vs mastectomía)	34 (34)	1,7	0,82; 3,87	0,14
Ganglios linfáticos (positivos vs negativos)				
En BSGC	11 (28,9)	2,9	1,1;7,7	0,031
En Linfadenectomía	16 (64)	0,65	0,23;1,81	0,41
En BSGC o Linfadenectomía	16 (64)	1,19	0,61;2,32	0,6
Nº ganglios axilares positivos	--	0,92	0,82; 1,04	0,21
Secuencia quimioterapia				
Adyuvante	14 (26,9)	1	--	--
Neoadyuvante	34 (65,3)	0,93	0,45;1,92	0,85
Ambas	4 (7,6)	0,54	0,07;4,08	0,55
Régimen quimioterapia				
Basada ciclofosfamida	39 (72)	1,19	0,57;2,48	0,64
Basada en carboplatino	13 (24)	0,58	0,25;1,33	0,2
Taxanos secuenciales	28 (52)	1,2	0,64; 2,41	0,52
Inmunoterapia				
Trastuzumab	19 (35)	0,98	0,7;2,38	0,97
Trastuzumab+Pertuzumab	7 (13)	1,3	0,64;2,63	0,45
Tamoxifeno	35 (64)	0,8	0,4;1,62	0,54

## Resultados

### 5.2.5. Asociación entre covariables y variables explicativas

Con el fin de identificar las covariables que deben ser incluidas en el análisis bi y multivariado, se ha analizado la asociación entre las variables explicativas en las que se encontró un umbral significativamente asociado con el restablecimiento de ciclos en el tiempo –RFA preQT y variable combinada AMH/RFA– y las covariables con potencial relación biológicamente plausible.

#### 5.2.5.1. Asociación entre covariables y RFA preQT

El RFA preQT mostró asociación significativa inversa con la edad, tanto considerada como variable continua (Rho: -0,39; p=0,003), como dicotomizada utilizando como punto de corte la edad de 32 y 36 años (p= 0.04 y p=0,028 respectivamente) (tabla 33).

También se detectó asociación significativa entre el RFA previo a QT y el IMC de la paciente: El RFA resultó menor a mayor IMC (Rho: -0,32; P=0,019). Estratificando la variable por medio de los puntos de corte establecidos en la clasificación estatoponderal de la OMS, se apreciaron diferencias significativas en el RFA tanto al comparar las pacientes con peso normal frente a las que presentaron sobrepeso y obesidad, como comparando las pacientes con normopeso o sobrepeso con las obesas, y también al contrastar la diferencias entre los RFA de pacientes con normopeso, sobrepeso y obesidad clase I con las afectadas por obesidad clase II (tabla 33).

La concentración sérica de FSH basal, disponible sólo en 28 pacientes de la muestra, no mostró no correlación significativa con el RFA previo a quimioterapia. Como se aprecia en la tabla 33, el resto de las covariables analizadas tampoco presentaron asociación con el RFA previo a la quimioexposición.

**Resultados**

Tabla 33: Análisis de asociación entre características basales, antecedentes de la paciente y relacionadas con la reserva ovárica y el RFA preQT

Covariable	Nº expuestos (%)	Estadístico	p
Edad (años)	--	-0,39*	0,003
Edad estratificada			
< 32 años (P25)	41 (76)	367**	0,04
< 34 años (P50)	33 (61)	430**	0,13
<36 años (P75)	18 (33)	444**	0,028
Edad menarquía (años)	--	0,19*	0,16
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	--	-0,32*	0,019
IMC estratificado(kg/m <sup>2</sup> )			
<25	30 (56)	183**	0,037
<30	47 (53)	54**	0,012
<35	51 (94)	24,5**	0,04
Nuliparidad (Sí/no)	40 (80)	182**	0,67
Consumo de tabaco (Sí/No)	7 (13)	125**	0,32
Portadora de mutación BRCA	7 (29,1)	35**	0,13
FSH basal (UI/L)	--	-0,34*	0,07
Estradiol (ng/L)	--	0,12*	0,38
Cociente FSH basal/E2	--	-0,24*	0,08

\* Rho de Spearman

\*\* U de Mann-Whitney

**Resultados****5.2.5.2. Asociación entre covariables y concentración de AMH preQT**

Al igual que con el RFA, la edad mostró correlación significativa inversa con el nivel sérico de AMH previa a la quimioterapia (Rho: -0,27; p=0,04). En este caso, la significación de la asociación no se mantuvo al estratificar la edad por ninguno de los tres cuartiles de su distribución (32, 34 y 36 años) (tabla 34).

Tabla 34: Análisis de asociación entre características basales, antecedentes de la paciente y relacionadas con la reserva ovárica y la concentración de AMH preQT

Covariable	Nº expuestos (%)	Estadístico	p
Edad (años)	--	-0,27*	0,04
Edad estratificada			
< 32 años (P25)	41 (76)	353,5**	0,76
< 34 años (P50)	33 (61)	412**	0,22
<36 años (P75)	18 (33)	419**	0,08
Edad menarquía (años)	--	0,24*	0,083
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	--	-0,31*	0,02
IMC estratificado			
<25	30 (56)	178**	0,028
<30	47 (53)	52**	0,01
<35	51 (94)	21**	0,03
Nuliparidad (Sí/no)	40 (80)	146*	0,19
Consumo de tabaco (Sí/No)	7 (13)	184**	0,63
Portadora de mutación BRCA	7 (29,1)	54,5**	0,75
FSH basal (UI/L)	--	-0,29*	0,12
Estradiol (ng/L)	--	0,18*	0,35
Cociente FSH/E2	--	-0,03*	0,84

\* Rho de Spearman

\*\* U de Mann-Whitney

## Resultados

El nivel sérico de AMH preQT también presentó correlación significativa negativa con el IMC (Rho: -0,31; p=0,02). La comparación de las distribuciones de AMH categorizando el IMC por los intervalos de la OMS mostró diferencias significativas en todos los estratos.

De forma análoga a lo descrito en el caso del RFA, la AMH previa a QT no presentó asociación con la FSH ni con el estradiol determinados en la fase folicular –en las 28 pacientes en las que estuvo disponible–, ni tampoco la ratio FSH/estradiol (tabla 34).

### 5.3. ANÁLISIS BIVARIADO

Se presenta a continuación el análisis bivariado destinado a identificar posibles interacciones o confusiones ejercidas por las covariables asociadas a la probabilidad de restablecimiento de ciclos menstruales tras la quimioterapia, y bien a los niveles séricos de AMH o bien al recuento de folículos antrales prequimioterapia, que podrían incidir sobre la asociación causal que constituye la hipótesis principal del presente estudio.

#### 5.3.1. Análisis bivariado según covariables del efecto de RFA preQT sobre restablecimiento de ciclos menstruales

La tabla 35 muestra el resumen del análisis bivariado para detectar la interacción o confusión que podrían ejercer ciertas covariables sobre el efecto que el RFA preQT produce sobre el tiempo hasta restablecimiento de ciclos, si se dicotomiza entre RFA preQT menor y mayor o igual a 12.

**Resultados**Tabla 35: Análisis bivariado del efecto del RFA previo a quimioterapia  $\leq 12$  sobre la probabilidad de restablecimiento de ciclos menstruales según covariables asociadas

Variable	HR crudo	IC 95 %	p*	HR ajustado	IC 95 %
<b>Edad (años)</b>					
<32 años	0,38	0,16; 0,92	0,12	0,4	0,18;1,12
< 34 años	0,38	0,16; 0,92	0,13	0,43	0,17;1,04
<36 años	0,38	0,16; 0,92	0,11	0,43	0,16;0,97
<b>IMC(kg/m<sup>2</sup>)</b>					
<25	0,38	0,16; 0,92	0,2	0,42	0,17;1,05
<30	0,38	0,16; 0,92	0,22	0,30	0,11;0,84
<35	0,38	0,16; 0,92	0,07	0,28	0,1 ;0,77
<b>BSGC (positivos vs negativos)</b>	0,38	0,16; 0,92	0,05	0,48	0,16;1,49
<b>Secuencia quimioterapia</b>					
Neoadyuvante	0,38	0,16; 0,92	0,68	0,4	0,16;0,97
Adyuvante	0,38	0,16; 0,92	0,36	0,38	0,15;0,93
Ambas	0,38	0,16; 0,92	0,25	0,36	0,14;0,90
<b>Régimen quimioterapia</b>					
Basada ciclofosfamida	0,38	0,16; 0,92	0,66	0,38	0,16;0,92
Basada en carboplatino	0,38	0,16; 0,92	0,17	0,38	0,16;0,92
Taxanos secuenciales	0,38	0,16; 0,92	0,38	0,37	0,15;0,89
<b>Tamoxifeno</b>	0,38	0,16;0,92	0,54	0,39	0,16;0,94

\* Valor p de la prueba estadística de interacción

El efecto del RFA estratificado por 12 sobre el tiempo hasta reaparición de ciclos menstruales conserva la significación estadística tras ajustar individualmente por edad, por el IMC y por resultado positivo en la biopsia selectiva de ganglio centinela, que se han revelado como variables confusoras (tabla 35).

**Resultados****5.3.2. Análisis bivariado según covariables del efecto de los niveles combinados de AMH y RFA preQT sobre restablecimiento de ciclos menstruales**

El estudio del efecto de la covariables consideradas sobre el efecto de la variable combinada AMH <1.4 ng/mL o RFA < 11 folículos antrales) se resume en la tabla 36.

Tabla 36: Análisis bivariado del efecto de los niveles séricos de AMH < 1,4 ng/mL o el RFA < 11 folículos previos a QT sobre la probabilidad de restablecimiento de ciclos menstruales según covariables asociadas

Variable	HR crudo	IC 95 %	p*	HR ajustado	IC 95 %
<b>Edad (años)</b>					
< 32 años	0,42	0,19; 0,9	0,13	0,50	0,20;1,18
< 34 años	0,42	0,19; 0,9	0,18	0,48	0,21;1,10
< 36 años	0,42	0,19; 0,9	0,20	0,47	0,20;1,06
<b>IMC(kg/m<sup>2</sup>)</b>					
<25	0,42	0,19; 0,9	0,12	0,43	0,19;0,98
<30	0,42	0,19; 0,9	0,3	0,36	0,14;0,88
<35	0,42	0,19; 0,9	0,11	0,34	0,14;0,81
<b>Secuencia quimioterapia</b>					
Neoadyuvante	0,42	0,19; 0,9	0,83	0,44	0,19;0,99
Adyuvante	0,42	0,19; 0,9	0,46	0,43	0,19;0,96
Ambas	0,42	0,19; 0,9	0,24	0,39	0,17;0,90
<b>Régimen quimioterapia</b>					
Basada ciclofosfamida	0,42	0,19; 0,9	0,81	0,42	0,19;0,94
Basada en carboplatino	0,42	0,19; 0,9	0,24	0,43	0,19;0,96
Taxanos secuenciales	0,42	0,19; 0,9	0,55	0,42	0,19;0,93
Tamoxifeno	0,42	0,19; 0,9	0,65	0,43	0,19;0,95

\* Valor p de la prueba estadística de interacción.

El efecto de la variable combinada que clasifica a las pacientes en función de la presencia de RFA < a 11 o niveles de AMH < 1.4 ng/mL mantiene su significación

**Resultados**

respecto a la frecuencia de restablecimiento de ciclos menstruales en función del tiempo, aún ajustando éste por el efecto confusor del IMC (tabla 36).

El estudio del efecto de las covariables consideradas sobre el efecto de la variable combinada AMH  $\geq 4$  ng/mL o RFA  $\geq 16$  folículos antrales se resume en la tabla 37.

Tabla 37: Análisis bivariado del efecto de los niveles séricos de AMH  $\geq 4$  ng/mL o el RFA  $\geq 16$  folículos previos a QT sobre la probabilidad de restablecimiento de ciclos menstruales según covariables asociadas

Variable	HR crudo	IC 95 %	p*	HR ajustado	IC 95 %
<b>Edad (años)</b>					
< 32 años	0,42	0,19; 0,9	0,13	0,50	0,20;1,18
< 34 años	0,42	0,19; 0,9	0,18	0,48	0,21;1,10
< 36 años	0,42	0,19; 0,9	0,20	0,47	0,20;1,06
<b>IMC(kg/m<sup>2</sup>)</b>					
<25	0,42	0,19; 0,9	0,12	0,43	0,19;0,98
<30	0,42	0,19; 0,9	0,3	0,36	0,14;0,88
<35	0,42	0,19; 0,9	0,11	0,34	0,14;0,81
<b>Secuencia quimioterapia</b>					
Neoadyuvante	0,42	0,19; 0,9	0,83	0,44	0,19;0,99
Adyuvante	0,42	0,19; 0,9	0,46	0,43	0,19;0,96
Ambas	0,42	0,19; 0,9	0,24	0,39	0,17;0,90
<b>Régimen quimioterapia</b>					
Basada ciclofosfamida	0,42	0,19; 0,9	0,81	0,42	0,19;0,94
Basada en carboplatino	0,42	0,19; 0,9	0,24	0,43	0,19;0,96
Taxanos secuenciales	0,42	0,19; 0,9	0,55	0,42	0,19;0,93
Tamoxifeno	0,42	0,19; 0,9	0,65	0,43	0,19;0,95

\* Valor p de la prueba estadística de interacción.

El efecto de la variable combinada que clasifica a las pacientes en función de la presencia de RFA  $\geq 16$  o niveles de AMH  $\geq 4$  ng/mL, al igual que la variable previa,

## Resultados

mantiene su significación respecto a la frecuencia de restablecimiento de ciclos menstruales en función del tiempo, aún ajustando éste por el efecto confusor del IMC, sin embargo pierde la significación al ajustar por edad (tabla 37).

### 5.4. ANÁLISIS MULTIVARIADO

La estimación de la magnitud del efecto independiente de cada una de las variables explicativas se ha estimado por medio de análisis multivariado basado en el modelo de riesgos proporcionales. En el modelo completo inicial, además de la variable explicativa, se han incluido todas las variables para capaces de crear sesgo de confusión de manera individual, indentificadas por medio del análisis bivariado. Además, se han incluido las variables cuyo ajuste determinó cambios en el HR próximos a la confusión, al igual que aquellas otras para las que la asociación independiente con el efecto ha sido previamente descrita, aunque no se haya visto sustentada por el análisis de nuestros datos.

