

ESTIMULAÇÃO ANGIOGÉNICA DE TECIDO OVÁRIO CRIOPRESERVADO

ESTIMULAÇÃO ANGIOGÉNICA DE TECIDO OVÁRIO CRIOPRESERVADO

UNIVERSIDADE DE
COIMBRA



UNIVERSIDADE DE
COIMBRA



Maria Carolina Pereira Reis

**ESTIMULAÇÃO ANGIOGÉNICA DE TECIDO OVÁRIO
CRIOPRESERVADO**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Bioquímica orientada pelo
Professor Doutor João Ramalho Sousa Santos e pela Doutora Ana
Paula de Sousa e apresentada ao departamento de Ciências da Vida da
Universidade de Coimbra.

Agosto de 2018

Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Estimulação angiogénica de tecido ovárico criopreservado

Maria Carolina Pereira Reis

Dissertação de Mestrado em Bioquímica orientada pelo Professor Doutor João Ramalho Sousa Santos e pela Doutora Ana Paula de Sousa e apresentada ao Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Agosto de 2018



UNIVERSIDADE D
COIMBRA



“Remember to look up at the stars and not
down at your feet. Try to make sense of what you see
and wonder about what makes the universe exist.

Be curious.

And however difficult life may seem,
there is always something you can do and succeed at.
It matters that you don't just give up.”

Stephen Hawking

Agradecimentos

Agradeço ao Professor Doutor João Ramalho Santos por me ter acolhido no grupo de trabalho que lidera, por ter acreditado nas minhas capacidades tendo sempre uma palavra de incentivo e ânimo nos meus momentos de dúvida e ansiedade.

Agradeço de igual modo à Doutora Ana Paula de Sousa, por me levar a compreender melhor o mundo da ciência. Agradeço a forma como valorizou todas as minhas pequenas descobertas e me tranquilizou em momentos de hesitação.

À Dra Ana Sofia Pais, agradeço por me ter permitido fazer parte do seu projeto e por todos os momentos de partilha do saber, que em clima de cumplicidade, foram importantes para a execução do estudo.

Um agradecimento à Professora Doutora Teresa Almeida Santos por me ter recebido no Serviço de Medicina da Reprodução do CHUC, onde tive a oportunidade de realizar parte do trabalho e estar em contacto com a vertente clínica. Um obrigada ainda a todas as funcionárias deste serviço.

Ao serviço de Anatomia Patológica do CHUC, nomeadamente à Doutora Fátima Silva pelo processamento dos tecidos que me permitiu a análise histológica e imunohistoquímica. Tenho a agradecer a sua incansável disponibilidade para me receber e esclarecer as minhas dúvidas.

Ao laboratório de oncologia e hematologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, na pessoa da Doutora Ana Cristina Gonçalves, pelo apoio no campo da biologia molecular, não só ao nível das infraestruturas, mas principalmente pela transmissão do conhecimento técnico-científico. Gostaria também de agradecer à Raquel e à Joana, por me terem acompanhado de forma amável durante a estadia no seu laboratório.

A todo o grupo de Biologia da Reprodução e Células Estaminais que tão bem me recebeu. Recordarei sempre as reuniões onde, num ambiente de cumplicidade científica, se valorizou não só a partilha do conhecimento como também o sentimento de entajuda e de pertença. Agradeço em especial, à Paula Mota, à Sandra Amaral, à

Ana Sofia Rodrigues e à Sandra Reis todo o apoio e a disponibilidade para esclarecer as minhas questões, bem como todas as sugestões para superar os constrangimentos. Agradeço-lhes ainda todo o apoio motivacional, que também recebi por parte da Bibiana, Renata, Maria Inês, Alexandra e Andreia.

Ao clã que me acolheu e integrou na cidade de Coimbra, obrigada por me mostrarem o espírito desta cidade e pelos momentos de “terapia de grupo” em que cada um de nós olhava o outro como companheiro de aprendizagem.

Às minhas meninas da Covilhã, que mesmo longe marcaram sempre a sua animada presença de forma regular.

Agradeço ao David toda a paciência e por estar sempre a torcer por mim.

Ao meu irmão e aos meus pais, agradeço a compreensão dos fins de semana passados em Coimbra; obrigada por me animarem em todos os momentos, pelo apoio incondicional que sempre me transmitiram e por todos os ensinamentos. São a minha força!

Índice

Índice de Figuras.....	vii
Índice de Tabelas.....	x
Lista de abreviaturas.....	xi
Resumo.....	xiv
Abstract.....	xvi
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Sistema Reprodutor Feminino.....	2
1.1.1 Oogénese e foliculogénese.....	3
1.1.2 Balanço entre o desenvolvimento folicular e atresia.....	7
1.1.3 Sistema reprodutor feminino do rato.....	11
1.2. Oncofertilidade e preservação da fertilidade.....	13
1.3. Angiogénese.....	16
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS.....	21
CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1. Congelação lenta e descongelação do tecido ovárico.....	24
3.2. Cultura do tecido ovárico.....	26
3.3. Avaliação Histológica.....	27
3.4.1 Avaliação qualitativa do estado do tecido.....	29
3.4.2 Classificação e densidade dos folículos.....	29
3.4. Avaliação da proliferação celular, da formação de vasos sanguíneos e da apoptose por imunohistoquímica.....	31
3.5.1 Quantificação da marcação resultante da imunohistoquímica.....	34
3.5. Análise da expressão génica dos tecidos por microarray.....	37
3.6.1 Extração de ácidos nucleicos do tecido.....	37
3.6.2 Quantificação de ácido nucleicos.....	38
3.6.3 Análise da expressão génica por microarray.....	39
3.6. Análise estatística.....	41
CAPÍTULO 4: RESULTADOS.....	43
4.1. Avaliação qualitativa da morfologia do tecido.....	44
4.2. Efeito da criopreservação na qualidade do tecido ovárico.....	46
4.3. Impacto da cultura na qualidade do tecido.....	52
4.4. Efeito do tratamento de tecido ovárico com fatores de crescimento VEGF, FGF e com hMG.....	60

CAPÍTULO 5: DISCUSSÃO	74
CAPÍTULO 6: CONCLUSÃO	83
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFIA.....	85
ANEXOS.....	92

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema dos órgãos internos do sistema reprodutor feminino humano.....	2
Figura 2. Distinção entre a medula e o córtex ovárico, num ovário humano..	3
Figura 3. Esquema da evolução folicular.	4
Figura 4. Ciclo ovárico e sua regulação.	7
Figura 5. Esquematisação de fatores de sobrevivência folicular e do processo apoptótico que ocorre nas células da granulosa dos folículos.	9
Figura 6. Esquema do sistema reprodutor feminino de roedor.	12
Figura 7. Representação esquemática das principais etapas do processo angiogénico.	16
Figura 8. Vias de sinalização que promovem a angiogénese.	17
Figura 9. Esquematisação das primeiras etapas da angiogénese e fatores intervenientes em cada uma delas	18
Figura 10. Microscópio Axio Imager.Z2 (Zeiss, Munich, Alemanha).	28
Figura 11. Esquema de funcionamento do kit de deteção OptiView DAB IHQ.	32
Figura 12. Marcação imunohistoquímica com Ki-67	35
Figura 13. Marcação imunohistoquímica com AC-3.	36
Figura 14. Marcação com Fator VIII-R.Ag	37
Figura 15. Imagens representativas do tecido ovárico corado com hematoxilina e eosina nas diferentes condições em estudo às 0h, 4h e 48h de cultura	45
Figura 16. Representação da densidade folicular, expressa em número de folículos por mm ² , no tecido ovárico fresco (TOF) e no tecido ovárico criopreservado (TOPC), ambos às 0h.	46
Figura 17. Representação da percentagem de folículos marcados com Ki-67 e da percentagem de área de estroma marcado com Ki-67, no tecido ovárico fresco (TOF) e no tecido ovárico criopreservado (TOPC), ambos às 0h.	47
Figura 18. Imagens representativas da marcação de AC-3 no estroma e folículos de tecido ovárico fresco.	48
Figura 19. Percentagem de folículos marcados com AC-3 e percentagem de área marcada nos folículos no tecido ovárico fresco (TOF) e no tecido ovárico criopreservado (TOPC), ambos às 0h.	49
Figura 20. Representação da média da percentagem de área de estroma marcado com AC-3 no tecido ovárico fresco (TOF) e no tecido ovárico criopreservado (TOPC), ambos às 0h.	50
Figura 21. Representação da densidade vascular (número de vasos/mm ²) e da percentagem de área vascular no tecido (TOF) e no tecido ovárico criopreservado (TOPC), ambos às 0h.	50
Figura 22. Gráfico de dispersão comparando os grupos TOF 0h e TOPC 0h e respetivo score de dispersão.	51
Figura 23. Representação da densidade folicular no tecido ovárico imediatamente após a criopreservação (TOPC 0h) e no tecido ovárico criopreservado cultivado durante 4 horas (TOPC 4h).	52
Figura 24. Proporção folicular em TOPC 0h e em TOPC 4h.	53
Figura 25. Representação da percentagem de folículos marcados com Ki-67 e da percentagem de área de estroma marcado com este marcador no tecido ovárico imediatamente após criopreservação (TOPC 0h) e no tecido ovárico após criopreservação cultivado durante 4h (TOPC 4h).	54
Figura 26. Percentagem de área de folículo marcada com AC-3 no tecido ovárico após criopreservação no tempo inicial (TOPC 0h) e no tecido ovárico criopreservado cultivado durante 4h (TOPC 4h).	55

Figura 27. Grau de marcação do estroma dado pela percentagem de área de estroma marcado com AC-3.	56
Figura 28. Densidade vascular (número de vasos/mm ²) e percentagem de área vascular no tecido ovárico fresco após criopreservação (TOPC 0h) e no tecido ovárico pós criopreservado após 4h de cultura (TOPC 4h).	56
Figura 29. Gráfico de dispersão comparando os grupos TOPC 0h e TOPC 4h respetivo score de dispersão.	57
Figura 30. Gráfico Volcano de log ₂ (fold-change) versus -log ₁₀ (valor p corrigido), comparando a expressão génica em TOPC 4h relativamente à expressão dos TOPC 0h.	59
Figura 31. Representação da densidade folicular nos tecidos ováricos criopreservados após 4 horas de cultura, nos tecidos ováricos criopreservados após cultura tratado com VEGF e FGF, nos tecidos após cultura com apenas hMG e nos tecidos cultivados com todos os fatores	61
Figura 32. Proporção folicular, dada pela percentagem de folículos de cada classe, nos tecidos ováricos criopreservados após 4 horas de cultura, nos tecidos ováricos criopreservados após cultura tratado com VEGF e FGF, nos tecidos após cultura com apenas hMG e nos tecidos cultivados com todos os fatores	62
Figura 33. Representação da percentagem de marcação de cada classe folicular com Ki-67, nos tecidos criopreservados após 4 horas de cultura, nos tecidos ováricos criopreservados após cultura tratado com VEGF e FGF, nos tecidos após cultura com apenas hMG e nos tecidos cultivados com todos os fatores.	63
Figura 34. Percentagem da média de área de estroma marcado com Ki-67, nos tecidos ováricos criopreservados após 4 horas de cultura, nos tecidos ováricos criopreservados após cultura tratado com VEGF e FGF, nos tecidos após cultura com apenas hMG e nos tecidos cultivados com todos os fatores.....	64
Figura 35. Representação da percentagem de área de folículo marcado com AC-3 nos tecidos ováricos criopreservados após 4 horas de cultura, nos tecidos ováricos criopreservados após cultura tratado com VEGF e FGF, nos tecidos após cultura com apenas hMG e nos tecidos cultivados com todos os fatores.....	65
Figura 36. Percentagem de área de estroma marcado com AC-3 nos tecidos ováricos criopreservados após 4 horas de cultura, nos tecidos ováricos criopreservados após cultura tratado com VEGF e FGF, nos tecidos após cultura com apenas hMG e nos tecidos cultivados com todos os fatores.....	66
Figura 37. Densidade vascular nos tecidos ováricos criopreservados após 4 horas de cultura, nos tecidos ováricos criopreservados após cultura tratado com VEGF e FGF, nos tecidos após cultura com apenas hMG e nos tecidos cultivados com todos os fatores.....	67
Figura 38. Percentagem de área vascular nos tecidos ováricos criopreservados após 4 horas de cultura (TOPC 4h), nos tecidos ováricos criopreservados após cultura tratado com VEGF e FGF, nos tecidos após cultura com apenas hMG e nos tecidos cultivados com todos os fatores.	67
Figura 39. Gráfico de dispersão tendo como referência o TOPC 4h com os vários grupos com tratamento e respetivos score de dispersão.....	70
Figura 40. Gráfico Volcano de log ₂ (fold-change) versus -log ₁₀ (valor p corrigido), comparando a expressão génica em TOPC 0h relativamente à expressão dos TOPC 4h+VEGF+bFGF.....	71
Figura 41. Gráfico Volcano de log ₂ (fold-change) versus -log ₁₀ (valor p corrigido) comparando a expressão génica em TOPC 0h relativamente à expressão dos TOPC 4h+hMG.	72

Figura 42. Gráfico Volcano de $\log_2(\text{fold-change})$ versus $-\log_{10}(\text{valor p corrigido})$, comparando a expressão génica em TOPC 0h relativamente à expressão dos TOPC 4h+VEGF+bFGF+hMG.
..... 73

Índice de Tabelas

Tabela 1. Descrição do protocolo para a coloração com hematoxilina e eosina (H&E).....	28
Tabela 2. Características estipuladas para a classificação dos folículos	30
Tabela 3. <i>Resumo dos resultados da contagem folicular e da expressão imunohistoquímica no efeito da cultura na qualidade do tecido</i>	57
Tabela 4. Resumo dos resultados da contagem folicular no efeito do tratamento na qualidade do tecido.....	68
Tabela 5. Resumo dos resultados da expressão imunohistoquímica no efeito do tratamento na qualidade do tecido.....	69
Tabela 6. Resumo dos resultados da expressão imunohistoquímica do fator VIII no efeito do tratamento na qualidade do tecido..	69
Tabela 7. Resumo dos genes e da sua expressão e valores de p, dados pelo gráfico Volcano da figura 40.	71
Tabela 8. Resumo dos genes e da sua expressão e valores de p, dados pelo gráfico Volcano da figura 41.	72
Tabela 9. Resumo dos genes e da sua expressão e valores de p, dados pelo gráfico Volcano da figura 42.	73
Tabela 10. Genes em estudo por microarray e referências dos respetivos primers dispostos na placa.	93

Lista de abreviaturas

AC-3: Caspase Activa-3

Ang: Angiopietina

bFGF: *Basic Fibroblast Growth Factor*, Fator de Crescimento Fibroblástico Básico

Bcl-2: *B cell lymphoma-2*

Bax: *Bcl-2 associated x protein*

Bid: *BH3interacting-domain*

CAD: *Endonuclease Caspase-Activated DNase*

CC: *Cell Conditioning*

cDNA: Ácido Desoxirribonucleico Complementar

CHUC: Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

CO²: Dióxido de Carbono

Col4a3: Colagénio, tipo IV, alfa 3

Col18a1: Colagénio, tipo XVIII, alfa 1

Ct: *Cycle Threshold*

°C: *grau Celsius*

DAB: *3'3-Diaminobenzine, 3,3'-Diaminobenzidina*

DNA: *Deoxyribonucleic acid*, Ácido Desoxirribonucleico

DNase: desoxirribonuclease

dNTPs: *Deoxynucleotide Triphosphates*, Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados

DPBS: *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*

EGF: *Epidermal Growth Factor*, Fator de Crescimento da Epiderme

EPAS1: *Endothelial PAS domain-containing protein 1*

FasL: Ligando Fas

Figf: *C-fos Induced Growth Factor*

Fgfr3: *Fibroblast Growth Factor Receptor 3*

FSH: *Follicle Stimulating Hormone*, Hormona Folículo-Estimulante

g: Força Gravitacional

G0: *Gap 0*, intervalo de repouso

G1: *Gap 1*, intervalo 1

G2: *Gap 2*, intervalo 2

GDF-9: *Growth differentiation factor 9*

h: Horas

HIF-1: *Hypoxia-Inducible Factor 1*, Fator de Indução de Hipoxia-1

hMG: *Human Menopausal Gonadotropin*, Gonadotropina Menopáusica Humana

Hprt1: Fosforibosil Transferase Hipoxantina 1

HRP: *Horseradish Peroxidase*

H&E: Hematoxilina e Eosina

IGF-1: *Insulin-like Growth Factor 1*, Fator de Crescimento Semelhante à Insulina

IL-1- α : Interleucina-1- α

ICAD: *Inhibitor of Caspase-Activated DNase*

KL: *c-kit/kit ligand*

Ldha: lactato desidrogenase A

LH: *Luteinizing Hormone*, Hormona Luteinizante

M: Molaridade ou Concentração Molar

M: Mitose

MEM: *Minimum Essential Medium*

mg: miligrama

min: minutos

ml: mililitro

MMPs: metaloproteinases da matriz

mm²: milímetro quadrado

ng: nanograma

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

PDGF: Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

Q1: Quartil Primário

Q3: Quartil Terciário

RNA: *Ribonucleic acid*, Ácido Ribonucleico

RNase: Ribonuclease

RNU: *Rowett Nude*

S: *Synthesis*. Síntese

TGF- α : Fator de Crescimento Transformador

Tie-2: *Endothelial-Specific Receptor Tyrosine Kinase 2*

TOF: Tecido Ovárico a Fresco

TOPC: Tecido Ovárico Pós Criopreservação

VEGF: Fator de Crescimento Vascular Endotelial

UNG: *Uracil-N-glycosylase*

μ l: microlitro

μ m: micrómetro

Resumo

A criopreservação do tecido cortical ovárico é uma forma de preservar a fertilidade de jovens mulheres em idade reprodutiva e de crianças pré-púberes. Apesar de começar a ser aceite como técnica rotineira, um dos aspetos que limita o sucesso na sua utilização é a sobrevivência e o tempo de vida do enxerto, provavelmente devido à isquemia inicialmente induzida.

