

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

Scuola di Scienze Mediche e Farmaceutiche



Corso di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia

Tesi di Laurea

***“Impatto di trastuzumab e/o lapatinib da soli o in combinazione con paclitaxel settimanale sulla riserva ovarica misurata con i valori sierici di ormone anti-mülleriano nelle giovani donne con carcinoma mammario precoce HER2-positivo: analisi dello studio clinico NeoALTTO”***

Relatore

Prof. Lambertini Matteo

Co-Relatrice

Prof.ssa Del Mastro Lucia

Candidato

Jacopo Ligato

ANNO ACCADEMICO 2020-2021

# Sommario

<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	<b>2</b>
1.1 <u>IL TUMORE DELLA MAMMELLA</u> .....	2
1.1.1 Epidemiologia, fattori di rischio e screening .....	2
1.1.2 Diagnosi, classificazione e stadiazione .....	6
1.2 <u>IL TUMORE DELLA MAMMELLA NELLA DONNA GIOVANE</u> .....	7
1.2.1 Caratteristiche principali del tumore della mammella in questa popolazione .....	7
1.2.2 Gonadotossicità dei trattamenti oncologici per neoplasia mammaria.....	8
1.2.3 Ormone anti-mülleriano (AMH) e riserva ovarica funzionale .....	10
1.2.4 Tecniche di preservazione della fertilità e della funzionalità ovarica .....	16
1.3 <u>I TRATTAMENTI DELLA NEOPLASIA MAMMARIA PRECOCE E LORO GONADOTOSSICITÀ NELLA DONNA GIOVANE</u> .....	19
1.3.1 Trattamento neoadiuvante .....	19
1.3.2 Trattamento adiuvante .....	19
1.3.3 Gonadotossicità dei farmaci anti-HER2.....	19
<b>2. MATERIALI E METODI</b> .....	<b>21</b>
2.1 <u>DISEGNO DELLO STUDIO</u> .....	21
2.2 <u>IL TUMORE DELLA MAMMELLA NELLA DONNA GIOVANE</u> .....	22
2.3 <u>OBIETTIVI DELLO STUDIO</u> .....	22
2.4 <u>ANALISI STATISTICHE</u> .....	22
<b>3. RISULTATI</b> .....	<b>24</b>
<b>4. DISCUSSIONE</b> .....	<b>32</b>
<b>5. CONCLUSIONI</b> .....	<b>36</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>37</b>

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 IL TUMORE DELLA MAMMELLA

### 1.1.1 Epidemiologia, fattori di rischio e screening

#### ✦ Incidenza

Il tumore al seno è, escludendo i carcinomi cutanei, la neoplasia più frequentemente diagnosticata in Italia nel sesso femminile in tutte le fasce d'età 0-49 anni (41%), 50-69 anni (35%) e >70 anni (22%) (1).

Rango	Maschi	Femmine	Totale
1°	Prostata (19%)	Mammella (30%)	Mammella (15%)
2°	Polmone (14%)	Colon-retto (11%)	Colon-retto (12%)
3°	Colon-retto (12%)	Polmone (7%)	Polmone (11%)
4°	Vescica (11%)	Tiroide (5%)	Prostata (10%)
5°	Fegato (5%)	Utero corpo (5%)	Vescica (7%)

Tabella 1. Definisce i primi cinque tumori più frequentemente diagnosticati in Italia 2020 (1).

Questi dati risultano sovrapponibili anche negli altri Paesi occidentali, tra cui gli USA (come visibile in figura 2): qui, in particolare, si prevede infatti che nel 2020 siano stati diagnosticati circa 280.000 nuovi casi di carcinoma mammario nelle donne (2).

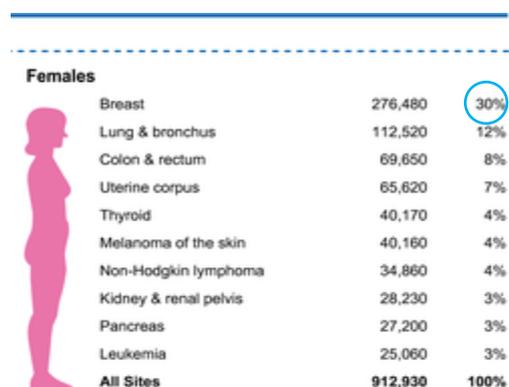


Figura 1. Nuovi casi stimati in USA nel 2020 (2).

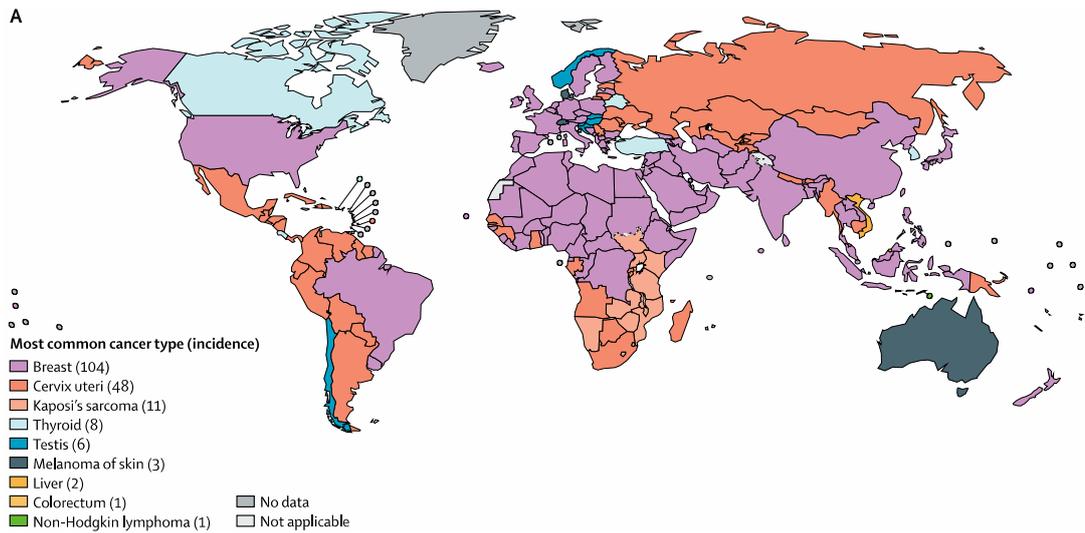


Figura 2. Mappa che illustra la distribuzione per Nazione delle neoplasie più frequenti nel 2012 in una popolazione tra 20-39 anni (3).

Il carcinoma mammario è la neoplasia più frequentemente diagnosticata nelle donne giovani, rappresentando più del 30% delle nuove diagnosi oncologiche in donne con meno di 40 anni.

L'incidenza in Italia appare in leggero aumento (+0,3% per anno): ciò è dato, in parte, al continuo calo del tasso di fertilità e all'aumento dell'obesità (1; 4); secondo le stime AIRTUM, le nuove diagnosi previste in Italia nel 2020 sono state circa 55.000 (circa il 30% delle neoplasie totali nelle donne – tabella 1) (1) – in figura 3, è rappresentato il trend negli Stati Uniti.

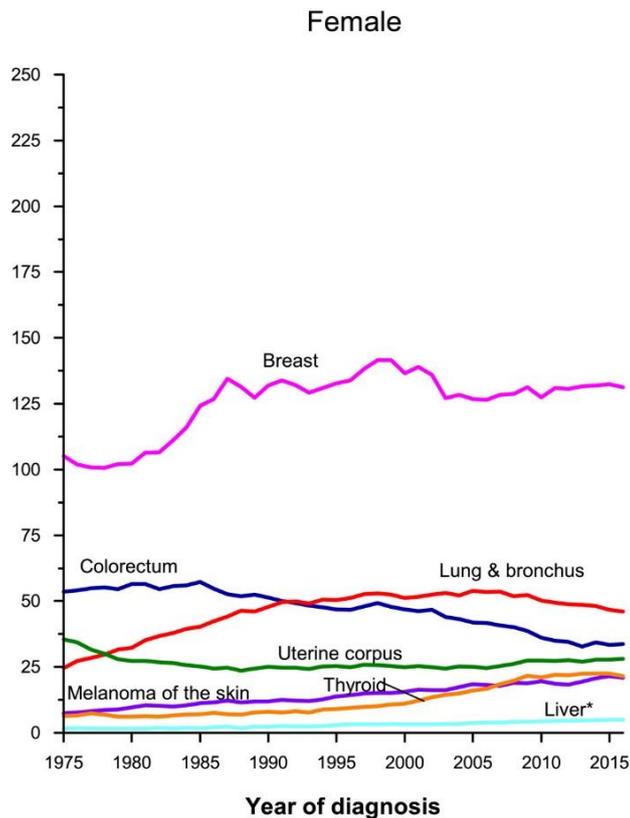


Figura 3. Trend di incidenza per tumori selezionati nelle donne, USA, 1975-2016. \*Include il condotto biliare intraepatico (2).

✦ *Sopravvivenza e mortalità*

I decessi in Italia per tumore al seno sono stati stimati in circa 12.300/anno, rappresentando così la prima causa di morte per tumore nelle donne (1): il trend è in riduzione (meno 6% dal 2015 al 2020) grazie alla maggiore diffusione dei programmi di diagnosi precoce e ai progressi terapeutici (1).

La sopravvivenza a 5 anni, in Italia, è pari all'87% (1) e risulta sovrapponibile negli USA (90%) (5).

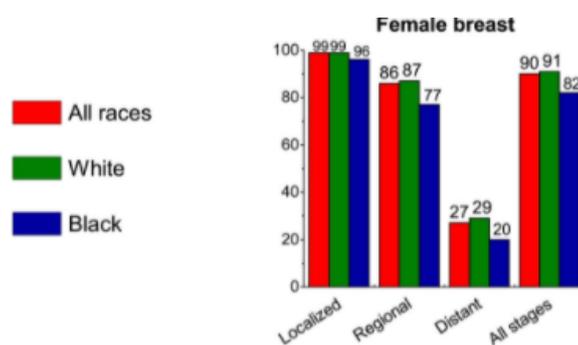


Figura 4. Tassi di sopravvivenza relativi a 5 anni per tumori al seno, razza e fase di diagnosi, USA, 2009-2015 (2).

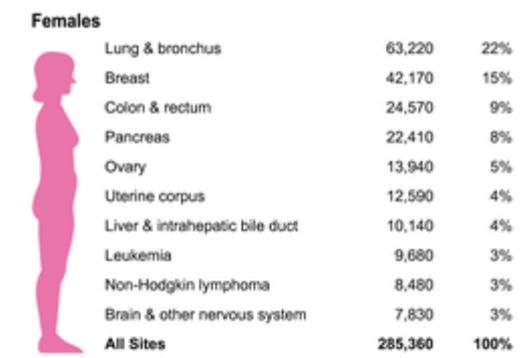


Figura 5. Numero decessi stimati in USA (2).

È probabile che i tassi di sopravvivenza della neoplasia mammaria siano elevati poiché è implementata la fase di screening. A partire dal 2017, il tasso di mortalità per cancro al seno femminile è sceso dal suo picco massimo di circa il 40% (dal 1989) (2).

#### ✦ *Fattori di rischio*

L'insorgenza della malattia risulta essere influenzata da più fattori:

- ✦ **Età:** la tendenza ad ammalarsi di tumore al seno incrementa in maniera direttamente proporzionale all'età: il rischio è del 2,3% nella fascia d'età 0-49 anni, aumentando al 5,4% tra i 50-69 anni e infine al 4,5% tra i 70-84 anni (1).  
Questi dati risultano sovrapponibili anche negli USA: infatti, nella fascia 0-49 anni si ha una probabilità di sviluppo di carcinoma mammario del 2,0%, nella fascia 50-59 anni del 2,4%, tra i 60-69 anni del 3,5% e, infine, nelle donne over-70 è del 7,0% (2). Questa proporzionalità diretta potrebbe essere dovuta all'associazione tra stimoli endocrini a carico dell'epitelio mammario ed alterazioni su DNA ed epigenetica. Tuttavia, nei Paesi in via di sviluppo questo dato risulta opposto (6).
- ✦ **Fattori ormonali:** l'impiego di una terapia a base di estroprogestinici in fase menopausale (eg. per ridurre rischio osteoporotico), soprattutto se a lungo termine, si correla con un incremento del rischio di sviluppare neoplasia mammaria. Dati controversi esistono per la contraccezione ormonale (7).
- ✦ **Fattori metabolici:** una dieta inopportuna, ricca di lipidi ed alcool e povera di fibre, ma anche comorbidità quali obesità e sindrome metabolica possono aumentare il rischio di carcinoma mammario (1).
- ✦ **Fattori riproduttivi:** la nulliparità (o un'unica gravidanza dopo i 30 anni), mancato allattamento al seno, maggiore esposizione dell'epitelio ghiandolare agli stimoli degli estrogeni endogeni (ie. prodotti a livello ovarico): sono tutti fattori che incrementano il rischio di insorgenza neoplastica.  
L'eccessiva esposizione agli estrogeni endogeni è evidenziabile maggiormente nella donna con menarca precoce e/o menopausa tardiva.
- ✦ **Genetica e familiarità:** alcune specifiche varianti patogenetiche germinali possono incrementarne lo sviluppo – eg. BRCA-1, BRCA-2, ATM, PALB-2, sindrome Li-Fraumeni, etc.  
Allo stesso modo, c'è un rischio aumentato nel caso in cui la donna presenti un'anamnesi positiva per neoplasie mammarie precedenti.

### 1.1.2 Classificazione istologica ed immunofenotipica

Tipo molecolare	ER	PR	HER2	Ki-67	Prognosi
<b>Luminale A</b>	+	+	-	Basso	Migliore
<b>Luminale B</b>	+	+	-	Elevato	Peggior del tipo
	+	+	+	Indifferente	Luminale A
<b>HER2+</b>	-	-	+	Indifferente	Peggior dei tipi Luminale in assenza di trattamento mirato
<b>Triplo Negativo</b>	-	-	-	Indifferente	Peggior

Tabella 2. Classificazione molecolare della neoplasia mammaria (1).

La neoplasia mammaria non è una singola entità ma è in realtà costituita da vari sottotipi biologici candidati a trattamenti medici completamente diversi (1):

- ✦ *Luminale A*: aver un basso valore di Ki-67 significa avere bassa attività proliferativa; hanno la prognosi migliore. La condizione in genere presenta un'elevata sensibilità alla terapia endocrina, meno alla chemioterapia.
- ✦ *Luminale B*: hanno aggressività maggiore rispetto ai Luminale A. Qui avrà maggiore rilievo la chemioterapia, che viene comunque sempre seguita dalla terapia endocrina.
- ✦ *HER2* (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2)+: esprimono il recettore 2 per il fattore di crescita epidermico umano, un recettore tirosin-chinasico che stimola la proliferazione e la crescita cellulare. In questi tumori è indicata la terapia target specifica che agisce inibendo questo recettore. In questo sottotipo la terapia migliore consta di chemioterapia e terapia target anti-HER2.
- ✦ *Triplo negativo*: non esprimono né i recettori ormonali né HER2. Sono i tumori a peggior prognosi, sia per la scarsa differenziazione che li rende altamente proliferanti sia per la minore disponibilità di trattamenti oncologici specifici oltre alla sola chemioterapia (che rimane il punto cardine in questo sottotipo di tumore).

## 1.2 IL TUMORE DELLA MAMMELLA NELLA DONNA GIOVANE

### 1.2.1 Caratteristiche principali del tumore della mammella in questa popolazione

I tumori al seno che sorgono nelle giovani donne, rispetto alle loro controparti nelle donne più anziane, sono caratterizzati da una percentuale più elevata di iper-espressione di HER2, invasione linfovaskolare, infiltrazione linfocitica. In questa categoria di pazienti si ha inoltre una maggiore incidenza di tumori triplo negativi e più frequentemente queste pazienti sono portatrici di varianti patogenetiche germinali ai geni BRCA1 e BRCA2 (8).

Recenti studi hanno dimostrato che le donne giovani hanno un pattern di incidenza e caratteristiche differenti di neoplasia mammaria, in particolare si è visto che le giovani donne si ammalano più frequentemente di forme biologicamente più aggressive: circa il 20% dei tumori diagnosticati in donne in età fertile sono HER2 positivi e il 10-15% triplo negativi (8). Tuttavia, i tumori luminal-like restano quelli più frequentemente diagnosticati anche in questa fascia d'età, con una maggiore incidenza di tumori ad alta proliferazione (Luminale B) e con un generale andamento peggiore rispetto a quello osservato nelle donne in post-menopausa (8).