#### 5.4.1. Análisis multivariado con finalidad explicativa

##### 5.4.1.1. Modelos explicativos basados RFA <12

El modelo basado exclusivamente en la variable RFA < 12 proporciona una capacidad explicativa de la reaparición de ciclos menstruales a lo largo del tiempo de observación similar a la obtenida por medio del modelo que incluye todas las covariables capaces de generar sesgo de confusión, además de la edad. La eliminación sucesiva de las covariables, comenzado por las que presentan menor grado de asociación, no perjudica significativamente la calidad del modelo, es decir, no identifica covariables asociadas de forma independiente al resultado (tabla 38).

**Resultados**

Tabla 38: Análisis multivariado explicativo del efecto del RFA &lt;12 sobre la probabilidad restablecimiento de ciclos en función del tiempo

	-2LL	gl	p	HR	IC 95%	CIA
Modelos con variable principal y covariables asociadas						
RFA < 12	180,2	6	0,03	0,30	0,10; 0,91	174,2
Edad			0,66			
IMC			0,9			
Axila Positiva			0,22			
Tipo Luminal B			0,73			
QT neoadyuvante + Adyuvante			0,17			
RFA < 12	180,2	5	0,02	0,30	0,10; 0,87	175,2
Edad			0,66			
Axila Positiva			0,22			
Tipo Luminal B			0,73			
QT neoadyuvante + Adyuvante			0,16			
RFA <12	180,3	4	0,02	0,31	0,10; 0,88	176,2
Edad			0,63			
Axila Positiva			0,2			
QT neoadyuvante + Adyuvante			0,17			
RFA < 12	180,5	3	0,01	0,28	0,10; 0,75	177,5
Axila Positiva			0,11			
QT neoadyuvante + Adyuvante			0,16			
RFA <12	182,9	2	0,02	0,36	0,14; 0,9	180,9
QT neoadyuvante + Adyuvante			0,33			
RFA < 12	184,2	1	0,04	0,40	0,16;0,97	183,2

CIA: Criterio de información de Akaike

**5.4.1.2. Modelos explicativos basados en AMH  $\geq$  4 ng/mL o RFA  $\geq$  16**

El efecto de la variable combinada 'AMH  $\geq$  4 ng/mL o RFA  $\geq$  16' ha resultado independiente respecto del resto de las variables asociadas a la probabilidad de restablecimiento del ciclo menstrual a lo largo del tiempo. La eliminación sucesiva de las mismas en el orden determinado por su grado de asociación no determina cambios significativos respecto de la calidad explicativa del modelo constituido sólo por la variable explicativa (tabla 39).

**Resultados**Tabla 39: Análisis multivariado explicativo del efecto de la AMH  $\geq 4$  ng/mL o RFA  $\geq 16$  sobre la probabilidad restablecimiento de ciclos en función del tiempo

	-2LL	gl	p	HR	IC 95%	CIA
Modelos con variable principal y covariables asociadas						
AMH $\geq 4$ ng/mL o RFA $\geq 16$	157,5	8	0,02	0,19	0,04; 0,85	149,5
Edad			0,56			
IMC			0,81			
FSH preQT			0,87			
Axila Positiva			0,10			
Tipo Luminal B			0,59			
QT neoadyuvante + Adyuvante			0,14			
QT basada en Ciclofosfamida			0,27			
AMH $\geq 4$ ng/mL o RFA $\geq 16$	157,5	7	0,01	0,19	0,05; 0,72	150,5
Edad			0,54			
IMC			0,85			
Axila Positiva			0,09			
Tipo Luminal B			0,54			
QT neoadyuvante + Adyuvante			0,11			
QT basada en Ciclofosfamida			0,27			
AMH $\geq 4$ ng/mL o RFA $\geq 16$	157,6	6	0,01	0,19	0,05; 0,72	151,6
Edad			0,55			
Axila Positiva			0,09			
Tipo Luminal B			0,55			
QT basada en Ciclofosfamida			0,11			
QT neoadyuvante + Adyuvante			0,27			
AMH $\geq 4$ ng/mL o RFA $\geq 16$	157,9	5	0,01	0,20	0,05; 0,75	152,9
Edad			0,62			
Axila Positiva			0,10			
QT basada en Ciclofosfamida			0,13			
QT neoadyuvante + Adyuvante			0,34			
AMH $\geq 4$ ng/mL o RFA $\geq 16$	158,1	4	0,007	0,25	0,09; 0,69	154,1
Axila Positiva			0,10			
QT basada en Ciclofosfamida			0,15			
QT neoadyuvante + Adyuvante			0,45			
AMH $\geq 4$ ng/mL o RFA $\geq 16$	158,8	3	0,01	0,28	0,1; 0,74	155,8
Axila Positiva			0,14			
QT neoadyuvante + Adyuvante			0,17			
AMH $\geq 4$ ng/mL o RFA $\geq 16$	160,8	2	0,02	0,35	0,14; 0,87	158,8
QT neoadyuvante + Adyuvante			0,33			
AMH $\geq 4$ ng/mL o RFA $\geq 16$	162,1	1	0,03	0,39	0,16; 0,95	161,1

CIA: Criterio de información de Akaike

**Resultados****5.4.1.3. Modelos explicativos basados en AMH < 1,4ng/mL o RFA < 11**

El efecto de la variable combinada 'AMH < 1,4 ng/mL o RFA < 11' ha resultado independiente respecto del resto de las variables asociadas a la probabilidad de restablecimiento del ciclo menstrual a lo largo del tiempo. La eliminación sucesiva de las mismas en el orden determinado por su grado de asociación no determina cambios significativos respecto de la calidad explicativa del modelo constituido sólo por la variable explicativa (tabla 40).

Tabla 40: Análisis multivariado explicativo del efecto de la AMH < 1,4 ng/mL o RFA <11 sobre la probabilidad restablecimiento de ciclos en función del tiempo

	-2LL	gl	p	HR	IC 95%	CIA
<b>Modelos con la variable principal y covariables asociadas</b>						
AMH < 1,4 ng/mL o RFA <11	158,3	8	0,04	0,24	0,06;0,98	150,3
Edad			0,66			
IMC			0,87			
FSH preQT			0,67			
Axila Positiva			0,17			
Tipo Luminal B			0,55			
QT neoadyuvante + Adyuvante			0,18			
QT basada en Ciclofosfamida			0,46			
AMH < 1,4 ng/mL o RFA <11	158,4	7	0,04	0,24	0,06;0,98	151,4
Edad			0,66			
FSH preQT			0,69			
Axila Positiva			0,18			
Tipo Luminal B			0,55			
QT neoadyuvante + Adyuvante			0,18			
QT basada en Ciclofosfamida			0,47			
AMH < 1,4 ng/mL o RFA <11	158,5	6	0,02	0,22	0,06; 0,81	152,5
Edad			0,63			
Axila Positiva			0,15			
Tipo Luminal B			0,44			
QT basada en Ciclofosfamida			0,12			
QT neoadyuvante + Adyuvante			0,48			
AMH < 1,4 ng/mL o RFA <11	158,7	5	0,01	0,27	0,1; 0,74	153,7
Axila Positiva			0,15			
Tipo Luminal B			0,51			
QT basada en Ciclofosfamida			0,14			
QT neoadyuvante + Adyuvante			0,57			
AMH < 1,4 ng/mL o RFA <11	159,1	4	0,013	0,28	0,1; 0,76	155,1
Axila Positiva			0,18			
Tipo Luminal B			0,60			
QT neoadyuvante + Adyuvante			0,16			
AMH < 1,4 ng/mL o RFA <11	159,3	3	0,01	0,29	0,11; 0,78	156,3
Axila Positiva			0,14			
QT neoadyuvante + Adyuvante			0,18			

**Resultados**

AMH < 1,4 ng/mL o RFA <11 QT neoadyuvante + Adyuvante	161,4	2	0,03 0,34	0,37	0,15;0,91	159,4
AMH < 1,4 ng/mL o RFA <11	162,5	1	0,04	0,45	0,21; 0,98	161,5

CIA: Criterio de información de Akaike

**5.4.2. Análisis multivariado con finalidad predictiva**

Se han generado modelos de predicción de la reaparición de ciclos basados en cada una de las variables explicativas consideradas en el presente estudio. El único modelo explicativo cuya curva ROC ofreció un valor p significativo fue el basado edad, el IMC, la AMH y el RFA. Este modelo estimó una frecuencia de recuperación de ciclos del 87%, es decir, 20 puntos porcentuales superior a la observada, y predijo correctamente el 66% de las observaciones. Finalmente, proporcionó una sensibilidad del 68%, una especificidad del 57,1% y valores predictivos positivo y negativo del 91% y 21% respectivamente (tabla 41).

Tabla 41: Análisis multivariado de la capacidad predictiva del RFA sobre probabilidad de restablecimiento de ciclos a los 12 meses tras QT

	Probabilidad estimada (%)	Acierto (%)	S	E	VPP	VPN	AUC	IC 95%	p*
RFA, AMH	94	66,6	66	66,6	97,1	10,5	0,6	0,44; 0,77	0,19
RFA, Edad	81,4	64,8	68,1	50	85,7	26,3	0,65	0,5; 0,8	0,06
AMH, Edad	90,7	62,9	65,3	40	91	10	0,64	0,49;0,79	0,07
RFA, Edad, IMC	68,5	63	70	47,6	74,2	42,1	0,65	0,5; 0,8	0,06
RFA, AMH,IMC, Edad	87	66,6	68	57,1	91,4	21	0,66	0,51; 0,82	0,04
RFA < 12, Edad < 36, IMC < 30	86,7	66	67,4	57,1	91,1	21,0	0,62	0,46; 0,78	0,12
RFA < 12, Edad < 36, AMH<2	79	66	69	54	85	31,5	0,62	0,45; 0,78	0,14

S: sensibilidad; E: Especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo  
AUC: Área bajo la curva ROC

\* Valor p de la prueba de contraste de discriminación

## Resultados

# DISCUSIÓN



## Discusión

## 6. DISCUSIÓN

El presente estudio ha abordado el análisis de la asociación entre la reserva ovárica previa a la quimioexposición, evaluada por medio de estimadores de uso clínico, con la probabilidad de fallo ovárico clínico, por medio de un diseño de cohortes prospectivo, con análisis multivariado para definir el grado de implicación explicativa de las variables analizadas.

Nuestros resultados sustentan que el RFA previo a quimioterapia se asocia de forma independiente a la probabilidad acumulada de restablecimiento de ciclos menstruales en pacientes con cáncer de mama en edad reproductiva tratadas con quimioterapia. Desde el punto de vista predictivo, tanto el RFA como la AMH asociada a éste permiten discriminar aceptablemente las pacientes con riesgo de desarrollar amenorrea irreversible, por medio de modelos en los que predomina la sensibilidad y el valor predictivo positivo.

### 6.1. RESULTADOS RELEVANTES

#### 6.1.1. Asociación de estimadores de reserva con fallo ovárico clínico

La concentración sérica basal de FSH, interpretada aisladamente o en conjunción con el estradiol determinado en la misma fase del ciclo, fue ampliamente utilizada como estimador de la reserva de folículos primordiales, desde las observaciones que relacionaron su incremento progresivo con la reducción gradual del conjunto de folículos sensibles al efecto FSH [187]. No obstante, la elevación de la FSH no resulta relevante hasta que la depleción del conjunto folicular de reserva resulta considerable. Según estimaciones realizadas por estudios longitudinales, la elevación clara y consistente de la FSH basal suele preceder en un promedio de 10 años a la edad de la menopausia [188, 189].

La correlación entre el nivel de FSH sérica y la reserva funcional ovárica está en estrecha dependencia de la fase del ciclo ovárico en la que se determina este parámetro. Los valores estandarizados en pacientes con ciclos menstruales se refieren siempre a la fase folicular precoz, en la que la retroalimentación negativa de estrógenos, inhibina-B y AMH resulta menos intensa que tras el establecimiento de la dominancia folicular. En nuestro estudio, la determinación de FSH basal fue posible en el 55% de las pacientes de la cohorte, mientras que en el resto se registró la una determinación disponible o la

## Discusión

más cercana al 2º-4º día del ciclo. La imposibilidad de determinar la FSH basal fue debida, en la mayoría de los casos, a la imposibilidad de diferir la estimulación ovárica destinada a la vitrificación preventiva de ovocitos. A pesar de que las distribuciones de FSH sérica basal y no basal fueron notablemente similares, sólo se incluyeron en los análisis de asociación entre FSH y variables de resultado los casos en los que se contaba con cuantificación de FSH en fase folicular precoz. En este subgrupo de pacientes, los niveles centrales de FSH (media: 6,6; mediana: 6) y su dispersión (DE: 3; IIC: 5-8) resultaron esperables, en función del perfil etario de las pacientes analizadas.

La AMH ha sido aplicada en la estimación de la edad de advenimiento de la menopausia en distintos estudios. Uno de los que cuentan con seguimiento más prolongado ha generado un modelo de predicción individualizada de la edad de la menopausia, basado en la edad y la AMH como factores pronósticos independientes [190]. Estos hallazgos han sido confirmados por estudios similares posteriores [191]. Con respecto a la capacidad de predicción de respuesta ovárica a la estimulación del desarrollo folicular múltiple, está considerada en la actualidad como la prueba analítica de referencia [192] por presentar una capacidad de discriminación entre respuesta ovárica insuficiente, normal y excesiva comparable a la del RFA y útil para la selección de la dosis de estimulación según el perfil de respuesta del paciente.

La estimación de la fertilidad natural por medio de la AMH sérica sigue siendo en la actualidad motivo de controversia, generada a partir del estudio de Steiner [193]. Este autor describió una asociación entre el nivel de AMH y la probabilidad de gestación espontánea a los seis meses de la determinación, en pacientes con edades comprendidas entre 30 y 44 años, y que no habían consultado por esterilidad. En las mujeres que presentaban niveles de AMH inferiores a 0,7 ng/mL se observó una probabilidad de gestación espontánea significativamente menor (RR: 0,3; IC 95%: 0,08; 0,91) en relación con aquellas con AMH superior a dicho umbral. Este mismo estudio no halló asociación significativa equivalente entre la FSH y la fecundabilidad. Un estudio posterior de La Marca, realizado sobre una muestra acumulativa de ciclos de FIV analizados retrospectivamente para elaborar un modelo de predicción de nacido vivo, la edad de la mujer y el nivel de AMH en el momento de la estimulación resultaron predictores independientes [194]. El análisis de utilidad pronóstica de la AMH sobre la fecundabilidad en la población general fue reproducido por el estudio de Hagen, quien concluyó que los niveles de AMH no resultaban un estimador adecuado de fecundabilidad. Este estudio se efectuó sobre una muestra de oportunidad de 430 pacientes, cuyas edades no superaban los 35 años, y que en su mayor parte tenían menos de 31 años [195].