O presente trabalho procurou avaliar o efeito de um pré-tratamento *in vitro* de tecido ovárico de rato criopreservado com os fatores pró-angiogénicos, VEGF (fator de crescimento vascular endotelial) e bFGF (fator de crescimento fibroblástico básico), juntamente com a gonadotropina menopáusica humana (hMG), para avaliar o potencial efeito na estimulação de passos iniciais da angiogénese. Para isso, foram estudados tecidos imediatamente após ovariectomia (TOF 0h), tecidos após a criopreservação lenta e descongelação (TOPC 0h), após as 4h de cultura sem nenhum tratamento (TOPC 4h), tecidos cultivados apenas com os fatores de crescimento (TOPC 4h+VEGF+bFGF), ou com apenas a hMG (TOPC 4h+hMG), e finalmente com os três fatores (TOPC 4h+VEGF+bFGF+hMG). Avaliou-se a densidade folicular e proporção de diferentes tipos de folículos, a proliferação do tecido através da marcação imunohistoquímica com Ki-67, a apoptose através da caspase activa-3 (AC-3) e a expressão do marcador vascular, fator VIII. Foi ainda realizado um *microarray* de angiogénese, para detetar a expressão de outros marcadores angiogénicos nos tecidos.

O processo de criopreservação não apresentou impacto na morfologia, nem na densidade folicular, proliferação e apoptose dos tecidos. Pelo contrário, a cultura de 4 horas provocou uma certa desorganização da arquitetura dos folículos. Esta não teve impacto na densidade folicular nem na apoptose, mas provocou uma diminuição na proliferação do estroma e um aumento da expressão dos genes EGF, Col4a3, Tie1 e Epas1. Nos grupos com tratamento, a maioria dos folículos era positiva para o marcador Ki-67 e a apoptose foi residual, sugerindo a viabilidade dos folículos. No entanto, foi na condição TOPC 4h+VEGF+FGF+hMG que se observou maior proliferação tanto nos folículos como no estroma; pelo que será neste grupo onde o estroma terá maior competência para suportar o desenvolvimento dos folículos, e estes maior capacidade

de crescimento e de desenvolvimento. Não foram encontradas diferenças na densidade vascular, indicando que 4 horas de cultura não foram suficientes para que se observassem alterações visíveis ao nível das células endoteliais. Após as 48 horas de cultura, o tecido apresentou-se totalmente degradado mostrando que não será uma boa escolha temporal para as condições de cultura utilizadas.

Futuramente, seria necessário realizar o transplante dos enxertos para confirmar se os fatores utilizados melhoram de facto a função do tecido criopreservado. Será ainda importante rever quais os *timepoints* a utilizar e reajustar o modelo da cultura de forma a aumentar a sobrevivência do tecido.

Palavras-chave: Angiogénese, Preservação da Fertilidade, Tecido Ovárico Criopreservado, hMG, VEGF, bFGF

Abstract

Ovarian cortical tissue cryopreservation is one of the procedures to preserve the fertility of young women at reproductive age and prepubertal girls. This technique is currently being accepted as a routine procedure, yet, graft survival and lifespan is limited by the initial induced ischemia.

This study evaluated the effect of an *in vitro* pre-treatment with the angiogenic factors, VEGF (vascular endothelial growth factor) and bFGF (basic fibroblast growth factor) together with hMG (human menopausal gonadotropin) in the promotion of initial angiogenesis in rat cryopreserved ovarian tissue.

For this purpose, tissues were studied in different conditions: immediately after ovariectomy (TOF 0h), after thawing of slow cryopreserved tissue (TOPC 0h) and cryopreserved samples after a 4-hour culture without any supplementation, with VEGF and FGF (TOPC 4h+VEGF+FGF), or with only hMG (TOPC 4h+hMG) or finally with all the 3 molecules (TOPC 4h+VEGF+FGF). The impact of these factors was accessed in terms of follicular density, tissue integrity, tissue proliferation and apoptosis using Ki-67 and AC-3 staining, respectively, and vascular density by factor VIII staining. An angiogenic microarray was performed to detect other angiogenic factors expression in the tissue.

Slow cryopreservation did not affect tissue morphology, proliferation, apoptosis or follicular density. The 4-hour culture caused some follicle architecture disarrangement and a diminished stroma proliferation. Yet it had no impact in follicle density and in apoptosis. This condition also triggered an upregulation of EGF, Col4a3, Tie1 e Epas1 gene expression. In the treatment groups, most of the follicles were positively stained with Ki-67 and the staining with AC-3 was residual, which can be an indication of follicular viability. The TOPC 4h+VEGF+FGF+hMG group reveal a higher proliferation rate both in follicles and stroma, theoretically indicating a higher stroma ability to support follicular development and an increase capacity for follicle growth.

No differences were found in vascular density between treatments groups, showing that an *in vitro* culture for 4 hours is not enough for visible changes in endothelial cells. After a 48-hour culture, the tissue presented a high level of degradation, indicating that

this is not an adequate time point for these culture conditions, and possibly not relevant therapeutically.

In the future, it would be important to transplant samples in order to confirm the present results. It is also important to re-adjust the culture model to increase tissue survival.

Keywords: Angiogenesis, Ovarian Tissue cryopreservation, Fertility Preservation, hMG, VEGF, bFGF

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

1.1. Sistema Reprodutor Feminino

O sistema reprodutor feminino é responsável pela formação dos gâmetas femininos, os oócitos, bem como pelo transporte dos espermatozoides até ao local de fertilização e pelo desenvolvimento inicial do embrião. Este sistema é composto por órgãos internos (figura 1) como as gónadas (ovários), as trompas de Falópio, o útero e a vagina, mas também pela genitália externa (Revisto em Koeppen *et al.*, 2008).

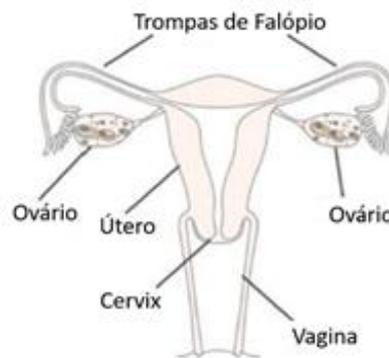


Figura 1. Esquema dos órgãos internos do sistema reprodutor feminino humano. Imagem adaptada de Koebele *et al.*, 2017.

O ovário distingue-se das outras glândulas do sistema endócrino uma vez que para além da produção das hormonas sexuais (estrogénios e a progesterona), é também responsável pela oógenese, a formação de gâmetas femininos (Revisto em Koeppen *et al.*, 2008).

O ovário distingue-se das outras glândulas do sistema endócrino uma vez que para além da produção das hormonas sexuais (o estrogénio e a progesterona), é também responsável pela oógenese, formação de gâmetas femininos (Revisto em Koeppen *et al.*, 2008).

Os ovários são estruturas pares, localizados na cavidade abdominal na maioria das espécies, mas numa posição pélvica nos humanos. Estas estruturas encontram-se ligadas à parede abdominal posterior pelo meso-ovário (parte do ligamento largo que suporta os ovários). O ovário encontra-se envolvido pela túnica albugínea, camada de tecido conjuntivo denso pouco vascularizado, que por sua vez está envolvida pelo epitélio germinativo (Revisto em Koeppen *et al.*, 2008; Johnson, 2013).

O estroma do ovário divide-se em dois compartimentos (figura 2): a medula, parte interna constituída por tecido conjuntivo e vasos sanguíneos e linfáticos provenientes do hilo ovárico, e o córtex, região periférica em contacto com a túnica albugínea, composto por um denso estroma onde se encontra a unidade fundamental funcional do ovário, os folículos ováricos. Um folículo, estrutura onde se dá a maturação de um oócito, corresponde ao oócito envolvido por células somáticas especializadas, células da granulosa e da teca (Revisto em Koeppen *et al.*, 2008; Johnson, 2013).

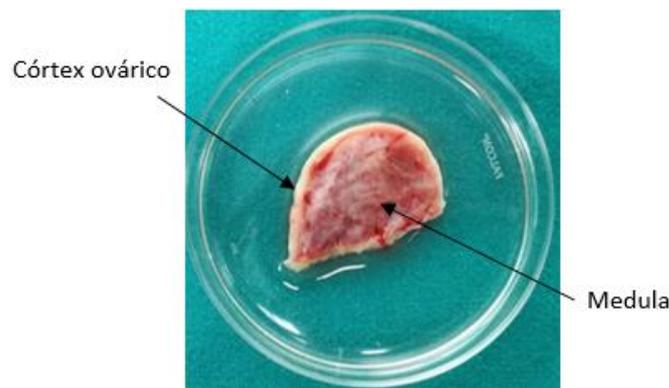


Figura 2. Distinção entre a medula e o córtex ovárico, num ovário humano. Imagem cedida pelo Serviço de Medicina da Reprodução do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC).

1.1.1 Oogénese e foliculogénese

A oogénese e a foliculogénese são processos coordenados, ambos iniciados durante a embriogénese, cujo objetivo é a ovulação de um oócito maduro (Revisto em Johnson, 2013).

Durante o desenvolvimento embrionário, as células germinativas primordiais $2n$, precursoras dos gâmetas, morfologicamente idênticas em ambos os sexos, migram para as cristas genitais, isto é, para as gónadas primitivas, e multiplicam-se por mitose até que atingem um pico de cerca de 6-7 milhões de células. Depois as células germinativas femininas, já chamadas oogónias, cessam a sua multiplicação. Nesta altura, a futura mulher tem todas as células germinativas que terá durante a vida. Depois desta paragem, e de forma a produzir gâmetas haploides, as oogónias iniciam o processo de divisão meiótica. Estas células entram em prófase da primeira meiose, a prófase I, e param a meiose no diploteno desta, passando-se a chamar oócitos primários (Revisto

em Johnson, 2013; Vanderhyden, 2002). Nesta altura, estes oócitos encontram-se rodeados por uma única camada de células da granulosa ainda indiferenciadas, formando assim os folículos primordiais (figura 3A) (Revisto em Koeppen *et al.*, 2008; Johnson, 2013; Vanderhyden, 2002). À nascença o ovário humano possui uma reserva de aproximadamente 2 milhões de folículos primordiais, dispostos na periferia do córtex do ovário. Ainda durante a embriogénese, por volta do 5º mês, há um crescimento dos folículos primordiais em folículos primários. Este crescimento envolve o crescimento do oócito, bem como a mitose e transformação das células da granulosa em células cuboides. Os folículos primários caracterizam-se então, por um oócito primário ligado por *gap junctions* a uma camada de células cuboides da granulosa (figura 3B) (Revisto em Koeppen *et al.*, 2008; Johnson, 2013).

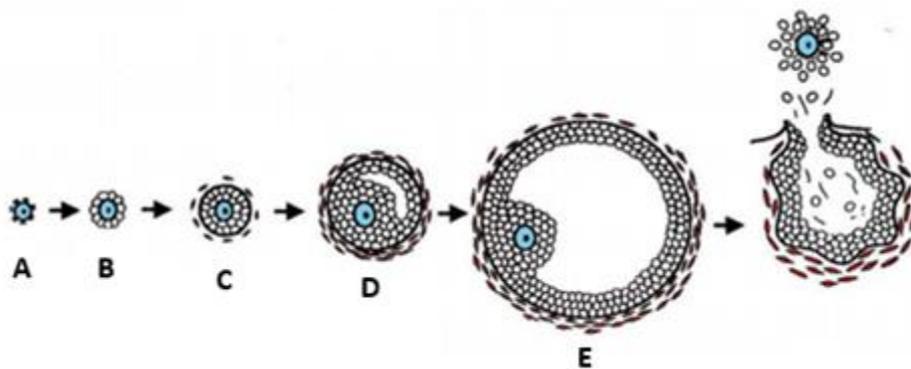


Figura 3. Esquema da evolução folicular. A: folículo primordial; B: folículo primário; C: folículo secundário; D: folículo pré-antral; E: folículo antral. Imagem adaptada de Orisaka *et al.*, 2009.

É apenas na puberdade, após a primeira menstruação, que se dá todos os meses ciclicamente o recrutamento de um certo número de folículos para retomar a meiose. Este processo é ainda independente de hormonas, as gonadotropinas. Os folículos recrutados evoluem para folículos secundários, constituídos por um oócito primário rodeado por mais do que uma camada de células da granulosa (figura 3C). Nesta fase forma-se uma camada protetora glicoproteica em torno do oócito, a zona pelúcida, e as células do estroma que circundam os folículos começam a diferenciar-se em células da teca. Folículos com as células da teca e da granulosa em diferenciação são considerados folículos pré-antrais (figura 3D). Quando se atinge a maturidade sexual são produzidas progressivamente pela hipófise anterior duas hormonas, a hormona foliculo-

estimulante (FSH) e a hormona luteinizante (LH). Só a partir da fase pré-antral é que as células da granulosa e da teca adquirem recetores para gonadotropinas, sendo, portanto, só a partir daqui que os folículos têm a capacidade de responder a este tipo de estímulo. As células intersticiais da teca desenvolvem recetores de LH, enquanto as células da granulosa possuem recetores para FSH (Revisto em Koeppen *et al.*, 2008; Orisaka *et al.*, 2009).

O crescimento folicular entra, então numa fase em que é altamente dependente da ação de gonadotropinas, e o folículo denomina-se antral ou de *Graaft* (figura 3E). Os folículos antrais são caracterizados pelo aumento do tamanho, devido ao aumento proliferativo das células da granulosa, e ao aparecimento de um antro preenchido com líquido folicular. Nesta estrutura, o oócito tende a ficar numa posição acêntrica, rodeado por algumas camadas de células da granulosa, que se designam de células do *cumulus oophorus* (Revisto em Koeppen *et al.*, 2008; Johnson, 2013; Orisaka *et al.*, 2009). A FSH é fundamental para que este folículo continue o seu desenvolvimento e crescimento. Por sua vez, a LH atua nas células da teca, levando-as a produzir androgénios (precursores dos estrogénios), que vão potenciar a ação da FSH no desenvolvimento folicular. Nesta fase o oócito sintetiza uma quantidade suficiente de componentes celulares, de forma a adquirir competência meiótica; isto é, a capacidade para completar a maturação parada em prófase I. Apenas um dos folículos previamente recrutados em cada ciclo será selecionado para ovular, sendo este o folículo funcionalmente dominante. Todos os outros folículos que não maturam entram num processo de atresia. Durante este processo, o oócito degenera e entra em apoptose, bem como as células da granulosa e seguidamente as células da teca (Revisto em Koeppen *et al.*, 2008). Os folículos atréticos são caracterizados pelo núcleo picnótico das células da granulosa, pelo antro com restos foliculares e colapso folicular. Este ocorre em todas as etapas da foliculogénese (Revisto em Koeppen *et al.*, 2008; Kitajima *et al.*, 2014).

O contínuo desenvolvimento dos folículos, já na fase folicular tardia, leva a um aumento acentuado de estrogénio (figura 4). Este aumento causa um retro controlo positivo na hipófise que por sua vez, aumenta os níveis das gonadotropinas, FSH e LH, sendo que esta última apresenta um aumento relativamente superior (figura 4). O aumento dos níveis intracelulares de LH tem como consequência a rutura do contacto entre o oócito e as células da granulosa, contacto este, que é essencial para a

manutenção do bloqueio meiótico. Este é o momento em que o folículo dominante entra na fase pré-ovulatória, sendo denominado de folículo pré-ovulatório. É apenas no momento em que surge este pico de LH (figura 4), que a meiose do oócito é retomada. Quando completada, a meiose I resulta num oócito secundário, célula com metade dos cromossomas que possui a maior parte do citoplasma e num primeiro corpo polar, com o resto dos cromossomas, que degenera. De seguida, o oócito secundário prossegue para a meiose II, sendo esta também bloqueada, mas na metáfase II. Em paralelo com a maturação do núcleo do oócito, também a maturação do citoplasma tem um papel importante na preparação do oócito para a fecundação. Nesta etapa, o contacto entre o oócito e as células da granulosa é quebrado e são sintetizadas novas proteínas (Revisto em Koeppen *et al.*, 2008; Johnson, 2013; Vanderhyden, 2002). No folículo pré-ovulatório, o oócito maduro e fecundável rodeado pelas células do *cumulus oophorus* começa a separar-se do resto do folículo, o antro expande-se e é ovulado pela protrusão folicular. A meiose II deste oócito secundário é apenas completada quando, e se, ocorrer a fertilização (Revisto em Koeppen *et al.*, 2008; Johnson, 2013).

Após a ovulação o folículo remanescente no ovário é transformado num corpo lúteo, também chamado corpo amarelo. As células da granulosa cessam a sua divisão, aumentam o volume e colapsam. Esta zona fica altamente irrigada por vasos sanguíneos. O corpo lúteo é uma estrutura glandular que produz elevados níveis de progesterona (figura 4). No caso de ocorrer fecundação, esta elevada produção suprime a secreção de LH e FSH, impedindo o desenvolvimento de novos folículos. Para além disso, é também importante na implantação e manutenção do embrião. Caso contrário, o corpo lúteo degenera em corpo albicans ou corpo branco (Revisto em Koeppen *et al.*, 2008).