Per questo motivo, alle donne in età riproduttiva sono in genere proposti trattamenti adiuvanti che comprendono la chemioterapia. Tra gli effetti collaterali di quest'ultima rientra la potenziale riduzione o perdita della fertilità (5). Questo aspetto acquista rilevanza soprattutto in virtù del continuo aumento della sopravvivenza delle pazienti con carcinoma mammario che a 8 anni supera il 90% (9).

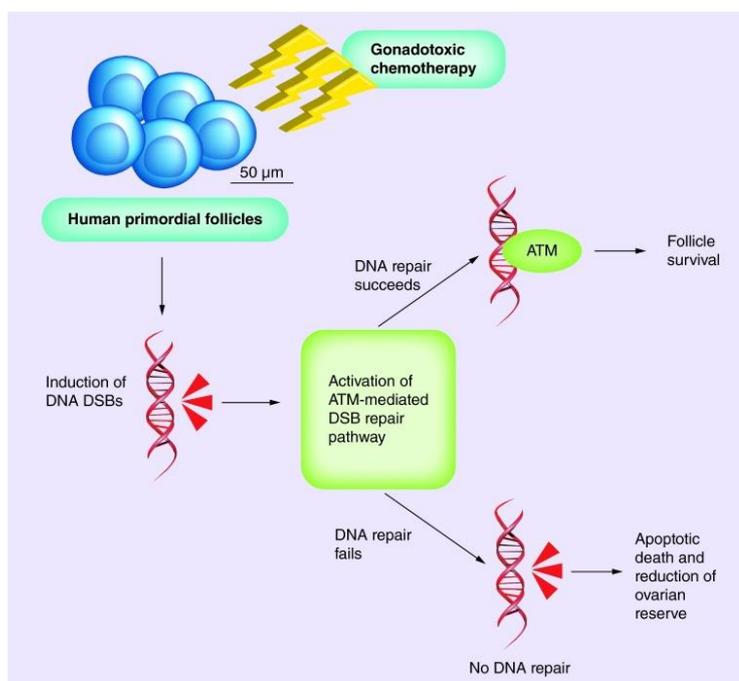
L'adeguata gestione delle tossicità da chemioterapia comprende l'attuazione di strategie terapeutiche mirate alla preservazione della fertilità.

Questo risulta particolarmente importante per le giovani pazienti oncologiche rispetto agli uomini, considerata la maggiore complessità delle tecniche di preservazione della fertilità in questo ambito e della necessità di tempistiche più lunghe. Il percorso deve prevedere un'adeguata selezione delle pazienti da inviare al counselling di oncofertilità, e una stretta coordinazione tra oncologo e ginecologo specialista in medicina della riproduzione, per la presa in carico delle pazienti oncologiche nella fase di scelta delle strategie di preservazione della fertilità (6).

### 1.2.2 Gonadotossicità dei trattamenti oncologici per neoplasia mammaria

Il trattamento neoadiuvante/adiuvante del tumore della mammella è basato sull'uso di farmaci con noto potenziale gonadotossico; tra questi, quelli attualmente usati principalmente in pratica clinica si annoverano:

- ✦ antracicline (epirubicina e Doxorubicina): inibiscono la sintesi e la funzione del DNA. Specificamente, la Doxorubicina, derivante da *Streptomyces Peuceetius* e impiegata nel trattamento di diverse neoplasie, induce un blocco sulla topoisomerasi II (10), comportando una rottura del doppio filamento del DNA (e quindi apoptosi dei follicoli primordiali) (11); inoltre, comporta danni a carico dell'architettura microvascolare e fibrosi della corteccia ovarica (12).
- ✦ Gli agenti alchilanti (ciclofosfamide) hanno un rischio di infertilità alto: comportano una rottura nel doppio filamento di DNA della cellula, inducendo la morte apoptotica nei follicoli primordiali (13; 11) (Figura 15).



*Figura 15. Meccanismo di danno della Ciclofosfamide: una volta che è stata indotta la rottura del DNA, solo i follicoli con alta capacità riparativa possono sopravvivere a questo stress genotossico; gli altri andranno incontro ad apoptosi o a senescenza cellulare (11).*

- ✦ Taxani: nell'ambito del carcinoma mammario, aggiungere un Taxano (docetaxel o paclitaxel) alla terapia a base di antracicline ha un impatto negativo sulla riserva ovarica – ciò è stato dimostrato dalla riduzione dei valori sierologici di ormone anti-mülleriano (AMH) (14) e, anche se in maniera meno specifica, clinicamente da amenorrea.

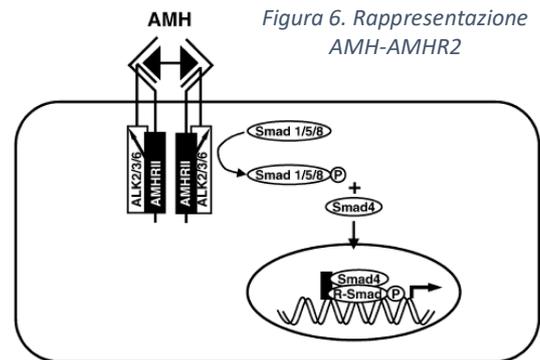
- ✦ I composti del platino, con particolare riferimento a carboplatino e cisplatino, sono anch'essi associati a rischio di infertilità: si legano covalentemente al DNA e ne provocano la rottura durante la replicazione, inibendo così la trascrizione, la sintesi e il funzionamento del DNA (11).
  
- ✦ Tamoxifene è un modulatore selettivo del recettore degli estrogeni. Si lega al loro recettore e inibisce l'azione degli estrogeni nel tessuto mammario: viene usato nel trattamento adiuvante per le donne in pre-menopausa a cui è stato diagnosticato un cancro al seno (15).  
Tuttavia, le pazienti che hanno usato tamoxifene hanno meno probabilità di intraprendere una gravidanza rispetto a coloro che invece non l'hanno assunto (16).
  
- ✦ Al contrario, ci sono alcuni farmaci chemioterapici che hanno effetti tossici sul DNA, ma che non hanno manifestato comunque effetti gonadotossici: tra questi, si riscontrano gli antimetaboliti (eg. 5-Fluorouracile) (11).

### 1.2.3 Ormone antimülleriano (AMH) e riserva ovarica

#### ✦ *AMH e gonatotossicità dei trattamenti oncologici*

L'AMH è una glicoproteina appartenente alla superfamiglia del TGF- $\beta$  (Fattore di Crescita Trasformante  $\beta$ ), col ruolo di differenziazione della crescita e nella follicologenesi.

Codificato dal gene AMH sul cromosoma 19, compie la propria azione su *AMHR-2* (codificato dal cromosoma 12), un recettore transmembrana tirosinkinasi presente in entrambi i sessi: una volta stimolato, attiva il recettore di tipo 1 [*AMHR-1*] che così fosforila le proteine SMAD, così da regolare l'espressione genica nel nucleo.



- ✦ Nel maschio, l'AMH viene secreto dalle cellule del Sertoli immature e, durante la vita fetale, induce regressione dei dotti Mülleriani all'ottava-nona settimana di gestazione (impedendo così la formazione dell'apparato genitale femminile, con riferimento a tube di Falloppio, utero, cervice ed ultimo terzo della vagina);
- ✦ Nelle donne, invece, AMH è prodotto nelle cellule della granulosa dei follicoli antrali e pre-antrali, e serve a regolare la follicologenesi ovarica: de-sensibilizza i piccoli follicoli verso FSH, così da evitare che si generi un follicolo "prescelto" (e, di conseguenza, impedisce che tutti gli altri vadano incontro ad atresia); inoltre, regola la produzione estrogenica da parte del follicolo, così che ciascun piccolo follicolo antrale produca bassi livelli di estradiolo prima della selezione (17).  
Nelle donne si ha un picco nei livelli sierici di AMH poco dopo la nascita, e aumenta progressivamente sino al 25° anno d'età, momento in cui seguirà un costante declino sino a livelli non più rilevabili all'inizio della menopausa (17) (vd. tabella 3).

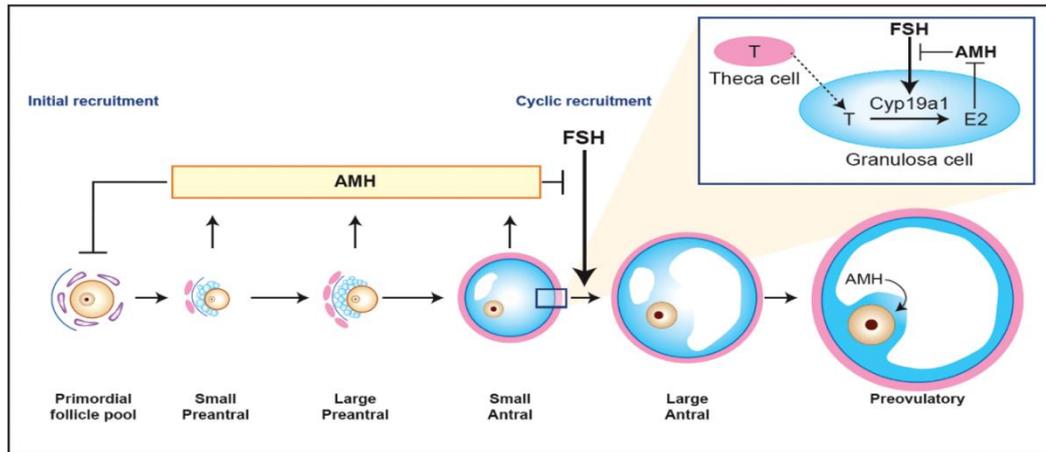


Figura 7. Reclutamento follicolare nel ciclo ovarico: l'AMH, prodotto dalle cellule della granulosa dei piccoli follicoli in crescita, inibisce il reclutamento iniziale del follicolo primordiale, la crescita e la selezione dei follicoli pre-antrali e antrali piccoli FSH-dipendente: in particolare, AMH inibisce l'espressione del CYP19A1 (associato all'aromatasi) FSH-indotta, comportando bassi livelli di Estradiolo (E2) a partire dal testosterone (19; 94).

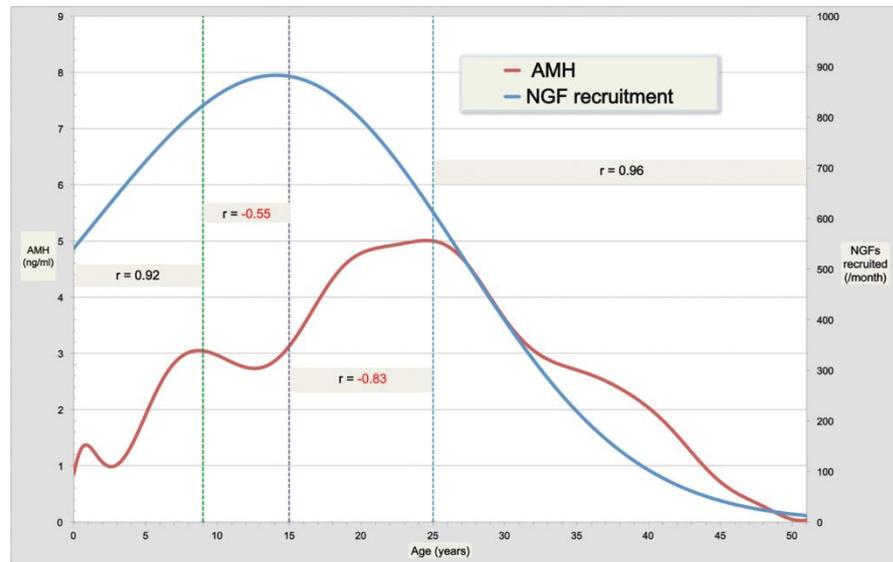


Figura 8. Rapporto tra concentrazioni sieriche di AMH e reclutamento dei follicoli non in crescita (numero espresso per mese: il picco lo si ha intorno ai 14 anni) (21).

Tabella 3. Valori AMH (ng/ml)	
<3 anni: 0,11 – 4,20	25-29 anni: 0,89 – 9,90
3-6 anni: 0,21 – 4,90	30-34 anni: 0,58 – 8,10
7-11 anni: 0,36 – 5,90	35-39 anni: 0,15 – 7,50
12-14 anni: 0,49 – 6,90	40-44 anni: 0,03 – 5,50
15-19 anni: 0,62 – 7,80	45-50 anni: <2,60
20-24 anni: 1,2 - 12	51-55 anni: <0,88
	>55 anni: <0,03

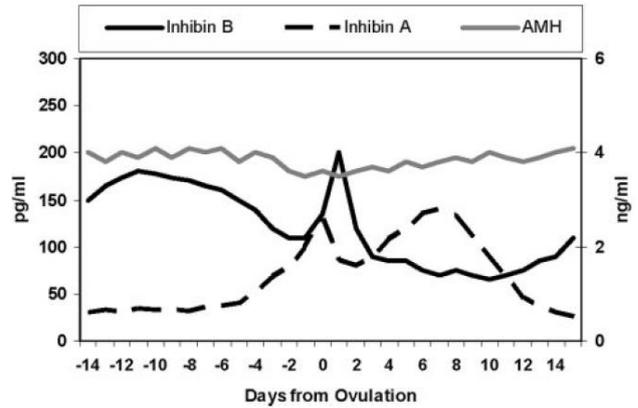
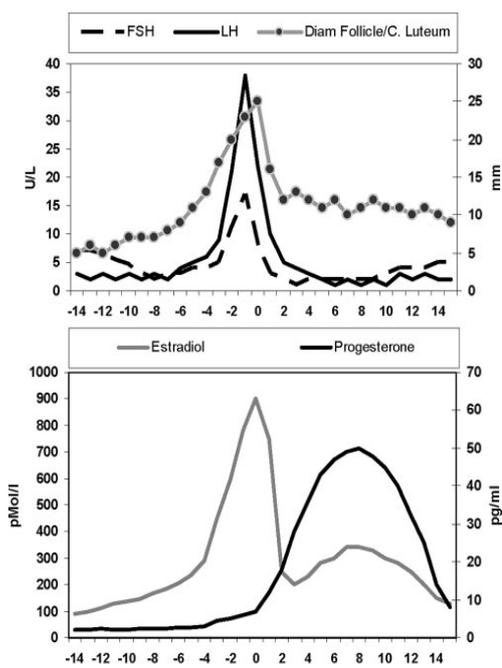


Figura 9-10. Rappresentazione grafica dell'andamento dei diversi parametri ormonali durante il ciclo mestruale (FSH, LH, E2, PROGESTERONE, INIBINA, AMH): si noti come il solo AMH rimanga costante (18).

Da un punto di vista clinico, osservare i valori dell'AMH può essere utilizzato per diverse funzioni:

- ✦ Procreazione medicalmente assistita (PMA): la fecondazione in vitro (19) è una procedura che permette l'incontro tra i due gameti, precedentemente prelevati, *in vitro*: l'embrione che si viene a formare verrà successivamente trasferito nell'utero della donna.

L'AMH viene impiegato nel campo della PMA in particolare per personalizzare la terapia. Valori alti e bassi di AMH sono predittivi di una risposta alle gonadotropine, rispettivamente, alta e bassa, in quanto si correlano con una riserva ovarica migliore o peggiore (20).

Provando a mettere in relazione i valori AMH e il ciclo mestruale (Figure 11-12), si osserva come i valori siano elevati nelle fasi pre-antrali di sviluppo follicolare (ie. follicoli con diametro <4mm) e poi tendano a ridursi quando i follicoli si ingrandiscono (ie. vanno incontro ad ovulazione).

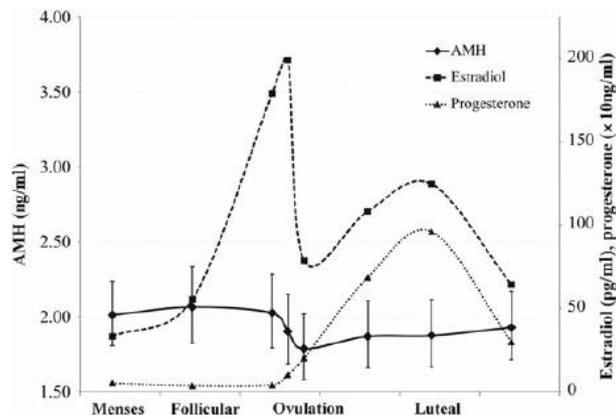


Figura 11. Valori di AMH, Estradiolo e Progesterone in relazione al ciclo mestruale (103).