## Discusión

El RFA es otro de los evaluadores de reserva ovárica de utilidad contrastada en la estimación de la respuesta a la estimulación, cuya accesibilidad en el ámbito de la medicina reproductiva lo ha convertido uno de los estimadores más utilizados. Su limitación más relevante es la conveniencia de usar valores estandarizados, procedentes de determinaciones en fase folicular precoz, aunque la correlación entre éstos y los obtenidos en otras fases del ciclo es relativamente alta [196, 197]. La determinación del RFA basal estuvo disponible en el 59% de las pacientes de la cohorte; el resto de las pacientes no pudo ser sometida a cuantificación folicular basal por precisar el inicio inmediato de la estimulación ovárica, que se siguió del inicio de la quimioterapia en la mayoría de los casos. Considerando que las distribuciones del RFA obtenido en fase folicular precoz y en otras fases del ciclo fue similar, esta variable se ha utilizado en el análisis sin discriminar el momento de su cuantificación ecográfica. Todos los estudios ecográficos fueron realizados en el mismo ámbito asistencial y por un mismo investigador, que utilizó siempre uno de los dos equipos de diagnóstico ultrasonográfico disponibles para la atención de estas pacientes, cuyas características técnicas son comparables. La distribución del RFA en las pacientes de nuestra cohorte fue acorde a la concentración de AMH y la edad de las mismas, con una media global de 18,6 y una DE de 3,1.

La inhibina B no ha sido considerada por nuestro estudio como potencial variable explicativa. La variabilidad intracíclica de esta hormona, y su moderada capacidad predictiva respecto a la respuesta ovárica a la estimulación han limitado su aplicación clínica ordinaria, por lo que no se halla disponible en la mayoría de los ámbitos clínicos relacionados con la asistencia reproductiva, y tampoco en nuestro medio.

Para analizar la influencia de la reserva ovárica estimada por medio del RFA, realizamos inicialmente un análisis exploratorio por intervalos, que permitió detectar varios puntos de corte, correspondientes a los segmentos altos de la distribución, para generar dicotomizaciones que se asociaron a diferencias significativas en el porcentaje de restablecimiento de ciclos (<12, < 16 y <22). El valor crítico de la distribución de RFA asociado a un efecto de mayor magnitud sobre la reaparición de ciclos fue 12 folículos antrales, umbral que fue seleccionado por este motivo para introducir en modelos multivariados posteriores. Las pacientes con RFA preQT inferiores a 12 folículos antrales, presentan, según nuestros datos, una probabilidad de restablecimiento de ciclos a lo largo del periodo de observación menor en casi dos terceras partes a la de las mujeres con recuentos mayores (HR: 0,38; IC 95%: 0,16; 0,92; p=0,03). El umbral definido por el estudio de D'Avila que resulta más apropiado para la predicción de amenorrea (9 folículos) a es algo menor, aunque este autor estima la frecuencia de

## Discusión

amenorrea persistente a los seis meses de la exposición a quimioterapia, y el HR estimado comprende el valor neutro [156]. Nuestro análisis ha considerado como hito más relevante el estatus menstrual a lo largo del seguimiento, ya que tras los primeros seis meses de observación, la menstruación reapareció en el 50% de las pacientes de la cohorte, mientras que tras doce meses la frecuencia de pacientes con ciclos se incrementó hasta casi un 95% de las observadas. En consecuencia, la valoración a los seis meses del fin de la quimioterapia parece resultar demasiado precoz estimar la frecuencia de recuperación final.

La utilidad de la AMH en el pronóstico de restablecimiento de ciclos ha sido objeto de mayor número de estudios. La conclusión más relevante es la del metaanálisis de Barnabei, realizado a partir de cuatro estudios primarios prospectivos de pequeño tamaño [86]. El análisis global de los mismos concluyó que la quimioexposición se asocia a un descenso significativo de la AMH sérica, y que la reaparición de ciclos menstruales fue significativamente más frecuente en las pacientes con mayores niveles de AMH preQT. Según Barnabei, La AMH resultó el mejor predictor aislado del restablecimiento de ciclos, y su asociación predictiva resultó independiente de la edad. En nuestro estudio, la AMH preQT se asoció significativa pero débilmente con la frecuencia de ciclos al comparar a las pacientes con AMH mayor o menor de 1 ng/mL a los 12 meses tras finalizar la quimioterapia (80% vs 23%;  $p=0,04$ ). El cálculo de la magnitud del efecto de este patrón de exposición no permitió descartar la hipótesis nula (HR=1,04; IC 95%: 0,95; 1,13;  $p=0,34$ ), aunque la potencia estadística para dicho contraste resulta, como se ha argumentado, insuficiente para concluir al respecto.

Las características de las pacientes analizadas limitan la comparabilidad de nuestro estudio con los que han realizado estimaciones predictivas sobre el riesgo de amenorrea irreversible. En el metaanálisis de Barnabei, de las 157 pacientes con información sobre la edad –del total de 176 pacientes analizadas–, solo el 23% presentaron edades inferiores a 40 años, frecuencia menor a la determinada por los criterios de inclusión de nuestra cohorte (100%). Esta diferencia en el rango etario explica probablemente la diferencia entre la distribución de AMH preQT de nuestra cohorte y las descritas por los estudios metaanalizados por Barnabei [86]. La AMH previa a quimioexposición de las pacientes incluidas en nuestro análisis presentó una mediana de 3 e IIC de 1,4 a 5,7 ng/mL y un rango de 0,47 a 24,8 ng/mL. Los estudios primarios del referido metaanálisis describieron medianas comprendidas entre 0,55 y 1,9 ng/mL, con un rango de 0,01 a 8,63 ng/mL. Además, uno de los estudios, que fue en concreto el menor tamaño muestral, utilizó un bioensayo de primera generación para cuantificar la AMH.

## Discusión

Los dos estudios análogos no incluidos en el metaanálisis, y publicados por Su y D'Avila en 2014 y 2015 respectivamente, analizan también cohortes de pacientes con mayor edad (mediana de 39 y media de 35 años, respectivamente) [156, 163]. En ambos casos se identificó asociación significativa entre los niveles previos a la quimioterapia de AMH y la probabilidad de amenorrea definitiva. En los dos estudios se objetivó una frecuencia de restablecimiento de ciclos (57% y 61,7% respectivamente) similar al estimado en nuestro estudio, aunque el primero la cuantificó tras un seguimiento cuya mediana fue de 163 días, y el segundo a los seis meses de la quimioterapia. Una explicación para la posible influencia de la duración del seguimiento sobre el valor predictivo de la AMH, sería que las pacientes que las pacientes en las que reaparece antes la menstruación tienden a ser las de mayor nivel de AMH preQT, como han descrito numerosos estudios [100, 154, 179, 198]. Al evaluar a más largo plazo la reaparición de los ciclos, quedarían incluidas en el análisis pacientes con menores concentraciones de AMH, lo que puede modificar la potencia de la asociación.

La ausencia de asociación entre la AMH y el estado final de la función ovárica puede resultar llamativa si se considera que otro estimador de reserva como el RFA, fuertemente correlacionado con la AMH [113], sí determina diferencias en la frecuencia de restablecimiento de ciclos. Con la salvedad de que nuestro estudio no permite concluir definitivamente sobre la ausencia de asociación de AMH, resulta pertinente recordar que cada uno de estos marcadores de reserva informan más específicamente sobre dos conjuntos foliculares cuantitativa y cualitativamente distintos. La AMH sérica estimaría con mayor rigor el tamaño del remanente folicular que comprende desde los folículos primordiales hasta los antrales pequeños (2 a 5 mm de diámetro máximo), mientras que el RFA cuantifica los visibles por presentar un antro de un tamaño suficiente para ser identificado ultrasonográficamente, que se corresponden aproximadamente con productores de la mayor parte de la inhibina B [68]. Es sabido que el restablecimiento de los ciclos depende de que se reanude el proceso de desarrollo folicular terminal sin interferencia del efecto antimitótico de la quimioterapia, a partir de una cohorte de folículos antrales reclutados para iniciar la selección, y que podría ser mejor estimada con el RFA.

Hemos decidido generar variables combinadas para clasificar a las pacientes con arreglo a la información que aportan conjuntamente el RFA y la AMH, para considerar como exposición la menor reserva ovárica frente a la más abundante. Como suele ser el objetivo de estas estrategias, se ha pretendido una clasificación de las pacientes con intención de privilegiar la sensibilidad del criterio, ya que una paciente fue catalogada en

## Discusión

el estrato favorable o desfavorable cuando al menos uno de los dos marcadores estuvo por encima o debajo del nivel crítico.

Con respecto a las variables combinadas RFA-AMH, el 55,6% de las pacientes se hallaba en la categoría de reserva ovárica elevada –asociada *a priori* a mejor pronóstico. La estratificación basada en la combinación de parámetros de mal pronóstico, consideró expuestas al 38,9% de las pacientes. En consecuencia, más de la mitad de las pacientes presentaban uno o dos parámetros de reserva ovárica por encima del límite definido para riesgo de respuesta excesiva a la estimulación. Por otro lado, la estratificación destinada a delimitar a las de pacientes con mayor riesgo de fallo ovárico quimioinducido ha adoptado como puntos de corte los percentiles 25 de la distribuciones de AMH y RFA. Una posibilidad alternativa habría sido dicotomizar las variables por sus respectivos percentiles 10 (AMH de 0,73 ng/mL y RFA de 6), lo que habría seleccionado a pacientes que ya presentaban criterios de baja reserva, más que a mujeres susceptibles de quedar en esta condición como efecto de la quimioterapia.

El diseño de estas variables combinadas obedeció a la intención de clasificar como de buen pronóstico de conservación de ciclos a cualquier paciente con un estimador favorable, y considerando que el evento que pretende predecirse es el cese de la amenorrea, y no la frecuencia de gestación, para la que habría sido más pertinente combinar AMH o RFA con edad. El efecto de la reserva ovárica basal, definida con arreglo a la combinación entre AMH y RFA mantuvo asociación con la probabilidad de restablecimiento de ciclos. En las pacientes con AMH preQT inferior a 4 ng/mL o RFA menor de 16 la probabilidad de recuperación de ciclos fue la mitad de la estimada para las que estaban por encima de dicho umbral (HR: 0,45; IC 95%: 0,21: 0,98; p=0,04). En el caso de las pacientes con peor pronóstico estimado, se estimó la misma relación entre las probabilidades (HR: 0,42; IC 95%: 0,19: 0,93; p=0,03). Sin embargo, el análisis multivariado demostró que la capacidad predictiva y explicativa de estas variables no superaba las de los estimadores aislados en las están basadas.

El análisis multivariado con intención explicativa identificó el RFA (< 12 frente a  $\geq$  12) como la única variable asociada a la probabilidad de restablecimiento de ciclos a los 12 meses del fin de la quimioterapia, sin que la edad, el IMC, la afectación axilar, el subtipo molecular del tumor ni la secuencia de QT mostrasen relación explicativa adicional e independiente. Todas las variables distintas del RFA incluidas en el modelo de regresión lo fueron por haber mostrado asociación con la variable explicativa y la de resultado, o fuerte asociación con alguna de las dos. La edad resultó excluida precozmente del modelo, como consecuencia de la eliminación sucesiva de las variables con menor

## Discusión

fuerza de asociación. En el caso de las variables combinadas, tampoco se identificó asociación independiente de ninguna covariable que mejorase la capacidad explicativa del modelo.

Los estudios que han aplicado procedimientos de análisis multivariado para la evaluación de la asociación independiente de los distintos determinantes de la probabilidad de amenorrea quimioinducida [105, 137, 154, 161, 163] son sin duda los más útiles para contextualizar nuestros resultados:

En uno de estos estudios, Anderson identificó la AMH preQT como el único factor pronóstico independiente (OR: 0,013; IC 0,001-0,227  $p=0,005$ ), que además resultó el mejor predictor de amenorrea. Aunque la edad no resultó asociada a la frecuencia de amenorrea, su adición al modelo predictivo incrementó el rendimiento pronóstico de la AMH aislada, generando un modelo de predicción de la amenorrea con una sensibilidad del 98,2% y una especificidad del 80% [154]. Anderson basó este análisis en la elección de dos puntos de corte en la distribución de AMH (3,8 pmol/L y 20,3 pmol/L) con el objetivo de lograr mejor discriminación entre las pacientes con baja y elevada reserva frente al resto. Hemos aplicado una estrategia similar en nuestro análisis de asociación, sin que ninguna de las estratificaciones realizadas haya identificado asociación estadística. Por el contrario, los resultados de Ruddy no apoyan la asociación independiente de la AMH con la frecuencia de amenorrea quimioinducida a los 12 meses de observación tras quimioterapia, con la que sólo resultó asociada la edad. Sin embargo, y según este autor, si el análisis se realizaba a los 18 meses de observación, tanto la edad como el nivel de AMH mostraba asociación independiente, con la particularidad de que la magnitud de efecto de la AMH duplicó la de la edad. De nuevo, las diferencias en la edad de las pacientes de la cohorte, y la mayor elevada frecuencia de amenorrea persistente a los 12 y 18 meses (82% y 81% respectivamente) limitan la comparabilidad de los resultados [137].

Otro estudio con resultados distintos a los obtenidos en nuestro análisis es el de Rosendhal, que halla asociación entre la AMH pre-tratamiento y la frecuencia de reaparición de ciclos, que además resultó independiente de la influencia de los regímenes de quimioterapia aplicados, de la presencia de uno o ambos ovarios y de la edad [161].

El estudio de Su es de referencia para la comparación de los resultados de análisis multivariado de causalidad independiente. El efecto de la AMH estratificada por 0,7 ng/mL, ajustado por la influencia de otras covariables relacionadas con el resultado

## Discusión

(edad, IMC, raza, FSH inicial, tipo de quimioterapia y uso de tamoxifeno) resultó significativo y de magnitud considerable (HR: 2,9; IC 95%:1,51;5,56), ya que las pacientes con AMH mayores del umbral definido presentaron una frecuencia estimada de recuperación de ciclos tres veces mayor [163]. Las estratificaciones que esta autora introduce en edad, FSH y AMH se basan en umbrales cercanos a los percentiles extremos de la distribución (40 años, 0,7 ng/mL y 11 UI/L). Este criterio, que se revela útil, es posible por la mayor dispersión de su muestra, relacionada a su vez con el perfil de pacientes que analiza.