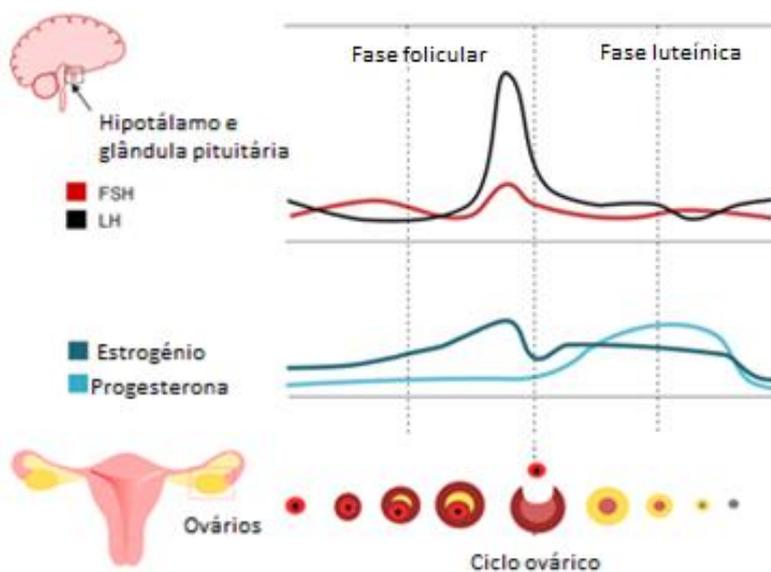


Figura 4. Ciclo ovárico e sua regulação. Imagem adaptada. [consultada a 15fevereiro.2018]. Disponível em: <http://histocutup.co.uk/Gynaecology/Menstrual.aspx>

1.1.2 Balanço entre o desenvolvimento folicular e atresia

O ovário é, pois, um órgão dinâmico que passa por diversas transformações ciclicamente. Assim, e de forma a manter o equilíbrio entre a sobrevivência e a apoptose dos folículos é necessário haver uma regulação, conseguida através de um balanço entre a expressão de fatores que promovem a proliferação, o crescimento e a diferenciação das células foliculares e fatores indutores da morte celular (Revisto em Jiang *et al.*, 2003). A ausência ou insuficiência de fatores de sobrevivência nas células da granulosa, leva o folículo a entrar numa fase apoptótica mediada pelo aumento da expressão de genes de morte. Esta regulação é dependente da fase de desenvolvimento folicular visto que diferentes fatores afetam a sobrevivência ou morte em diferentes fases (Revisto em Markström *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2003).

O crescimento folicular inicia-se com a transição dos folículos primordiais de um estado quiescente para uma fase de crescimento. Fatores como o c-kit/kit ligand (KL) e o GDF-9, são importantes na sobrevivência dos folículos pequenos. Por exemplo, o KL desempenha um papel crucial na oogénese, viabilidade folicular, recrutamento de folículos primordiais e desenvolvimento folicular e do oócito. Foi ainda demonstrado que fatores como a interleucina-1- α (IL-1- α), fator de crescimento semelhante à insulina

(IGF-1), fator de crescimento da epiderme (EGF) e o fator de crescimento fibroblástico (bFGF) são também fatores de sobrevivência nesta fase (Revisto em David *et al.*, 2012; Johnson A. *et al.*, 2002). Nilsson *et al.* demonstraram que o bFGF induziu o desenvolvimento dos folículos primordiais e o início da foliculogénese. Os autores sugerem que este fator leva ao crescimento dos folículos primordiais devido à sua ação direta nas células ováricas adjacentes, como as da granulosa, da teca e do estroma para promover a sua proliferação (Nilsson *et al.*, 2001). Esta ativação é altamente regulada envolvendo a comunicação entre o oócito e as células da granulosa. Nas fases iniciais do desenvolvimento folicular (folículos primordiais, primários e secundários), a atresia é iniciada pela apoptose do oócito e seguida pela morte das células da granulosa (Revisto em Glamoclija *et al.*, 2005).

Em folículos já em desenvolvimento, a atresia é caracterizada pela progressão da apoptose através das células da granulosa e posteriormente a morte do oócito (Revisto em Johnson A. *et al.*, 2002). Nesta fase, a sobrevivência das células da granulosa é promovida por fatores endócrinos como a FSH e a LH, e por fatores parácrinos, como o IGF-1, EGF/fator de crescimento transformador (TGF- α), e bFGF (Revisto em Hsueh *et al.*, 1994; Markström *et al.*, 2002). No entanto, são as gonadotropinas os principais reguladores fisiológicos da sobrevivência dos folículos. Numa fase em que os folículos se tornam dependentes da estimulação da FSH, esta promove a sobrevivência e o crescimento do folículo, mas também suprime a apoptose, aumentando a expressão de proteínas intracelulares anti apoptóticas (Revisto em Jiang *et al.*, 2003).

A apoptose é um mecanismo dependente de energia que ocorre em tecidos em desenvolvimento ou em resposta a um estímulo fisiológico (Hsueh *et al.*, 1994). A progressão da apoptose pode dividir-se em três fases: iniciação, execução e terminação. A fase de iniciação pode ser promovida por fatores extrínsecos ativando a via extrínseca ou via dos recetores de morte, ou por fatores intrínsecos incluindo estímulos não mediados por recetores que produzem sinais intracelulares que podem agir de forma positiva ou negativa, desencadeando a via intrínseca ou mitocondrial (figura 5). Nesta última, a ausência de fatores de crescimento, hormonas e citoquinas, constitui um estímulo negativo, enquanto estímulos como a radiação, a exposição a toxinas e hipoxia, radicais livres e outros, são considerados estímulos positivos (Revisto em Elmore, 2007). Todas as vias envolvem a ativação inicial de proteases cisteína aspartato específicas, as

caspases, em que cada uma ativa as suas correspondentes, como é o caso da caspase-8 e da caspase-9 (Revisto em Johnson *et al.*, 2003). Esta iniciação muitas vezes pode ser contrariada pela rápida ativação de vias de sobrevivência (Revisto em Markström *et al.*, 2002). Por exemplo, a falta de sinais de sobrevivência nas células da granulosa, leva a um aumento da expressão de genes de morte como o Fas e o ligando Fas (FasL) (figura 5), que é o sistema que se encontra nas células da granulosa e está envolvido durante a atresia folicular na indução de apoptose pela via extrínseca (Revisto em Jiang *et al.*, 2003).

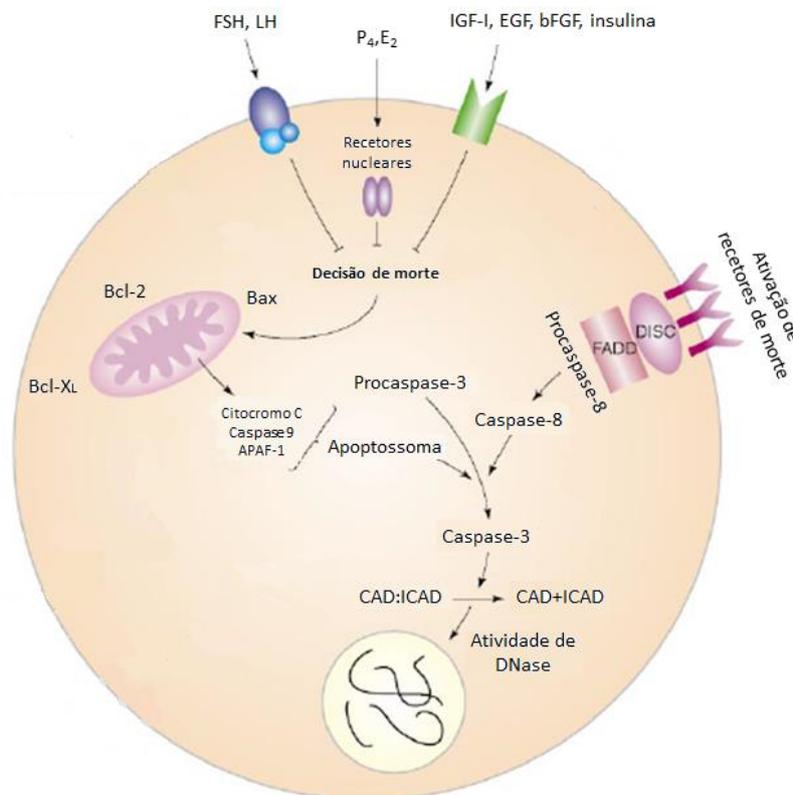


Figura 5. Esquemática de fatores de sobrevivência folicular e do processo apoptótico que ocorre nas células da granulosa dos folículos. Imagem adaptada de Markström *et al.*, 2002.

As duas principais famílias responsáveis pela regulação do processo apoptótico são a família das caspases e a família do Bcl-2 (Revisto em Johnson *et al.*, 2003).

As caspases são proteases que estão expressas sob a forma inativa de proenzima, e que, uma vez ativadas por clivagem autocatalítica, têm a capacidade de ativar outras caspases amplificando o sinal apoptótico (Revisto em Markström *et al.*, 2002). Estas proteases podem ser iniciadoras (caspase-2,-8,-9,-10) ou executoras (caspase-3,-6,-7) (Revisto em Elmore, 2007). A família Bcl-2 engloba membros anti-apoptóticos (como o

Bcl-2 e o Bcl-XL) e membros pró-apoptóticos (Bax, Bid, entre outros). Após a ocorrência de um estímulo de indução de apoptose há a libertação de vários fatores pró-apoptóticos a partir da mitocôndria. A principal função desta família é a regulação da libertação destes membros, particularmente o citocromo c da mitocôndria para o citosol, sendo este necessário para a ativação da caspase-9 e formação de um complexo, o apoptosoma, que de seguida ativa caspases executoras, como a caspase-3 (figura 5) (Revisto em Markström *et al.*, 2002).

Tanto a via intrínseca como a extrínseca convergem para uma única via, a via executora. Esta via é irreversível e inicia-se com a ativação de caspases executoras. A caspase-3 é considerada uma das mais importantes executoras, que tem a função de ativar de forma específica a endonuclease caspase-activated DNase (CAD) (figura 5). A CAD está normalmente associada ao seu inibidor (ICAD), e numa célula apoptótica a clivagem da subunidade inibitória pela caspase-3 ativa leva à ativação da CAD, que por sua vez é responsável pela fragmentação do DNA nuclear (Revisto em Elmore, 2007). Para além disso, a caspase-3 induz a reorganização do citoesqueleto e a desintegração das células em corpos apoptóticos. Desta forma, a execução da via é caracterizada por alterações na membrana celular, fragmentação nuclear, condensação da cromatina e degradação do DNA. A fase terminal compreende a fagocitose de “corpos apoptóticos” fragmentados, num processo não inflamatório (Revisto em Elmore, 2007; Hsueh *et al.*, 1994).

No entanto, há outro mecanismo de morte celular, a necrose. Em baixas doses uma variedade de estímulos prejudiciais como o calor, radiação ou hipoxia podem induzir a apoptose, no entanto, este mesmo estímulo pode induzir necrose em doses maiores (Revisto em Elmore, 2007). A necrose, ao contrário da apoptose, é um processo tóxico não controlado, consequência da lesão celular sendo, portanto, um mecanismo independente de energia. É também por este motivo que a necrose afeta uma maior extensão de células ao contrário da apoptose que afeta apenas células individuais. Morfologicamente a apoptose envolve a diminuição do tamanho celular, a condensação da cromatina e a formação de corpos apoptóticos que contém os fragmentos nucleares. As células apoptóticas são fagocitadas por células vizinhas, desta forma não há dispersão de componentes do citoplasma para meio circundante, não sendo induzida reação de inflamação. Por outro lado, a necrose se caracteriza pelo aumento do volume celular,

formação de vacúolos celulares, quebra das membranas dos organelos e eventualmente da membrana celular, o que provoca uma libertação do citoplasma das células para o meio intersticial desencadeando uma resposta inflamatória (Revisto em Elmore, 2007; Hsueh *et al.*, 1994). A apoptose e a necrose podem ocorrer independentemente, simultaneamente ou sequencialmente e o processo que leva a célula à sua morte depende da natureza e do grau do estímulo, o que muitas vezes dificulta a distinção histológica destes dois mecanismos de morte celular. Para além disso, a condensação do núcleo (picnose celular) e a fragmentação nuclear são características morfológicas comuns à apoptose e à necrose (Revisto em Elmore, 2007; Hsueh *et al.*, 1994).

1.1.3 Sistema reprodutor feminino do rato

O rato (*Rattus rattus*) é um dos animais mais utilizados como modelo animal para investigação biomédica. Para este estudo foi utilizado como modelo experimental ratos fêmeas da estirpe Rowett (RNU).

O sistema reprodutivo feminino do rato tem uma estrutura semelhante à da maioria dos mamíferos: dois ovários, um útero, longas trompas de Falópio e vagina. No entanto há algumas diferenças funcionais (figura 6) e histológicas (Revisto em Treuting P., 2012; Scudamore, 2014). Os ovários de roedores têm uma forma esférica e não ovoide como nos humanos, encontram-se encapsulados por uma parede fina originada pelo meso-ovário, a bursa ovárica, normalmente embebida em gordura (figura 6). Tal como nos humanos, os ovários dos roedores possuem também um córtex periférico onde se encontram os folículos e os corpos lúteos, e uma medula, numa região mais central. Esta divisão está pouco definida devido ao pequeno tamanho do ovário (Revisto em Treuting P., 2012; Scudamore, 2014).

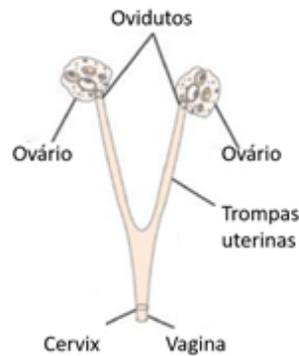


Figura 6. Esquema do sistema reprodutor feminino de roedor. Imagem adaptada de Koebele *et al.*, 2017.

A maturação do ócito e do folículo, bem como a ovulação, são processos que ocorrem de forma semelhante nos humanos e nos roedores. A classificação dos folículos, tal como nos humanos é feita com base na camada das células da granulosa e na presença de antro, pelo que iremos encontrar também folículos primordiais, primários, secundários, pré-antrais, antrais e pré-ovulatórios (Yoshida *et al.*, 2009).

Em geral, os ratos iniciam a sua maturidade sexual entre as 6 e 8 semanas. Em vez de ciclo menstrual como nos humanos, os roedores apresentam um ciclo do estro. Este ciclo tem quatro estados, que ocorrem de forma contínua até acontecer uma gravidez. Uma vez iniciado, cada ciclo tem a duração de 4 a 5 dias. No estado proestro, verifica-se a maturação dos folículos devido ao aumento dos níveis de estrogénio bem como o desenvolvimento do endométrio. É nesta fase que se encontram folículos de maiores dimensões. No estro, há a recetividade por parte das fêmeas para o acasalamento e ocorre a ovulação após o pico de LH. Caso não ocorra fecundação pela altura da ovulação, forma-se o corpo lúteo. As fases metestro e diestro correspondem à fase lútea. O corpo lúteo formado produz uma pequena quantidade de progesterona, durante 1 ou 2 dias, desde o metestro até ao diestro. Nos roedores, assim que a quantidade de progesterona diminui, ocorre pouco tempo depois uma nova ovulação, o que os distingue dos humanos. No diestro, o corpo lúteo atinge o seu tamanho máximo sendo ainda possível encontrar alguns corpos lúteos degenerados resultantes de ciclos anteriores. Esta fase é seguida imediatamente pelo proestro do novo ciclo. (Revisto em Treuting P., 2012; Yoshida *et al.*, 2009; Levine, 2014).

1.2. Oncofertilidade e preservação da fertilidade

O cancro é uma das principais doenças que afeta mulheres e homens de todas as idades, em todo o mundo. Quando mulheres jovens em idade reprodutiva, adolescentes e crianças são diagnosticadas com qualquer tipo de cancro, o seu plano de tratamento passa principalmente pela cirurgia oncológica, pela radioterapia e quimioterapia. No entanto, estes últimos tratamentos são gonadotóxicos e afetam a fertilidade feminina, provocando a perda das funções endócrinas e reprodutivas (Ladanyi *et al.*, 2017). A quimioterapia e a radioterapia reduzem as reservas de folículos primordiais, o que pode resultar em insuficiência imediata e prematura do ovário e consequente menopausa precoce. Estes fatores levam à redução do potencial reprodutivo destas mulheres e à elevada probabilidade de infertilidade (Revisto em Ladanyi *et al.*, 2017; Meirrow, 2001).

Com o avanço nas formas de tratamento e na capacidade de detetar atempadamente a doença, alguns cancros têm uma elevada taxa de sobrevivência. Como tal, é importante considerar a qualidade de vida das sobreviventes ao cancro, os seus sonhos e ambições. A sua fertilidade é um dos principais aspetos a ter em conta, visto que após o tratamento esta pode estar comprometida (Revisto em Ladanyi *et al.*, 2017; Melo, C. *et al.*, 2017; Silva, C. *et al.*, 2017).

Atualmente mulheres têm a possibilidade de ver a sua fertilidade preservada através da criopreservação de oócitos ou do tecido ovárico, antes de se proceder ao tratamento anticancerígeno. A criopreservação é um procedimento pelo qual as células e os tecidos biológicos são preservados através do congelamento, retardando as reações metabólicas nas células. Este congelamento caracteriza-se por ser realizado a temperaturas muito baixas, num meio como o azoto líquido onde pode ficar durante longos períodos de tempo. Este procedimento pode ser realizado através de dois métodos, por congelação lenta ou por vitrificação (congelação rápida). O método de criopreservação convencional lenta já deu origem a muitos nascimentos, embora não seja muito eficaz na criopreservação de oócitos. Relativamente ao tecido ovárico, essa é técnica geralmente usada, no entanto, a vitrificação do tecido ovárico tem sido investigada de forma a ser otimizada (Revisto em Ladanyi *et al.*, 2017; Lane, 2012).

A criopreservação da região cortical do ovário requer a remoção de um fragmento ou de todo o ovário cirurgicamente, no entanto, apesar dessa desvantagem, esta metodologia apresenta vantagens relativamente à criopreservação de oócitos neste caso. O córtex ovárico alberga uma grande reserva folicular e apresenta maior resistência a potenciais danos causados pela criopreservação, comparativamente com o oócito. Para além disso, a criopreservação do tecido ovário não requer uma hiperestimulação ovárica, diminuindo potenciais efeitos secundários deste tratamento e permitindo o início imediato do tratamento do cancro após a recolha do ovário. Esta técnica é, ainda, a única apropriada para raparigas pré-púberes, visto que salvaguarda a função gametogénica (Salama *et al.*, 2013; Ladanyi *et al.*, 2017).