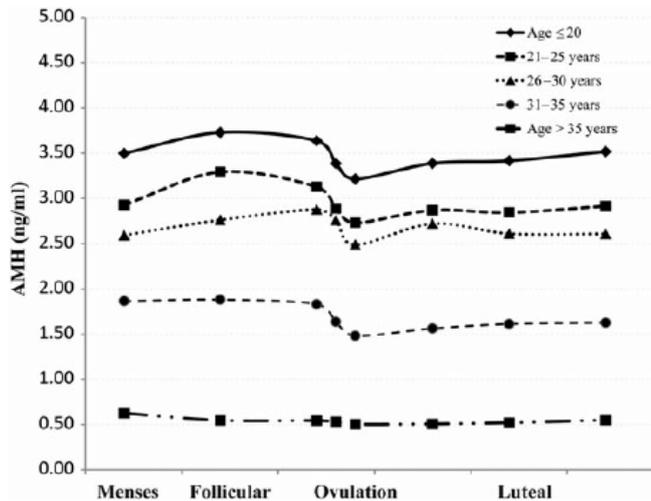


Figura 12. Valori di AMH in relazione al ciclo mestruale, a seconda delle varie fasce d'età: ≤20 / 21-25 / 26-30 / 31-35 / >35 anni (103).

#### ✦ Riserva ovarica funzionale

Si parla di riserva ovarica funzionale (e non semplicemente di riserva ovarica), poiché si fa riferimento al fatto che l'AMH rifletta il pool di follicoli in crescita potenzialmente in grado di ovulare (21).

AMH, essendo prodotto in particolare nei follicoli immaturi preantrali/antrali (che rappresentano la quasi totalità dei follicoli), viene successivamente immesso in circolo raggiungendo così la circolazione ematica generale.

Dunque, l'AMH viene considerato come un promettente marcatore della riserva ovarica (22); da questo punto di vista, tende ad essere altamente predittivo per la tempistica della menopausa (Figura 13).

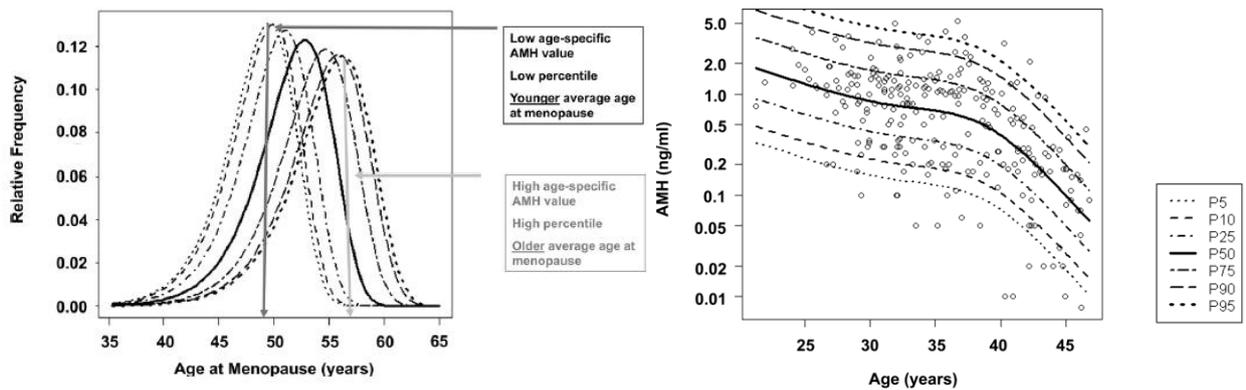


Figura 13. Andamento dei valori di AMH in base all'età (dx) e andamento in base al rapporto età-menopausa (77).

L'ovaio umano contiene infatti un numero importante di follicoli primordiali, il cui numero massimo viene raggiunto a 18-22 settimane nella vita neonatale, quando si contano mediamente circa 300.000 unità<sup>(49)</sup>: ad ogni ciclo ovulatorio, l'ovaio rilascia un'ocita; inoltre, un certo quantitativo di follicoli primordiali (ciascuno con una cellula uovo) viene perso mediante il processo di atresia ovulazione-dipendente (circa 10/mese) ed altri sono persi attraverso processi di atresia ovulazione-indipendente. Un meccanismo che sembra contribuire al fisiologico declino della riserva ovarica è dato dai deficit nei meccanismi di riparazione del DNA come nel caso di varianti patogenetiche germinali ai geni BRCA (Figura 14)<sup>(50)</sup>.

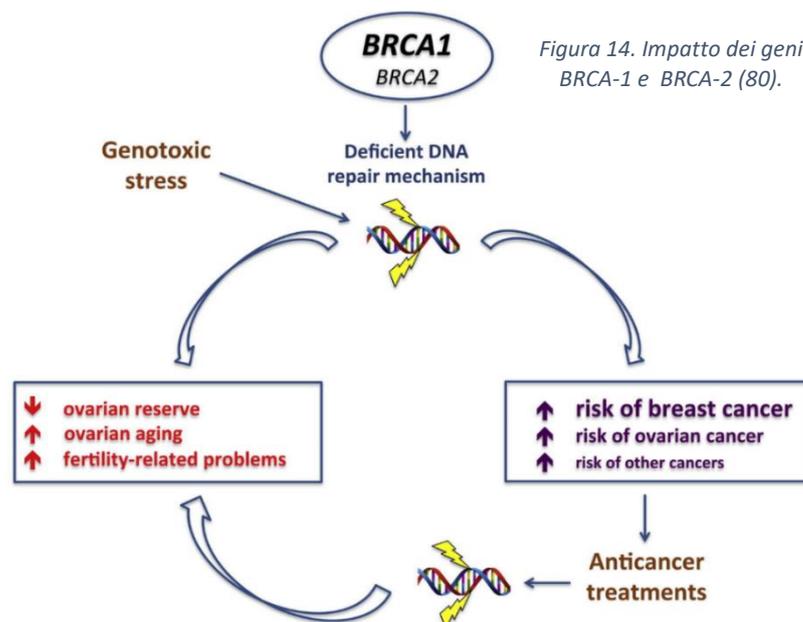


Figura 14. Impatto dei geni BRCA-1 e BRCA-2 (80).

- ✦ Conservazione della fertilità nelle giovani donne a rischio di menopausa precoce (23).

Per poter osservare l'eventuale gonadotossicità insorta durante o dopo la chemioterapia, l'AMH sembra essere un buon marcatore: in caso di gonadotossicità, i valori di AMH infatti risulteranno ridotti (24), in quanto indicheranno la perdita dei follicoli negli stadi antrali e pre-antrali.

La terapia antineoplastica è spesso causa di insufficienza ovarica prematura ed infertilità, poiché la riserva ovarica è assai sensibile agli effetti della chemioterapia e della radioterapia (10): negli ultimi anni, una serie di studi ha analizzato i livelli di AMH pre- e post-trattamento in pazienti con cancro, in particolare nella neoplasia mammaria. Gli studi concordano sul fatto che, dopo la chemioterapia, i livelli di AMH diminuiscono rapidamente a livelli (quasi) non rilevabili (25; 26). Questo rapido declino può essere spiegato dall'eliminazione immediata dei follicoli in crescita che producono AMH.

#### 1.2.4 Tecniche di preservazione della fertilità e della funzionalità ovarica

Tra i rischi legati alla terapia antineoplastica si annovera la ridotta fertilità. Questo aspetto risulta destare particolare attenzione e apprensione nelle donne giovani affette da tumore (27; 28; 29), tanto da influenzare la scelta di intraprendere la chemioterapia e arrivando a rifiutarla in alcuni casi (30). Allo stesso modo, sempre più attenzione è rivolta alle tecniche di conservazione della funzione ovarica (29), l'eventuale impiego di terapie ormonali che devono essere assunte per lunghi periodi di tempo (31), i problemi psicosociali e la qualità di vita dopo la diagnosi (32).

Essendo dunque i problemi correlati molteplici, si consiglia sempre l'intervento di un gruppo multidisciplinare (*Breast Unit*) specializzato nel campo della neoplasia mammaria (33).

Peraltro, esiste anche un certo grado di incertezza su questo tema all'interno del personale sanitario: infatti, molti oncologi (in Italia, circa uno su due (34)) ritengono che intraprendere una gravidanza possa peggiorare la prognosi delle pazienti, sostenendo che la stimolazione ovarica non dovrebbe essere considerata sicura, in particolar modo nelle pazienti con neoplasia positiva per i recettori ormonali, per via di un aumentato rischio di recidiva (35).

In realtà, però, sembrerebbe che una gravidanza sopraggiunta dopo una diagnosi di neoplasia mammaria Luminal-like o HER2+ non abbia alcuna conseguenza negativa sulla prognosi di queste pazienti (36; 37).

Pertanto, la gravidanza nelle donne sopravvissute al cancro, dopo adeguati trattamenti e follow-up, non dovrebbe essere scoraggiata (38).

L'età, da questo punto di vista, è un fattore molto importante: più giovane è la paziente, minore è il rischio di disfunzione ovarica (39; 40); altri fattori sono legati alla terapia stessa: la dose totale e il tipo (eg. agenti alchilanti) di chemioterapia somministrata (39).

La preservazione della funzione ovarica e della fertilità delle pazienti giovani affette da neoplasia mammaria si basa innanzitutto sull'età delle pazienti alla diagnosi:

- Pazienti tra i 41-45 anni: preservazione della funzione ovarica con GnRHa durante chemioterapia;
- Pazienti tra i 35-40 anni: preservazione della fertilità attraverso la crioconservazione degli ovociti;
- Pazienti <35 anni: preservazione della fertilità anche con crioconservazione del tessuto ovarico.

In generale, come anche accennato precedentemente, possiamo dunque riassumere 3 principali metodiche per la preservazione della fertilità nelle donne che dovranno essere sottoposte a trattamenti citotossici:

- ✦ Criopreservazione ovocitaria: questa procedura, svolta in centri appositi dopo una consulenza preliminare, consta nel prelevare per via transvaginale gli ovociti. Si inizia stimolando le ovaie con una terapia ormonale a base di gonadotropine, al fine di far maturare e crescere contemporaneamente più follicoli. Una volta raggiunto un sufficiente sviluppo follicolare, si fa il prelievo per via transvaginale (41). Gli ovociti prelevati verranno successivamente congelati.

Il successo di questa metodica è dipendente dalle capacità del personale sanitario, ma anche dall'età della paziente: più sono giovani e maggiore è la chance di intraprendere una gravidanza (42). Per le donne con neoplasia mammaria luminale è bene che sia aggiunto il Letrozolo durante la stimolazione ovarica, in quanto contrasta, inibendo l'aromatasi, l'eventuale incremento dell'estradiolo indotto dalla stimolazione ormonale (43).

- ✦ Criopreservazione di tessuto ovarico: in questo caso, a differenza della tecnica precedente, non c'è la necessità della stimolazione ovarica e, non richiedendo la maturità sessuale, è l'unico metodo disponibile nei soggetti pre-pubere (41).

Questa tecnica, da fare pre-trattamento antitumorale, permette di prelevare un alto numero di follicoli contenenti ovociti, tramite biopsia laparoscopica di una o entrambe le ovaie; il tessuto prelevato lo si crioconserverà.

Nel momento in cui si ottenesse la remissione della malattia, si scongelerà il tessuto ovarico e lo si reimplanterà, generalmente, nelle ovaie della paziente.

- ✦ Soppressione ovarica temporanea durante la chemioterapia con GnRHa: non si tratta di una tecnica di preservazione della fertilità ma di una tecnica in grado di preservare la funzione ovarica con la speranza di ridurre la probabilità di insufficienza ovarica chemioterapia-indotta (41).

Le gonadotropine (FSH, LH) sono ormoni adenoipofisari. Esse stimolano nella donna la funzionalità delle ovaie, aumentando la produzione di estrogeni da parte delle stesse. Le gonadotropine, a loro volta, sono stimulate dal GnRH, prodotto a livello ipotalamico, dando luogo ad un meccanismo di produzione ormonale controllato dal sistema a feedback negativo.

I GnRHa hanno attività simile al GnRH, ma a lungo termine si avvia un meccanismo di desensibilizzazione tale per cui non si producono più FSH o LH e, di conseguenza,

di estrogeni.

Tra gli effetti collaterali dei GnRHa si ricordano in particolare modo vampate di calore, osteoporosi e perdita della libido.

Sopprimere temporaneamente l'ovaio, durante la chemioterapia, dunque, riduce l'impatto gonadotossico indotto dai trattamenti oncologici, diminuendo così il rischio di sviluppare insufficienza ovarica prematura (44).

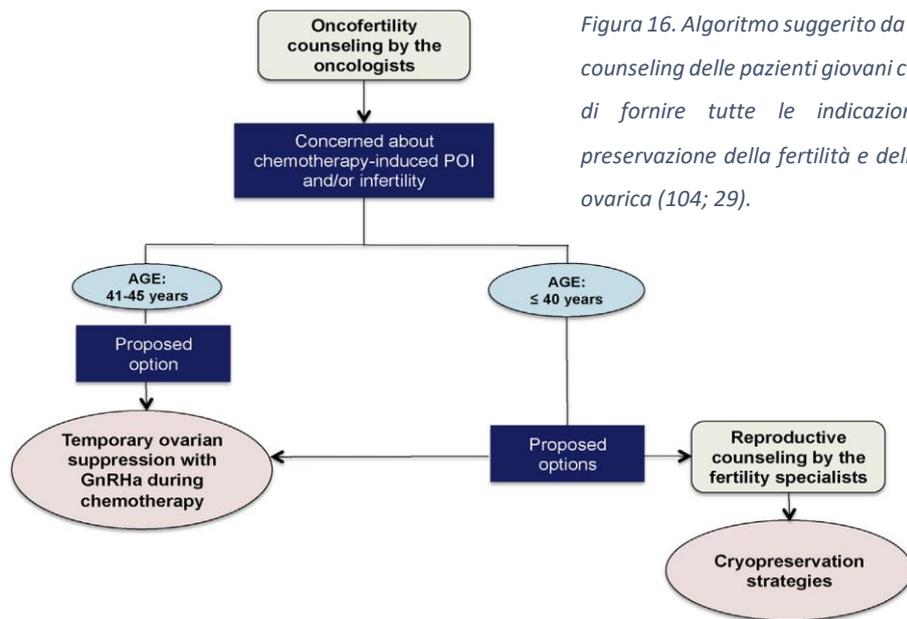


Figura 16. Algoritmo suggerito da seguire nel counseling delle pazienti giovani con lo scopo di fornire tutte le indicazioni per la preservazione della fertilità e della funzione ovarica (104; 29).

### 1.3 I TRATTAMENTI DELLA NEOPLASIA MAMMARIA PRECOCE HER2+ E LORO GONADOTOSSICITÀ NELLA DONNA GIOVANE

#### 1.3.1 *Trattamento neoadiuvante*

In generale, la chemioterapia nel caso di neoplasia mammaria, indipendentemente dall'età, si basa sull'impiego di antracicline, ciclofosfamide e taxani per una durata di 3-6 mesi.

Ciò che cambia è la positività, o meno, a HER2: infatti, la sua presenza indirizza all'aggiunta di terapia target con trastuzumab (anticorpo monoclonale che agisce contro HER2) per un anno complessivo di trattamento.

#### 1.3.2 *Trattamento adiuvante*

In questo caso la chemioterapia impiegata è la stessa, ma gli ultimi studi stanno sempre più evidenziando un'ottima efficacia con una terapia meno intensiva in quei tumori HER2 positivi e a basso rischio (Stadio I): questa terapia è rappresentata dall'associazione per 12 settimane di paclitaxel con trastuzumab, proseguita dal solo trastuzumab per 9 mesi (45; 46; 47).

#### 1.3.3 *Gonadotossicità dei farmaci anti-HER2*

Nonostante nell'arco degli anni l'impiego di farmaci anti-HER2 sia incrementato, le prove di relazione farmaci-gonadotossicità risultano essere limitate (48; 49; 50): attraverso lo studio *ALTT0 (BIG 2-06)* sono stati descritti i tassi di amenorrea indotta dal trattamento chemioterapico più trastuzumab e/o lapatinib; ciò che si è osservato è che non ci sia un incremento del tasso di amenorrea indotta dal trattamento nel braccio con doppio blocco anti-HER2, suggerendo così la possibile sicurezza gonadica di questi farmaci (48; 50).

Nel caso di pertuzumab, un altro anticorpo anti-HER2 somministrato per via endovenosa (con trastuzumab sia come terapia neoadiuvante che adiuvante), mancano prove sui suoi possibili effetti sulla fertilità (51); allo stesso modo, vale il discorso per neratinib, anti-HER2 assunto per via orale come terapia adiuvante dopo la terapia di base con trastuzumab (52).

T-DM1 è un farmaco coniugato (ie. trastuzumab legato a DM1, un derivato citotossico della maytansina che agisce a livello della tubulina) altamente efficace nella terapia post-neoadiuvante per quelle pazienti senza risposta completa a seguito della terapia a base di trastuzumab (53). Al momento, anche con questo farmaco si hanno pochi

dati riguardo la gonadotossicità associata: per quanto scarsi quantitativamente, sembrerebbe esserci un potenziale profilo di sicurezza gonadica per T-DM1 (49; 54).