La explotación con finalidad predictiva de los estimadores de reserva analizados se ha realizado por medio de modelos que incorporan la variable explicativa independiente identificada y las que han mostrado asociación explicativa o simplemente mejoraron la validez pronóstica del modelo. Todas las variables fueron inicialmente utilizadas en su forma continua original, con el fin no perder capacidad predictiva como consecuencia de las dicotomizaciones. Los modelos generados se caracterizaron por un rendimiento pronóstico de bajo a moderado, con valores de sensibilidad comprendidos entre el 66 y el 70% y de especificidad más baja (40% al 66%). La calidad predictiva de este modelo resulta inferior a algunos previamente publicados, y en especial al de Anderson, que logra predecir con una sensibilidad del 98,2% y una especificidad del 80% la reaparición de ciclos [87].

El modelo con mejor balance entre sensibilidad y especificidad incluyó como variables predictivas la edad, el IMC, la AMH y el RFA, que son precisamente las seleccionadas por Su como más adecuadas para la predicción de la reaparición de ciclos al término del seguimiento. La validez pronóstica del modelo es cuestionable, considerando que sobreestima la frecuencia del fenómeno, y que clasificaría incorrectamente una de cada tres pacientes. Sin embargo, su elevado valor predictivo positivo confiere al pronóstico favorable respecto a la reaparición de la menstruación un estrecho margen de error, puesto que una de cada diez predicciones afirmativas del restablecimiento de ciclos resultaría equivocada.

## Discusión

### 6.2. FORTALEZAS

#### 6.2.1. Estimación de la reserva ovárica basal

Considerando que la variable explicativa principal del estudio es la reserva ovárica estimada en la fase previa a la quimioexposición, la categorización de las pacientes entre expuestas y no expuestas requería la utilización de marcadores de reserva aceptables en términos de plausibilidad biológica, reproducibilidad y validez pronóstica.

Los parámetros más acreditados para la estimación de la baja reserva ovárica han sido evaluados por capacidad de predicción de un resultado terapéutico, la respuesta a la estimulación del desarrollo folicular múltiple en pacientes tratadas con FIV-TE, y de un evento reproductivo, la edad de aparición de la menopausia en la población general, que no constituye el resultado que nuestro estudio trata de analizar, y que sólo tienen con éste una relación tangencial. La asociación entre los estimadores clásicos de reserva ovárica con probabilidad de nacido por medio de reproducción natural o asistida suscita más discusión.

El RFA ha sido mucho menos empleado que los estimadores analíticos de reserva ovárica en valoración del riesgo de fallo ovárico. Ello puede deberse a su menor accesibilidad en los entornos de investigación más próximos a la oncología. Su uso habitual en la asistencia reproductiva se debe en buena medida a su accesibilidad, aceptabilidad, reproducibilidad y validez para obtener estimaciones de reserva ovárica. De hecho, y en nuestro conocimiento, un solo estudio previo ha elaborado modelos de predicción de amenorrea quimioinducida basados en el RFA [156].

El interés por la evaluación de los niveles de AMH séricos en relación con el tratamiento quimioterápico deriva de la posibilidad de estimar fiablemente tanto el estado inicial de la reserva ovárica como el grado de deterioro achacable a la quimioexposición, con objeto de establecer un pronóstico adecuado acerca de la fertilidad y de la función endocrina en la paciente quimiotratada en la que se logre la remisión completa de la enfermedad [172]. De hecho, la AMH es el estimador analítico de reserva ovárica más utilizado en estudios similares al nuestro, sobre todo como variable explicativa [86]. En las pacientes de nuestra cohorte, la distribución de la AMH sérica se correspondió con el rango de edad definido en los criterios de inclusión, ya que el 75% de las mismas presentaron niveles de AMH superiores a 1,4 ng/mL, es decir, superiores a los umbrales definidos para el riesgo de baja respuesta a la estimulación.

## Discusión

En relación con la variabilidad y reproducibilidad de la AMH, todas las determinaciones fueron realizadas en un mismo laboratorio, a partir de muestras de suero congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  tras centrifugación y por medio de sistemas comerciales de enzimoimmunoensayo quimioluminiscente de segunda generación.

Nuestro estudio ha considerado variables de exposición combinadas, basadas en los niveles de AMH sérica y en el RFA, y destinadas a clasificar, con mayor sensibilidad que especificidad a las pacientes en aquéllas con mayor reserva ovárica presumible ( $\text{AMH} \geq 4 \text{ ng/mL}$  o  $\text{RFA} \geq 16$ ) y menor reserva esperable ( $\text{AMH} < 1,4 \text{ ng/mL}$  o  $\text{RFA} < 11$ ). Esta clasificación pretende aproximar la estratificación de las pacientes al razonamiento discriminativo aplicado en medicina reproductiva, que, en casos de estimación discordante, tiende a catalogar a una paciente con riesgo de baja respuesta ante la aparición de cualquier estimador de signo desfavorable, y, a la inversa, de potencial hiperrespondedora a la paciente con una AMH o un RFA elevado.

La reducción del RFA a menos de 5, de la AMH a menos de  $0,5 \text{ ng/mL}$  y la combinación de una de las dos condiciones han sido considerados como indicio de fallo ovárico oculto, y han sido valorados en el momento del restablecimiento de los ciclos y al final del seguimiento. Este análisis se ha realizado en el momento de la reaparición de los ciclos para evitar la pérdida de observaciones generada por la introducción del agonista GnRH a partir del restablecimiento de los ciclos, que se produjo en el 43% de las pacientes. Por otro lado, se ha reiterado al término del seguimiento para favorecer la prolongación del periodo de observación en las pacientes que no recibieron agonistas.

El riesgo de aparición de los estados definidos como fallo ovárico oculto apareció, tras el análisis de nuestros datos, asociado de manera significativa pero inconsistente a las variables explicativas consideradas de forma individual. La situación de fallo ovárico oculto al final del seguimiento definido como RFA menor de 5 y/o AMH menor de  $0,5 \text{ ng/mL}$  resultó asociada con el RFA por debajo de 17 (RR: 1,3; IC: 1,03; 1,6;  $p=0,04$ ), y con la variable combinada cuando la concentración de AMH fue menor a  $4 \text{ ng/mL}$  y/o el RFA fue menor de 16' (HR: 1,5; IC 95: 1,05; 2,4;  $p=0,03$ ). Los estimadores de reserva basal parecen representar una vía aceptable para la estimación de fallo ovárico oculto que podría tener utilidad en la definición de umbrales de riesgo y de protección, pero que debe ser explorada más ampliamente para poder obtener conclusiones válidas.

## Discusión

Hemos abordado también el análisis de la asociación entre la reserva ovárica y la probabilidad de aparición de cualquier resultado claramente desfavorable para el pronóstico reproductivo de la mujer, como la aparición de amenorrea quimioinducida o reducción sustancial de la reserva ovárica estimada. La intención de agrupar ambos resultados como evento desfavorable ha sido contemplada también por el estudio de D'Avila, que consideró conjuntamente como evento relevante la persistencia de amenorrea u oligomenorrea [156]. El uso de un umbral de 17 folículos ha permitido discriminar las pacientes con mayor riesgo de sufrir amenorrea o reducción subclínica de la reserva ovárica al final del seguimiento; dicho umbral es coherente con el descrito por D'Avila para detectar las pacientes con amenorrea (9 folículos) y oligomenorrea-amenorrea (13 folículos) y parece definir un gradiente lineal de pronóstico, cuya consistencia podría ser objeto de estudios ulteriores.

### 6.2.2. Variables de resultado consideradas

La adopción de la amenorrea quimioinducida como evento de resultado negativo principal permite valorar la reducción de la reserva ovárica tan solo a través de su efecto más expresivo y severo. La mayor parte de los estudios publicados han estimado su frecuencia en cohortes de mujeres premenopáusicas cuya edad máxima había rebasado el límite de la edad reproductiva social asumida en nuestro entorno. Por otra parte, la adopción de un criterio de definición recomendado por una reciente guía de práctica clínica añade interés a dicha estimación, a efectos de análisis comparativos posteriores. La distribución temporal de la reaparición de los ciclos menstruales ha sido objeto de estimaciones previas [105, 163], y tiene un claro interés desde el punto de vista del asesoramiento pronóstico.

Algunos estudios previos han optado por considerar como resultado desfavorable el conjunto de amenorrea y oligomenorrea [156, 161], ya que permite englobar a las pacientes con probable depleción severa de la reserva ovárica. Nuestro criterio ha sido considerar que cualquier patrón de restablecimiento de ciclos significaba, a efectos de análisis, el fin de la amenorrea transitoria postquimioterapia. Esta decisión se fundamenta en la elevada frecuencia de ciclos irregulares como patrón menstrual inicial entre las pacientes que recuperaron los ciclos, que no llegan a normalizarse en gran medida por la administración precoz y frecuente del agonista de la GnRH. Además, nuestro estudio analiza de manera específica, y como objetivo secundario, la frecuencia y los determinantes de aparición de fallo ovárico oculto definido con criterios basados en estimadores cuantitativos de reserva ovárica, así como la combinación de ambos

## Discusión

resultados (fallo ovárico clínico y oculto), que hemos denominado 'reducción severa de la reserva ovárica'.

La definición operativa de fallo ovárico oculto revestía mucha más dificultad, por la ausencia de un criterio uniforme para su diagnóstico y cuantificación. Como se ha argumentado, algunos autores, procedentes generalmente del ámbito de la oncología clínica, han propuesto considerar en fallo ovárico oculto a la paciente con alteraciones menstruales acompañadas de elevación de la FSH basal. Los conocimientos actuales sobre la capacidad estimativa de los indicadores de reserva ovárica permiten considerar los más sensibles, ya que pueden revelar compromisos severos de la reserva en pacientes que conserven ciclos regulares [113, 153].

Con respecto al fallo ovárico oculto, hemos optado por utilizar los umbrales de definición para la AMH sérica y el RFA contenidos en los Criterios de Bolonia para riesgo de baja respuesta a la estimulación, asumiendo que se refieren a una situación relacionada pero no equivalente a la reducción de la reserva [183]. A pesar de todo, la elección de la aparición de fallo ovárico oculto como variable secundaria de respuesta supone una característica diferenciadora que aborda un aspecto poco conocido de la repercusión reproductiva de la quimioexposición, y de indudable interés para el asesoramiento y la prevención. La introducción frecuente de agonistas GnRH como medio de hormonoterapia ablativa médica ha dificultado el análisis, restando potencia estadística a las comparaciones.

La estimación del efecto a medio y largo plazo de la quimioexposición debería realizarse en una fase del seguimiento biológicamente idónea para este propósito. Se ha descrito que el efecto de la quimioterapia es particularmente intenso ya durante el primer ciclo administrado [87], y que se mantiene hasta el final del mismo. Como se ha descrito en el apartado correspondiente, la toxicidad folicular de la quimioterapia actúa por un doble mecanismo con diferente grado de reversibilidad. Por una parte, promueve la apoptosis y la muerte celular tanto en las células de la granulosa de los folículos en crecimiento, metabólicamente más activas, como en los ovocitos, cuya alteración tiene más relevancia en la patogenia de la pérdida de folículos primordiales. La aparición de la menstruación traduce el reinicio del desarrollo folicular terminal tras el cese del efecto tóxico de la quimioterapia en los folículos que alcanzan la fase de reclutamiento, que se expresa también a través de la reducción progresiva de la FSH descrita previamente, y también apreciada en nuestra cohorte. Sin embargo, el efecto sobre el compartimento folicular de reserva, que también cesa, se ha postulado como definitivo aunque resulte clínicamente silente.

## Discusión

### 6.2.3. Control del efecto potencial de las covariables

La edad de la mujer constituye en realidad un estimador de reserva de eficacia discreta, en parte limitada por su variabilidad. Esta variable aparece asociada a la probabilidad de aparición de fallo ovárico clínico, conceptuado generalmente como amenorrea quimioinducida, en la mayor parte de los estudios. Nuestro análisis solo ha identificado esta asociación comparando las pacientes con menos de 32 años frente a las mayores de esta edad, y en relación con la reaparición de ciclos al final del seguimiento. El descenso del remanente de folículos primordiales en función del tiempo se produce según un patrón relativamente lineal, que podría experimentar, según algunos modelos biológicos, un aumento de la velocidad de pérdida folicular a partir de edades reproductivas extremas [119, 126, 174]. La exclusión de nuestro estudio de las pacientes con edad superior a 40 años, cuyo pronóstico reproductivo parece menos susceptible de estimación, ha reducido la amplitud del rango etario de nuestras observaciones, lo que puede explicar, junto con la limitación de la potencia estadística, la menor fuerza de la asociación identificada.

Las características somatométricas de las pacientes, y en concreto el IMC, han sido contempladas como covariable susceptible de análisis. Estudios previos han observado asociación entre la condición estatoponderal de las pacientes y el tiempo hasta reaparición de ciclos menstruales [163]. Estos autores hallaron una asociación favorable entre el IMC mayor de 25 kg/m<sup>2</sup> y la precocidad en la recuperación de los ciclos menstruales (HR: 5,07 (IC 95%; 2,44; 10,54; p<0,001). Según nuestros datos, que muestran una distribución del IMC muy similar a las de los estudios previos [135, 163, 181], el IMC no está asociado de forma independiente a la probabilidad de recuperación de ciclos, como ha puesto de manifiesto el análisis multivariado, en el que fue incluido tanto por su asociación con la frecuencia de fallo ovárico oculto, como por su relación significativa con las variables explicativas (AMH y RFA).

El consumo de tabaco ha sido registrado por nuestro estudio, y considerado como potencial fuente de sesgo, en virtud de la conocida asociación entre el consumo de tabaco prolongado y la reducción de la reserva folicular mediada por aquél. Al igual que los autores que han considerado la influencia de esta variable [163, 179, 181], no hemos identificado asociación estadística entre el tabaquismo y la aparición de amenorrea definitiva, ni entre el primero y la reserva ovárica basal. Como es habitual, el consumo de tabaco y su magnitud han sido considerados según la información referida por la paciente en la anamnesis, lo que probablemente reduce la validez de las estimaciones.