Após o tratamento e recuperação do cancro, na altura em que a mulher decidir engravidar, é realizado o autotransplante do tecido criopreservado (Salama *et al.*, 2013).

Desde há cerca de 60 anos que esta técnica tem vindo a ser estudada. Em 1954, Deanesly removeu, congelou e implantou subcutaneamente tecido ovárico de rato noutras fêmeas da mesma espécie às quais tinham sido retirados os ovários, tendo provado que o tecido mantinha a sua funcionalidade. No entanto, não teve sucesso na ocorrência de gravidez (Deanesly, 1954). Depois deste estudo foram também realizados transplantes bem-sucedidas em ovelhas (Revisto em Ladanyi *et al.*, 2017). Em 1996, Newton e os seus colegas, realizaram o transplante de tecido cortical ovárico humano em ratos, tendo mostrado resultados promissores (Newton *et al.*, 1996). Em 1999, foi efetuado o primeiro transplante ovárico humano usando tecido ovárico criopreservado pelo grupo do Dr. Oktay (Oktay K., 2000). Só em 2004, o Professor Donnez e o seu grupo de trabalho obtiveram o primeiro nascimento resultado do transplante de tecido ovárico criopreservado pelo método de criopreservação lenta (Donnez *et al.*, 2004). Até aos dias de hoje estão mencionados pelo menos 130 nascimentos por meio desta técnica (Planer, 2017). Em Portugal, foi removido e criopreservado tecido ovárico pela primeira vez em 2008, no Centro de Preservação da Fertilidade do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), tendo o primeiro transplante ocorrido em 2015 (dados não publicados). Tendo em conta estes dados, é visível que a criopreservação do tecido ovárico é uma técnica promissora e que permite salvaguardar a fertilidade. No entanto, esta técnica tem alguns aspetos que podem ser melhorados (Revisto em Ladanyi *et al.*,

2017). Uma das suas fragilidades é a sobrevivência do tecido e consequentemente dos folículos após transplante. Kim *et al.* mostraram que, após o transplante, o tamanho do tecido reduziu de 30% a 70% do seu tamanho original, havendo uma perda de folículos primordiais. O número de folículos primordiais no ovário determina a vida útil do enxerto; assim, a sua perda após o transplante diminui a funcionalidade do mesmo (Kim *et al.*, 2002).

O tecido cortical é transplantado sem anastomose vascular, isto é, sem o estabelecimento de comunicação entre vasos sanguíneos do enxerto e do recetor. Assim, a sobrevivência do tecido depende da revascularização. No entanto, até esta estar estabelecida há uma restrição no fornecimento de sangue ao tecido, resultando em isquemia, e consequentemente um fornecimento insuficiente de oxigénio, hipoxia. Van Eyck *et al.* demonstraram que o tecido ovárico humano se mantinha em hipoxia até cinco dias após a transplantação. Estes investigadores observaram também que ao décimo dia, a vasculatura entre o enxerto de tecido ovárico e o indivíduo já estaria estabelecida. Neste intervalo de tempo ocorre uma lesão isquémica no tecido (Van Eyck *et al.*, 2010). Vários estudos sugerem que é neste período de isquemia inicial após transplantação que ocorre a maior perda folicular no tecido ovárico (Liu *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002).

A sobrevivência e o normal desenvolvimento dos folículos são condição para o sucesso da transplantação de tecido ovárico (Gao *et al.*, 2015). Desta forma, a isquemia inicial afeta a sobrevivência do tecido e dos folículos após o transplante, comprometendo o sucesso desta operação (Liu *et al.*, 2002).

Para otimizar este procedimento, é, pois, importante estabelecer um desenvolvimento mais rápido de vasos sanguíneos para garantir o fornecimento de oxigénio e de nutrientes ao tecido, ou seja, deve promover-se a angiogénese e a revascularização no tecido, para reduzir a isquemia inicial e melhorar a qualidade do transplante.

1.3. Angiogénese

A angiogénese consiste na formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos já existentes e a sua subsequente remodelação e maturação para formar uma nova vasculatura. Este processo ocorre durante a vida adulta apenas durante a cura de feridas, no ciclo menstrual, na gravidez, estando envolvida também na evolução de tumores. Os ovários são órgãos que passam ciclicamente por diferentes estádios que requerem constante irrigação sendo necessária uma contínua angiogénese. A este nível, há uma intensa atividade deste processo durante o desenvolvimento folicular, sendo importante na seleção molecular do folículo dominante e atresia, bem como na formação do corpo lúteo (Revisto em Hyder, 1999; Robinson *et al.*, 2009; Fraser, 2006).

O processo angiogénico engloba as seguintes etapas: ativação das células endoteliais dos capilares pré-existentes pelos fatores de crescimento (figura 7B), degradação da membrana basal capilar, migração e proliferação das células endoteliais em direção ao estímulo angiogénico (figura 7C), reorganização das células endoteliais para formar túbulos com lúmen (figura 7D) (Jain, 2003; Rizzi *et al.*, 2017; Francavilla *et al.* 2009).

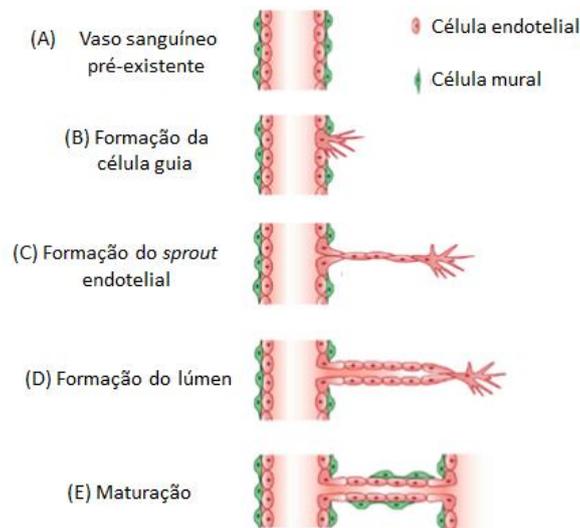


Figura 7. Representação esquemática das principais etapas do processo angiogénico. Imagem adaptada de Francavilla *et al.*, 2009.

A angiogénese é um processo dependente da hipoxia e exige uma ação extremamente coordenada dos fatores angiogénicos. Os vasos sanguíneos mantêm-se

quiescentes até que haja um estímulo, como condições de falta de nutrientes e baixa concentração de oxigénio (Revisto em Fraser, 2006).

Como demonstrado na figura 8, este estímulo leva à ativação e indução da expressão do fator de transcrição HIF-1, fator de indução de hipoxia-1. Este fator, por sua vez, medeia a libertação de fatores pró-angiogénicos principalmente do VEGF (fator de crescimento vascular endotelial). Da família VEGF, o VEGFA é o fator com mais relevância na angiogénese, visto que regula tanto este processo, como a permeabilidade vascular (figura 9A). A ligação deste fator aos seus recetores, principalmente presentes na membrana das células endoteliais, leva à estimulação da proliferação e migração destas células (figura 9A), bem como à indução da migração de monócitos. Para além destas funções, o VEGF aumenta a expressão de proteases. Ao longo do processo angiogénico, o efeito do VEGF é modulado pela ação de outros fatores, como a angiopoietina (Ang), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) (Revisto em Gerwins *et al.*, 2000 e Jain, 2003). Diversos estudos demonstraram que o FGF tem a capacidade de aumentar a expressão do VEGF e regular a sua via (Revisto em Jain, 2003).

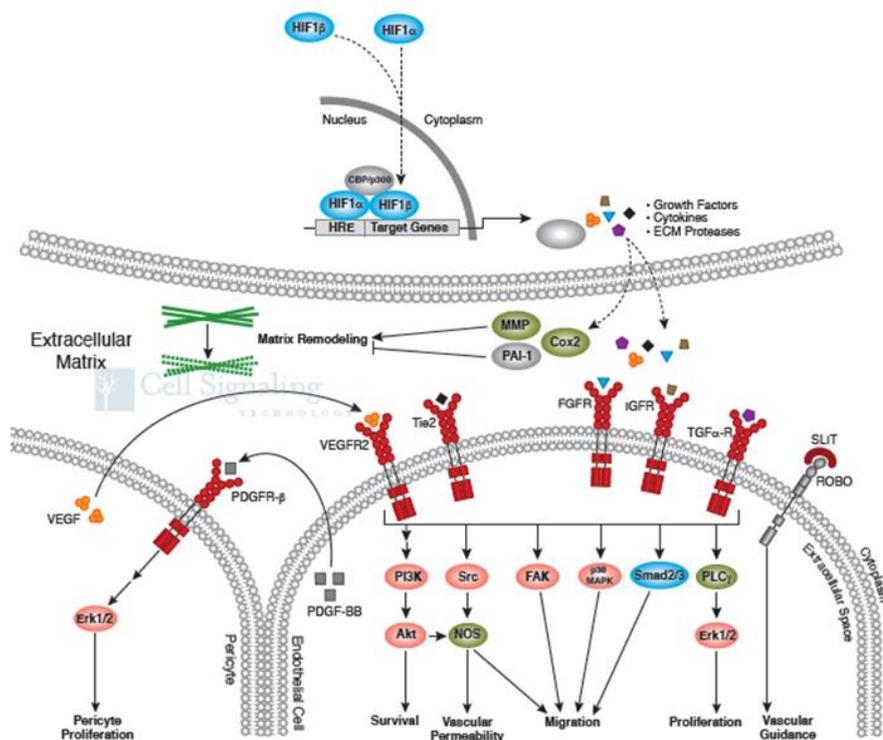


Figura 8. Vias de sinalização que promovem a angiogénese. Imagem adaptada de Cell Signaling Technology Inc. Angiogenesis Signaling Interactive Pathway. [consultada a 5julho.2017]. Disponível em: <https://www.cellsignal.com/contents/science-cst-pathways-angiogenesis>

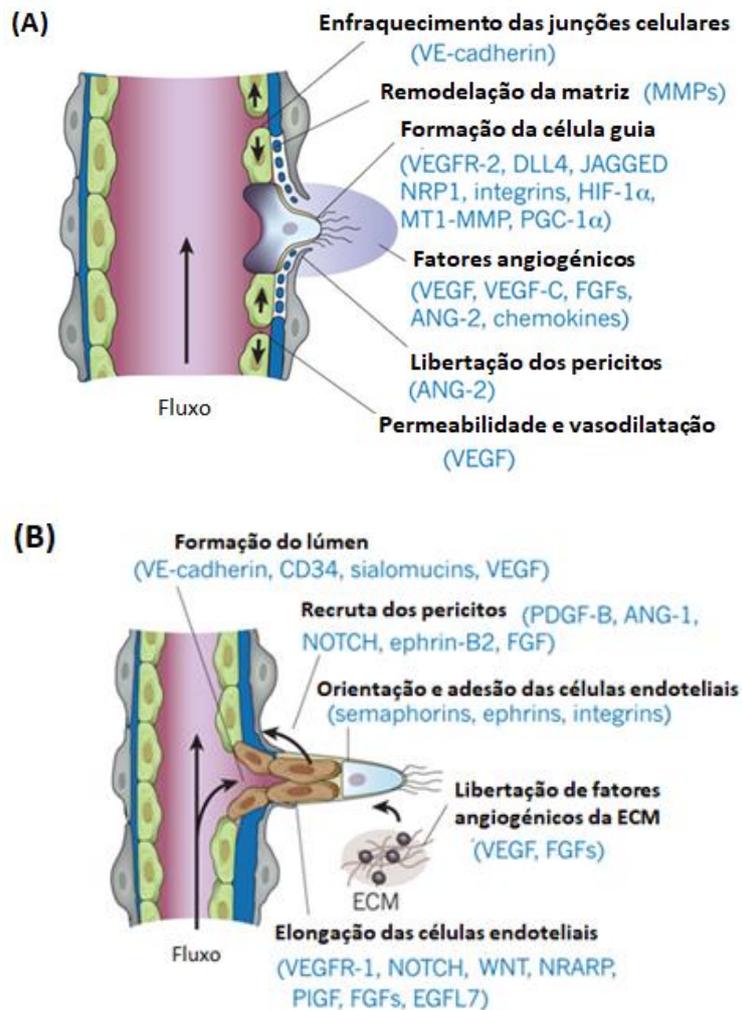


Figura 9. Esquematização das primeiras etapas da angiogénese e fatores intervenientes em cada uma delas. (A) Ativação das células endoteliais dos capilares quiescentes que iram migrar. (B) Orientação células endoteliais em direção ao estímulo e sua alongação. Imagem adaptada de Carmeliet, 2011.

O VEGF e FGF são considerados os principais indutores da angiogénese, promovendo a permeabilidade vascular e a migração das células endoteliais dos capilares circundantes ao centro angiogénico, fonte da hipoxia. As angiopoietinas são também uma família de proteínas capazes de promover a angiogénese. A ligação da angiopoietina 2 com o recetor Tie-2 contribui para a destabilização das células de suporte (figura 9A), que por sua vez facilita a ligação do VEGF à célula endotelial. As metaloproteinases da matriz (MMPs) que são enzimas proteolíticas, produto de genes induzidos pelo HIF-1, degradam a matriz extracelular dos capilares, nomeadamente a

membrana basal para facilitar a migração das células endoteliais (figura 9A). Células endoteliais especializadas migram de acordo com o gradiente químico gerado pelos fatores angiogénicos difundidos (figura 9A), enquanto ocorre a proliferação das células endoteliais vizinhas, de forma a acompanhar a migração das células especializadas (figura 9B), formando-se assim o corpo do novo vaso. Por último, as células endoteliais segregam PDGF que estimula o recrutamento de células de suporte estrutural (os perícitos) para os vasos (figura 9B). Desta forma, são gerados os novos vasos sanguíneos, permitindo a irrigação do tecido (Revisto em Rizzi *et al.*, 2017; Zimna, 2015; Francavilla *et al.*, 2009).

Uma vez que requerem uma contínua angiogénese, os ovários são órgãos ricos em fatores de crescimento, como o VEGF e o FGF, que estimulam a rápida migração das células endoteliais. Desta forma, colocou-se a hipótese que estes poderiam aumentar a angiogénese e promover a sobrevivência do tecido a transplantar (Revisto em Li *et al.*, 2016).

Como referido, o FGF, para além de fator angiogénico, é também um importante fator de sobrevivência na fase inicial do crescimento folicular. Gao *et al* demonstraram que a suplementação com bFGF potenciou não só a neoangiogénese mas também apresentou um papel importante na sobrevivência dos folículos e das células do estroma após transplante de tecido ovárico de rato. Dada a importância das células do estroma para a normal função do ovário e regulação do desenvolvimento dos folículos, os autores propuseram que a proliferação das células estromais promovida pelo tratamento de bFGF seria benéfica para a sobrevivência dos folículos (Gao *et al.*, 2013).

Li *et al.* mostraram que o tratamento do tecido cortical ovárico de rato com VEGF e bFGF, encapsulados num extrato de membrana basal, antes da transplantação, promovia a revascularização e aumentava significativamente a sobrevivência do tecido depois do transplante. Estes autores demonstraram também que a qualidade dos oócitos obtidos a partir do tecido tratado tinha potencial fértil. No entanto, ficou por determinar se os efeitos detetados no tecido teriam sido resultado apenas da ação do bFGF sozinho, ou se teria sido potenciada pela conjugação com o VEGF (Li *et al.*, 2016). Adicionalmente, outros estudos indicam que o bFGF e o VEGF têm uma ação simultânea no processo angiogénico. Gao *et al.* encapsularam o tecido ovárico de rato com um

hidrogel de fibrina juntamente com fatores angiogénicos antes da transplantação, por forma a serem libertados controladamente. Os autores estudaram o efeito do bFGF e VEGF separadamente, bem como o seu efeito conjugado. Após o transplante, foi mostrado que a administração de VEGF e bFGF, especialmente quando combinados, melhorava a angiogénese no enxerto transplantado e promovia o desenvolvimento folicular (Gao *et al.*, 2015). Por outro lado, Wang *et al.* realizaram um xenotransplante de tecido humano fresco tratado com VEGF e bFGF em coelhos, mostrando que a administração conjunta dos fatores parecia despoletar a angiogénese e reduzir a apoptose e fibrose, apesar do número de folículos ter diminuído depois do transplante (Wang *et al.*, 2013).

Há ainda diversas experiências que confirmam que a hMG (gonadotropina menopáusic humana), solução de FSH e a LH no rácio de 1:1, promove o aumento da expressão do VEGF e aumentam a angiogénese e a permeabilidade vascular. Para além disso, algumas destas investigações indicam que a intervenção transiente *in vitro* com gonadotropinas em tecidos ováricos poderia evitar a perda folicular (Revisto em Wang *et al.*, 2012). Assim, Wang *et al.* mostraram que o pré-tratamento do tecido ovárico fresco com hMG antes da transplantação melhorou a reconstituição do fornecimento de sangue e aumentou o número de folículos autotransplantados, possivelmente devido ao aumento da expressão de VEGF (Wang *et al.*, 2012).

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

O presente estudo pretende fazer uma avaliação do impacto do pré-tratamento de tecido ovárico de rato preservado por congelação lenta com os fatores de crescimento exógenos, VEGF e FGF, em conjunto com a hMG. É de interesse verificar se este tratamento tem a capacidade de promover a angiogénese no tecido sem afetar a sua viabilidade. Para estudar o efeito do tratamento conjunto destes fatores na estimulação da angiogénese de tecido em cultura pretendeu-se:

- i) avaliar a morfologia dos diferentes tecidos através da avaliação qualitativa folicular e do estroma, bem como da densidade folicular determinada a partir da contagem e classificação dos folículos;
- ii) verificar a proliferação do tecido; isto é, do estroma e dos folículos;
- iii) estudar o estado apoptótico do tecido;
- iv) determinar a densidade vascular;
- v) identificar outros fatores da via angiogénica diferentemente expressos.

CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS

Recolheram-se 72 ovários de 36 ratos fêmea da estirpe Rowett (RNU) sacrificadas, através de ovariectomia bilateral realizada entre as 8 e 10 semanas de idade. Os ovários foram divididos em metades, de forma a obter 144 hemiovários e colocados e transportados em soro fisiológico. Destes 144 hemiovários, 108 foram criopreservados, 24 foram destinados para uma cultura a fresco, de forma a ter um controlo do tecido cultivado não criopreservado e os restantes 12 foram reservados para controlo do tecido imediatamente após a sua recolha.

3.1. Congelação lenta e descongelação do tecido ovárico

Os hemiovários foram criopreservados na totalidade em criotubos, através do protocolo de congelação lenta já estabelecido no Serviço de Medicina da Reprodução do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC).

Na falta de um protocolo ótimo que se ajuste a todos os tipos de células presentes no tecido ovárico, a criopreservação deste, tem sido realizada de acordo com o protocolo de congelação lenta desenvolvido para embriões (Revisto em Lane, 2012). Este tipo de preservação é conseguido através de uma descida lenta da temperatura, de forma a conseguir uma desidratação progressiva, minimizando a potencial formação de gelo intracelular. Este protocolo requer tratamento do tecido com crioprotetores para remover alguma água presente nas células, bem como reduzir certos efeitos destrutivos que possam advir da congelação. Estes crioprotetores podem ser permeáveis (como por exemplo o etilenoglicol) e não permeáveis (como a sacarose) (Revisto em Lane, 2012).

Para a criopreservação, foram transferidos dois hemiovários da placa de transporte para cada criotubo com 1mL de meio de congelação: DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* – Biological Industries, Israel), com 1,5M de etilenoglicol (Sigma-Aldrich, St. Louis, E.U.A), 0,1M de sacarose (Merck, Darmstadt, Alemanha) e 200 mg/mL de albumina sérica humana (Grifols, Barcelona, Espanha). Colocaram-se os criotubos em cima de uma placa de gelo no agitador durante 30 minutos para assegurar o equilíbrio osmótico do tecido.

Para a congelação lenta utilizou-se o sistema de congelação automatizado *Planer Kryo 360-1.7* (Planer PLC, Middlesex, Reino Unido) com o seguinte protocolo:

1. Iniciou-se a congelação lenta a uma temperatura de 0°C seguido de uma taxa de arrefecimento de 2°C/min até aos -9°C.
2. Fez-se aos -9°C o *seeding* manual, por forma a evitar a cristalização no tecido. O tecido permaneceu a esta temperatura durante 10 minutos.
3. Prosseguiu-se a congelação a uma taxa de arrefecimento de 0,3°C/min até aos -40°C e a partir de aí, a 10°C/min até aos -140°C.
4. Armazenaram-se os criotubos num contentor de azoto líquido.

Os tecidos criopreservados foram depois mantidos em azoto líquido, durante no mínimo uma semana, período de tempo a partir do qual se procedeu à descongelação.

A descongelação e reidratação do tecido ovárico requerem a sua passagem por três meios de descongelação. O primeiro meio, meio I, consistiu em DPBS com 0,75M de etilenoglicol, 0,25M de sacarose e 10mg/mL de albumina sérica humana. O meio II constituído por DPBS com 0,25M de sacarose e 10mg/mL de albumina sérica humana. E por fim, o meio III com apenas DPBS e 10mg/mL de albumina sérica humana. Após preparação, mantiveram-se os meios à temperatura ambiente durante 30 minutos. Os criotubos foram retirados do azoto líquido e colocados num banho a 37°C até se verificar a sua descongelação. Foram colocados 5mL de cada meio de descongelação em caixas de *Petri* correspondentes. Sob condições assépticas, o conteúdo dos criotubos foi transferido para o primeiro meio de descongelação. Os fragmentos ficaram imersos neste durante 10 minutos, mediante agitação para equilibrar o tecido. De seguida, os hemiovários foram transferidos consecutivamente para o segundo e terceiro meio de descongelação, onde ficaram também durante 10 minutos em cada um.

Imediatamente após a descongelação, como forma de controlo do tecido pós-criopreservação, foram fixados seis hemiovários em 4% formaldeído tamponado (VWR, Leuven, Bélgica) e outros seis colocados em NZYol® (Nzytech, Lisboa, Portugal).

3.2. Cultura do tecido ovárico

Os restantes hemiovários, 24 a fresco e 96 criopreservados, foram cultivados em placas de cultura de quatro poços contendo 300µL de meio MEM (Minimum Essential Medium) Alpha Medium (Gibco, Paisley, Escócia, Reino Unido) com 10% de albumina sérica humana.

Os hemiovários mencionados foram distribuídos de forma aleatória por cinco grupos de cultura:

- 1- tecido ovárico a fresco (não criopreservado) cultivado em meio de cultura não suplementado (TOF);
- 2- tecido ovárico que após a remoção cirúrgica foi sujeito a criopreservação e que após descongelação, foi cultivado em meio de cultura não suplementado (TOPC);
- 3- tecido ovárico pós-criopreservação tratado com 100ng/mL VEGF₁₆₅ (*Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, E.U.A*) e 150ng/mL bFGF (*Sigma-Aldrich*) (TOPC+VEGF+bFGF);
- 4- tecido ovárico pós-criopreservação tratado com 0,3ng/mL hMG (*Menopur®*, *Ferring Pharmaceuticals, Saint-Prex, Suíça*) (TOPC+hMG);
- 5- tecido ovárico pós-criopreservação tratado com 100ng/mL VEGF₁₆₅, 150ng/mL bFGF e 0,3ng/mL hMG (TOPC+VEGF+bFGF+hMG).

Cada condição de cultura incluiu dois hemiovários.

Foram realizadas duas culturas de durações temporais diferentes, 60 hemiovários foram cultivados durante 4h e outros 60 durante 48h, ambas as culturas a 37°C e 5% CO₂.

Terminada a cultura, um dos hemiovários de cada condição foi fixado em 4% formaldeído tamponado (VWR) destinado à análise histológica e imunohistoquímica, realizadas pelo Serviço de Anatomia Patológica dos CHUC. O segundo hemiovário foi macerado numa caixa de *Petri* com o auxílio de agulha e bisturi e transferido para um tubo com 1ml de NZYol para realizar a extração do ácido ribonucleico (RNA) e do ácido desoxirribonucleico (DNA) e posterior realização do *array*. Todo o procedimento foi realizado sob condições estéreis.

Os tubos com o tecido em NZYol e com o meio de cultura foram armazenados a -86°C até à data dos ensaios a que estavam destinados.

3.3. Avaliação Histológica

No Serviço de Anatomia Patológica do CHUC, os hemiovários fixados em formaldeído, foram depois incluídos em parafina, cortados num micrótomo em secções de 3µm de espessura e montados em lâminas para posterior análise histológica e imunohistoquímica.

A análise histológica, com recurso à coloração das fatias do tecido com Hematoxilina e Eosina (H&E), foi realizada de forma a avaliar a morfologia do tecido ovárico através da análise qualitativa dos folículos e do estroma, bem como, a contagem e classificação dos folículos.

Esta técnica rotineira permite visualizar e distinguir constituintes celulares e tipos de células, bem como deduzir o estado funcional das células. O procedimento de coloração baseia-se na combinação de dois corantes, a hematoxilina, corante catiónico que cora estruturas ácidas (basófilas) como por exemplo grupos fosfatos dos ácidos nucleicos e a eosina, corante aniónico que cora estruturas básicas (acidófilas). Quando adicionados sequencialmente ao tecido resultam numa coloração azul dos núcleos e rosa no citoplasma e matriz extracelular (Chan, 2014).

O protocolo realizado para a coloração com Hematoxilina e Eosina foi o descrito na tabela 1.

Tabela 1. Descrição do protocolo para a coloração com hematoxilina e eosina (H&E).

Composto	Número de passagens	Tempo
Xilol (VWR)	3	2min.
Álcool absoluto (Proclínica)	2	2min.
Álcool 95% (vol/vol) (Proclínica, Caneças, Portugal)	1	2min.
Água corrente	1	2min.
Hematoxilina Gill 1 (Leica, Richmond, E.U.A.)	1	5min.
Lavagem com água corrente	1	5min.
Eosina 1% solução aquosa (Bio-optica, Milão, Itália)	1	40seg.
Álcool 95% (vol/vol)	1	30seg.
Álcool absoluto	2	30seg.
Xilol	3	30seg.

As fatias do tecido coradas com hematoxilina e eosina foram observadas no microscópio ótico, Axio Imager.Z2 (Zeiss, Munich, Alemanha) (figura 10) a uma ampliação total de 200x e 400x. As imagens do tecido foram adquiridas com a câmara digital AxioCam HRc (Zeiss) com o auxílio do software ZEN Blue 2012 (Zeiss).



Figura 10. Microscópio Axio Imager.Z2 (Zeiss, Munich, Alemanha).

3.4.1 Avaliação qualitativa do estado do tecido

O estado do tecido foi avaliado de forma qualitativa tendo em conta a morfologia do estroma e a qualidade dos folículos. No estroma qualificou-se a sua organização, a presença de edema intersticial bem como de necrose demonstrada por núcleos das células do estroma picnóticos e sinais de citólise, incluindo a presença de resíduos celulares (Dath *et al.*, 2010; Fabbri *et al.*, 2003). Para a qualidade dos folículos avaliou-se a presença de corpos picnóticos, eosinofilia do ooplasma e contração da cromatina do oócito, a integridade da membrana basal, a densidade e organização das células da granulosa e a sua separação do oócito e da membrana à volta do folículo (Damous *et al.*, 2015; Dath *et al.*, 2010; Kitajima *et al.*, 2014).

3.4.2 Classificação e densidade dos folículos

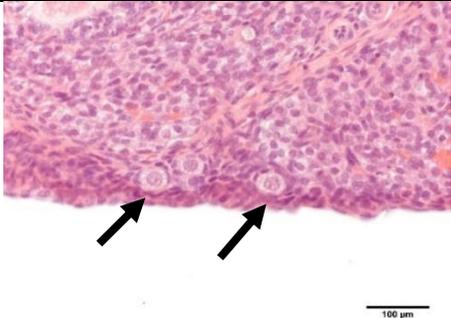
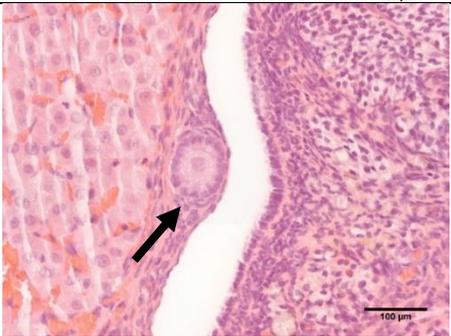
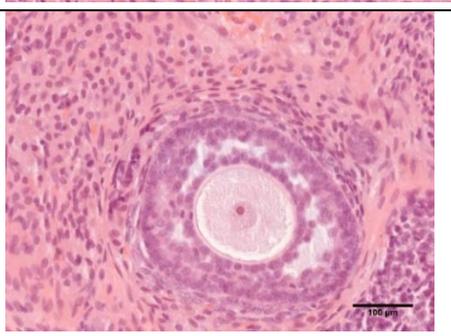
Contaram-se e classificaram-se os folículos presentes no fragmento inteiro de tecido de acordo com as características descritas na tabela 2 e mediu-se a sua área manualmente com o auxílio do programa *ImageJ*. Foram apenas contabilizados os folículos onde fosse possível visualizar o oócito, todos os outros foram considerados inclassificáveis. Em caso de observação de um folículo intermédio entre primordial e primário, com apenas uma célula da granulosa cuboide, este foi considerado como primário.

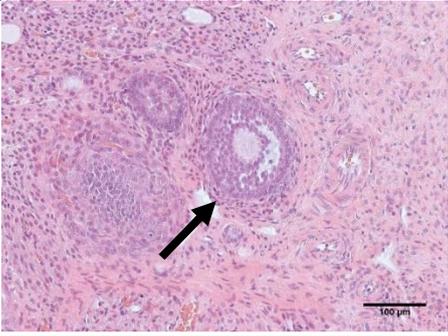
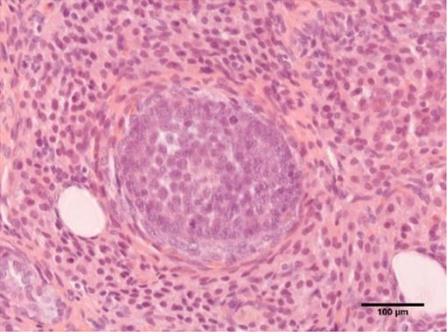
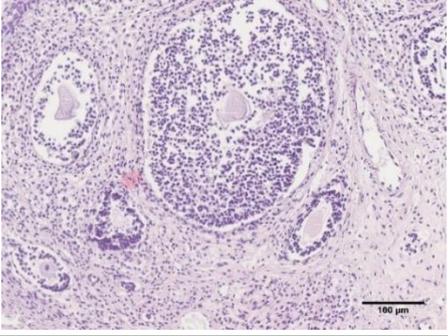
Consideraram-se folículos degenerados os que apresentassem células da granulosa picnóticas, redução da densidade deste tipo celular, degradação da membrana basal e degeneração do oócito (Damous *et al.*, 2015; Dath *et al.*, 2010; Kitajima *et al.*, 2014).

A densidade folicular foi calculada como o número de folículos por milímetro quadrado (mm^2) de tecido ovárico e a proporção folicular apresentada sobre a forma de percentagem de folículos de cada classe, pela quantidade total de folículos considerados.

A classificação e contagem foram realizadas por dois observadores independentes, alheios às condições em estudo.

Tabela 2. Características estipuladas para a classificação dos folículos. Os folículos primordiais primários, secundários, pré-antrais e inclassificáveis apresentam-se a uma ampliação de 400x enquanto os antrais e os degenerados uma ampliação de 200x.

	Descrição do folículo	Hematoxilina e Eosina
Folículos primordiais	Oócito rodeado apenas por uma camada de células achatadas da granulosa	
Folículos primários	Oócito rodeado por uma única camada de células cuboides da granulosa	
Folículos Secundários	Oócito rodeado por mais do que uma camada de células cuboides da granulosa	
Folículos Pré Antrais	Oócito rodeado por mais do que duas camadas de células da granulosa, com espaços emergentes mas sem antro definido	

Folículos Antrais	Oócito rodeado por mais do que duas camadas de células da granulosa, com um antro totalmente definido	
Folículos inclassificáveis	Folículos em que não é possível visualizar o oócito devido à amplitude do corte histológico	
Folículos degenerados	Folículos que apresentam células da granulosa picnóticas, redução da densidade deste tipo celular, degradação da membrana basal e degeneração do oócito	

3.4. Avaliação da proliferação celular, da formação de vasos sanguíneos e da apoptose por imunohistoquímica

A imunohistoquímica é uma técnica que permite a identificação de um antígeno presente num tecido, recorrendo ao reconhecimento deste por anticorpos (Revisto em Hawes *et al.*, 2009). Esta técnica é muito útil, uma vez que a arquitetura histológica do tecido é preservada, permitindo desta forma, detetar a presença de determinados antígenos e identificar a localização do antígeno no tecido, sendo assim possível saber quais são as células marcadas (Revisto em Hawes *et al.*, 2009).

A marcação foi realizada no dispositivo de marcação automática BenchMark ultra IHC/ISH (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) usando o kit de deteção OptiView DAB IHC v5 (v1.00.0117, Ventana Medical Systems). O kit de deteção OptiView DAB IHC é um

método indireto de deteção da reação anticorpo-antigénio. Este kit permite detetar anticorpos primários de rato e de coelho ligados a um antigénio em secções de tecido em parafina. Este utiliza um anticorpo terciário associado a uma enzima, neste caso a peroxidase. Quando ocorre a ligação específica entre o antigénio e anticorpo primário específico, este é identificado por um *cocktail* de anticorpos secundários (HQ linker), que por sua vez são reconhecidos por anticorpos terciários com a enzima (HRP multimer) (figura 11). Este complexo é observado pela oxidação dos substratos, o peróxido de hidrogénio e o 3,3'-diaminobenzidina, ou DAB, pela *horseradish peroxidase* (HRP), traduzindo-se num produto insolúvel de cor castanha (Dako, 2009; Ventana, 2011) (figura 11).

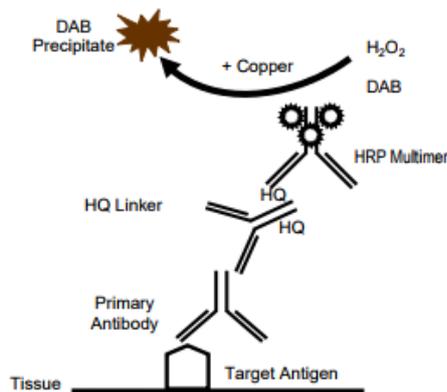


Figura 11. Esquema de funcionamento do kit de deteção OptiView DAB IHQ.

A atividade proliferativa do tecido foi evidenciada, por imunohistoquímica, através da incubação com o anticorpo primário anti-Ki-67. O Ki-67 é um antigénio nuclear que está presente no ciclo celular ativo (numa fase tardia do G1, na fase S, G2 e M) e ausente em células em quiescência (ou repouso), em G0 (Traut *et al.*, 2002).

A identificação de células apoptóticas nos tecidos foi levada a cabo através da marcação anti-caspase activa-3, AC-3. Como referido anteriormente, a caspase-3 é sintetizada na forma de proenzima inativa. Em células em apoptose, esta forma é processada quer por auto proteólise como por clivagem por outra protease da via, dando origem a duas subunidades que se associam para formar a enzima ativa.

De forma a identificar células endoteliais dos vasos sanguíneos, foi feita a marcação do fator de von Willebrand ou antigénio relacionado com o Fator VIII (Fator VIII-RAg). Este antigénio é uma glicoproteína produzida unicamente por células endoteliais e megacariócitos, sendo por isso usado para a identificação de vasos (Peyvandi *et al.*, 2011).