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1 DISEGNO DELLO STUDIO

Lo studio NeoALTTO [*NeoAdjuvant lapatinib and/or trastuzumab Treatment Optimisation – Breast International Group (BIG) 1-06*] è uno studio neoadiuvante, multicentrico, in aperto, randomizzato di fase III in pazienti con carcinoma mammario in fase iniziale HER-2 positivo.

Le pazienti con carcinoma mammario in fase iniziale HER2-positivo di dimensioni superiori a 2cm e funzione cardiaca adeguata sono state assegnate in modo casuale a ricevere lapatinib da solo 1500mg/die (*Braccio lapatinib*), solo trastuzumab (*Braccio trastuzumab*) o la combinazione di trastuzumab + lapatinib 1000mg/die (*Braccio trastuzumab+lapatinib*) in monoterapia per 6 settimane seguite dall'aggiunta di paclitaxel 80mg/m<sup>2</sup> per 12 settimane prima dell'intervento. Entro 4 settimane dall'ultima dose di paclitaxel, le pazienti sono state sottoposte a intervento chirurgico definitivo seguito, entro 6 settimane, da tre cicli di chemioterapia a base di epirubicina, ciclofosfamide e fluorouracile (FEC); dopo aver completato la chemioterapia, sono state somministrate 34 settimane aggiuntive della stessa terapia anti-HER2 ricevuta nella fase neoadiuvante per completare un anno di trattamento target.

La presente analisi, condotta all'interno dello studio NeoALTTO, ha incluso solo pazienti di età ≤45 anni e in pre-menopausa nota al momento della randomizzazione, che avessero campioni di siero disponibili al basale e almeno in un momento aggiuntivo durante la fase di trattamento neoadiuvante.

Lo studio NeoALTTO è stato approvato dai Comitati Etici di tutti i centri partecipanti e tutte le pazienti incluse hanno fornito il consenso informato scritto prima dell'ingresso nello studio. Il Comitato Esecutivo e Direttivo di NeoALTTO ha approvato la conduzione della presente analisi.

## 2.2 PROCEDURA DELLO STUDIO

Secondo il disegno dello studio NeoALTTO, a tutte le pazienti sono stati prelevati campioni di siero in momenti specifici predefiniti:

- Screening/basale (ie. pre-somministrazione di qualsiasi trattamento antitumorale);
- Settimana 2 (ie. nella “finestra biologica” della sola terapia mirata anti-HER2);
- Chirurgia (ie. alla fine delle 12 settimane di paclitaxel più terapia mirata anti-HER2).

Tutti i campioni di siero congelati sono stati trasferiti alla Biobank of Gynecology – Research Laboratory on Human Reproduction at Erasme Hospital – Université Libre de Bruxelles (Bruxelles – Belgio) per testare AMH.

Il test AMH è stato eseguito con il dosaggio Roche Elecsys® AMH Plus. I livelli di AMH sono stati presentati in ng/mL con 0,01ng/mL come limite inferiore di rilevamento.

## 2.3 OBIETTIVI DELLO STUDIO

L'obiettivo primario di questa analisi era quello di fornire prove sulla gonadotossicità degli agenti anti-HER2 (trastuzumab e/o lapatinib) da soli o in combinazione con la chemioterapia basata solo sui Taxani, utilizzando i livelli sierici di AMH come misura dell'impatto del trattamento sulla riserva ovarica delle donne.

Come obiettivi secondari, è stato studiato l'impatto dei diversi agenti anti-HER2, ma anche dell'età delle pazienti e della riserva ovarica alla diagnosi (ie. i livelli di AMH) sulla gonadotossicità del trattamento.

## 2.4 ANALISI STATISTICA

Le presenti analisi incentrate sulla gonadotossicità del trattamento misurata tramite AMH non sono state pre-pianificate nel protocollo dello studio e la potenza delle analisi statistiche non è stata prespecificata.

I livelli di AMH a ogni punto temporale sono stati riassunti usando le mediane e l'intervallo interquartile; per presentare la dinamicità dei valori di AMH durante il trattamento sono stati utilizzati gli “*Scattered and box plots*”. La variazione cumulativa tra i valori di AMH dopo 2 settimane e prima dell'intervento rispetto ai valori di AMH al basale è stata calcolata secondo la seguente formula:

$$\Delta_{BX} = (AMH_X - AMH_B) / (AMH_B - 0.0098) * 100$$

dove  $AMH_B$  è il valore basale,  $AMH_X$  è in ciascuno degli altri 2 punti temporali e 0,0098 è il valore minimo osservato di AMH – in questo modo si ottiene una diminuzione di AMH al massimo del -100% durante la chemioterapia. Inoltre, è stata calcolata la differenza tra i due  $\Delta_{BX}$ . Il test di Kruskal-Wallis è stato utilizzato per il confronto tra gruppi ad ogni punto

temporale. Per confrontare AMH nei diversi punti di tempo a due a due, è stato impiegato il test di Wilcoxon; per eseguire un confronto generale tra i valori di AMH in ogni punto temporale, è stato utilizzato il test di Skillings-Mack (ie. un'estensione del test di Friedman da utilizzare in caso di dati sbilanciati e/o presenza di dati mancanti) (55).

Le analisi sono state condotte prima nella popolazione complessiva dello studio, indipendentemente dal braccio di trattamento, confrontando i livelli di AMH alla settimana 2 e al tempo della chirurgia con quelli al tempo di screening/baseline. Poi, le stesse analisi sono state condotte per braccio di trattamento (lapatinib da solo vs. trastuzumab da solo vs. trastuzumab + lapatinib), per età delle pazienti (sia come variabile continua che come variabile categorica – <35 anni vs. 35-40 anni vs. >40 anni) e per livelli di AMH (sia come variabile continua che come variabile categorica – 1° terzile vs. 2° terzile vs. 3° terzile). Per valutare l'impatto dell'età e dei livelli di AMH pre-trattamento sui cambiamenti dei valori di AMH durante la terapia, è stato calcolato il coefficiente di correlazione di Spearman ed è stato applicato il metodo Lowess per visualizzare le tendenze (56).

Le analisi principali sono state ripetute includendo solo le pazienti con i tre campioni (screening/baseline, settimana 2 e intervento chirurgico) disponibili per il test AMH.

I test statistici erano a due facce e i valori  $P < 0.05$  sono stati considerati statisticamente significativi.

### 3. RISULTATI

Delle 455 pazienti randomizzate tra Gennaio 2008 e Maggio 2010 nello studio NeoALTTO, 139 donne erano in premenopausa e di età  $\leq 45$  anni al momento della randomizzazione. Tra queste, i campioni di siero non erano disponibili o non potevano essere testati per AMH al basale in 9 casi, per cui 130 pazienti sono state incluse nella presente analisi (Figura 15).

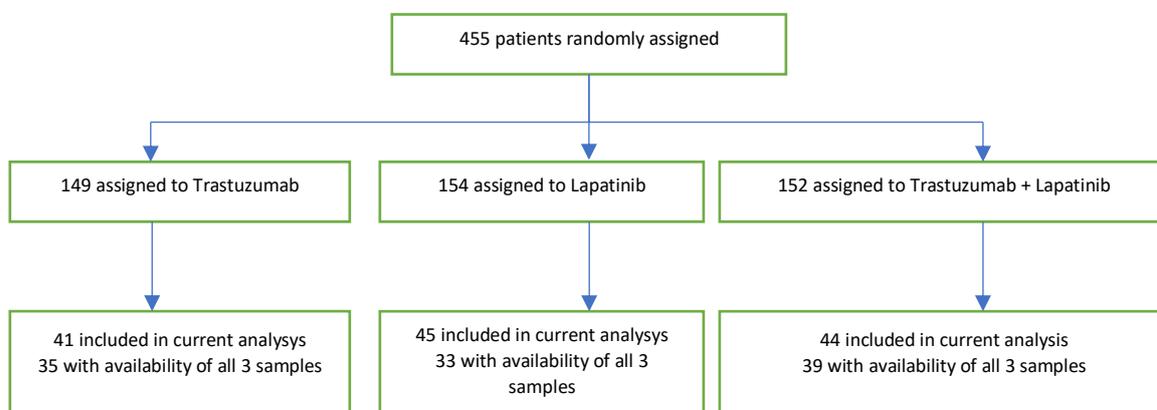


Figura 15. Consort NeoALTTO Trial

L'età mediana era di 38 anni (range interquartile [IQR] 33-42 anni), e 86 (66,2%) pazienti avevano un'età  $\leq 40$  anni. La maggior parte delle pazienti erano caucasiche (n=82, 63,1%) e avevano un normale indice di massa corporea (n=78, 60,0%). Le caratteristiche del tumore e del trattamento sono riassunte nella Tabella 4.

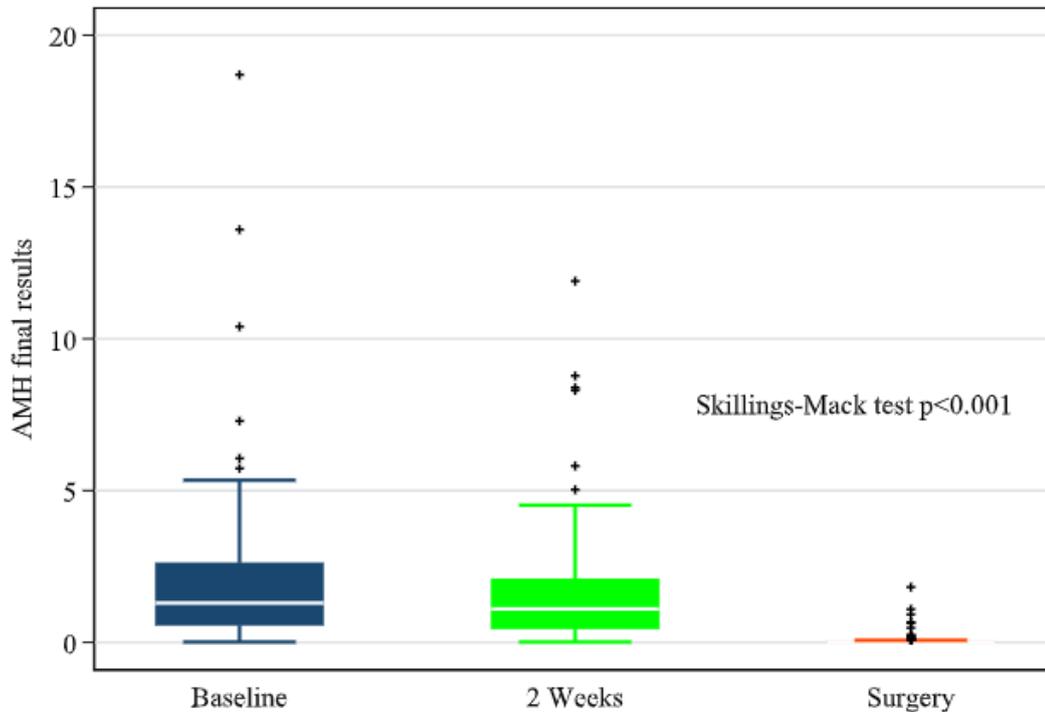
Un totale di 41 (31,5%), 45 (34,6%) e 44 (33,9%) pazienti sono state incluse rispettivamente nei bracci trastuzumab, lapatinib o trastuzumab + lapatinib.

Tabella 4. Caratteristiche delle pazienti e del tumore

<sup>a</sup> Percentuali calcolate sul numero totale delle pazienti con malattia recettore ormonale-positiva

	N pazienti = 130 – N (%)
<b>Età alla diagnosi, mediana (IQR), anni</b>	38 (33-42)
<b>Età alla diagnosi:</b>	
≤ 34 anni	42 (32.31)
35-40 anni	44 (33.85)
≥ 41 anni	44 (33.85)
<b>BMI, kg/m<sup>2</sup>:</b>	
Sottopeso (BMI < 18.5)	6 (4.62)
Normopeso (BMI 18.5-24.9)	78 (60.00)
Sovrappeso (BMI 25-29.9)	28 (21.54)
Obeso (BMI ≥ 30)	18 (13.85)
<b>Etnia:</b>	
Caucasica	82 (63.08)
Asiatica	32 (24.62)
Altro	16 (12.31)
<b>Chirurgia:</b>	
Chirurgia mammaria conservativa	40 (30.77)
Chirurgia radicale	90 (69.23)
<b>Dimensioni tumore:</b>	
T2 (2-5cm)	67 (51.54)
T3-4 (> 5cm)	63 (48.46)
<b>Stato linfonodale:</b>	
N0-1	112 (86.15)
N ≥ 2 / missing	18 (13.85)
<b>Grado del tumore:</b>	
G1	4 (3.08)
G2	55 (42.31)
G3	54 (41.54)
GX / missing	17 (13.08)
<b>Stato recettore ormonale:</b>	
Positivo	74 (56.92)
Negativo	56 (43.08)
<b>Braccio del trattamento:</b>	
trastuzumab	41 (31.54)
lapatinib	45 (34.62)
trastuzumab + lapatinib	44 (33.85)
<b>Terapia endocrina adiuvante:</b>	
Somministrata (SERM e/o AI ± GnRHa)	64 (86.49)
Non somministrata	10 (13.51)

Nel complesso, i valori di AMH ai 3 punti temporali differivano significativamente tra loro ( $p < 0,001$ ; Figura 16A). Allo screening/baseline, i livelli mediani di AMH erano 1,29 ng/mL (IQR 0,56 - 2,62 ng/mL). Dopo 2 settimane di solo trattamento anti-HER2, è stata osservata una lieve ma significativa riduzione dei livelli di AMH con un valore mediano di 1,10 ng/mL (IQR 0,45 - 2,09 ng/mL;  $p < 0,001$ ). Alla chirurgia, dopo la terapia con paclitaxel e anti-HER2, è stato osservato un calo significativo dei livelli di AMH con un valore mediano di 0,01 ng/mL (IQR 0,01 - 0,03 ng/mL;  $p < 0,001$ ).

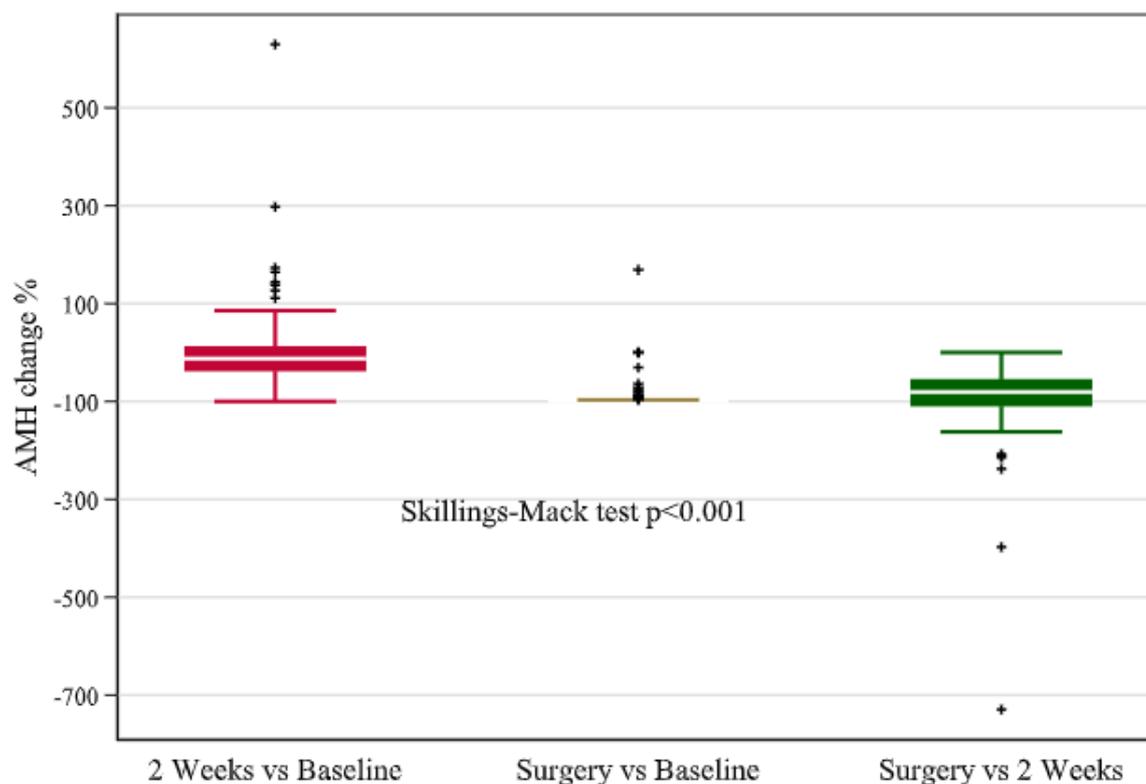


	Baseline	Week 2	Surgery	Total
N	130	129	108	367
Median	1.29	1.10	0.01	0.64
25 pctile	0.56	0.45	0.01	0.04
75 pctile	2.62	2.09	0.03	1.81

Ho: Baseline = Week 2  $p < 0.001$   
 Ho: Baseline = Surgery  $p < 0.001$   
 Ho: Week 2 = Surgery  $p < 0.001$

Figura 16A. Andamento di AMH in tutte le pazienti

Nel complesso, la percentuale di cambiamento di AMH nei due punti temporali durante la terapia rispetto ai valori basali e la loro differenza reciproca erano significativamente diverse tra loro ( $p < 0,001$ ; Figura 16B). Rispetto ai valori basali, la diminuzione cumulativa mediana dei livelli di AMH era -12,5% (IQR -37,6% - 12,4%) alla settimana 2 e -99,9% (IQR -100,0% - -98,7%) all'intervento. Rispetto ai valori della settimana 2, la diminuzione cumulativa mediana dei livelli di AMH alla chirurgia è stata di -80,7% (IQR -109,5% - -54,8%).