## Discusión

La influencia de la presencia de mutaciones BRCA 1 y 2 sobre la reserva ovárica inicial y su descenso tras la quimioexposición ha sido analizada con la intención de evaluar la introducción de un posible efecto confusor, que no se ha puesto de manifiesto en los análisis de asociación respecto a las variables de exposición ni de resultado. La escasa presencia de pacientes con mutaciones BRCA (12% de la cohorte) y el hecho de que su influencia no se contempla en el objetivo principal del estudio no ha inducido a realizar un subanálisis específico.

Respecto a las características de la enfermedad tumoral y a su tratamiento, nuestra cohorte muestra una marcada similitud con la mayoría de los estudios análogos y un perfil similar al habitual de los tumores epiteliales mamarios en el rango de edad estudiado [100, 106, 179, 181]. Más de la mitad de los casos se diagnosticaron en estadio II, con afectación ganglionar axilar detectada en el 49,3% de los casos en los que se realizó abordaje ganglionar axilar. Se observó un claro predominio de los carcinomas ductales infiltrantes (95,5%), de los que el 62,7% resultaron moderadamente diferenciados. La frecuencia de tumores con RE y RP negativos fue inferior al 30%, y la expresión de HER2 neu se detectó en 35,8% de los tumores. La frecuencia de tumores con perfil molecular HER 2 neu fue ligeramente superior al 6%.

En relación con los regímenes de quimioterapia, tanto el uso de quimioterapia neoadyuvante como primera quimioexposición como la distribución por tipo de esquemas de adyuvancia corresponde a los patrones habituales en el contexto del tratamiento sistémico actual del cáncer de mama, y resulta similar a lo descrito por los estudios más recientes [179, 181]. A efectos de análisis multivariado, los regímenes de quimioterapia administrados se han agrupado, en función de su grado de toxicidad germinal, en tres categorías pronósticas: poliquimioterapia basada en ciclofosfamida, basadas carboplatino y con administración de taxanos secuenciales. La distinción específica de los regímenes con antraciclinas y con taxanos no secuenciales no fue posible, ya que ambos incluyeron simultáneamente ciclofosfamida o carboplatino.

La frecuencia de uso de agonista GnRH registrada por nuestro estudio (43,1%) ha sido notablemente superior a la publicada, lo que refleja la tendencia actual de uso generalizado en pacientes premenopáusicas con tumores estrogénosensibles, y obedece también a que el periodo de reclutamiento ha sido prospectivo y por ello más reciente. Por medio de un análisis preliminar, constatamos que las distribuciones de AMH y RFA no difirieron al comparar a las pacientes que recibieron agonistas con las no

## Discusión

tratadas, pero la decisión final fue segregar del análisis las pacientes bajo supresión hipofisaria para asegurar la validez conceptual del mismo.

El control de la influencia de las covariables que podrían generar modificación del efecto o sesgo de confusión en el efecto que propone la hipótesis principal se ha realizado, como es preciso en todo estudio de cohortes, por medio de instrumentos de regresión, y no simplemente mediante la comparación estadística de las distribuciones según el factor de exposición.

Con respecto a las variables explicativas, la edad y el IMC mostraron asociación con el RFA, de sentido directo en el primer caso e inverso en el segundo. Las pacientes clasificadas como de mayor reserva ovárica fueron de menor edad, más delgadas, presentaron niveles de FSH basal más bajos, y recibieron más frecuentemente quimioterapia basada en ciclofosfamida. Salvo la última, todas las asociaciones resultaron previsibles en función del sentido de la clasificación de las pacientes introducida por la variable de exposición combinada.

La edad menor de 32 años, así como el tipo molecular luminal B, y la afectación axilar fueron características significativamente más frecuentes en las pacientes en las que restablecieron los ciclos. A diferencia de lo descrito en otros estudios, no se halló asociación entre la reaparición de ciclos y el tipo de quimioterapia aplicada, la secuencia adyuvante-neoadyuvante ni el uso de tamoxifeno [103, 105].

Los análisis bivariados para la detección de interacción y confusión identificaron efectos confusores de la afectación axilar en la relación entre el RFA y la probabilidad de amenorrea definitiva, así como del IMC sobre el efecto de las variables combinadas AMH-RFA. En ningún caso la confusión detectada anuló la asociación estadística entre las variables explicativas y las de resultado. Todas las variables confusoras fueron introducidas en los modelos multivariados explicativos, para asegurar el control correcto de los sesgos.

### **6.2.4. Definición y caracterización de la población de interés**

La edad de las pacientes, limitada por los criterios de inclusión del estudio, corresponde a la de las mujeres que, tras la remisión del cáncer de mama, podrían tener eventuales deseos de gestación, lo que, desde esta perspectiva, parece adecuado para estimar la fertilidad potencial. La edad media de las pacientes de la cohorte (media; 33,5 años; mediana: 34 años) no es sólo más baja, sino que presenta menor variabilidad (DE: 3,5;

## Discusión

IIC: 31-36) que la descrita en la mayor parte de las series y cohortes publicadas [87, 131, 134, 136, 137, 160, 163, 179, 181].

### 6.3. LIMITACIONES

#### 6.3.1. Variables de exposición y resultado

Nuestro propósito ha sido evaluar la capacidad de los estimadores de reserva ovárica previa a la quimioterapia para la predicción del fallo ovárico quimioinducido. La reserva funcional ovárica no puede ser *medida* en sentido estricto, sino que constituye una estimación momentánea de un proceso dinámico de pérdida de folículos primordiales, cuya normalidad se establece por comparación respecto a estándares ajustados por la edad de la paciente. En consecuencia, su evaluación depende de estimadores válidos, y deberían ser además aceptablemente precisos. Los dos estimadores más acreditados y difundidos en el ámbito de la medicina reproductiva son la determinación sérica de AMH y el RFA.

El uso de procedimientos de cuantificación analítica de AMH con elevados umbrales de detección y alta variabilidad intraensayo han limitado la validez externa de algunos estudios, y existe un consenso generalizado sobre la necesidad de utilizar procedimientos de segunda generación, que solventan adecuadamente dichas limitaciones. Sin embargo, el RFA, que deriva de exploración ultrasonográfica realizada por un único observador en el ámbito de la clínica, podría ser más dependiente del observador y de las características de la paciente, lo que podría cuestionar su precisión. El uso generalizado de este parámetro ecográfico ha sido avalado por evaluaciones favorables acerca de su repetibilidad, reproducibilidad y robustez. A pesar de ello, la evaluación de su variabilidad inter e intraobservador, asumida como suficiente en nuestro estudio, habría resultado necesaria.

La estimación natural de la fertilidad posterior a la quimioexposición debería basarse, como en cualquier otro contexto, en la determinación de la probabilidad de nacido a lo largo de un periodo de tiempo determinado. En el caso de pacientes quimiotratadas por cáncer de mama, las estimaciones directas resultan complejas, ya que la intención genésica es aún desestimada por la mayoría de las pacientes. La cuantificación estimada de la reserva ovárica se asocia con la probabilidad de gestación de un modo parcial, ya que la edad, que sin duda guarda relación con el estado de la reserva de

## Discusión

folículos primordiales, determina más que ésta la probabilidad de obtener descendencia. Por tanto, el empleo de la reserva ovárica como estimador de fertilidad es un recurso operativo representa *per se* una limitación conceptual en la propia fase del diseño, sólo paliable parcialmente por la delimitación del estudio a la población en edad reproductiva.

### 6.3.2. Tamaño muestral reclutado y duración del seguimiento.

La muestra analizada estuvo constituida por un total de 67 pacientes que aceptaron la inclusión en el estudio, que supusieron la práctica totalidad de las que cumplían los criterios de inclusión a lo largo del periodo de acumulación de observaciones. La dinámica de reclutamiento presentó dos fases claramente diferenciadas, ya que el 90% de las inclusiones se produjo a lo largo de los tres últimos años de prospección. Inicialmente, se ofreció la participación a pacientes cuyo tratamiento y seguimiento oncológico tenía lugar en nuestro propio centro. A partir de 2014, se ofreció la incorporación al estudio a toda paciente atendida en nuestro programa de preservación de fertilidad y que satisfacía los criterios de inclusión, por lo que la información sobre la enfermedad tumoral y la quimioexposición procedía se extrajo en estos casos de los informes de los centros de referencia, o fue solicitada a los especialistas responsables.

La mediana global del periodo de seguimiento fue de 18 meses, y su duración estuvo comprendida entre 6 y 54 meses, lo que representa una posición intermedia en el rango descrito por los estudios previos [87, 108, 134, 155, 161-163, 177]. La mediana de seguimiento en las pacientes con restablecimiento de la menstruación fue de 21 meses, es decir, mayor que la del seguimiento global. Este hecho se explica por el elevado número de pacientes que se incorporaron de forma tardía a la cohorte, entre las cuales, y por este motivo, podría estar subestimándose la frecuencia de la reaparición de ciclos.

La concentración temporal de la acumulación de observaciones ha limitado el reclutamiento final y el tamaño muestral analizado, pero, en contraposición, puede haber reducido la heterogeneidad de los datos relativos a la reserva ovárica estimada y al efecto de la quimioterapia. Por otro lado, la mayor frecuencia de reclutamiento a lo largo de los dos últimos años de acumulación de observaciones ha influido tanto en la mediana de seguimiento como en la frecuencia de pérdidas, que nuestro se han debido casi en su totalidad a la introducción del tratamiento con agonistas GnRH como hormonoterapia ablativa, que ha impedido la inclusión del curso de estas pacientes para determinados análisis. Esta circunstancia ha sido descrita también por otros autores [99, 163, 179], en particular en referencia al uso creciente de los agonistas GnRH como parte de la hormonoterapia en pacientes con tumores estrogénosensibles.

## Discusión

### 6.3.3. Frecuencia y origen de las pérdidas; potencia estadística real

Para el cálculo del tamaño muestral necesario con el fin de obtener una potencia mínima del 80% en los contrastes bilaterales de superioridad se asumió una diferencia de frecuencias entre pacientes expuestas y no expuestas del 20% y una razón expuestas/no expuestas de 0,6, escogiendo para ello los resultados de los estudios que habían definido la exposición con criterios basados en AMH y RFA, y cuyos resultados han identificado efectos significativos de mayor magnitud [86, 156, 163]. En nuestra cohorte, la diferencia en amenorrea definitiva –o de su evento complementario, el restablecimiento de los ciclos– observadas en nuestro estudio han resultado inferiores a las previstas, así como la relación entre expuestos y no expuestos para todas las variables de exposición.

La tendencia progresiva a introducir el tratamiento antigonadotropo con agonistas GnRH en las pacientes premenopáusicas con tumores que expresan receptores estrogénicos, especialmente acentuada durante los últimos años, ha ocasionado un porcentaje de pérdidas no debidas a falta de seguimiento más alto del esperado. En nuestra cohorte recibieron agonista un 43% de las pacientes, aunque su introducción se produjo en diferentes momentos a lo largo del seguimiento: en siete casos se indicó el tratamiento con agonista al término de la quimioterapia, en otras 16 al inicio de los ciclos menstruales, y en cinco más al observarse el incremento del estradiol sérico. Como es lógico, las pacientes que se hallaban bajo tratamiento con agonista no fueron incluidas en los análisis de asociación que afectaban a variables como AMH, FSH o RFA, por su efecto supresor de la actividad ovárica. En consecuencia, la pérdida global de observaciones valorables para el análisis sobre reaparición de ciclos representó un 17%, es decir, tres veces más de lo esperado.

La consecuencia global de estos hechos ha sido la reducción de la potencia real del estudio, que limita la posibilidad de concluir sobre la ausencia de diferencias observadas en la muestra para algunos contrastes. En el caso de la AMH estratificada por 4 ng/mL, cuya asociación con la reaparición de ciclos a lo largo del tiempo está próxima a la significación estadística (HR: 0,48; IC 95%: 0,23; 1,03; p=0,06), el contraste se ha realizado con una potencia final inferior al 10%, por lo que no resulta posible concluir acerca de la no asociación.

La concentración de FSH en pacientes sin tratamiento con agonista fue descendiendo gradualmente a lo largo de los 12 primeros meses del periodo de observación, tras los

## Discusión

cuales no se produjeron reducciones adicionales sustanciales. Esta evolución no fue evidente para la AMH sérica ni para el RFA, cuya evolución es estable o ligeramente descendente. No se ha contrastado estadísticamente la magnitud de estas diferencias, ya que el incremento de la FSH y el descenso de la AMH y del RFA tras la exposición a quimioterapia ha sido ampliamente descrito, y su valoración no está relacionada con el objetivo del estudio ni incluida en la hipótesis conceptual que se deriva de la misma.

### 6.4. IMPLICACIONES PARA LA PRÁCTICA CLÍNICA

La posibilidad de estimar fiablemente la reserva ovárica —e idealmente la fertilidad futura— de las pacientes quimiotratadas, o la respuesta a una eventual estimulación ovárica para tratar una esterilidad sobrevenida, resulta de evidente interés en pacientes en edad reproductiva diagnosticadas de cáncer [84]. Nuestro estudio aporta nuevas evidencias sobre esta asociación, por medio de análisis realizados específicamente en las pacientes premenopaúsicas en edad reproductiva que son la población diana de las intervenciones informativas, preventivas y terapéuticas frente a un posible daño germinal quimiotóxico.

Los resultados de nuestro estudio se añaden a los que avalan el uso del RFA como estimador de reserva ovárica basal útil en la clasificación pronóstica de las pacientes. Este procedimiento de diagnóstico ultrasonográfico goza de una amplia difusión entre los profesionales de la medicina reproductiva, se aplica de manera habitual en la estimación de la reserva ovárica con fines de estimulación ovárica en el contexto de los tratamientos de reproducción asistida y requiere un periodo de aprendizaje breve. La comparación crítica de su utilidad pronóstica en relación con su principal alternativa, la determinación de AMH sérica, no ha podido derivarse de este estudio.

En términos de utilidad predictiva, el modelo de estimación de probabilidad de restablecimiento de ciclos que resulta de elección entre los analizados, consta de variables accesibles en los entornos habituales de práctica clínica. Aunque el balance entre su valor predictivo positivo y negativo no resulta ideal, la fiabilidad de la predicción positiva resulta elevada, y permite asumir como certeros los pronósticos de reaparición de la menstruación.