Para marcações de imunohistoquímica o tecido de 3µm de espessura montado na lâmina foi submetido ao seguinte protocolo:

1) Desparafinação: Através do seu aquecimento até aos 72°C durante 4 minutos.		
2) Recuperação do antigénio: Induzida pelo calor e por incubação com uma solução tampão <i>cell conditioning 1</i> (CC1) durante:		
AC-3 40 minutos a 100°C	Ki-67 24 minutos a 100°C	Fator VIII-RAg 24 minutos a 95°C
3) Inibição da peroxidase endógena:		
AC-3 Inibidor pré-primário	Ki67; Fator VIII-RAg Inibidor pós-primário	
4) Marcação imunohistoquímica: Incubação com o anticorpo primário durante:		
AC-3 (anticorpo policlonal de coelho, anti-rato, diluição 1:1000, Bio-Rad, California, E.U.A) 36 minutos a 36°C	Ki-67 (anticorpo policlonal de coelho, anti-rato, diluição 1:4000, ThermoFisher) 24 minutos a 36°C	Fator VIII-RAg (anticorpo policlonal de coelho, anti-rato, Cell Marque, California, E.U.A) 20 minutos a 36°C
5) Detecção da reação antigénio-anticorpo realizada pelo kit de deteção OptiView DAB IHC v5 (V1.00.0117; Ventana Medical Systems): - Incubação com cocktail de anticorpos secundários, HQ Universal linker, durante 8 minutos;		

- Incubação com os anticorpos terciários com a enzima peroxidase HRP Multimer também durante 8 minutos.
6) Revelação cromogénea: - Aplicação de uma gota de peróxido de hidrogénio simultaneamente com uma gota de DAB; - Adição de uma gota de solução de cobre.
7) Contraste dos núcleos, para observação da arquitetura dos núcleos: - Adição de uma gota de hematoxilina e incubação durante 8 minutos; - Incubação com uma gota de pós-contraste, <i>bluing reagent</i> , durante 4 minutos.

A solução *cell conditioning 1* (CC1) é uma com uma solução tampão, ligeiramente básica (pH=8) que a elevadas temperaturas quebra as ligações covalentes formadas entre o formaldeído e o tecido. A remoção destas ligações permite a renaturação das proteínas aumentando a acessibilidade ao anticorpo, o que pode resultar num aumento na ligação ao anticorpo, melhorando o sinal obtido.

Em cada ciclo de marcação foi realizado um controlo negativo, por omissão do anticorpo primário, onde foi aplicado apenas o anticorpo secundário, bem como um controlo de confirmação de marcação de Ki-67 em apêndice de rato RNU, de AC-3 em baço e rim e de fator VIII também em rim de RNU.

3.5.1 Quantificação da marcação resultante da imunohistoquímica

Tal como para o tecido corados com Hematoxilina e Eosina, também as lâminas resultantes da imunohistoquímica foram observadas no microscópio ótico, Axio Imager.Z2 a uma ampliação total de 200x. As imagens foram adquiridas sob a forma de tile pela câmara AxioCam HRc com o auxílio do software ZEN Blue 2012, sob as mesmas condições de brilho e gama (0,45).

Como foi referido, uma marcação positiva corresponde à presença dos anticorpos em estudo, sendo esta traduzida pela coloração castanha obtida pelo DAB.

A análise da marcação positiva do Ki-67 (figura 12) e da AC-3 (figura 13) nos folículos e no estroma foi realizada com o auxílio do programa *ImageJ* (versão 1.51t). Em primeiro lugar, os folículos foram classificados conforme o seu grau de desenvolvimento, de

acordo com a tabela 2; de seguida foram distinguidos entre folículos marcados e não marcados.

Folículos com uma célula marcada com Ki-67, consideraram-se folículos que iniciaram o crescimento (Gougeon *et al.*, 2000; Scalercio *et al.*, 2013).

Para o estudo da expressão destes anticorpos nucleares nos folículos marcados foi também medida a percentagem de área marcada em cada um.

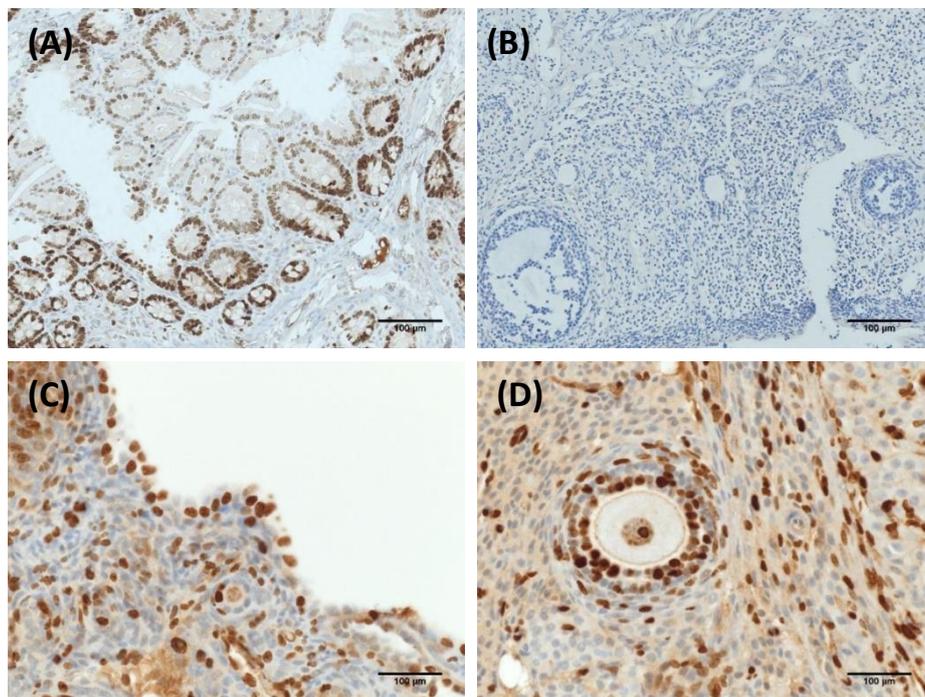


Figura 12. Marcação imunohistoquímica com Ki-67. (A) Confirmação de marcação em apêndice de RNU (x200); (B) Controlo negativo (x200); Representação da marcação de Ki-67 em ovário de rato, num (C) folículo primário (x400) e num (D) folículo secundário (x400). Barra=100µm.

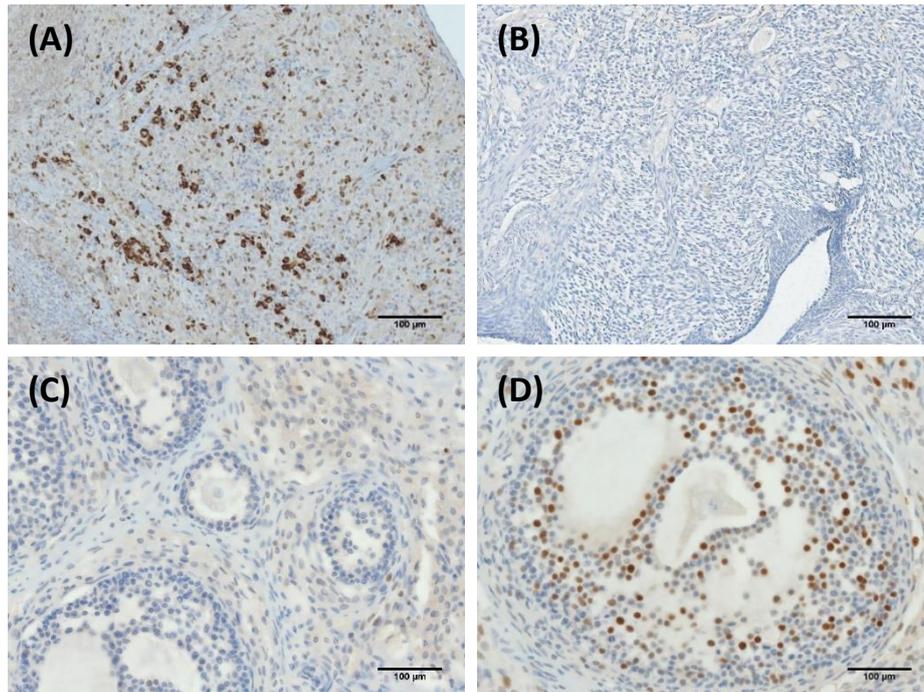


Figura 13. Marcação imunohistoquímica com AC-3. (A) Confirmação da marcação com AC-3 em baço de RNU (x200); (B) Controlo negativo (x200); (C) Exemplo de um folículo primário marcado negativamente com AC-3 (x400); (D) Exemplo de marcação com AC-3 em ovário de rato, num folículo antral (x400). Barra=100μm.

O estudo da marcação no estroma envolveu primeiramente a seleção aleatória de três áreas iguais que compreendessem apenas estroma do hemiovário de cada condição. De seguida, avaliou-se a percentagem de área marcada com o auxílio do *ImageJ*, sendo esta percentagem dada pela razão entre a área marcada e a área da secção selecionada. Considerou-se como resultado final para a marcação de cada caso, a média dos três resultados.

Para a contabilização do fator VIII escolheram-se cinco secções aleatórias de todo o fragmento. Contaram-se os vasos sanguíneos nessas áreas e, através do *ImageJ*, obteve-se a percentagem de área marcada. Consideraram-se como vasos individuais aglomerados de células endoteliais marcados positivamente com fator VIII (figura 14C e 14D), com ou sem lúmen nítido, enquanto vasos com paredes vasculares grossas não foram contabilizados (Kato *et al.*, 2001).

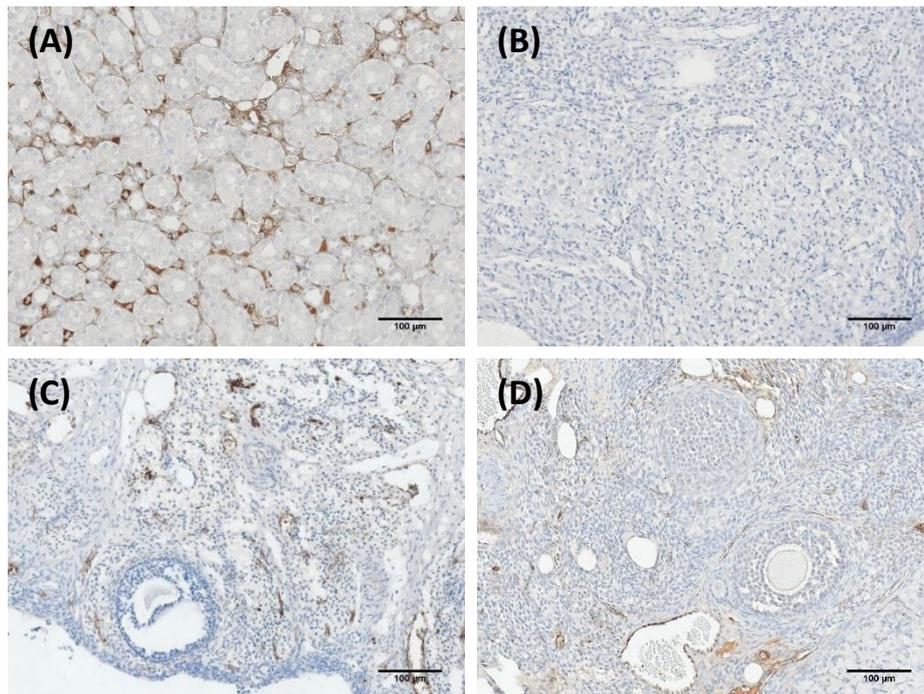


Figura 14. Marcação com Fator VIII-R.Ag. (A) Confirmação da marcação do fator VIII-R.Ag em rim (x200). (B) Controlo negativo (x200). (C) e (D) Marcação em ovário de rato (x200). Barra=100µm.

À semelhança do procedimento para a classificação e contagem dos folículos, também a quantificação da marcação imunohistoquímica foi realizada por dois observadores independentes, alheios às condições em estudo.

3.5. Análise da expressão génica dos tecidos por microarray

Todos os reagentes foram comprados a Sigma-Aldrich exceto os que indicam especificamente outra marca.

3.6.1 Extração de ácidos nucleicos do tecido

O tecido que se encontrava armazenado em NZYol a -86°C foi descongelado e a extração total de RNA foi realizada conforme o protocolo seguinte:

1. Colocou-se o tecido num *ependrof* com cerca de 6 esferas de vidro e 1 mL de trizol.
2. Agitou-se no vortex até o tecido estar completamente macerado.
3. Incubaram-se as amostras durante 5 minutos à temperatura ambiente.

4. Adicionou-se 200µL de clorofórmio e agitaram-se os tubos durante 15 segundos.
5. Incubaram-se as amostras durante 2-3 minutos à temperatura ambiente.
6. Centrifugou-se a 12000g durante 15 minutos a 4°C. As amostras separaram-se por fases sendo a que a fase transparente e aquosa que ficou no cimo continha o RNA.
7. Transferiu-se a fase aquosa com cuidado para um novo *ependrof*.
8. Adicionou-se 500µL de isopropanol a 4°C.
9. Incubaram-se as amostras durante 10 minutos à temperatura ambiente.
10. Centrifugaram-se as amostras a 12000g durante 10 minutos a 4°C.
11. Removeu-se o sobrenadante e adicionou-se 1mL de etanol a 75%.
12. Agitaram-se as amostras no vortex e centrifugaram-se a 75000g durante 5 minutos a 4°C.
13. Deixou-se secar o *pellet* e dissolveu-se em água DNase/RNase free.

3.6.2 Quantificação de ácido nucleicos

A quantificação dos ácidos nucleicos foi realizada no espectrofotómetro NanoDrop® 2000 (*Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, E.U.A.*).

1. No programa, escolheu-se a opção *Acid Nucleic*.
2. Pipetaram-se 2 µL de água DNase/RNase free diretamente para o pedestal de medição, de forma a estabelecer o espectro do branco.
3. Limpou-se o pedestal com papel seco macio.
4. Recarregou-se outra vez o pedestal com DNase/RNase free e fez-se uma medição. Se esta apresentasse uma variação maior do que 0,4 Abs, repetiram-se os passos 2 e 3.
5. Pipetaram-se 2 µL da amostra para o pedestal.
6. Tomou-se nota da quantidade de ácidos nucleicos (em ng) e dos rácios 260/280 e 260/230.
7. Fez-se uma lavagem com água DNase/RNase free a cada três medições.
8. Lavou-se, depois de todas as medições efetuadas, com 5 µL de DNase/RNase free e deixou-se durante 5 minutos. Por fim, colocou-se papel seco entre o pedestal e o braço e fechou-se.

3.6.3 Análise da expressão génica por microarray

De forma a verificar a presença de outros fatores angiogénicos, envolvidos na via da angiogénese bem como a diferença da sua expressão genética entre os tecidos em estudo, foi desenhado um array, TaqMan® Array Fast (Applied Biosystems, Foster City, CA, E.U.A). Este *array* permitiu verificar a expressão de 46 genes (Anexos, Tabela 4).

3.6.3.1 Transcrição reversa do RNA em DNA complementar (cDNA)

A partir de 1,5 µg de RNA total extraído de cada amostra foi sintetizado o DNA complementar (cDNA) por transcrição reversa utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. Para evitar contaminação, todo o procedimento foi realizado com material e reagentes livre de RNases. Este kit pressupôs as seguintes etapas:

A. Preparou-se a *mix* de transcrição reversa:

Master mix composta por componentes necessários para a ocorrência da reação: buffer de transcrição reversa, *mix* de dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfatados) (100mM), primers aleatórios para iniciar a síntese de cDNA, transcriptase reversa MultiScribe™ (Applied Biosystems), inibidor de RNase e água livre de nucleases.

B. Preparou-se e realizou-se a reação de transcrição:

1. Pipetou-se 10µL da *mix* de transcrição reversa preparada em cada tubo individual;
2. Pipetou-se 10µL da amostra de RNA para cada tudo e homogeneizar;
3. Centrifugaram-se os tubos e coloca-los em gelo até à sua colocação no termociclador.
4. Programou-se o termociclador T100 (Bio-Rad) segundo as condições seguintes:

	Passo 1	Passo 2	Passo 3	Passo 4
Temperatura	25°C	37°C	85°C	4°C
Tempo	10 minutos	120 minutos	5 minutos	∞

O cDNA convertido foi armazenado entre 2°C a 6°C, até à sua utilização.

3.6.3.2. Perfil de transcrição através de microarray de nucleótidos

Foi avaliada a expressão dos genes referidos na tabela 4 dos Anexos, em cada condição em estudo:

- Tecido ovárico fresco (TOF): 0h, 4h
- Tecido ovárico pós-criopreservação (TOPC): 0h, 4h
- Tecido ovárico pós-criopreservação tratado com VEGF e FGF (TOPC+VEGF+FGF): 4h
- Tecido ovárico pós-criopreservação tratado com hMG (TOPC+hMG): 4h
- Tecido ovárico pós-criopreservação tratado com VEGF, FGF e hMG (TOPC+VEGF+FGF+hMG): 4h

O array foi repetido para os seis hemiovários provenientes de cada condição às 0 e às 4 horas. Cada placa TaqMan® Array Fast, 96-well Plate & Format 48 (Catalog: 4413257; Design ID: RPGZE6Y) permitiu a análise da expressão génica de duas condições ao mesmo tempo.

Para a reação de amplificação por PCR utilizaram-se 5µL de cDNA como molde, amplificados pela DNA polimerase da TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems) através de uma sequência de *primers* específicos, descritos na tabela 4 dos anexos, que já se encontravam dispostos na placa. A reação de amplificação realizou-se no sistema de PCR em tempo real QuantStudio™ 3, de acordo com as seguintes condições:

		PCR (40 ciclos)	
UNG incubation	Activação da polimerase	Desnaturação	Anneal/extensão
50°C	95°C	95°C	60°C
2 minutos	20 segundos	1 segundo	20 segundos

A quantificação foi realizada no sistema de Real-Time PCR QuantStudio™ 3 (*Thermo Fisher Scientific Inc.*). Os valores de Ct (*cycle threshold*) resultantes do ensaio, isto é, dos pontos onde a fluorescência ultrapassa o valor da fluorescência de background foram calculados no Software QuantStudio™ Design and Analysis (*Thermo Fisher Scientific Inc.*) e analisados no software Applied Biosystems Analysis (*Thermo Fisher Scientific Inc.*) com a aplicação *relative quantification*.