	2 Weeks – Baseline %	Surgery – Baseline %	Surgery - 2 Weeks %
N	129	108	107
Median	-12.5	-99.9	-80.7
25 pctile	-37.6	-100.0	-109.5
75 pctile	12.4	-98.7	-54.8

Ho: 2 Weeks vs Baseline = Surgery vs Baseline  $p < 0.001$

Ho: 2 Weeks vs Baseline = Surgery vs Week 2  $p < 0.001$

Ho: Surgery vs Baseline = Surgery vs Week 2  $p = 0.003$

Figura 16B. Andamento di AMH in tutte le pazienti

Il tipo di trattamento anti-HER2 (trastuzumab vs. lapatinib vs. trastuzumab + lapatinib) non sembra avere un impatto sui risultati.

Non c'è stata alcuna differenza significativa tra i bracci di trattamento nel grado di riduzione dei livelli di AMH alla settimana 2 ( $p=0,763$ ) e alla chirurgia ( $p=0,700$ ; Figura 17A).

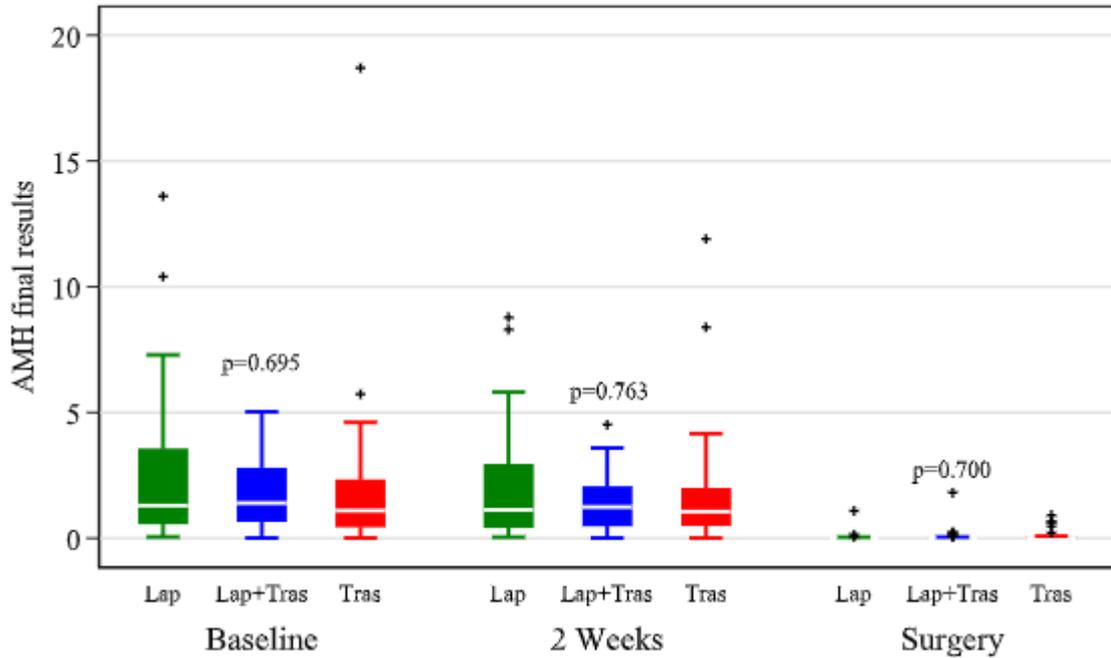


Figura 17A. Andamento di AMH in base al braccio di trattamento.

Lap: lapatinib; Tras: trastuzumab; p-values nel grafico fanno riferimento alla relazione tra i trattamenti in ogni singolo tempo.

Allo stesso modo, non vi era alcuna differenza significativa tra i bracci di trattamento nel grado di diminuzione cumulativa dei livelli di AMH alla settimana 2 rispetto al basale ( $p=0,732$ ), alla chirurgia rispetto al basale ( $p=0,678$ ) e alla chirurgia rispetto alla settimana 2 ( $p=0,851$ ; Figura 17B).

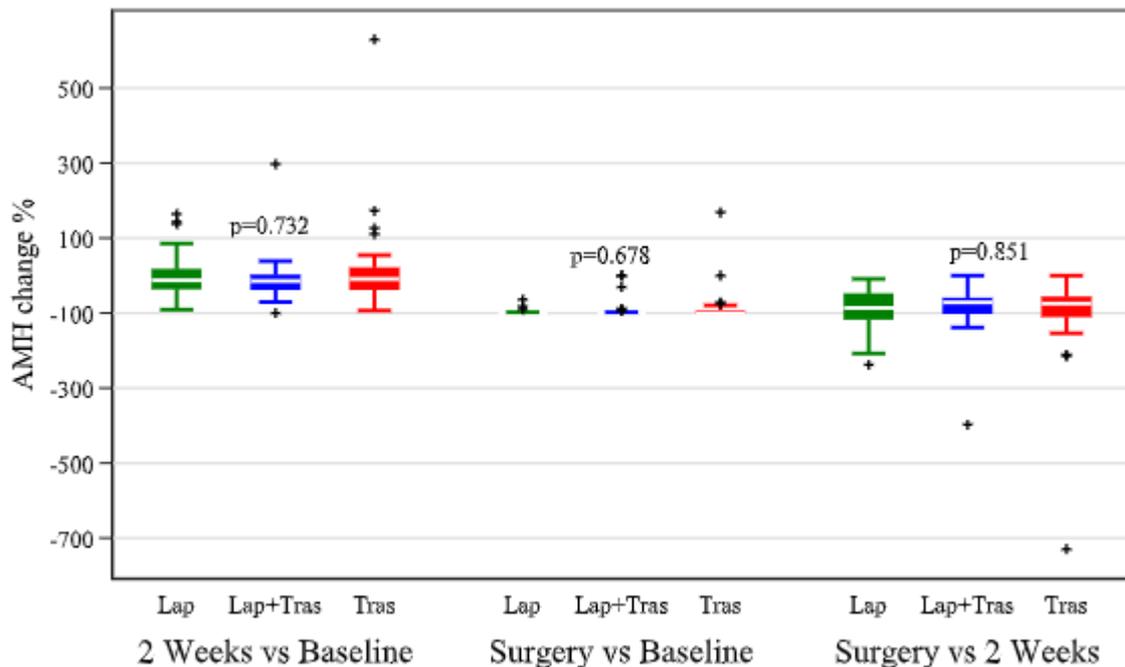


Figura 17B. Andamento di AMH in base al braccio di trattamento.

Lap: lapatinib; Tras: trastuzumab; p-values nel grafico fanno riferimento alla relazione tra i trattamenti in ogni singolo tempo.

Allo screening/baseline, i livelli mediani di AMH erano 2,76 ng/mL (IQR 1,40 - 4,07 ng/mL), 1,33 ng/mL (IQR 0,95 - 2,25 ng/mL) e 0,52 ng/mL (IQR 0,12 - 1,01 ng/mL) nelle pazienti di età <35 anni, 35-40 anni e >40 anni, rispettivamente. I livelli di AMH sono rimasti significativamente diversi tra i gruppi di età in tutti i punti temporali ( $p < 0,001$ ; Figura 18A). Una significativa correlazione negativa è stata osservata tra l'età e i livelli di AMH al basale ( $r = -0,609$ ;  $p < 0,001$ ), alla settimana 2 ( $r = -0,617$ ;  $p < 0,001$ ) e alla chirurgia ( $r = -0,500$ ;  $p < 0,001$ ).

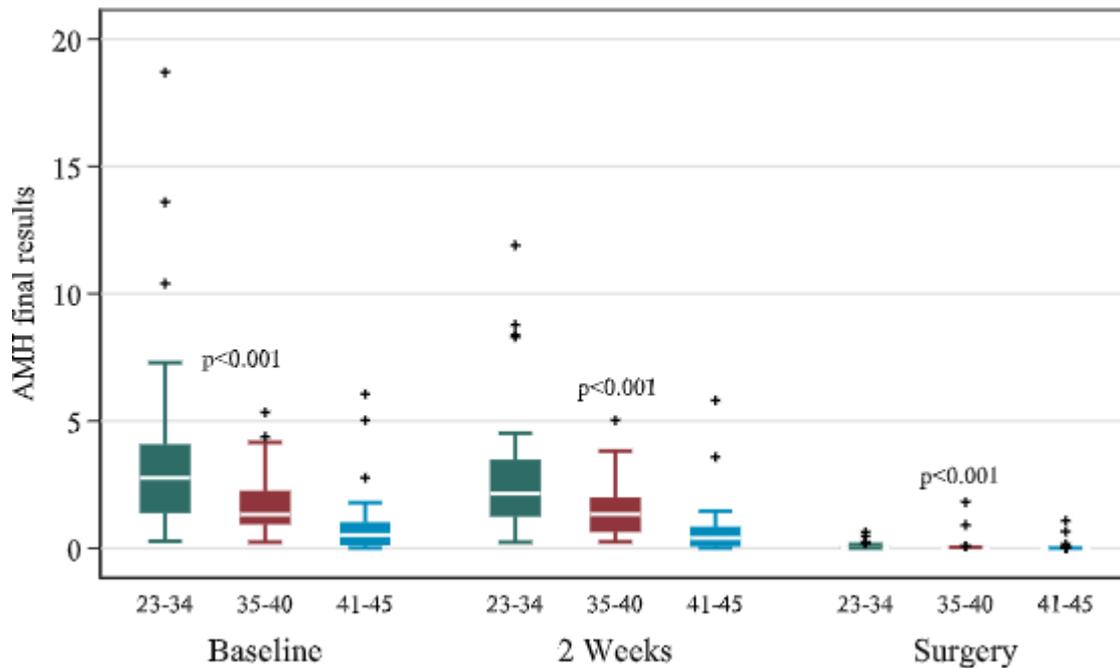


Figura 18A. Andamento di AMH per età.  
*p-values nel grafico fanno riferimento alla relazione tra i trattamenti in ogni singolo tempo.*

In termini di grado di diminuzione cumulativa dei livelli di AMH tra i gruppi di età, non vi era alcuna differenza significativa alla settimana 2 rispetto al basale ( $p = 0,561$ ) e alla chirurgia rispetto alla settimana 2 ( $p = 0,088$ ), mentre una differenza significativa è stata osservata alla chirurgia rispetto al basale ( $p < 0,001$ ; Figura 18B). Non è stata riscontrata una correlazione negativa significativa tra l'età e il grado di diminuzione cumulativa dei livelli di AMH alla settimana 2 rispetto al basale ( $r = -0,055$ ;  $p = 0,537$ ) e alla chirurgia rispetto alla settimana 2 ( $r = 0,164$ ;  $p = 0,091$ ), mentre la differenza era significativa alla chirurgia rispetto al basale ( $r = -0,326$ ;  $p < 0,001$ ).

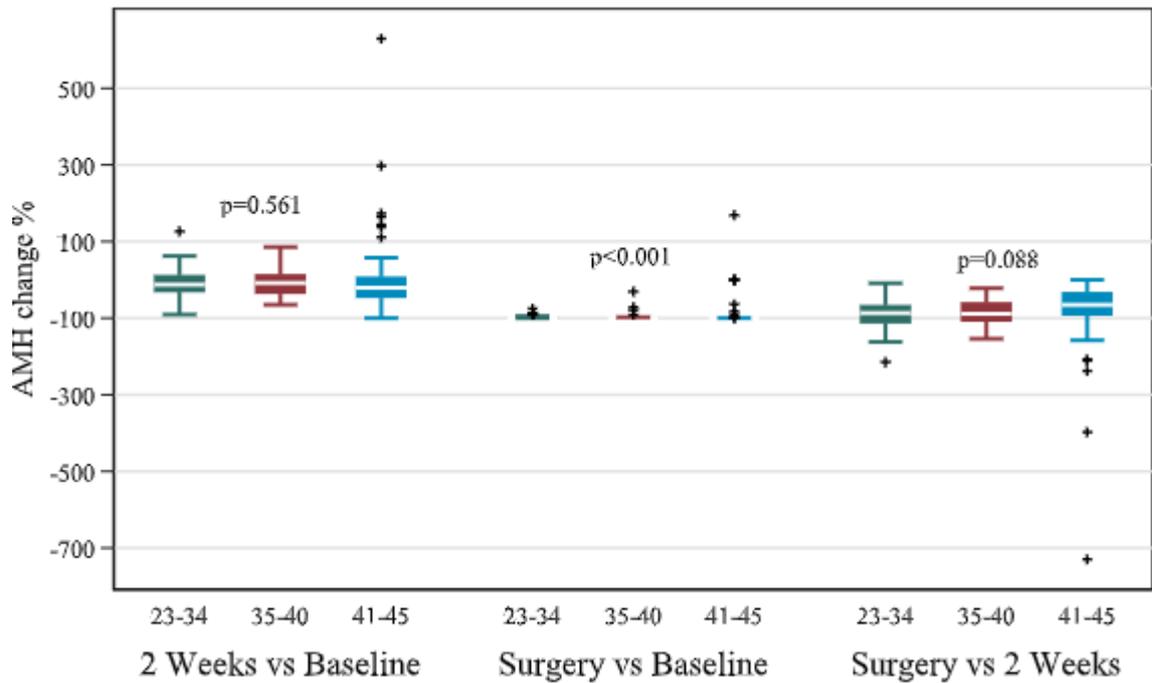


Figura 18B. Andamento di AMH per età.  
*p-values nel grafico fanno riferimento alla relazione tra i trattamenti in ogni singolo tempo.*

Sulla base dei livelli di AMH pre-trattamento, il cut-off per distinguere tra i tre terzi era <0,74, 0,74-1,98 e >1,98. I livelli di AMH sono rimasti significativamente diversi tra i gruppi AMH pre-trattamento in tutti i punti temporali ( $p < 0,001$ ; Figura 19A). Una significativa correlazione positiva è stata osservata tra i gruppi AMH pre-trattamento e i livelli di AMH alla settimana 2 ( $r = 0,91$ ;  $p < 0,001$ ) e alla chirurgia ( $r = 0,54$ ;  $p < 0,001$ ).