## Discusión

### 6.5. IMPLICACIONES PARA LA INVESTIGACIÓN

El efecto de la quimioexposición sobre la fertilidad posterior en pacientes con cáncer de mama en edad reproductiva requiere análisis que, idealmente, deberían ceñirse a algunas de las características del diseño del presente estudio, y al tiempo, superar algunas de las limitaciones que han afectado al presente estudio:

- La población analizada deben ser las mujeres premenopáusicas en el rango de edades en las que el deseo gestacional tras la quimioterapia sea probable. Considerando las limitaciones de la fertilidad natural derivadas de la edad en población general, la edad promedio de abordaje de la maternidad en nuestro medio, y la duración mínima del tratamiento adyuvante en pacientes con tumores estrogénosensibles, el límite superior de edad de la población de interés debería ser más cercano a 38 que a 40 años.
- La reserva ovárica previa a la quimioexposición que cabe esperar en estas pacientes es la que corresponde a la población general comparable por edad. Ello determinará una menor variabilidad en los estimadores de reserva ovárica previa a la quimioterapia. En consecuencia, las distribuciones de parámetros como el RFA y la AMH prequimioterapia se caracterizarán por una relativa homogeneidad. La consecuencia más inmediata, desde el punto de vista de la factibilidad de estudios posteriores, será la necesidad de un tamaño muestral de magnitud inicial no escasa.
- La práctica consolidada de añadir tratamiento con agonistas de la GnRH a las pacientes premenopáusicas con tumores estrogénosensibles incrementará el porcentaje de pérdidas no imputables al celo del investigador. Es decir, el número de observaciones aptas para analizar la capacidad de predicción del fallo ovárico clínico y oculto por medio de estimadores como AMH y RFA, susceptibles de modificación por el tratamiento con agonistas, puede requerir correcciones del tamaño muestral por previsión realista de pérdidas de hasta el 50%
- Por otro lado, la direccionalidad ideal de futuros estudios debería ser prospectiva, con objeto de lograr un control de sesgos adecuado. Este argumento, unido a la necesidad de generar conjuntos de observaciones con un alto porcentaje de pérdidas no evitables, prolongará muy probablemente los periodos de reclutamiento de pacientes. A lo largo de los mismos, pueden surgir cambios en la conducta terapéutica –como ha sucedido con la frecuencia del uso de agonistas en el esquema de hormonoterapia adyuvante, o con la introducción de la quimioterapia basada en taxanos–, que impongan la necesidad de análisis de subgrupos o tengan efecto sobre el número de observaciones válidas reclutadas.

## Discusión

- Los estimadores de reserva ovárica utilizados deberían los más reproducibles, repetibles y robustos posibles. En consecuencia, sería necesario utilizar un bioensayo de segunda generación para la determinación de AMH, con coeficientes de variación inter e intraensayo conocidos y dentro del rango admisible para pruebas diagnósticas en biopatología clínica. Igualmente, la precisión del RFA debería ser evaluada en cada centro y para cada observador.
- En un diseño ideal, la estimación de la fertilidad posterior a la quimioterapia debería basarse en el resultado más relevante, que es sin duda la frecuencia de nacido vivo. La singularidad del cáncer de mama, en comparación con otras neoplasias quimiotrables, hace que el abordaje del deseo gestacional tras el tratamiento siga siendo poco frecuente entre las pacientes afectadas. Ello representa una dificultad añadida a las ya mencionadas para el diseño de cohortes con tamaño suficiente para concluir con potencias sobre las diferencias hipotetizadas. Por ello, es necesario asumir variables intermedias de resultado, tales como la reserva ovárica estimada o la frecuencia de amenorrea. Ésta última representa sólo una parte, minoritaria además, del impacto de la quimioterapia en la fertilidad potencial de las pacientes, que debería ser evaluada considerando la totalidad de la afectación, y no sólo su expresión más intensa y desfavorable. La ausencia de una definición consensuada de reserva ovárica críticamente reducida para la edad dificulta la adopción de un criterio unánime como variable de resultado principal, pero el establecimiento de un acuerdo al respecto, limitado a propósitos de investigación, es imprescindible para la comparabilidad de futuros estudios.
- El análisis de la capacidad predictiva de los estimadores de reserva ovárica resulta de especial interés en ciertos subgrupos con perfiles terapéuticos concretos. El posible efecto protector del uso simultáneo de agonistas de la GnRH, y la toxicidad específica de los taxanos son dos estrategias que no han sido evaluadas de forma específica en relación con el efecto potencial sobre la fertilidad posterior.

## **Discusión**

# CONCLUSIONES



## Conclusiones

### 7. CONCLUSIONES

1. La reserva folicular ovárica, estimada por medio del recuento de folículos antrales, determina la probabilidad de restablecimiento de ciclos tras exposición a quimioterapia en pacientes en edad reproductiva afectadas por cáncer de mama.
2. El número de folículos antrales identificado como umbral de riesgo para amenorrea definitiva es superior al propuesto para la identificación de pacientes con baja respuesta a la estimulación ovárica.
3. La existencia de un recuento de folículos antrales menor de 12 triplica el riesgo estimado de amenorrea definitiva tras quimioterapia, efecto que resulta tan intenso como el de la edad superior a 32 años.
4. El mejor modelo predictivo de restablecimiento de ciclos, basado según nuestro análisis en la edad, el recuento de folículos antrales, la concentración de AMH sérica y el IMC, sólo resulta adecuadamente fiable en la predicción del resultado positivo.
5. La reserva ovárica previa, estimada por medio del recuento de folículos antrales aislado o en combinación con la concentración AMH sérica, parece útil para evaluar el riesgo de fallo ovárico oculto al final del seguimiento en pacientes quimioexpuestas.

## **Conclusiones**

# BIBLIOGRAFÍA



## Bibliografía

### 8. BIBLIOGRAFÍA

1. <http://www.ine.es>.
2. Aebi, S., et al., *Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann Oncol, 2011. **22 Suppl 6**: p. vi12-24.
3. Ghafoor, A., et al., *Trends in breast cancer by race and ethnicity*. CA Cancer J Clin, 2003. **53**(6): p. 342-55.
4. Martin, M., et al., *Adjuvant docetaxel for node-positive breast cancer*. N Engl J Med, 2005. **352**(22): p. 2302-13.
5. Brewster, A.M., et al., *Residual risk of breast cancer recurrence 5 years after adjuvant therapy*. J Natl Cancer Inst, 2008. **100**(16): p. 1179-83.
6. Colleoni, M., et al., *Annual Hazard Rates of Recurrence for Breast Cancer During 24 Years of Follow-Up: Results From the International Breast Cancer Study Group Trials I to V*. J Clin Oncol, 2016. **34**(9): p. 927-35.
7. <http://seer.cancer.gov>.
8. Berkowitz, G.S., et al., *Delayed childbearing and the outcome of pregnancy*. N Engl J Med, 1990. **322**(10): p. 659-64.
9. Martin, J.A., et al., *Births: final data for 2005*. Natl Vital Stat Rep, 2007. **56**(6): p. 1-103.
10. Ventura, S.J., *First births to older mothers, 1970-86*. Am J Public Health, 1989. **79**(12): p. 1675-7.
11. Hudson, M.M., et al., *Efficacy and toxicity of multiagent chemotherapy and low-dose involved-field radiotherapy in children and adolescents with Hodgkin's disease*. J Clin Oncol, 1993. **11**(1): p. 100-8.
12. Thibaud, E., et al., *Ovarian function after bone marrow transplantation during childhood*. Bone Marrow Transplant, 1998. **21**(3): p. 287-90.
13. Azim, H.A., Jr., et al., *Safety of pregnancy following breast cancer diagnosis: a meta-analysis of 14 studies*. Eur J Cancer, 2011. **47**(1): p. 74-83.
14. Azim, H.A., Jr., et al., *Prognostic impact of pregnancy after breast cancer according to estrogen receptor status: a multicenter retrospective study*. J Clin Oncol, 2013. **31**(1): p. 73-9.
15. Kroman, N., et al., *Pregnancy after treatment of breast cancer--a population-based study on behalf of Danish Breast Cancer Cooperative Group*. Acta Oncol, 2008. **47**(4): p. 545-9.
16. Goldrat, O., et al., *Pregnancy following breast cancer using assisted reproduction and its effect on long-term outcome*. Eur J Cancer, 2015. **51**(12): p. 1490-6.
17. Partridge, A.H., et al., *Web-based survey of fertility issues in young women with breast cancer*. J Clin Oncol, 2004. **22**(20): p. 4174-83.
18. Thewes, B., et al., *Fertility- and menopause-related information needs of younger women with a diagnosis of early breast cancer*. J Clin Oncol, 2005. **23**(22): p. 5155-65.
19. Peate, M., et al., *Development and pilot testing of a fertility decision aid for young women diagnosed with early breast cancer*. Breast J, 2011. **17**(1): p. 112-4.
20. Camp-Sorrell, D., *Cancer and its treatment effect on young breast cancer survivors*. Semin Oncol Nurs, 2009. **25**(4): p. 251-8.
21. Duffy, C. and S. Allen, *Medical and psychosocial aspects of fertility after cancer*. Cancer J, 2009. **15**(1): p. 27-33.
22. Ruddy, K.J. and A.H. Partridge, *The unique reproductive concerns of young women with breast cancer*. Adv Exp Med Biol, 2012. **732**: p. 77-87.
23. Canada, A.L. and L.R. Schover, *The psychosocial impact of interrupted childbearing in long-term female cancer survivors*. Psychooncology, 2012. **21**(2): p. 134-43.
24. Goldfarb, S.B., et al., *Fertility Preservation for the Young Breast Cancer Patient*. Ann Surg Oncol, 2016. **23**(5): p. 1530-6.
25. Lee, S., et al., *Anti-Mullerian hormone and antral follicle count as predictors for embryo/oocyte cryopreservation cycle outcomes in breast cancer patients*

## Bibliografía

- stimulated with letrozole and follicle stimulating hormone*. J Assist Reprod Genet, 2011. **28**(7): p. 651-6.
26. Senkus, E., et al., *Attitudes of young patients with breast cancer toward fertility loss related to adjuvant systemic therapies*. EORTC study 10002 BIG 3-98. Psychooncology, 2014. **23**(2): p. 173-82.
27. Coates, A.S., et al., *Tailoring therapies--improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015*. Ann Oncol, 2015. **26**(8): p. 1533-46.
28. Paik, S., et al., *A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer*. N Engl J Med, 2004. **351**(27): p. 2817-26.
29. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 747-52.
30. Perou, C.M., et al., *Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(16): p. 9212-7.
31. Sorlie, T., et al., *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(19): p. 10869-74.
32. van 't Veer, L.J., et al., *Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer*. Nature, 2002. **415**(6871): p. 530-6.
33. Sorlie, T., et al., *Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(14): p. 8418-23.
34. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, G., *Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials*. Lancet, 2005. **365**(9472): p. 1687-717.
35. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, G., et al., *Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials*. Lancet, 2012. **379**(9814): p. 432-44.
36. Fisher, B., et al., *Two months of doxorubicin-cyclophosphamide with and without interval reinduction therapy compared with 6 months of cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in positive-node breast cancer patients with tamoxifen-nonresponsive tumors: results from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-15*. J Clin Oncol, 1990. **8**(9): p. 1483-96.
37. French Adjuvant Study, G., *Benefit of a high-dose epirubicin regimen in adjuvant chemotherapy for node-positive breast cancer patients with poor prognostic factors: 5-year follow-up results of French Adjuvant Study Group 05 randomized trial*. J Clin Oncol, 2001. **19**(3): p. 602-11.
38. Henderson, I.C., et al., *Improved outcomes from adding sequential Paclitaxel but not from escalating Doxorubicin dose in an adjuvant chemotherapy regimen for patients with node-positive primary breast cancer*. J Clin Oncol, 2003. **21**(6): p. 976-83.
39. De Laurentiis, M., et al., *Taxane-based combinations as adjuvant chemotherapy of early breast cancer: a meta-analysis of randomized trials*. J Clin Oncol, 2008. **26**(1): p. 44-53.
40. Jones, S.E., et al., *Phase III trial comparing doxorubicin plus cyclophosphamide with docetaxel plus cyclophosphamide as adjuvant therapy for operable breast cancer*. J Clin Oncol, 2006. **24**(34): p. 5381-7.
41. von Minckwitz, G., et al., *Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes*. J Clin Oncol, 2012. **30**(15): p. 1796-804.
42. Perez, E.A., et al., *Four-year follow-up of trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: joint analysis of data from NCCTG N9831 and NSABP B-31*. J Clin Oncol, 2011. **29**(25): p. 3366-73.

## Bibliografía

43. Gianni, L., et al., *Treatment with trastuzumab for 1 year after adjuvant chemotherapy in patients with HER2-positive early breast cancer: a 4-year follow-up of a randomised controlled trial*. Lancet Oncol, 2011. **12**(3): p. 236-44.
44. Slamon, D., et al., *Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer*. N Engl J Med, 2011. **365**(14): p. 1273-83.
45. Knoop, A.S., et al., *Value of epidermal growth factor receptor, HER2, p53, and steroid receptors in predicting the efficacy of tamoxifen in high-risk postmenopausal breast cancer patients*. J Clin Oncol, 2001. **19**(14): p. 3376-84.
46. De Placido, S., et al., *Twenty-year results of the Naples GUN randomized trial: predictive factors of adjuvant tamoxifen efficacy in early breast cancer*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(3): p. 1039-46.
47. Allred, D.C., et al., *HER-2/neu in node-negative breast cancer: prognostic significance of overexpression influenced by the presence of in situ carcinoma*. J Clin Oncol, 1992. **10**(4): p. 599-605.
48. von Minckwitz, G., et al., *Integrating c into current neoadjuvant chemotherapy regimen for primary breast cancer. Safety results of the GeparQuinto trial*. Ann Oncol, 2011. **22**(2): p. 301-6.
49. Gianni, L., et al., *Neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab followed by adjuvant trastuzumab versus neoadjuvant chemotherapy alone, in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (the NOAH trial): a randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort*. Lancet, 2010. **375**(9712): p. 377-84.
50. Baselga, J., et al., *Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial*. Lancet, 2012. **379**(9816): p. 633-40.
51. Gianni, L., et al., *Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a randomised multicentre, open-label, phase 2 trial*. Lancet Oncol, 2012. **13**(1): p. 25-32.
52. Baselga, J., et al., *Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer*. N Engl J Med, 2012. **366**(2): p. 109-19.
53. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, G., et al., *Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials*. Lancet, 2011. **378**(9793): p. 771-84.
54. Davies, C., et al., *Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial*. Lancet, 2013. **381**(9869): p. 805-16.
55. Sanz, A. and M.L. Del Valle, *Extending Adjuvant Aromatase-Inhibitor Therapy to 10 Years*. N Engl J Med, 2016. **375**(16): p. 1590.
56. Pagani, O., et al., *Adjuvant exemestane with ovarian suppression in premenopausal breast cancer*. N Engl J Med, 2014. **371**(2): p. 107-18.
57. Francis, P.A., et al., *Adjuvant ovarian suppression in premenopausal breast cancer*. N Engl J Med, 2015. **372**(5): p. 436-46.
58. Pritchard, K., *Early stage breast cancer treatment in premenopausal women*, in <http://www.uptodate.com>, D.F. Hayes, Editor. 2016.
59. Oktay, K., et al., *Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue*. Fertil Steril, 1997. **67**(3): p. 481-6.
60. Lass, A., et al., *Follicular density in ovarian biopsy of infertile women: a novel method to assess ovarian reserve*. Hum Reprod, 1997. **12**(5): p. 1028-31.
61. Di Giacomo, M., et al., *Distinct DNA-damage-dependent and -independent responses drive the loss of oocytes in recombination-defective mouse mutants*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(3): p. 737-42.