A avaliação da quantidade relativa dos genes em estudo foi feita pelo método dos $\Delta\Delta Ct$. Inicialmente escolheram-se como genes de referência o β -actina, a fosforibosil transferase hipoxantina 1 (Hprt1) e a lactato desidrogenase A (Ldha). No entanto, após a análise da sua expressão excluíram-se os genes fosforibosil transferase hipoxantina 1 (Hprt1) e lactato desidrogenase A (Ldha), uma vez que apresentavam variabilidade entre as amostras. Desta forma, a expressão dos genes em estudo foi normalizada apenas para a β -actina. Para a análise da expressão génica calculou-se o *fold-change*, entre a amostra e o grupo de referência de interesse: para a análise do efeito da criopreservação utilizou-se como referência o grupo TOF 0h, para o estudo do efeito da cultura, o TOPC 0h e para a avaliação do impacto do tratamento, o TOPC 4h. Este *fold-change* foi determinado como $2^{-(\Delta Ct_{amostra} - \Delta Ct_{referência})}$ e reflete o número de vezes que um gene em específico foi expresso comparativamente com a referência. Foi estabelecido um limite onde genes com um *fold* maior que 2 foram considerados sobre expressos e genes com *fold* menos que 2 foram considerados sub expressos.

3.6. Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o programa Statistics Package for Social Science (SPSS) 22.0 (SPSS Inc., IBM Corporation, Chicago, IL, E.U.A).

Foi feita uma avaliação do efeito da criopreservação, através da comparação entre os tecidos a fresco e pós criopreservados sem tratamento (TOF 0h com TOPC 0h). Para o estudo do impacto da cultura no tecido, comparando os tecidos sem tratamento nos diferentes tempos (TOF 0h, 4h). Por fim, analisaram-se os tecidos pós criopreservados, às 4h com os diferentes tratamentos.

No estudo estatístico dos dados dos grupos em estudo, resultantes da histologia e imunohistoquímica foi realizado em primeiro lugar o teste de Shapiro-Wilk para aferir a normalidade dos dados. Consoante o resultado deste foram posteriormente feitos testes adequados. A densidade vascular apresentou uma distribuição normal, pelo que, para a comparação dos vários grupos foi efetuado o teste ANOVA de uma via e posteriormente para comparações de grupos dois a dois, realizou-se um teste t. Estes

resultados foram apresentados sob a forma de média \pm desvio padrão. Para comparação de dados com distribuições não normais como o caso da densidade e proporção folicular, bem como da percentagem e área folículos marcados e da área de estroma marcado com os marcadores Ki-67, AC-3 e fator VIII foi feito primeiramente o teste não paramétrico Kruskal-Wallis na comparação dos vários grupos e posteriormente para a análise de dois grupos independentes aplicou-se o teste não paramétrico Mann-Whitney. Nestes casos os resultados foram mostrados pela mediana e pelos quartis primário e terciário (mediana (Q1-Q3)). Para a comparação entre os grupos no *microarray*, aplicou-se o teste de Benjamini-Hochberg. Valores de *P* inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS

4.1. Avaliação qualitativa da morfologia do tecido

De forma a verificar o impacto da cultura durante 4h e 48h na arquitetura do tecido ovárico foi feita a avaliação da qualidade dos tecidos através da descrição morfológica dos folículos e do estroma (figura 15).

Às 0h, tanto em tecidos a fresco como em tecidos após a criopreservação não se visualizaram sinais de edema intersticial ou necrose; o estroma apresentou-se organizado e sem sinais de citólise. Nestas condições, os folículos mostravam uma morfologia normal, com células da granulosa de forma regular e oócitos sem sinais de degeneração (figura 15).

No geral, após cultura de 4h (figura 15), o estroma apresentou uma ligeira desorganização comparativamente à organização dos tecidos das 0h, sendo visível edema entre células, no entanto, não foram encontrados sinais de necrose. Os folículos apresentavam maioritariamente uma arquitetura alterada relativamente à verificada nos folículos do tecido ovárico às 0 horas, mostrando uma qualidade diminuída, apresentando algumas células da granulosa picnóticas e descoladas da membrana basal. No entanto, apenas com a análise histológica não é possível verificar a funcionalidade dos folículos.

Independentemente da condição, às 48 horas denotou-se em todos os tecidos a presença de edema intersticial e necrose, verificando-se a presença de resíduos celulares, onde as células do estroma se encontravam picnóticas e em baixa densidade. Os folículos mostravam células da granulosa picnóticas, desorganizadas e separadas do oócito bem como da membrana basal do folículo e degeneração do oócito.

Visto o impacto negativo das 48 horas de cultura no tecido ovárico dado pelo nível de degradação, e a sua inviabilidade na preservação e manutenção do mesmo, decidiu-se excluir esta condição temporal do estudo, uma vez que seria impeditivo de tirar quaisquer conclusões acerca dos parâmetros previstos.

Para a apresentação dos resultados, os folículos classificados segundo a tabela 2 foram agrupados em folículos primordiais, folículos primários e folículos secundários e antrais.

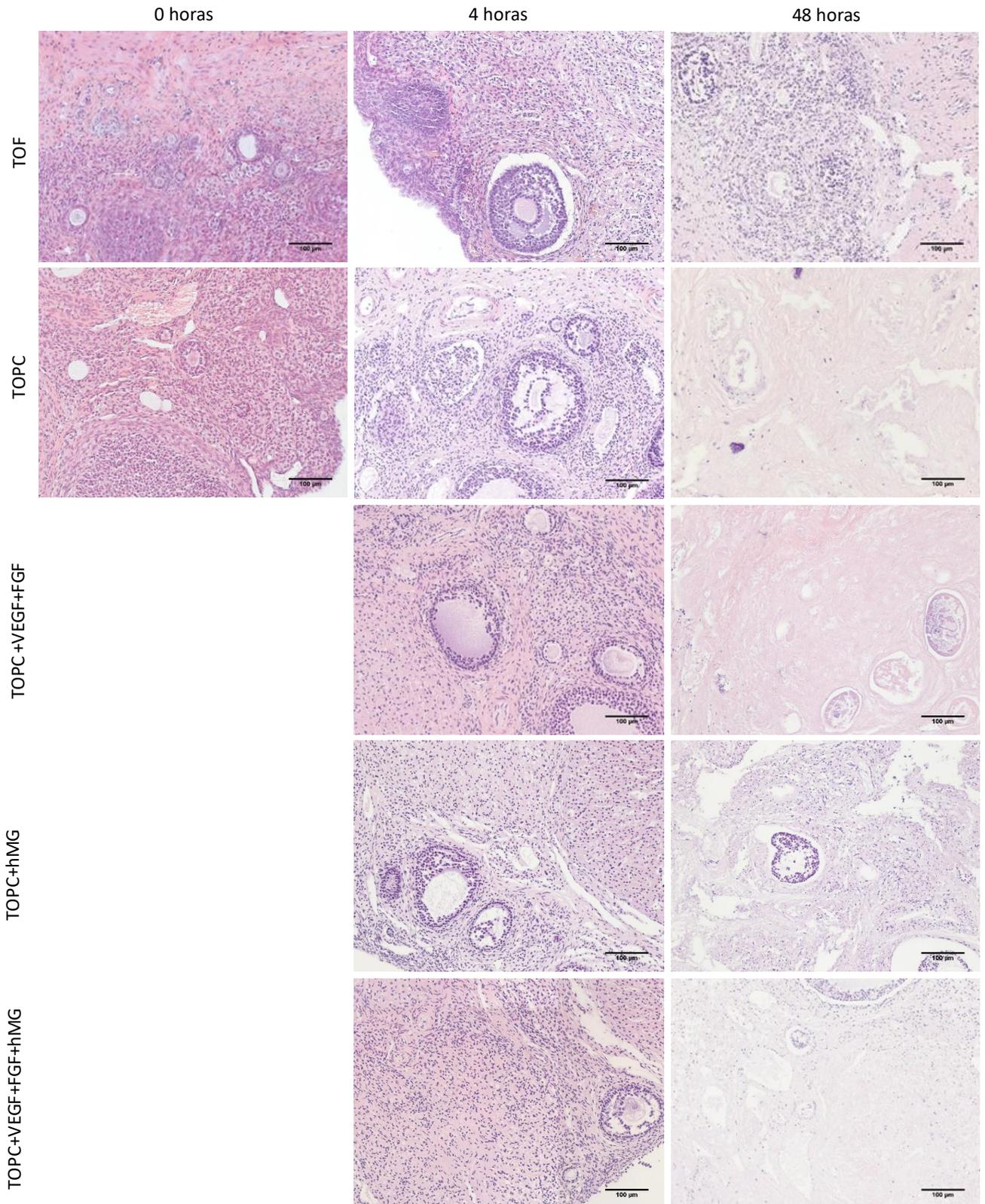


Figura 15. Imagens representativas do tecido ovárico corado com hematoxilina e eosina nas diferentes condições em estudo às 0h, 4h e 48h de cultura. Imagens numa ampliação de 200x. Barra=100 µm.

4.2. Efeito da criopreservação na qualidade do tecido ovárico

De forma a avaliar o impacto da criopreservação no estado do tecido ovárico fez-se uma comparação entre o tecido ovárico imediatamente após ovariectomia (ovário a fresco, TOF) e o tecido que após a remoção cirúrgica foi sujeito a criopreservação (TOPC).

4.2.1 Densidade e proporção folicular

Em primeiro lugar, procedeu-se a avaliação da densidade folicular determinada a partir da contagem e classificação dos folículos. Através da análise da coloração com hematoxilina e eosina observaram-se folículos de todas as classes em ambos os tecidos, para além disso, como indica a figura 16, não se verificaram diferenças significativas ($p > 0,05$) no número de folículos primordiais por mm^2 entre TOF 0h (mediana: 0,418 (primeiro quartil: 0,127; terceiro quartil: 0,875)) e TOPC 0h (0,909 (0,635; 1,78)), de folículos primários em TOF 0h (0,607 (0,0958; 1,22)) e TOPC 0h (0,427 (0,00; 1,13)), nem na densidade de folículos secundários e antrais em TOF 0h 0,324 (0,00; 0,818) e TOPC 0h 0,509 (0,407; 0,959). Assim, pode dizer-se que a densidade folicular se manteve semelhante após o processo de criopreservação.

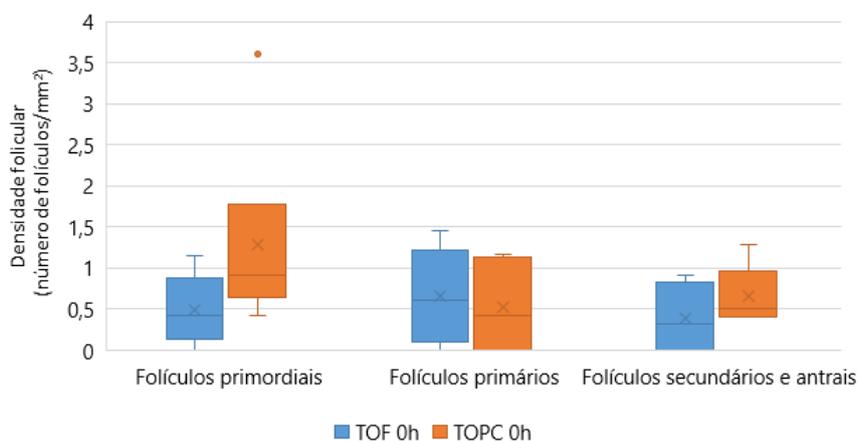


Figura 16. Representação da densidade folicular, expressa em número de folículos por mm^2 , no tecido ovárico fresco (TOF) e no tecido ovárico criopreservado (TOPC), ambos à 0h. A linha horizontal ao centro representa a mediana, a cruz (X) indica a média, a caixa corresponde ao intervalo interquartil (1º Quartil – 3º Quartil) e as linhas verticais indicam o máximo e o mínimo da distribuição. O resultado foi apresentado como mediana (1º quartil; 3º quartil).

Também a proporção folicular, dada pela percentagem de folículos de cada classe presente no tecido não demonstrou diferenças ($p>0,05$) entre os tecidos antes e após a criopreservação. No TOF 0h, visualizaram-se 33,0% (19,4; 81,3) de primordiais enquanto em TOPC 0h 52,8% (35,7; 66,9). Observaram-se 38,7% (18,8; 49,0) primários em TOF 0h e em TOPC 0h 9,51% (0,00; 39,9). Os secundários e antrais em TOF 0h representam 21,9% (0,00; 36,0) e 27,7% (21,6; 38,9) nos TOPC 0h.

4.2.2 Ki-67 e proliferação celular

De forma a analisar o estado proliferativo do tecido foi quantificada a marcação do Ki-67 tanto nos folículos como no estroma.

Como demonstrado na figura 17(A), não há diferenças significativas ($p>0,05$) na percentagem de folículos primordiais (TOF 0h: 100% (95;100) e TOPC 0: 88,1% (77,1; 98,2), primários (TOF 0h: 100% (91,7;100) e em TOPC 0h 100% (81,3;100) e secundários ou antrais (TOF 0h 100% (100; 100) e TOPC0h 100%: (100; 100) marcados com Ki-67. De igual forma, a expressão de Ki-67 no estroma (figura 17(B)) manteve-se semelhante ($p>0,05$) entre os tecidos antes (TOF 0h: 3,24 (2,10; 4,05)) e após (TOPC 0h: 3,86 (1,77; 5,95)) a criopreservação.

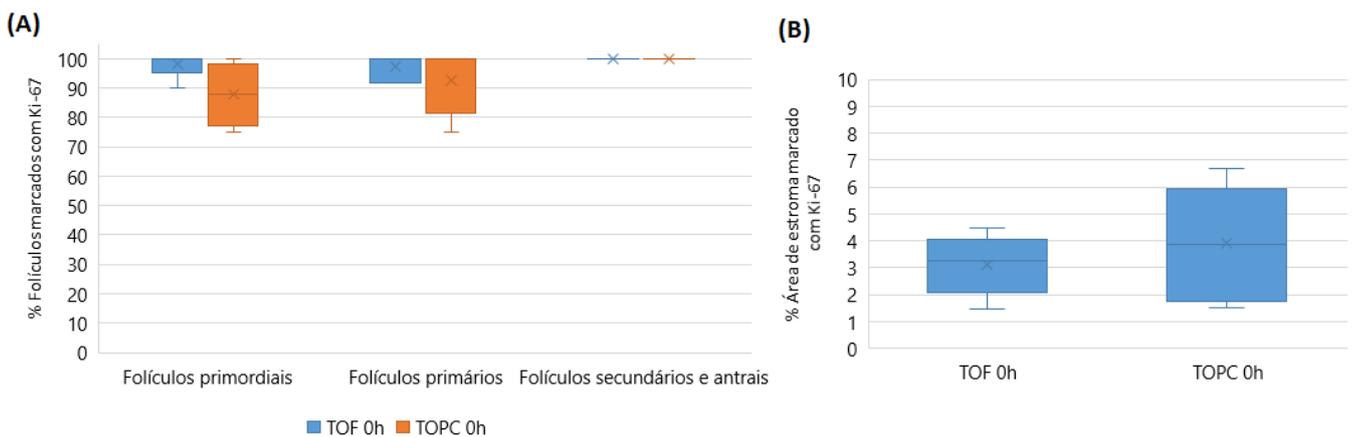


Figura 17. Representação (A) da percentagem de folículos marcados com Ki-67 e (B) da percentagem de área de estroma marcado com Ki-67, no tecido ovárico fresco (TOF) e no tecido ovárico criopreservado (TOPC), ambos às 0h. A linha horizontal ao centro representa a mediana, a cruz (X) indica a média, a caixa corresponde ao intervalo interquartil (1º Quartil – 3º Quartil) e as linhas verticais indicam o máximo e o mínimo da distribuição.

4.2.3 AC-3 e apoptose

Segundo Kang *et al.* (2016), folículos com o oócito marcado com AC-3 bem como mais de 50% das células da granulosa também marcadas foram considerados folículos não dinâmicos.

No presente estudo, não se verificou a ocorrência de oócitos marcados com AC-3. Para além disso, grande parte dos tecidos observou-se uma maior expressão de AC-3 no estroma em relação à expressão nos folículos (figura 18(A) e 18(B)). Por sua vez os folículos apresentavam uma marcação fraca, na sua maioria com percentagem de marcação até 25%. Os folículos primordiais encontravam-se raramente marcados.

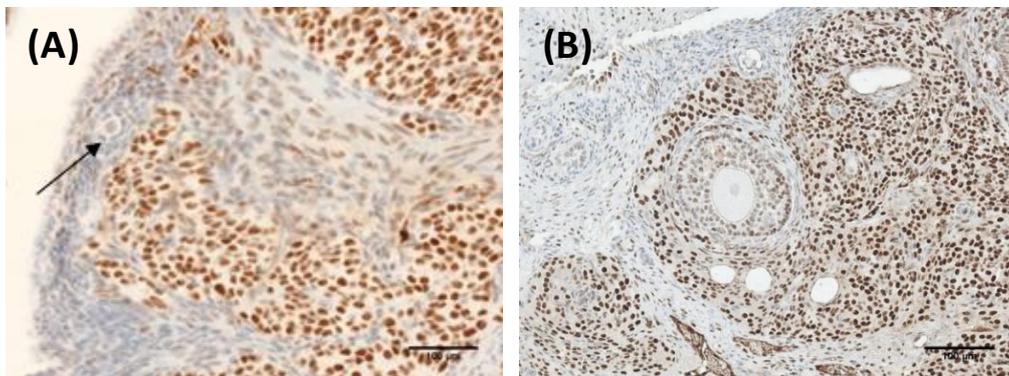


Figura 18. Imagens representativas da marcação de AC-3 no estroma e folículos de tecido ovárico fresco. (A) Visualização de um folículo primordial (seta) com marcação negativa para a AC-3, rodeado por áreas de estroma muito marcadas (200x). (B) Presença de um folículo secundário positivamente marcado com a AC-3, também circundado por áreas de elevada marcação (200x).