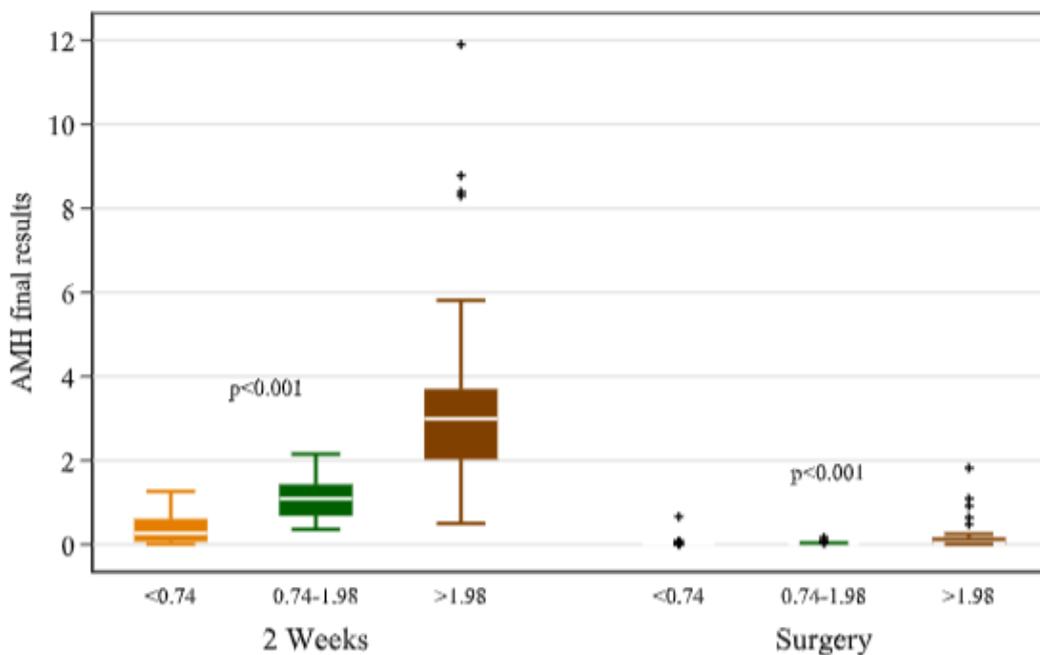


Figura 19A. Andamento di AMH in base al pre-trattamento.  
*p-values nel grafico fanno riferimento alla relazione tra i trattamenti in ogni singolo tempo.*

In termini di grado di diminuzione cumulativa dei livelli di AMH tra i gruppi pre-trattamento AMH, non vi era alcuna differenza significativa alla settimana 2 rispetto al basale ( $p=0,266$ ) e alla chirurgia rispetto alla settimana 2 ( $p=0,872$ ), mentre una differenza significativa è stata osservata alla chirurgia rispetto al basale ( $p<0,001$ ; Figura 19B). Non c'era una correlazione significativa tra AMH pre-trattamento e grado di diminuzione cumulativa dei livelli di AMH alla settimana 2 rispetto al basale ( $r=-0,166$ ;  $p=0,06$ ) e alla chirurgia rispetto alla settimana 2 ( $r=0,01$ ;  $p=0,96$ ), mentre una correlazione positiva significativa era presente alla chirurgia rispetto al basale ( $r=0,297$ ;  $p=0,002$ ).

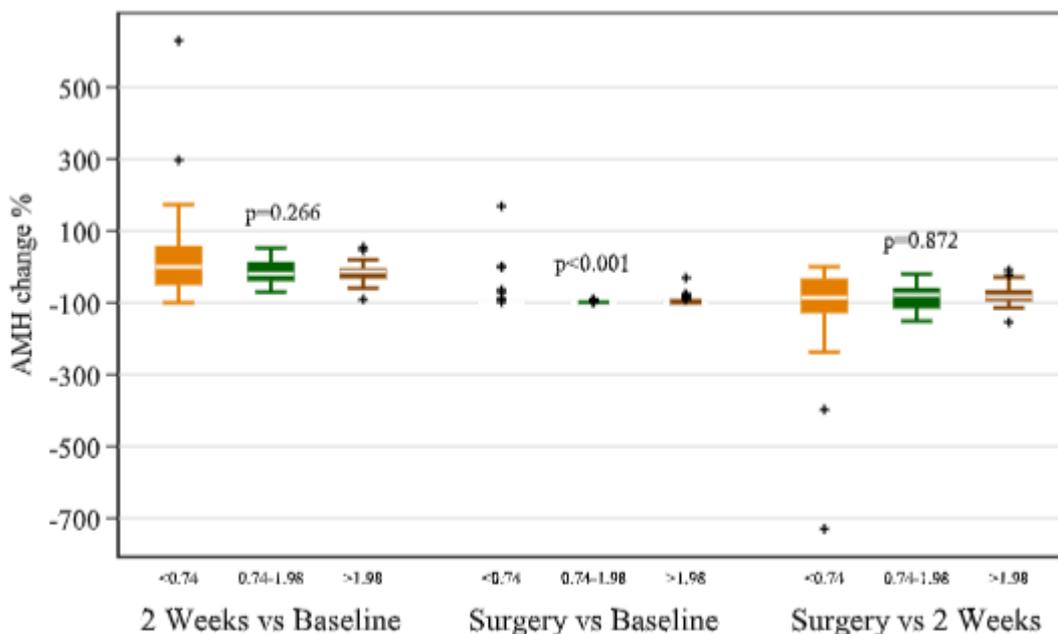


Figura 19B. Andamento di AMH in base al pre-trattamento.  
*p-values nel grafico fanno riferimento alla relazione tra i trattamenti in ogni singolo tempo.*

Un totale di 7 pazienti ha avuto una gravidanza dopo il completamento del trattamento. Tutte le pazienti avevano <35 anni al momento della randomizzazione. In queste pazienti, i livelli mediani di AMH erano 3,22 ng/mL (IQR 1,99 - 4,61ng/mL) allo screening/basale, 2,74 ng/mL (IQR 1,81 - 3,69ng/mL) dopo 2 settimane di solo trattamento anti-HER2, e 0,04 ng/mL (IQR 0,03 - 0,04ng/mL) alla chirurgia dopo la terapia con paclitaxel e anti-HER2.

Confrontando i loro livelli di AMH con quelli delle pazienti senza gravidanza successiva e di età <35 anni ( $n=35$ ), non è stata osservata alcuna differenza significativa al basale ( $p=0,316$ ), alla settimana 2 ( $p=0,463$ ) o alla chirurgia ( $p=0,610$ ). Nelle pazienti senza gravidanza successiva e di età <35 anni, i livelli mediani di AMH erano 2,55ng/mL (IQR 1,34 - 4,02ng/mL) allo screening/basale, 2,15ng/mL (IQR 1,24 - 3,43ng/mL) dopo 2 settimane di solo trattamento anti-HER2, e 0,04 ng/mL (IQR 0,01 - 0,08ng/mL) alla chirurgia dopo la terapia con paclitaxel e anti-HER2.

#### 4. DISCUSSIONE

La presente analisi di biomarcatori dello studio NeoALTTO ha esplorato per la prima volta l'impatto acuto della terapia anti-HER2 da sola e poi combinata con paclitaxel settimanale sulla riserva ovarica delle giovani donne (misurata con i livelli di AMH) con carcinoma mammario precoce HER2-positivo non precedentemente esposte a chemioterapia a base di antracicline e ciclofosfamide o a qualsiasi altro potenziale trattamento antineoplastico gonadotossico). Abbiamo osservato una lieve ma significativa riduzione dei livelli di AMH durante il trattamento anti-HER2 da solo e poi una profonda riduzione a livelli quasi non dosabili dopo la sua combinazione con paclitaxel settimanale. Il tipo di agente mirato anti-HER2 (trastuzumab, lapatinib o la loro combinazione) non ha influenzato i cambiamenti osservati nei livelli di AMH nei diversi momenti. Al contrario, l'età e la riserva ovarica pre-trattamento hanno un impatto importante sul rischio acuto di gonadotossicità indotta dal trattamento.

Questa analisi fornisce nuove informazioni importanti da condividere con le pazienti con cancro al seno in pre-menopausa per migliorare la loro consulenza di oncofertilità al momento della diagnosi.

Per un processo decisionale condiviso intorno ai trattamenti antitumorali proposti, tutte le donne in premenopausa dovrebbero ricevere una consulenza completa sull'oncofertilità al momento della diagnosi (41; 57; 58). Conoscere il rischio di gonadotossicità indotta dal trattamento è fondamentale per guidare le scelte delle pazienti non solo sulle terapie proposte (eg. se ricevere la chemioterapia più la terapia mirata anti-HER2 per una piccola riduzione stimata del rischio di recidiva) ma anche verso l'accesso alle strategie di conservazione della fertilità (eg. se sottoporsi alla crioconservazione degli ovociti prima dell'inizio del trattamento).

La presente analisi fornisce prove uniche sull'impatto gonadico acuto di due trattamenti (ie. la terapia anti-HER2 e il paclitaxel settimanale) che, nonostante siano ampiamente utilizzati in clinica, sono stati finora poco caratterizzati in termini di gonadotossicità.

Definire la gonadotossicità degli agenti mirati è considerato uno dei più importanti bisogni clinici insoddisfatti nel campo dell'oncofertilità (57; 58). Nelle donne in premenopausa con carcinoma mammario HER2-positivo, l'evidenza sull'impatto gonadico degli agenti anti-HER2 deriva da pochi studi che riportano l'amenorrea indotta dal trattamento dopo la chemioterapia più trastuzumab e/o lapatinib. Nelle pazienti che ricevono principalmente chemioterapia a base di antracicline e ciclofosfamide, l'aggiunta di trastuzumab alla terapia citotossica non sembra aumentare il rischio di amenorrea post-trattamento (39; 59) e non sono state osservate

differenze quando si usa trastuzumab, lapatinib o la loro combinazione (50). Bassi tassi di amenorrea post-trattamento sono stati osservati in donne in pre-menopausa che ricevevano trastuzumab e paclitaxel settimanale (60). Anche se questi studi hanno suggerito l'assenza di un apparente impatto gonadotossico negativo della terapia anti-HER2, non permettono di trarre conclusioni forti considerando che tutte le pazienti hanno ricevuto una chemioterapia precedente o concomitante agli agenti anti-HER2, e l'amenorrea era l'unico marcatore di gonadotossicità. Quindi, l'impatto effettivo della terapia anti-HER2 sulla riserva ovarica delle pazienti rimane finora indefinito (57; 58).

I nostri dati forniscono una visione unica su questo aspetto, dimostrando che un possibile effetto gonadico acuto negativo di questi agenti non dovrebbe essere trascurato. La via di segnalazione del fattore di crescita epidermico ha un ruolo importante anche nella funzione ovarica (61); pertanto, è plausibile che il blocco di HER2 possa avere un impatto sul tasso di attivazione dei follicoli ovarici e successivamente sulla riserva ovarica. Tuttavia, sebbene significativa, la riduzione osservata nei livelli di AMH dopo 2 settimane di trattamento anti-HER2 da solo è stata lieve, diversamente da quanto osservato con la chemioterapia dopo questa breve finestra di 2 settimane (62; 63). Non è stata osservata un'ulteriore riduzione dei livelli di AMH con il doppio blocco anti-HER2 rispetto a trastuzumab e lapatinib somministrati come singolo agente: quindi, l'impatto gonadico di queste terapie anti-HER2, quando somministrate senza chemioterapia, è probabilmente di scarso impatto clinico. Considerando che altri agenti anti-HER2, compresi i coniugati anticorpo-farmaco, sono entrati nella pratica clinica o sono in fase avanzata di sviluppo in pazienti con carcinoma mammario precoce HER2-positivo, ulteriori sforzi in questo campo sono molto attesi. In tutti i trial che studiano nuovi agenti antitumorali e che includono donne in premenopausa, la raccolta dei risultati sulla salute riproduttiva dovrebbe diventare parte della valutazione standard della loro tossicità (64).

L'agente alchilante ciclofosfamide è il trattamento più gonadotossico comunemente somministrato alle pazienti con cancro al seno; allo stesso modo, il rischio di insufficienza ovarica precoce indotta dal trattamento con antracicline è ben noto (57; 58). Nella maggior parte delle pazienti che ricevono questi regimi di chemioterapia, i valori di AMH scendono a livelli non rilevabili durante il trattamento con un recupero solo parziale e minimo dopo il completamento del trattamento (63). Quindi, nonostante il recupero della funzione mestruale e le gravidanze spontanee siano possibili (65) questi agenti causano un importante danno permanente alla riserva ovarica delle donne, suggerendo la necessità di offrire strategie di conservazione della fertilità a tutte le giovani donne interessate a concepimenti futuri (57; 58).

Esistono prove più limitate per consigliare le donne sottoposte a chemioterapia a base di Taxani. L'aggiunta di un Taxano alla chemioterapia a base di antracicline e ciclofosfamide sembra essere associata ad un ulteriore aumento del rischio di amenorrea indotta dal trattamento (50; 66), e a

una maggiore riduzione a breve termine dei livelli di AMH (14), senza apparenti differenze tra Docetaxel e paclitaxel (50). Rispetto ai regimi sequenziali con un Taxano somministrato dopo l'Antraciclina più la ciclofosfamide, ci si aspettano tassi simili di amenorrea indotta dal trattamento con l'uso di Docetaxel combinato con ciclofosfamide o Carboplatino (più la terapia anti-HER2) (50; 67). Sulla base dei risultati dello studio APT (45), il paclitaxel settimanale è attualmente ampiamente utilizzato in clinica come unico agente chemioterapico da offrire insieme al trastuzumab alle pazienti con carcinoma mammario precoce HER2-positivo. Quindi, la possibilità di studiare il suo impatto gonadico senza precedente esposizione o co-somministrazione di ciclofosfamide o antracicline utilizzando la coorte NeoALTTO è inestimabile. Nel piccolo gruppo di donne in pre-menopausa incluse nello studio APT con dati disponibili sulla funzione mestruale (n=64), il tasso osservato di amenorrea indotta dal trattamento (28%) è apparso inferiore a quello storicamente atteso con regimi di chemioterapia a base di ciclofosfamide e antracicline (60). Tuttavia, la nostra analisi mostra chiaramente che anche il paclitaxel settimanale da solo ha un impatto negativo acuto sulla riserva ovarica delle donne. Al momento del completamento del paclitaxel è stata osservata un'importante depressione dei livelli di AMH simile a quella prevista con altri agenti chemioterapici gonadotossici noti. Considerando che tutte le pazienti in NeoALTTO hanno ricevuto una chemioterapia a base di antracicline e ciclofosfamide dopo l'intervento e che non erano disponibili campioni di siero durante il follow-up, l'impatto gonadico a lungo termine di questo trattamento rimane sconosciuto. Sono molto attesi studi futuri che indaghino il potenziale recupero successivo della riserva ovarica delle donne a lungo termine per caratterizzare ulteriormente la gonadotossicità dei Taxani a singolo agente.

L'età è il più importante fattore legato al paziente che influenza il rischio di gonadotossicità (57; 58). Ciò è confermato nella nostra analisi che mostra una chiara tendenza a livelli di AMH più bassi al basale e una riduzione più profonda dei livelli di AMH nelle pazienti più anziane. Allo stesso modo, la riserva ovarica al basale (che è direttamente – ma non solo – legata all'età) misurata dai livelli di AMH influenza e predice il rischio di gonadotossicità indotta dal trattamento (57; 58). Nella nostra analisi, l'entità della riduzione dei livelli di AMH era fortemente influenzata dai valori al basale. Tuttavia, nonostante l'età e la riserva ovarica basale abbiano confermato il loro ruolo cruciale nell'influenzare il rischio di gonadotossicità, va notato che tutte le donne (comprese le più giovani e quelle con i valori più alti di AMH alla diagnosi) hanno avuto una riduzione acuta importante dei livelli di AMH al di sotto della soglia di 1 ng/mL in seguito a paclitaxel settimanale e agenti anti-HER2. Pertanto, anche se la maggior parte delle giovani donne con cancro al seno, e in particolare quelle con meno di 35 anni e con una riserva ovarica basale ottimale, è probabile che conservino o riacquistino la funzione ovarica dopo il completamento della chemioterapia e sperimentino una gravidanza spontanea (68), tali trattamenti possono causare danni ovarici anche in queste pazienti. Quindi, tutte le donne che

ricevono trattamenti anticancro sistemici devono essere considerate a potenziale rischio di gonadotossicità indotta dal trattamento e devono ricevere una consulenza di oncofertilità completa dove deve essere offerta la possibilità di sottoporsi a strategie di conservazione della fertilità (57; 58).

In medicina della riproduzione, l'AMH è un eccellente biomarcatore per stimare la risposta alla stimolazione ovarica controllata (69; 70). Tuttavia, la sua capacità di prevedere il potenziale riproduttivo rimane dibattuta e bassi livelli di AMH non sembrano essere associati a una ridotta fertilità (71). In giovani pazienti oncologiche con livelli di AMH bassi o non rilevabili, sono state descritte gravidanze spontanee. Nella nostra analisi, sebbene non fossero disponibili informazioni sui livelli di AMH durante il follow-up e al momento del concepimento, non sono state osservate differenze apparenti nei valori post-trattamento tra pazienti con o senza gravidanza successiva. Mentre l'AMH rappresenta un biomarcatore del danno ovarico indotto dal trattamento, non dovrebbe essere considerato un test di fertilità né una misura del potenziale riproduttivo.