## Bibliografía

62. Perez, G.I., et al., *Genetic variance modifies apoptosis susceptibility in mature oocytes via alterations in DNA repair capacity and mitochondrial ultrastructure*. Cell Death Differ, 2007. **14**(3): p. 524-33.
63. Arnon, J., et al., *Genetic and teratogenic effects of cancer treatments on gametes and embryos*. Hum Reprod Update, 2001. **7**(4): p. 394-403.
64. Meirou, D. and E. Schiff, *Appraisal of chemotherapy effects on reproductive outcome according to animal studies and clinical data*. J Natl Cancer Inst Monogr, 2005(34): p. 21-5.
65. Roness, H., L. Kalich-Philosoph, and D. Meirou, *Prevention of chemotherapy-induced ovarian damage: possible roles for hormonal and non-hormonal attenuating agents*. Hum Reprod Update, 2014. **20**(5): p. 759-74.
66. Green, D.M., et al., *Pregnancy outcome of female survivors of childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study*. Am J Obstet Gynecol, 2002. **187**(4): p. 1070-80.
67. Dalberg, K., J. Eriksson, and L. Holmberg, *Birth outcome in women with previously treated breast cancer--a population-based cohort study from Sweden*. PLoS Med, 2006. **3**(9): p. e336.
68. McGee, E.A. and A.J. Hsueh, *Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles*. Endocr Rev, 2000. **21**(2): p. 200-14.
69. Gougeon, A., *Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results*. Hum Reprod, 1986. **1**(2): p. 81-7.
70. Utsunomiya, T., et al., *A novel molecular mechanism for anticancer drug-induced ovarian failure: Irinotecan HCl, an anticancer topoisomerase I inhibitor, induces specific FasL expression in granulosa cells of large ovarian follicles to enhance follicular apoptosis*. Int J Oncol, 2008. **32**(5): p. 991-1000.
71. Perez, G.I., et al., *Apoptosis-associated signaling pathways are required for chemotherapy-mediated female germ cell destruction*. Nat Med, 1997. **3**(11): p. 1228-32.
72. Oktem, O. and K. Oktay, *Quantitative assessment of the impact of chemotherapy on ovarian follicle reserve and stromal function*. Cancer, 2007. **110**(10): p. 2222-9.
73. Baird, D.T., et al., *Long-term ovarian function in sheep after ovariectomy and autotransplantation of cryopreserved cortical strips*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2004. **113 Suppl 1**: p. S55-9.
74. Soleimani, R., et al., *Mechanisms of chemotherapy-induced human ovarian aging: double strand DNA breaks and microvascular compromise*. Aging (Albany NY), 2011. **3**(8): p. 782-93.
75. Kurita, T., et al., *Differential expression of p63 isoforms in female reproductive organs*. Mech Dev, 2005. **122**(9): p. 1043-55.
76. Livera, G., et al., *p63 null mutation protects mouse oocytes from radio-induced apoptosis*. Reproduction, 2008. **135**(1): p. 3-12.
77. Kerr, J.B., et al., *DNA damage-induced primordial follicle oocyte apoptosis and loss of fertility require TAp63-mediated induction of Puma and Noxa*. Mol Cell, 2012. **48**(3): p. 343-52.
78. Meirou, D., et al., *Cortical fibrosis and blood-vessels damage in human ovaries exposed to chemotherapy. Potential mechanisms of ovarian injury*. Hum Reprod, 2007. **22**(6): p. 1626-33.
79. Bar-Joseph, H., et al., *In vivo bioimaging as a novel strategy to detect doxorubicin-induced damage to gonadal blood vessels*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e23492.
80. Ben-Aharon, I., et al., *Long-Term Follow-Up of Chemotherapy-Induced Ovarian Failure in Young Breast Cancer Patients: The Role of Vascular Toxicity*. Oncologist, 2015. **20**(9): p. 985-91.
81. Bedoschi, G., P.A. Navarro, and K. Oktay, *Chemotherapy-induced damage to ovary: mechanisms and clinical impact*. Future Oncol, 2016. **12**(20): p. 2333-44.

## Bibliografía

82. Durlinger, A.L., et al., *Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary*. *Endocrinology*, 1999. **140**(12): p. 5789-96.
83. Blumenfeld, Z. and M. von Wolff, *GnRH-analogues and oral contraceptives for fertility preservation in women during chemotherapy*. *Hum Reprod Update*, 2008. **14**(6): p. 543-52.
84. Peigne, M. and C. Decanter, *Serum AMH level as a marker of acute and long-term effects of chemotherapy on the ovarian follicular content: a systematic review*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2014. **12**: p. 26.
85. Dunlop, C.E. and R.A. Anderson, *Uses of anti-Mullerian hormone (AMH) measurement before and after cancer treatment in women*. *Maturitas*, 2015. **80**(3): p. 245-50.
86. Barnabei, A., et al., *Predicting Ovarian Activity in Women Affected by Early Breast Cancer: A Meta-Analysis-Based Nomogram*. *Oncologist*, 2015. **20**(10): p. 1111-8.
87. Anderson, R.A., et al., *Pretreatment anti-Mullerian hormone predicts for loss of ovarian function after chemotherapy for early breast cancer*. *Eur J Cancer*, 2013. **49**(16): p. 3404-11.
88. Su, H.I., et al., *Antimullerian hormone and inhibin B are hormone measures of ovarian function in late reproductive-aged breast cancer survivors*. *Cancer*, 2010. **116**(3): p. 592-9.
89. Kalich-Philosoph, L., et al., *Cyclophosphamide triggers follicle activation and "burnout"; AS101 prevents follicle loss and preserves fertility*. *Sci Transl Med*, 2013. **5**(185): p. 185ra62.
90. Adhikari, D. and K. Liu, *Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles*. *Endocr Rev*, 2009. **30**(5): p. 438-64.
91. Wallace, W.H., R.A. Anderson, and D.S. Irvine, *Fertility preservation for young patients with cancer: who is at risk and what can be offered?* *Lancet Oncol*, 2005. **6**(4): p. 209-18.
92. Kawamura, K., et al., *Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(43): p. 17474-9.
93. Maiani, E., et al., *Reply to: Cisplatin-induced primordial follicle oocyte killing and loss of fertility are not prevented by imatinib*. *Nat Med*, 2012. **18**(8): p. 1172-4.
94. Del Mastro, L., et al., *Amenorrhea induced by adjuvant chemotherapy in early breast cancer patients: prognostic role and clinical implications*. *Breast Cancer Res Treat*, 1997. **43**(2): p. 183-90.
95. Partridge, A., et al., *Age of menopause among women who remain premenopausal following treatment for early breast cancer: long-term results from International Breast Cancer Study Group Trials V and VI*. *Eur J Cancer*, 2007. **43**(11): p. 1646-53.
96. Sukumvanich, P., et al., *Incidence and time course of bleeding after long-term amenorrhea after breast cancer treatment: a prospective study*. *Cancer*, 2010. **116**(13): p. 3102-11.
97. Partridge, A.H., et al., *Ovarian reserve in women who remain premenopausal after chemotherapy for early stage breast cancer*. *Fertil Steril*, 2010. **94**(2): p. 638-44.
98. Scott, R.T., et al., *Life table analysis of pregnancy rates in a general infertility population relative to ovarian reserve and patient age*. *Hum Reprod*, 1995. **10**(7): p. 1706-10.
99. Anderson, R.A., et al., *The effects of chemotherapy and long-term gonadotrophin suppression on the ovarian reserve in premenopausal women with breast cancer*. *Hum Reprod*, 2006. **21**(10): p. 2583-92.
100. Lutchman Singh, K., et al., *Predictors of ovarian reserve in young women with breast cancer*. *Br J Cancer*, 2007. **96**(12): p. 1808-16.

## Bibliografía

101. Letourneau, J.M., et al., *Acute ovarian failure underestimates age-specific reproductive impairment for young women undergoing chemotherapy for cancer*. Cancer, 2012. **118**(7): p. 1933-9.
102. Cohen, J., N. Chabbert-Buffet, and E. Darai, *Diminished ovarian reserve, premature ovarian failure, poor ovarian responder--a plea for universal definitions*. J Assist Reprod Genet, 2015. **32**(12): p. 1709-12.
103. Zhao, J., et al., *What lies behind chemotherapy-induced amenorrhea for breast cancer patients: a meta-analysis*. Breast Cancer Res Treat, 2014. **145**(1): p. 113-28.
104. Sonmezer, M. and K. Oktay, *Fertility preservation in young women undergoing breast cancer therapy*. Oncologist, 2006. **11**(5): p. 422-34.
105. Petrek, J.A., et al., *Incidence, time course, and determinants of menstrual bleeding after breast cancer treatment: a prospective study*. J Clin Oncol, 2006. **24**(7): p. 1045-51.
106. Long, J.P., et al., *DTC chemotherapy regimen is associated with higher incidence of premature ovarian failure in women of reproductive age with breast cancer*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016. **20**(6): p. 1087-92.
107. Pourali, L., et al., *Incidence of chemotherapy-induced amenorrhea after adjuvant chemotherapy with taxane and anthracyclines in young patients with breast cancer*. Iran J Cancer Prev, 2013. **6**(3): p. 147-50.
108. Tiong, V., et al., *Incidence of chemotherapy-induced ovarian failure in premenopausal women undergoing chemotherapy for breast cancer*. World J Surg, 2014. **38**(9): p. 2288-96.
109. Ruddy, K.J., et al., *Chemotherapy-related amenorrhea after adjuvant paclitaxel-trastuzumab (APT trial)*. Breast Cancer Res Treat, 2015. **151**(3): p. 589-96.
110. Silva, C., et al., *Factors associated with ovarian function recovery after chemotherapy for breast cancer: a systematic review and meta-analysis*. Hum Reprod, 2016. **31**(12): p. 2737-2749.
111. Blomberg Jensen, M., et al., *Temporal Trends in Fertility Rates: A Nationwide Registry Based Study from 1901 to 2014*. PLoS One, 2015. **10**(12): p. e0143722.
112. Faddy, M.J. and R.G. Gosden, *A model conforming the decline in follicle numbers to the age of menopause in women*. Hum Reprod, 1996. **11**(7): p. 1484-6.
113. Broekmans, F.J., M.R. Soules, and B.C. Fauser, *Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences*. Endocr Rev, 2009. **30**(5): p. 465-93.
114. Block, E., *Quantitative morphological investigations of the follicular system in women; variations at different ages*. Acta Anat (Basel), 1952. **14**(1-2): p. 108-23.
115. Gougeon, A. and G.B. Chainy, *Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different ages*. J Reprod Fertil, 1987. **81**(2): p. 433-42.
116. Richardson, S.J., V. Senikas, and J.F. Nelson, *Follicular depletion during the menopausal transition: evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion*. J Clin Endocrinol Metab, 1987. **65**(6): p. 1231-7.
117. Hansen, K.R., et al., *A new model of reproductive aging: the decline in ovarian non-growing follicle number from birth to menopause*. Hum Reprod, 2008. **23**(3): p. 699-708.
118. Grant, J., et al., *Trends in European fertility: should Europe try to increase its fertility rate...or just manage the consequences?* Int J Androl, 2006. **29**(1): p. 17-24.
119. Wallace, W.H. and T.W. Kelsey, *Human ovarian reserve from conception to the menopause*. PLoS One, 2010. **5**(1): p. e8772.
120. Meczekalski, B., et al., *Fertility in women of late reproductive age: the role of serum anti-Mullerian hormone (AMH) levels in its assessment*. J Endocrinol Invest, 2016. **39**(11): p. 1259-1265.
121. Battaglia, D.E., et al., *Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women*. Hum Reprod, 1996. **11**(10): p. 2217-22.