Tra i limiti dello studio, va notato che questa analisi non era prevista nel protocollo dello studio. Non erano disponibili campioni di siero dopo l'intervento, quindi non è stato possibile valutare l'impatto della successiva chemioterapia a base di antracicline e ciclofosfamide e il potenziale recupero dei livelli di AMH dopo il completamento del trattamento. Inoltre, nessuna informazione sulla funzione mestruale dopo l'inizio del trattamento è stata raccolta come parte dello studio NeoALTTO. Tuttavia, tutti i campioni sono stati raccolti prospetticamente durante la conduzione dello studio in precisi punti temporali e la loro conservazione ha seguito rigorose procedure operative. Il test AMH più sensibile, che offre una maggiore precisione rispetto ad altri test disponibili, è stato utilizzato per analizzare centralmente tutti i campioni. L'unicità di questa analisi è rappresentata dalla possibilità di studiare l'impatto gonadico di entrambi gli agenti anti-HER2 in monoterapia e del paclitaxel settimanale senza il precedente effetto confondente della chemioterapia a base di antracicline e ciclofosfamide che sono caratterizzati da un ben noto profilo di gonadotossicità. Sono state registrate informazioni sulle gravidanze post-trattamento permettendo di ottenere ulteriori informazioni sull'impatto di tali terapie sul potenziale di fertilità delle pazienti.

## 5. CONCLUSIONI

La presente analisi dei biomarcatori dello *studio NeoALTT0* in pazienti in premenopausa con carcinoma mammario precoce HER2-positivo non precedentemente esposto a chemioterapia a base di antracicline e ciclofosfamide fornisce prove sull'impatto acuto della terapia anti-HER2 in monoterapia (trastuzumab e/o lapatinib) e poi combinata con paclitaxel settimanale sulla riserva ovarica delle donne misurata dai livelli di AMH. Una lieve ma significativa riduzione dei livelli di AMH durante il trattamento anti-HER2 da solo e poi una profonda riduzione a livelli quasi non rilevabili dopo la sua combinazione con paclitaxel settimanale è stata osservata senza differenze in base al tipo di agente mirato anti-HER2 somministrato. Maggiore è l'età e più bassi sono i livelli di AMH al momento dell'inizio del trattamento, maggiore è il rischio di gonatotossicità. Questi dati sono altamente rilevanti per migliorare la consulenza di oncofertilità al momento della diagnosi di tutte le donne in premenopausa con carcinoma mammario HER2-positivo, aggiungendo alle conoscenze in questo campo l'evidenza che anche questi trattamenti possono causare danni gonadici.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Linee Guida Neoplasie della Mammella. **AIOM**. 18 Dicembre 2020, p. 522.
2. *Cancer Statistics*, 2020. **Siegel RL et al.** 2020, American Cancer Society Journals, Vol. 70, N°1.
3. **Fidler MM, et al.** s.l. : *The Lancet Oncology*, 2017, Vol. 18 N°12, p. 1579-89.
4. Proportion of U.S. trends in breast cancer incidence attributable to long-term changes in risk factor distributions. **Pfeiffer RM et al.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2018, p. 1214-1222.
5. *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016*. **Howlander N, et al.** 2019, National Cancer Institute.
6. Breast cancer in low-middle income countries: abnormality in splicing and lack of targeted treatment options. **Francies FZ, et al.** 2020, *American Journal of Cancer Research*, Vol. 10, N°5, p. 1568-1591.
7. Contemporary Hormonal Contraception and the Risk of Breast Cancer. **Mørch LS, Skovlund CW, Hannaford PC, Iversen L, Fielding S, Lidegaard Ø.** s.l. : *The New England Journal of Medicine*, 2017, Vol. 377 (2228-2239).
8. Biology of breast cancer in young women. **Azim Jr. HA, Partridge AH.** 2014, *Breast Cancer Research*, Vol. 16, p. 427.
9. Principles of cancer screening: lessons from history and study design issues. **Croswell JM, et al.** *Semin Oncol.* 2010, p. 202-215.
10. Ovarian damage from chemotherapy and current approaches to its protection. **Spears N, Lopes F, Stefansdottir A, Rossi V, De Felici M, Anderson RA, Klinger FG.** 2019, *Human Reproduction Update*, Vol. 25, N°6, p. 673-693.
11. Chemotherapy-induced damage to ovary: mechanisms and clinical impact. **Bedoschi G, Navarro PA, Oktay K.** 2016, *Future Oncology*, Vol. 12, p. 2333-2344.
12. In vivo bioimaging as a novel strategy to detect doxorubicin-induced damage to gonadal blood vessels. **Bar-Joseph H, Ben-Aharon I, Tzabari M, Tsarfaty G, Stemmer SM, Shalgi R.** 2011, *PLoS One*, Vol. 6.
13. Mechanisms of chemotherapy-induced human ovarian aging: double strand DNA breaks and microvascular compromise. **Soleimani R, Heytens E, Darzynkiewicz Z, Oktay K.** 2011, *Aging*, Vol. 3, p. 782-793.
14. Impact of Taxanes, Endocrine Therapy, and Deleterious Germline BRCA Mutations on Anti-müllerian Hormone Levels in Early Breast Cancer Patients Treated With Anthracycline- and Cyclophosphamide-Based Chemotherapy. **Lambertini M, Olympios N, Lequesne J, Calbrix C, Fontanilles M, Loeb A, Leheurteur M, Demeestere I, Di Fiore F, Perdrix A, Clatot F.** 2019, *Frontiers in Oncology*.
15. Effects of adjuvant tamoxifen and of cytotoxic therapy on mortality in early breast cancer. An overview of 61 randomized trials among 28,896 women. **Group, Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group.** 1988, *The New England Journal of Medicine*, Vol. 319, p. 1681-1692.
16. Impact of tamoxifen therapy on fertility in breast cancer survivors. **Shandley LM, Spencer JB, Fothergill A, Mertens AC, Manatunga A, Paplomata E, Howards PP.** 2017, *Fertility and Sterility*, Vol. 107, p. 243-252.
17. Ormone anti-mülleriano (AMH): funzione e livelli nell'uomo e nella donna. **Radicioni A., et al.** 2017, *SIE - Società Italiana Endocrinologia*.
18. Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences. **Broekmans FJ, Soules MR, Fauser BC.** 2009, *Endocrine Reviews*, Vol. 30 N°5, p. 465-493.
19. The physiology and clinical utility of anti-Müllerian hormone in women. **Dewailly D., Andersen CY., Balen A., Broekmans F., Dilaver N., Fanchin R., Griesinger G., Kelsey TW., La Marca A., Lambalk C., Mason H., Nelson S., Visser J., Wallace WH., Anderson RA.** 2014, *Human Reproduction Update*, Vol. 20, N°3, p. 370-385.
20. Early follicular serum müllerian-inhibiting substance levels are associated with ovarian response during assisted reproductive technology cycles. **Seifer DB, MacLaughlin DT, Christian BP, Feng B, Shelden RM.** 2002, *Fertility and Sterility*, Vol. 77, p. 468-471.
21. Anti-Müllerian Hormone and Ovarian Reserve: Update on Assessing Ovarian Function. **Moolhuijsen LME, Visser JA.** 2020, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Vol. 105, N°11, p. 3361-3373.
22. Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function. **Visser JA, de Jong FH, Laven JSE, Themmen APN.** 2006, *Reproduction*, Vol. 131, N° 1, p. 1-9.
23. Fertility preservation for girls and young women with cancer: what are the remaining challenges? **Wallace WHB., Barr RD.** 2010, *Human Reproduction Update*, Vol. 16, N° 6, p. 614-616.
24. How do chemotherapeutic agents damage the ovary? **Morgan S, Anderson RA, Gourley C, Wallace WHB, Spears N.** 2012, *Human Reproduction Update*, Vol. 18, N° 5, p. 525-535.
25. GnRHa for ovarian protection and the association between AMH and ovarian function during adjuvant chemotherapy for breast cancer. **Zhong Y, Lin Y, Cheng X, et al.** 2019, *Journal of Cancer*, Vol. 10, N° 18, p. 4278-4285.
26. The utility of anti-müllerian hormone in the diagnosis and prediction of loss of ovarian function following chemotherapy for early breast cancer. **Anderson RA, Mansi J, Coleman RE, Adamson DJA, Leonard RCF.** 2017, *European Journal of Cancer*, Vol. 87, p. 58-64.
27. Pretreatment fertility counseling and fertility preservation improve quality of life in reproductive age women with cancer. **Letourneau JM, Ebbel EE, Katz PP, Katz A, Ai WZ, Chien AJ, Melisko ME, Cedars MJ, Rosen MP.** 2012, *Cancer*, Vol. 118, p. 1710-1717.
28. Prospective study of fertility concerns and preservation strategies in young women with breast cancer. **Ruddy KJ, Gelber SI, Tamimi RM, et al.** 2014, *Journal of Clinical Oncology*, Vol. 32, p. 1151-1156.

29. Prospective study to optimize care and improve knowledge on ovarian function and/or fertility preservation in young breast cancer patients: results of the pilot phase of the PREgnancy and FERTility (PREFER) study. **Lambertini M, Fontana V, Massarotti C, Poggio F, Dellepiane C, Iacono G, Abate A, Miglietta L, Ferreccio C, Pescio MC, Conte B, Blondeaux E, Bighin C, D'Alonzo A, Vaglica M, Zanardi E, Boccardo F, Ballestrero A, Anserini P, Del Mastro L.** 2018, *The Breast*, Vol. 41, p. 51-56.
30. Fertility concerns, preservation strategies and quality of life in young women with breast cancer: Baseline results from an ongoing prospective cohort study in selected European Centers. **Ruggeri M, Pagan E, Bagnardi V, Bianco N, Gallerani E, Buser K, Giordano M, Gianni L, Rabaglio M, Freschi A, Cretella E, Clerico M, Farolfi A, Simoncini E, Ciccarese M, Rauch D, Ramello M, Glaus A, Berardi R, Ribbi K, Gelber S, Pagani O, et al.** 2019, *The Breast*, Vol. 47, p. 85-92.
31. Adjuvant Endocrine Therapy for Women With Hormone Receptor-Positive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update on Ovarian Suppression. **Burstein HJ, Lacchetti C, Anderson H, Buchholz TA, Davidson NE, Gelmon KE, Giordano SH, Hudis CA, Solky AJ, Stearns V, Winer EP, Griggs JJ.** 2016, *Journal of Clinical Oncology*, Vol. 34, N° 14, p. 1689-1701.
32. Premature menopause in young breast cancer: effects on quality of life and treatment interventions. **Rosenberg SM, Partridge AH.** 2013, *Journal of Thoracic Disease*, Vol. 5, p. S55-S61.
33. ESO-ESMO 4th International Consensus Guidelines for Breast Cancer in Young Women (BCY4). **Paluch-Shimon S, Cardoso F, Partridge AH, Abulkhair O, Azim Jr. HA, Bianchi-Micheli G, Cardoso MJ, Curigliano G, Gelmon KA, Harbeck N, Merschedorf J, Poortmans P, Pruneri G, Senkus E, Spanic T, Stearns V, Wengstrom Y, Peccatori F, Pagani O.** 2020, *Annals of Oncology*, Vol. 31, N° 6, p. 674-696.
34. Attitudes on fertility issues in breast cancer patients: an Italian survey. **Biglia N, Torrìs R, D'Alonzo M, Codacci Pisanelli G, Rota S, Peccatori FA.** 2015, *Gynecological Endocrinology*, Vol. 31, p. 458-464.
35. The BCY3/BCC 2017 survey on physicians' knowledge, attitudes and practice towards fertility and pregnancy-related issues in young breast cancer patients. **Lambertini M, Di Maio M, Pagani O, Curigliano G, Poggio F, Del Mastro L, Paluch-Shimon S, Loibl S, Partridge AH, Demeestere I, Azim HA Jr, Peccatori FA.** 2018, *The Breast*, Vol. 42, p. 41-49.
36. Long-term Safety of Pregnancy Following Breast Cancer According to Estrogen Receptor Status. **Lambertini M, Kroman N, Ameye L, Cordoba O, Pinto A, Benedetti G, Jensen MB, Gelber S, Del Grande M, Ignatiadis M, de Azambuja E, Paesmans M, Peccatori FA, Azim HA Jr.** 2018, *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 110, p. 426-429.
37. Pregnancies during and after trastuzumab and/or lapatinib in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive early breast cancer: Analysis from the NeoALTTO (BIG 1-06) and ALTTO (BIG 2-06) trials. **Lambertini M, Martel S, Campbell C, Guillaume S, Hilbers FS, Schuehly U, Korde L, Azim HA Jr, Di Cosimo S, Tenglin RC, Huober J, Baselga J, Moreno-Aspitia A, Piccart-Gebhart M, Gelber RD, de Azambuja E, Ignatiadis M.** 2019, *Cancer*, Vol. 125, p. 307-316.
38. Cancer and fertility preservation: international recommendations from an expert meeting. **Lambertini M, Del Mastro L, Pescio MC e Andersen CY, Azim Jr. HA, Peccatori FA, Costa M, Revelli A, Salvagno F, Gennari A, Ubaldi FM, La Sala GB, De Stefano C, Wallace WH, Partridge AH, Anserini P.** 2016, *BMC Medicine*, Vol. 14.
39. The effects of paclitaxel, dose density, and trastuzumab on treatment-related amenorrhea in premenopausal women with breast cancer. **Abusief ME, Missmer SA, Ginsburg ES, Weeks JC, Partridge AH.** 2010, *Cancer*, Vol. 116, p. 791-798.
40. 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. **Partridge A, Gelber S, Gelber RD, Castiglione-Gertsch M, Goldhirsch A, Winer E.** 2007, *European Journal of Cancer*, Vol. 43, p. 1646-1653.
41. Fertility Preservation in Patients With Cancer: ASCO Clinical Practice Guideline Update. **Oktay K, Harvey BE, Partridge AH, Quinn GP, Reinecke J, Taylor HS, Wallace WH, Wang ET, Loren AW.** 2018, *Journal of Clinical Oncology*, Vol. 36, p. 1994-2001.
42. Methods of controlled ovarian stimulation for embryo/oocyte cryopreservation in breast cancer patients. **Lambertini M, Pescio MC, Viglietti G, Goldrat O, Del Mastro L, Anserini P, Demeestere I.** 2016, *Expert Review of Quality of Life in Cancer Care*, p. 47-59.
43. Letrozole reduces estrogen and gonadotropin exposure in women with breast cancer undergoing ovarian stimulation before chemotherapy. **Oktay K, Hourvitz A, Sahin G, Oktem O, Safo B, Cil A, Bang H.** 2006, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, p. 3885-3890.
44. Ovarian protection with gonadotropin-releasing hormone agonists during chemotherapy in cancer patients: From biological evidence to clinical application. **Lambertini M, Horicks F, Del Mastro L, Partridge AH, Demeestere I.** 2019, *Cancer*, Vol. 72, p. 65-77.
45. Seven-Year Follow-Up Analysis of Adjuvant paclitaxel and trastuzumab Trial for Node-Negative, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer. **Tolaney SM, Guo H, Pernas S, Barry WT, Dillon DA, Ritterhouse L, Schneider BP, Shen F, Fuhrman K, Baltay M, Dang CT, Yardley DA, Moy B, Marcom PK, Albain KS, Rugo HS, Ellis MJ, Shapira I, Wolff AC, Carey LA, Overmoyer B, Partridge AH, Hudis CA, Winer EP.** 2019, *Journal of Clinical Oncology*, Vol. 37(1868-1875).
46. Adjuvant paclitaxel and trastuzumab for Node-Negative, HER2-Positive Breast Cancer. **Tolaney SM, Barry WT, Chau TD, Yardley DA, Moy B, Marcom K, Albain KS, Rugo HS, Ellis M, Shapira I, Wolff A, Carey A, et al.** 2015, *The New England Journal of Medicine*, Vol. 372 (134-141).
47. A Food and Drug Administration analysis of survival outcomes comparing the Adjuvant paclitaxel and trastuzumab trial with an external control from historical clinical trials. **Amiri-Kordestani L, Xie D, Tolaney SM, Bloomquist E, Tang S, Ibrahim A, Goldberg KB, Theoret MR, Pazdur R, Sridhara R, Winer EP, Beaver JA.** 2020, *Annals of Oncology*, Vol. 31 (1704-1708).
48. Oncofertility counselling in pre-menopausal women with HER2-positive breast cancer. **Lambertini M., Demeestere I., Viglietti G., de Azambuja E.** 2019, *Oncotarget*, p. 926-929.
49. Comparing the Gonadotoxicity of Multiple Breast Cancer Regimens: Important Understanding for Managing Breast Cancer in Pre-Menopausal Women. **Martelli V, Latocca MM, Ruelle T, Perachino M, Arecco L, Beshiri K, Razeti MG, Tagliamento M, Cosso M, Fregatti P, Lambertini M.** 2021, *Breast Cancer*, p. 341-351.
50. Adjuvant Anti-HER2 Therapy, Treatment-Related Amenorrhea, and Survival in Premenopausal HER2-Positive Early Breast Cancer Patients. **Lambertini M, Campbell C, Bines J, Korde LA, Izquierdo M, Fumagalli D, Del Mastro L, Ignatiadis M, Pritchard K, Wolff AC, Jackisch C, Lang I, Untch M, Smith I, Boyle F, Xu B, Barrios CH, Baselga J, Moreno-Aspitia A, Piccart M, Gelber RD, de Azambuja E.** 2019, *Journal of the National Cancer Institute*, p. 86-94.
51. Adjuvant Pertuzumab and trastuzumab in Early HER2-Positive Breast Cancer in the APHINITY Trial: 6 Years' Follow-Up. **Piccart M, Procter M, Fumagalli D, de Azambuja E, Clark E, Ewer MS, Restuccia E, Jerusalem G, Dent S, Reaby L, Bonnefoi H, Krop I, Liu TW, Pienkowski T, Toi M, Wilcken N, Andersson M, Im YH, Tseng LM, Lueck HJ, Colleoni M, Monturus E, Sicoe M, et al.** 2021, *Journal of Clinical Oncology*, p. 1448-1457.