## Bibliografía

122. Kuliev, A., J. Cieslak, and Y. Verlinsky, *Frequency and distribution of chromosome abnormalities in human oocytes*. *Cytogenet Genome Res*, 2005. **111**(3-4): p. 193-8.
123. Pellestor, F., T. Anahory, and S. Hamamah, *Effect of maternal age on the frequency of cytogenetic abnormalities in human oocytes*. *Cytogenet Genome Res*, 2005. **111**(3-4): p. 206-12.
124. Hunt, P.A. and T.J. Hassold, *Human female meiosis: what makes a good egg go bad?* *Trends Genet*, 2008. **24**(2): p. 86-93.
125. Farr, S.L., L.A. Schieve, and D.J. Jamieson, *Pregnancy loss among pregnancies conceived through assisted reproductive technology, United States, 1999-2002*. *Am J Epidemiol*, 2007. **165**(12): p. 1380-8.
126. Harton, G.L., et al., *Diminished effect of maternal age on implantation after preimplantation genetic diagnosis with array comparative genomic hybridization*. *Fertil Steril*, 2013. **100**(6): p. 1695-703.
127. Volarcik, K., et al., *The meiotic competence of in-vitro matured human oocytes is influenced by donor age: evidence that folliculogenesis is compromised in the reproductively aged ovary*. *Hum Reprod*, 1998. **13**(1): p. 154-60.
128. Levi, M., et al., *Morphological and molecular markers are correlated with maturation-competence of human oocytes*. *Hum Reprod*, 2013. **28**(9): p. 2482-9.
129. Johnson, M.T., et al., *Oxidative metabolism of pyruvate is required for meiotic maturation of murine oocytes in vivo*. *Biol Reprod*, 2007. **77**(1): p. 2-8.
130. Bines, J., D.M. Oleske, and M.A. Cobleigh, *Ovarian function in premenopausal women treated with adjuvant chemotherapy for breast cancer*. *J Clin Oncol*, 1996. **14**(5): p. 1718-29.
131. Davis, A.L., M. Klitus, and D.M. Mintzer, *Chemotherapy-induced amenorrhea from adjuvant breast cancer treatment: the effect of the addition of taxanes*. *Clin Breast Cancer*, 2005. **6**(5): p. 421-4.
132. Perez-Fidalgo, J.A., et al., *Incidence of chemotherapy-induced amenorrhea in hormone-sensitive breast cancer patients: the impact of addition of taxanes to anthracycline-based regimens*. *Breast Cancer Res Treat*, 2010. **120**(1): p. 245-51.
133. Valentini, A., et al., *Chemotherapy-induced amenorrhea in patients with breast cancer with a BRCA1 or BRCA2 mutation*. *J Clin Oncol*, 2013. **31**(31): p. 3914-9.
134. Meng, K., et al., *Impact of chemotherapy-induced amenorrhea in breast cancer patients: the evaluation of ovarian function by menstrual history and hormonal levels*. *World J Surg Oncol*, 2013. **11**: p. 101.
135. Jacobson, M.H., et al., *Menses resumption after cancer treatment-induced amenorrhea occurs early or not at all*. *Fertil Steril*, 2016. **105**(3): p. 765-72 e4.
136. Vriens, I.J., et al., *The correlation of age with chemotherapy-induced ovarian function failure in breast cancer patients*. *Oncotarget*, 2017.
137. Ruddy, K.J., et al., *Biomarker prediction of chemotherapy-related amenorrhea in premenopausal women with breast cancer participating in E5103*. *Breast Cancer Res Treat*, 2014. **144**(3): p. 591-7.
138. Meattini, I., et al., *Impact of age on cytotoxic-induced ovarian failure in breast cancer treated with adjuvant chemotherapy and triptorelin*. *Future Oncol*, 2016. **12**(5): p. 625-35.
139. Meldrum, D.R., et al., *Transvaginal ultrasound scanning of ovarian follicles*. *Fertil Steril*, 1984. **42**(5): p. 803-5.
140. Scheffer, G.J., et al., *Antral follicle counts by transvaginal ultrasonography are related to age in women with proven natural fertility*. *Fertil Steril*, 1999. **72**(5): p. 845-51.
141. Hendriks, D.J., et al., *Antral follicle count in the prediction of poor ovarian response and pregnancy after in vitro fertilization: a meta-analysis and comparison with basal follicle-stimulating hormone level*. *Fertil Steril*, 2005. **83**(2): p. 291-301.

## Bibliografía

142. Chang, M.Y., et al., *Use of the antral follicle count to predict the outcome of assisted reproductive technologies*. Fertil Steril, 1998. **69**(3): p. 505-10.
143. Bancsi, L.F., et al., *Predictors of poor ovarian response in in vitro fertilization: a prospective study comparing basal markers of ovarian reserve*. Fertil Steril, 2002. **77**(2): p. 328-36.
144. Depmann, M., et al., *The Relationship Between Variation in Size of the Primordial Follicle Pool and Age at Natural Menopause*. J Clin Endocrinol Metab, 2015. **100**(6): p. E845-51.
145. Depmann, M., et al., *Can we predict age at natural menopause using ovarian reserve tests or mother's age at menopause? A systematic literature review*. Menopause, 2016. **23**(2): p. 224-32.
146. Bancsi, L.F., et al., *Performance of basal follicle-stimulating hormone in the prediction of poor ovarian response and failure to become pregnant after in vitro fertilization: a meta-analysis*. Fertil Steril, 2003. **79**(5): p. 1091-100.
147. Jayaprakasan, K., et al., *A prospective, comparative analysis of anti-Mullerian hormone, inhibin-B, and three-dimensional ultrasound determinants of ovarian reserve in the prediction of poor response to controlled ovarian stimulation*. Fertil Steril, 2010. **93**(3): p. 855-64.
148. Ashrafi, M., et al., *Predictive values of anti-mullerian hormone, antral follicle count and ovarian response prediction index (ORPI) for assisted reproductive technology outcomes*. J Obstet Gynaecol, 2016: p. 1-7.
149. Scheffer, G.J., et al., *The number of antral follicles in normal women with proven fertility is the best reflection of reproductive age*. Hum Reprod, 2003. **18**(4): p. 700-6.
150. Broekmans, F.J., et al., *A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome*. Hum Reprod Update, 2006. **12**(6): p. 685-718.
151. Hendriks, D.J., et al., *Ultrasonography as a tool for the prediction of outcome in IVF patients: a comparative meta-analysis of ovarian volume and antral follicle count*. Fertil Steril, 2007. **87**(4): p. 764-75.
152. Haadsma, M.L., et al., *The predictive value of ovarian reserve tests for spontaneous pregnancy in subfertile ovulatory women*. Hum Reprod, 2008. **23**(8): p. 1800-7.
153. Broer, S.L., et al., *Added value of ovarian reserve testing on patient characteristics in the prediction of ovarian response and ongoing pregnancy: an individual patient data approach*. Hum Reprod Update, 2013. **19**(1): p. 26-36.
154. Anderson, R.A. and D.A. Cameron, *Pretreatment serum anti-mullerian hormone predicts long-term ovarian function and bone mass after chemotherapy for early breast cancer*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(5): p. 1336-43.
155. Dillon, K.E., et al., *Pretreatment antimullerian hormone levels determine rate of posttherapy ovarian reserve recovery: acute changes in ovarian reserve during and after chemotherapy*. Fertil Steril, 2013. **99**(2): p. 477-83.
156. D'Avila, A.M., et al., *Age, anti-mullerian hormone, antral follicles count to predict amenorrhea or oligomenorrhea after chemotherapy with cyclophosphamide*. J Ovarian Res, 2015. **8**: p. 82.
157. Scott, R.T., et al., *Follicle-stimulating hormone levels on cycle day 3 are predictive of in vitro fertilization outcome*. Fertil Steril, 1989. **51**(4): p. 651-4.
158. La Marca, A., et al., *The use of ovarian reserve markers in IVF clinical practice: a national consensus*. Gynecol Endocrinol, 2016. **32**(1): p. 1-5.
159. Toner, J.P., et al., *Basal follicle-stimulating hormone level is a better predictor of in vitro fertilization performance than age*. Fertil Steril, 1991. **55**(4): p. 784-91.
160. Anders, C., et al., *A pilot study of predictive markers of chemotherapy-related amenorrhea among premenopausal women with early stage breast cancer*. Cancer Invest, 2008. **26**(3): p. 286-95.

## Bibliografía

161. Rosendahl, M., et al., *Dynamics and mechanisms of chemotherapy-induced ovarian follicular depletion in women of fertile age*. Fertil Steril, 2010. **94**(1): p. 156-66.
162. Yu, B., et al., *Changes in markers of ovarian reserve and endocrine function in young women with breast cancer undergoing adjuvant chemotherapy*. Cancer, 2010. **116**(9): p. 2099-105.
163. Su, H.C., et al., *Prechemotherapy antimullerian hormone, age, and body size predict timing of return of ovarian function in young breast cancer patients*. Cancer, 2014. **120**(23): p. 3691-8.
164. Durlinger, A.L., J.A. Visser, and A.P. Themmen, *Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone*. Reproduction, 2002. **124**(5): p. 601-9.
165. Weenen, C., et al., *Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment*. Mol Hum Reprod, 2004. **10**(2): p. 77-83.
166. Fanchin, R., et al., *Serum anti-Mullerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3*. Hum Reprod, 2003. **18**(2): p. 323-7.
167. Kevenaar, M.E., et al., *Serum anti-mullerian hormone levels reflect the size of the primordial follicle pool in mice*. Endocrinology, 2006. **147**(7): p. 3228-34.
168. Bentzen, J.G., et al., *Ovarian antral follicle subclasses and anti-mullerian hormone during normal reproductive aging*. J Clin Endocrinol Metab, 2013. **98**(4): p. 1602-11.
169. Tsepelidis, S., et al., *Stable serum levels of anti-Mullerian hormone during the menstrual cycle: a prospective study in normo-ovulatory women*. Hum Reprod, 2007. **22**(7): p. 1837-40.
170. Cakmak, H., et al., *Effective method for emergency fertility preservation: random-start controlled ovarian stimulation*. Fertil Steril, 2013. **100**(6): p. 1673-80.
171. Cakmak, H. and M.P. Rosen, *Random-start ovarian stimulation in patients with cancer*. Curr Opin Obstet Gynecol, 2015. **27**(3): p. 215-21.
172. Nielsen, S.N., et al., *A 10-year follow up of reproductive function in women treated for childhood cancer*. Reprod Biomed Online, 2013. **27**(2): p. 192-200.
173. Penarrubia, J., et al., *Basal and stimulation day 5 anti-Mullerian hormone serum concentrations as predictors of ovarian response and pregnancy in assisted reproductive technology cycles stimulated with gonadotropin-releasing hormone agonist--gonadotropin treatment*. Hum Reprod, 2005. **20**(4): p. 915-22.
174. Toner, J.P. and D.B. Seifer, *Why we may abandon basal follicle-stimulating hormone testing: a sea change in determining ovarian reserve using antimullerian hormone*. Fertil Steril, 2013. **99**(7): p. 1825-30.
175. Su, H.I., et al., *Impact of breast cancer on anti-mullerian hormone levels in young women*. Breast Cancer Res Treat, 2013. **137**(2): p. 571-7.
176. Bala, J., et al., *Chemotherapy: Impact on Anti-Mullerian Hormone Levels in Breast Carcinoma*. J Clin Diagn Res, 2016. **10**(2): p. BC19-21.
177. Tamura, N., et al., *Predictive factors of adjuvant therapy-related amenorrhea for patients with breast cancer*. J Clin Oncol, 2011. **29**(27\_suppl): p. 217.
178. Chai, J., et al., *A highly-sensitive anti-Mullerian hormone assay improves analysis of ovarian function following chemotherapy for early breast cancer*. Eur J Cancer, 2014. **50**(14): p. 2367-74.
179. Hamy, A.S., et al., *Ovarian reserve in breast cancer: assessment with anti-Mullerian hormone*. Reprod Biomed Online, 2014. **29**(5): p. 573-80.
180. Hamy, A.S., et al., *Anti-Mullerian hormone in breast cancer patients treated with chemotherapy: a retrospective evaluation of subsequent pregnancies*. Reprod Biomed Online, 2016. **32**(3): p. 299-307.
181. Henry, N.L., et al., *Prediction of postchemotherapy ovarian function using markers of ovarian reserve*. Oncologist, 2014. **19**(1): p. 68-74.

## Bibliografía

182. Webber, L., et al., *ESHRE Guideline: management of women with premature ovarian insufficiency*. Hum Reprod, 2016. **31**(5): p. 926-37.
183. Ferraretti, A.P., et al., *ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria*. Hum Reprod, 2011. **26**(7): p. 1616-24.
184. Edge, S.B. and C.C. Compton, *The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM*. Ann Surg Oncol, 2010. **17**(6): p. 1471-4.
185. Lakhani, S.R., I.A.f.R.o. Cancer, and W.H. Organization, *WHO classification of tumours of the breast / edited by Sunil R. Lakhani ... [et al.]*. in *World Health Organization classification of tumours, 4th edition ; fourth*. 2012, Lyon : International Agency for Research on Cancer, 2012.: France.
186. Elston, C.W. and I.O. Ellis, *Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up*. C. W. Elston & I. O. Ellis. *Histopathology* 1991; **19**; 403-410. *Histopathology*, 2002. **41**(3a): p. 151-2, discussion 152-3.
187. Sherman, B.M., J.H. West, and S.G. Korenman, *The menopausal transition: analysis of LH, FSH, estradiol, and progesterone concentrations during menstrual cycles of older women*. J Clin Endocrinol Metab, 1976. **42**(4): p. 629-36.
188. van Rooij, I.A., et al., *Anti-mullerian hormone is a promising predictor for the occurrence of the menopausal transition*. Menopause, 2004. **11**(6 Pt 1): p. 601-6.
189. van Rooij, I.A., et al., *Serum antimullerian hormone levels best reflect the reproductive decline with age in normal women with proven fertility: a longitudinal study*. Fertil Steril, 2005. **83**(4): p. 979-87.
190. Broer, S.L., et al., *Anti-mullerian hormone predicts menopause: a long-term follow-up study in normoovulatory women*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(8): p. 2532-9.
191. Tehrani, F.R., et al., *Predicting age at menopause from serum antimullerian hormone concentration*. Menopause, 2011. **18**(7): p. 766-70.
192. Broer, S.L., et al., *Anti-Mullerian hormone: ovarian reserve testing and its potential clinical implications*. Hum Reprod Update, 2014. **20**(5): p. 688-701.
193. Steiner, A.Z., et al., *Antimullerian hormone as a predictor of natural fecundability in women aged 30-42 years*. Obstet Gynecol, 2011. **117**(4): p. 798-804.
194. La Marca, A., et al., *Anti-Mullerian hormone-based prediction model for a live birth in assisted reproduction*. Reprod Biomed Online, 2011. **22**(4): p. 341-9.
195. Hagen, C.P., et al., *Low concentration of circulating antimullerian hormone is not predictive of reduced fecundability in young healthy women: a prospective cohort study*. Fertil Steril, 2012. **98**(6): p. 1602-8.e2.
196. Rombauts, L., et al., *The predictive value of antral follicle count remains unchanged across the menstrual cycle*. Fertil Steril, 2011. **96**(6): p. 1514-8.
197. Mavrelou, D., et al., *Variation in antral follicle counts at different times in the menstrual cycle: does it matter?* Reprod Biomed Online, 2016. **33**(2): p. 174-9.
198. Kim, H.A., et al., *Prognostic Value of Anti-Mullerian Hormone and Inhibin B in Patients with Premenopausal Hormone Receptor-positive Breast Cancer*. Anticancer Res, 2016. **36**(3): p. 1051-7.