52. Neratinib after trastuzumab-based adjuvant therapy in HER2-positive breast cancer (ExteNET): 5-year analysis of a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. **Martin M, Holmes FA, Ejlertsen B, Delaloge S, Moy B, Iwata H, von Minckwitz G, Chia SKL, Mansi J, Barrios CH, Gnant M, Tomašević Z, Denduluri N, Šeparović R, Gokmen E, Bashford A, Ruiz Borrego M, Kim SB, Jakobsen EH, Ciceciene A, Inoue K, et al.** 2017, *The Lancet Oncology*, p. 1688-1700.
53. trastuzumab Emtansine for Residual Invasive HER2-Positive Breast Cancer. **von Minckwitz G, Huang CS, Mano MS, Loibl S, Mamounas EP, Untch M, Wolmark N, Rastogi P, Schneeweiss A, Redondo A, Fischer HH, Jacot W, Conlin AK, Arce-Salinas C, Wapnir IL, Jackisch C, DiGiovanna MP, Fasching PA, Crown JP, Wülfing P, Shao Z, et al.** 2019, *The New England Journal of Medicine*, p. 617-628.
54. Abstract P2-13-02: chemotherapy-related amenorrhea (CRA) after adjuvant trastuzumab emtansine (T-DM1) compared to paclitaxel in combination with trastuzumab (TH) (TBCRC033: ATEMPT trial). **Ruddy KJ, Trippa L, Hu J, et al.** 2020, *American Association for Cancer Research*, p. P2-13-02-P2-13-02.
55. On the use of a Friedman-type statistic in balanced and unbalanced block designs. **Skilling JH, Mack GA.** 1981, *Technometrics*, p. 23: 171-177.
56. Robust Locally Weighted Regression and Smoothing Scatterplots. **WS, Cleveland.** 1979, Vol. 74(368): 829-36.
57. Fertility Preservation and post-treatment pregnancies in post-pubertal cancer patients: ESMO Clinical Practice Guidelines. **Lambertini M, Peccatori FA, Demeestere I, Amant F, Wyns C, Stukenberg JB, et al.** 2018, *Annals of Oncology*, p. 31(12):1664-78.
58. ESHRE guideline: female fertility preservation. **Anderson RA, Amant F, Braat D, D'Angelo A, Chua de Sousa Lopes SM, et al.** 2020, *Human Reproduction Open*, p. 2020(4):hoaa052.
59. Anti-mullerian hormone as a serum biomarker for risk of chemotherapy-induced amenorrhea. **Ruddy KJ, Schaid DJ, Batzler A, Cecchini RS, Partridge AH, Norman A, et al.** 2020, *Journal of the National Cancer Institute*.
60. Chemotherapy-related amenorrhea after adjuvant paclitaxel-trastuzumab (APT trial). **Ruddy KJ, Guo H, Barry W, Dang CT, Yardley DA, Moy B, et al.** 2015, *Breast Cancer Research and Treatment*, p. 151(3):589-96. .
61. The epidermal growth factor network: role in oocyte growth, maturation and developmental competence. **Richani D, Gilchrist RB.** *Human Reproduction Update*, p. 24(1):1-14.
62. Anti-Müllerian hormone follow-up in young women treated by chemotherapy for lymphoma: preliminary results. **Decanter C, Morschhauser F, Pigny P, Lefebvre C, Gallo C, Dewailly D.** 2010, *Reproductive BioMedicine Online*, p. 20(2):280-5.
63. Prospective evaluation of serum anti-Müllerian hormone dynamics in 250 women of reproductive age treated with chemotherapy for breast cancer. **Dezellus A, Barriere P, Campone M, Lemanski C, Vanlemmens L, Mignot L, et al.** 2017, *European Journal of Cancer*, p. 79:72-80. .
64. Cancer survivorship: Reproductive health outcomes should be included in standard toxicity assessments. . **Anderson RA, Clatof F, Demeestere I, Lambertini M, Morgan A, Nelson SM, et al.** 2021, *European Journal of Cancer*, p. 144: 310-316.
65. Gonadotropin-releasing hormone agonists during chemotherapy for preservation of ovarian function and fertility in premenopausal patients with early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient-level data. **Lambertini M, Moore HCF, Leonard RCF, Loibl S, Munster P, Bruzzone M, Boni L, Unger JM, Anderson RA, Mehta K et al.** 2018, *Journal of Clinical Oncology*, Vol. 36, p. 1981-1990.
66. Factors associated with ovarian function recovery after chemotherapy for breast cancer: a systematic review and meta-analysis. **Silva C, Caramelo O, Almeida-Santos T, Ribeiro Rama AC.** 2016, *Human Reproduction*, p. 31(12): 2737-2749.
67. Adjuvant Cyclophosphamide and Docetaxel With or Without Epirubicin for Early TOP2A-Normal Breast Cancer: DBCG 07-READ, an Open-Label, Phase III, Randomized Trial. **Ejlertsen B, Tuxen MK, Jakobsen EH, Jensen M-B, Knoop AS, Højris I, et al.** 2017, *Journal of Clinical Oncology*, p. 35(23):2639-46.
68. Pregnancy after breast cancer: Results from a prospective cohort of young women with breast cancer. **Poorvu PD, Gelber SI, Zheng Y, Ruddy KJ, Tamimi RM, Peppercorn J, et al.** 2021, *Cancer*, p. 127(7):1021-1028.
69. Serum anti-Müllerian hormone predicts ovarian response and cycle outcome in IVF patients. **Wu C-H, Chen Y-C, Wu H-H, Yang J-G, Chang Y-J, Tsai H-D.** 2009, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, p. 26(7):383-389.
70. alue of antimüllerian hormone as a prognostic indicator of in vitro fertilization outcome. **Reichman DE, Goldschlag D, Rosenwaks Z.** 2014, *Fertility and Sterility*, p. 101(4):1012-1018.
71. Association Between Biomarkers of Ovarian Reserve and Infertility Among Older Women of Reproductive Age. **Steiner AZ, Pritchard D, Stanczyk FZ, Kesner JS, Meadows JW, Herring AH, et al.** 2017, *JAMA*, p. 318(14):1367-76.
72. Anti-Mullerian hormone is a specific marker of sertoli- and granulosa-cell origin in gonadal tumors. **Rey R., Sabourin JC., Venara M., Long WQ., Jaubert F., Zeller WP., Duvillard P., Chemes H., Bidart JM.** 2000, *Human Pathology*, Vol. 31, p. 1202-1208.
73. The role of inhibins B and antimüllerian hormone for diagnosis and follow-up of granulosa cell tumors. . **Geerts I., Vergote I., Neven P., Billen J.** 2009, *International Journal of Gynecological Cancer*.
74. Serum anti-Mullerian hormone throughout the human menstrual cycle. **La Marca A., Stabile G., Arsenio AC., Volpe A.** 2006, *Human Reproduction*, Vol. 21, p. 3103-3107.
75. Elevated prenatal anti-mullerian hormon reprograms the fetus and induces polycystic ovary syndrome in adulthood. **Tata B., Mimouni N., Barbotin AL., Malone SA., Loyens A., Pigny P., Dewailly D., Catteau-Jonard S., Sundström-Poromaa I., Piltonen TT., Dal Bello F., Medana C., Prevot V., Clasadonte J., Giacobini P.** 2018, *Nature Medicine*, Vol. 24, N°6, p. 834-846.
76. Anti-Mullerian hormone is a sensitive serum marker for gonadal function in women treated for Hodgkin's lymphoma during childhood. **van Beek RD, van den Heuvel-Eibrink MM, Laven JS, de Jong FH, Themmen AP, Hakvoort-Cammel FG, van den Bos C, van den Berg H, Pieters R, de Muinck Keizer-Schrama SM.** 2007, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Vol. 92, N° 10, p. 3869-3874.
77. Anti-mullerian hormone predicts menopause: a long-term follow-up study in normoovulatory women. **Broer SL, Eijkemans MJC, Scheffer GJ, van Rooij IAJ, de Vet A, Themmen APN, Laven JSE, de Jong FH, Velde ERT, Fauser BC, Broekmans FM.** 2011, *The Journal of Clinical Endocrinological & Metabolism*, Vol. 96, N° 8, p. 2532-2539.

78. Human ovarian reserve from conception to the menopause. **Wallace WHB, Kelsey TW.** 2010, *Plos One*.
79. Impairment of BRCA1-related DNA double-strand break repair leads to ovarian aging in mice and humans. **Titus S, Li F, Stobezki R, Akula K, Unsal E, Jeong K, Dickler M, Robson M, Moy F, Goswami S, Oktay K.** 2013, *Science Translational Medicine*.
80. Fertility and pregnancy issues in BRCA-mutated breast cancer patients. **Lambertini M, Goldrat O, Toss A, Azim HAJ, Peccatori F, Ignatiadis M, Del Mastro L, Demeestere I.** 2017, *Cancer Treatment Reviews*, Vol. 59, p. 61-70.
81. Pregnancies following high-dose cyclophosphamide with or without busulphan or total body irradiation and bone marrow transplantation. **Sanders J, Hawley J, Levy W, Gooley T, Buckner CD, Deeg HJ, Doney K, Storb R, Sullivan K, Wotherspoon R, et al.** 1996, *Blood*, Vol. 87, p. 3045-3052.
82. Predicting age of ovarian failure after radiation to a field that includes the ovaries. **Wallace WHB, Thomson AB, Saran F, Kelsey TW.** 2005, *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, Vol. 62, p. 738-744.
83. American Society of Clinical Oncology/American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. **Lee SJ, Schover LR, Partridge AH, Patrizio P, Wallace WH, Hagerty K, Beck LN, Brennan LV, Oktay K.** 2006, *Journal of Clinical Oncology*, Vol. 24, p. 2917-2931.
84. Ovarian cryopreservation for fertility preservation: indications and outcomes. **Anderson RA, Wallace WH, Baird DT.** 2008, *Reproduction*, Vol. 136, p. 681-689.
85. Ovarian function, fertility and reproductive lifespan in cancer patients. **Jayasinghe YL, Wallace WHB, Anderson RA.** 2018, *Expert Review of Endocrinology & Metabolism*, Vol. 13, p. 125-136.
86. Reproductive function and outcomes in female survivors of childhood, adolescent, and young adult cancer: a review. **van Dorp W, Haupt R, Anderson RA, Mulder RL, van den Heuvel-Eibrink MM, van Dulmen-den Broeder E, Su HI, Falck Winther J, Hudson MM, Levine JM et al.** 2018, *Journal of Clinical Oncology*, Vol. 36, p. 2169-2180.
87. Management of women with premature ovarian insufficiency. 2015, *European Society of Human Reproduction and Embryology*.
88. Hormone-replacement therapy: current thinking. **RA, Lobo.** 2017, *Nature Reviews Endocrinology*, Vol. 13, p. 220-231.
89. AMH/MIS as a contraceptive that protects the ovarian reserve during chemotherapy. **Kano M, Sosulski AE, Zhang L, Saatcioglu HD, Wang D, Nagykerly N, Sabatini ME, Gao G, Donahoe PK, Pepin D.** 2017, *Proceeding of the National Academy of Sciences of The United States of America*, Vol. 114, p. E1688-E1697.
90. AMH prevents primordial ovarian follicle loss and fertility alteration in cyclophosphamide-treated mice. **Sonigo C, Beau I, Grynberg M, Binart N.** 2018, *FASEB Journal*, Vol. 33, p. 1278-1287.
91. Cancer treatment and gonadal function: experimental and established strategies for fertility preservation in children and young adults. **Anderson RA, Mitchell RT, Kelsey TW, Spears N, Telfer EE, Wallace WH.** 2015, *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, Vol. 3, p. 556-567.
92. Breast Cancer Diagnosed During Pregnancy: Adapting Recent Advances in Breast Cancer Care for Pregnant Patients. **Loibl S, Schmidt A, Gentilini O, Kaufman B, Kuhl C, Denkert C, von Minckwitz G, Parokonnaya A, Stensheim H, Thomssen C, van Calsteren, Poortmans P, Berveiller P, Markert UR, Amant F.** 2015, *JAMA Oncology*, Vol. 1, N° 8, p. 1145-1153.
93. Ovarian reserve in women who remain premenopausal after chemotherapy for early stage breast cancer. **Partridge AH, Ruddy KJ, Gelber S, Schapira L, Abusief M, Meyer M, Ginsburg E.** 2010, *Fertility and Sterility*, Vol. 94, p. 638-644.
94. Mullerian-inhibiting substance inhibits cytochrome P450 aromatase activity in human granulosa lutein cell culture. **Grossman MP, Nakajima ST, Fallat ME, Siow Y.** 2008, *Fertility and Sterility*, Vol. 89, p. 1364-1370.
95. Evidence of residual disease in cryopreserved ovarian cortex from female patients with leukemia. **Rosendahl M, Andersen MT, Ralfkiaer E, Kjeldsen L, Andersen MK, Andersen CY.** 2010, *Fertility and Sterility*.
96. Cancer, pregnancy and fertility: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Peccatori FA, Azim Jr. HA, Orecchia R, Hoekstra HJ, Pavlidis N, Kesic V, Pentheroudakis G.** 2013, *Annals of Oncology*, Vol. 24.
97. Perimenopausal conception. **Tarlatzis BC, Zepiridis L.** 2003, *Annals of the New York Academy of Sciences*.
98. Ovarian Suppression With Triptorelin During Adjuvant Breast Cancer Chemotherapy and Long-term Ovarian Function, Pregnancies, and Disease-Free Survival: A Randomized Clinical Trial. **Lambertini M, Boni L, Michelotti A, Gamucci T, Scotto T, Gori S, Giordano M, Garrone O, Levaggi A, Poggio F, Giraudi S, Bighin C, Vecchio C, Sertoli MR, Pronzato P, Del Mastro L.** 2015, *JAMA*, Vol. 314, p. 2632-2640.
99. Sphingosine-1-phosphate suppresses cyclophosphamide induced follicle apoptosis in human fetal ovarian xenografts in nude mice. **Meng Y, Xu Z, Wu F, Chen W, Xie S, Liu J, Huang X, Zhou Y.** 2014, *Fertility and Sterility*, Vol. 102, p. 871-877.
100. Sphingosine-1-phosphate prevents chemotherapy-induced human primordial follicle death. **Li F, Turan V, Lierman S, Cuvelier C, De Sutter P, Oktay K.** 2014, *Human Reproduction*, Vol. 29, p. 107-113.
101. The prognosis of women diagnosed with breast cancer before, during and after pregnancy: a meta-analysis. **Hartman EK, Eslick GD.** 2016, *Breast Cancer Research and Treatment*, Vol. 160, p. 347-360.
102. Association of the Timing of Pregnancy With Survival in Women With Breast Cancer. **Iqbal J, Amir E, Rochon PA, Giannakeas V, Sun P, Narod SA.** 2017, *JAMA Oncology*, Vol. 3, p. 659-665.
103. Biological variability in serum anti-Müllerian hormone throughout the menstrual cycle in ovulatory and sporadic anovulatory cycles in eumenorrheic women. **Kissell KA, Danaher MR, Schisterman EF, Wactawski-Wende J, Ahrens KA, Schliep K, Perkins NJ, Sjaarda L, Weck J, Mumford SL.** 2014, *Human Reproduction*, Vol. 29, p. 1764-1772.
104. The PREgnancy and FERtility (REFER) study: an Italian multicenter prospective cohort study on fertility preservation and pregnancy issues in young breast cancer patients. **Lambertini, M., Anserini, P., Fontana, V. et al.** 2017, *BMC Cancer*.