No entanto, foi avaliada a percentagem de folículos marcados em cada tipo folicular e a percentagem da sua área marcada, parâmetro este que estará relacionado com a quantidade de células marcadas.

No seguimento da análise do efeito da criopreservação, é possível confirmar que a maioria dos folículos marcados com AC-3 foram folículos primários e em desenvolvimento, enquanto a quantidade de folículos primordiais marcados foi residual. Segundo a figura 19(A) não se observaram diferenças ($p > 0,05$) na quantidade de folículos primordiais positivos para AC-3 entre TOF 0h (0,00% (0,00;18,8)) e TOPC 0h (0,00% (0,00; 0,00)). O mesmo se verificou para os primários (TOF 0h: 73,2% (0,00;90) e TOPC 0h: 33,3% (0,00;65,7)) e secundários e antrais entre (TOF 0h: 100% (100;100) e TOPC 0h: 12,5% (0,00;100)).

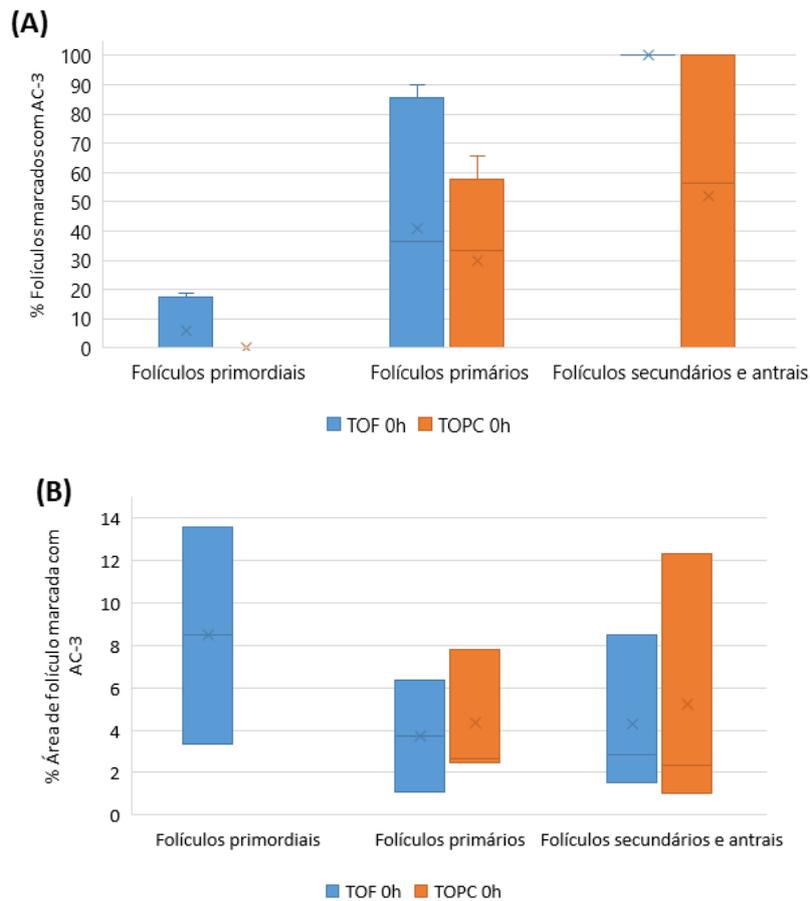


Figura 19. (A) Percentagem de folículos marcados com AC-3 e (B) Percentagem de área marcada nos folículos no tecido ovárico fresco (TOF) e no tecido ovárico criopreservado (TOPC), ambos às 0h. A linha horizontal ao centro representa a mediana, a cruz (X) indica a média, a caixa corresponde ao intervalo interquartil (1º Quartil – 3º Quartil) e as linhas verticais indicam o máximo e o mínimo da distribuição.

A figura 19 (B) representa a percentagem de marcação dos folículos que se encontraram positivos para a AC-3 nos tecidos em consideração. Também a este nível não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$). Verificou-se que os folículos primordiais que apresentaram marcação em TOF 0h tinham 8,46% (3,35; 13,6) de área marcada, enquanto em TOPC 0h não foram encontrados folículos primordiais marcados. Os folículos primários demonstraram 3,70% (1,06; 6,34) de área marcada em TOF 0h, enquanto em TOPC 0h a área foi de 2,67% (2,50; 7,81). De forma semelhante, os folículos secundários e antrais nos TOF 0h tinham 2,87% (1,54; 8,48) e no TOPC0h 2,32% (1,02; 12,1) de área marcada. Relativamente à expressão deste marcador no estroma, como evidenciado na figura 20, há a indicação que tanto no tecido ovárico fresco às 0 horas (8,26% (3,46; 16,8)) como no tecido após criopreservação 3,16% (2,10; 4,80) a expressão

de AC-3 no estroma é baixa, para além disso indica ainda que não há diferenças estatísticas ($p > 0,05$) entre os grupos.

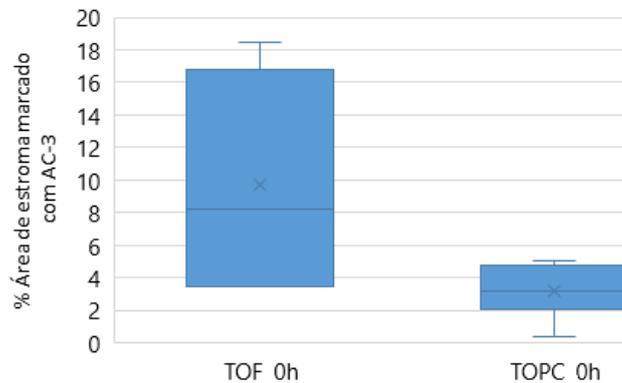


Figura 20. Representação da média da percentagem de área de estroma marcado com AC-3 no tecido ovárico fresco (TOF) e no tecido ovárico criopreservado (TOPC), ambos às 0h. A linha horizontal ao centro representa a mediana, a cruz (X) indica a média, a caixa corresponde ao intervalo interquartil (1º Quartil – 3º Quartil) e as linhas verticais indicam o máximo e o mínimo da distribuição.

4.2.4 Fator VIII, densidade e área vascular

De forma a avaliar a densidade e área vascular, recorreu-se à marcação do fator VIII-RAg. A figura 2 indica que a marcação com fator VIII-RAg demonstrou uma diminuição da densidade vascular (número de vasos por mm^2) do tecido ovárico a fresco ($24,5 \pm 3,57$) para o criopreservado ($15,3 \pm 4,33$) ($p = 0,034$). No entanto, não há diferenças ($p > 0,05$) quanto à percentagem de área marcada entre as condições (TOF 0h: 2,44% (1,24;4,50) e TOPC 0h: 2,00% (0,75;4,09)).

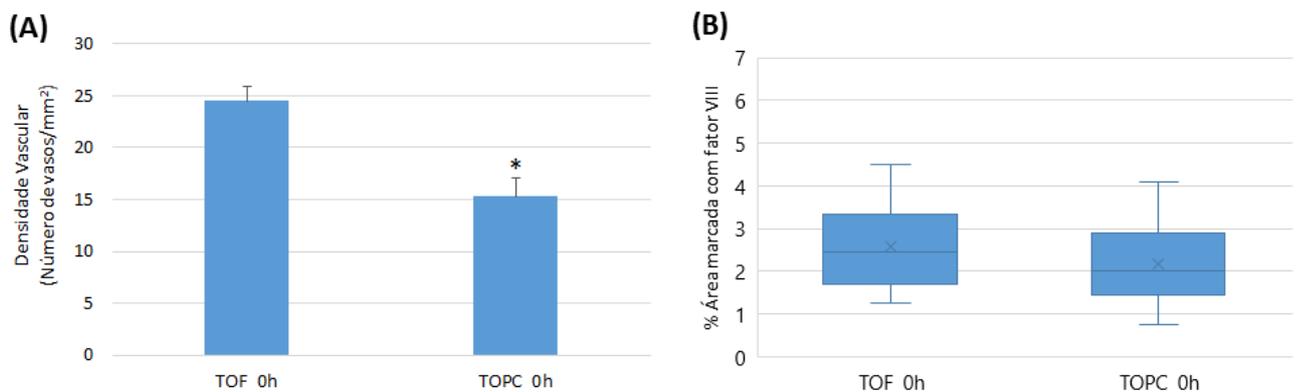


Figura 21. Representação (A) da densidade vascular (número de vasos/ mm^2) e (B) da percentagem de área vascular no tecido (TOF) e no tecido ovárico criopreservado (TOPC), ambos às 0h. O número de vasos/ mm^2 é apresentado como média \pm desvio padrão enquanto a percentagem de área marcada é dada pela mediana (1º Quartil; 3º Quartil). A linha horizontal ao centro representa a mediana, a cruz (X) indica a média, a caixa corresponde ao intervalo interquartil (1º Quartil – 3º Quartil) e as linhas verticais indicam o máximo e o mínimo da distribuição. (* $p < 0,05$).

4.2.5 Perfil de expressão génica

Com o intuito de rastrear e selecionar genes integrantes da via da angiogénese (Anexo; Tabela 4) com expressão alterada entre as condições foram realizados *microarrays* de PCR para cada grupo em estudo. A figura 22 representa o gráfico de dispersão que estabelece a comparação entre o painel de expressão dos TOF e dos TOPC ambos às 0 horas.

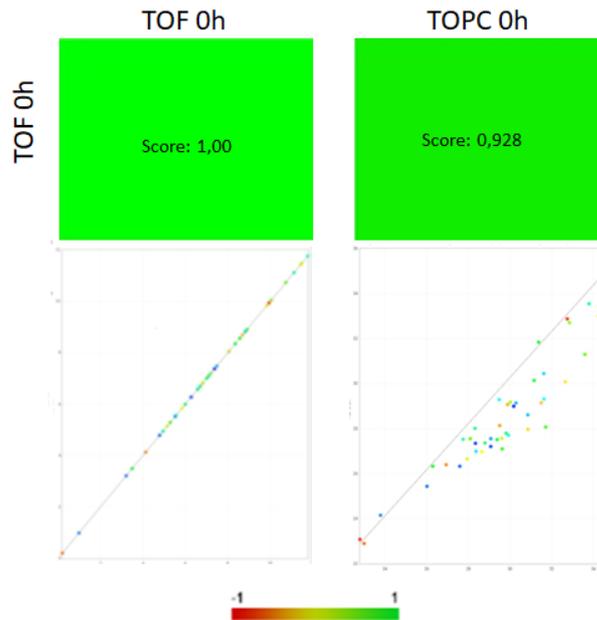


Figura 22. Gráfico de dispersão comparando os grupos TOF 0h e TOPC 0h e respetivo score de dispersão. Cada ponto representa a expressão de um gene (ΔCt).

Num gráfico de dispersão, genes com valores de expressão igual entre as condições alinham com a linha de identidade, ou linha diagonal. Pontos abaixo da diagonal representam genes com maior expressão na condição colocada nas abcissas e pontos acima da diagonal representam genes com maiores valores de expressão na condição das ordenadas. Quanto maior for a distância de um ponto à linha diagonal, maior é a diferença da sua expressão entre as duas condições. Esta dispersão é quantificada pelo score de dispersão (Kalocsai *et al.*, 1999).

Através do gráfico de dispersão, representado na figura 22, verifica-se que a expressão génica de marcadores angiogénicos nos grupos TOF 0h e TOPC 0h é muito semelhante, visto que os pontos estão relativamente próximos da linha, o que é

confirmado pelo score de dispersão muito próximo de 1 (score=0,928). Esta observação confirma-se estatisticamente através de um valor de $p > 0,05$.

4.3. Impacto da cultura na qualidade do tecido

Procurou-se também apurar o impacto das quatro horas de cultura nos parâmetros em estudo. Desta forma, foram comparadas as amostras criopreservadas após ovariectomia (TOPC 0h), com os tecidos criopreservados e de seguida colocados em cultura durante 4 horas (TOPC 4h).

4.3.1 Densidade e proliferação folicular

Como apresentado na figura 23 nos tecidos criopreservados a densidade de folículos primordiais é similar ($p > 0,05$) entre TOPC às 0 horas (0,909 (0,635; 1,78)) e TOPC às 4h (0,413 (0,154; 0,758)), tal como a densidade dos folículos primários (TOPC 0h: 0,427 (0,00; 1,13) e TOPC 4h: 0,701 (0,306; 0,964) e folículos secundários e antrais (TOPC 0h: 0,509 (0,407; 0,959) e TOPC 4h: 0,903 (0,670; 1,39)).

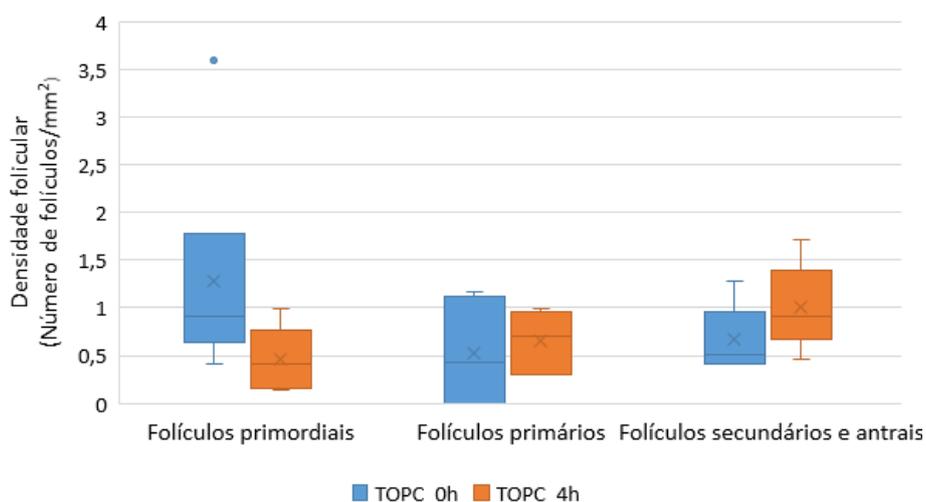


Figura 23. Representação da densidade folicular no tecido ovárico imediatamente após a criopreservação (TOPC 0h) e no tecido ovárico criopreservado cultivado durante 4 horas (TOPC 4h). A linha horizontal ao centro representa a mediana, a cruz (X) indica a média, a caixa corresponde ao intervalo interquartil (1º Quartil – 3º Quartil) e as linhas verticais indicam o máximo e o mínimo da distribuição.

Já no gráfico da figura 24 verifica-se que a percentagem de folículos primordiais diminuiu ($p=0,006$) das 0 horas (52,8% (35,7; 67,0)) para as 4 horas (29,0% (6,32; 30,1)) e a percentagem de folículos secundários e antrais aumentou ($p=0,025$) com a cultura (TOPC 0h 27,7% (21,6; 38,9) e TOPC 4h 46,0% (39,0; 60,3)). A proporção de folículos primários foi mantida ($p>0,05$) entre TOPC 0h: 9,51% (0,00; 40,0) e os TOPC 4h: 32,1% (25,2; 34,0).

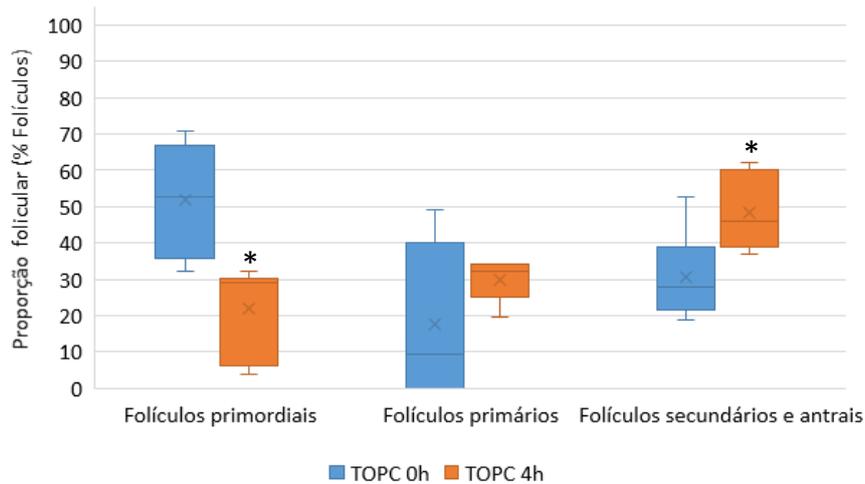


Figura 24. Proporção folicular em TOPC 0h e em TOPC 4h. A linha horizontal ao centro representa a mediana, a cruz (X) indica a média, a caixa corresponde ao intervalo interquartil (1º Quartil – 3º Quartil) e as linhas verticais indicam o máximo e o mínimo da distribuição. (* $p < 0,05$).

4.3.2 Ki-67 e proliferação celular

Atendendo ao gráfico da figura 25(A) constata-se que nos tecidos criopreservados não houve diferenças significativas ($p>0,05$) entre a quantidade de folículos primordiais marcados para Ki-67 às 0h (88,1% (77,1; 98,2)) e às 4h (0,00% (0,00; 80)) tal como a percentagem de folículos primários (TOPC 0h: 100% (81,3 ;100) e TOPC 4h: 0,00 (0,00;100)). Já a quantidade de folículos secundários e antrais em proliferação diminuiu ($p=0,006$) entre TOPC 0h (100% (100;100)) e o TOPC 4h (0,00% (0,00; 95,8)).

Na figura 25(B) observa-se nos tecidos que foram sujeitos à criopreservação uma diminuição ($p=0,004$) da marcação do estroma com Ki-67 das 0 horas (3,86% (1,77; 5,95)) para as 4h (0,138% (0,004; 0,520)).

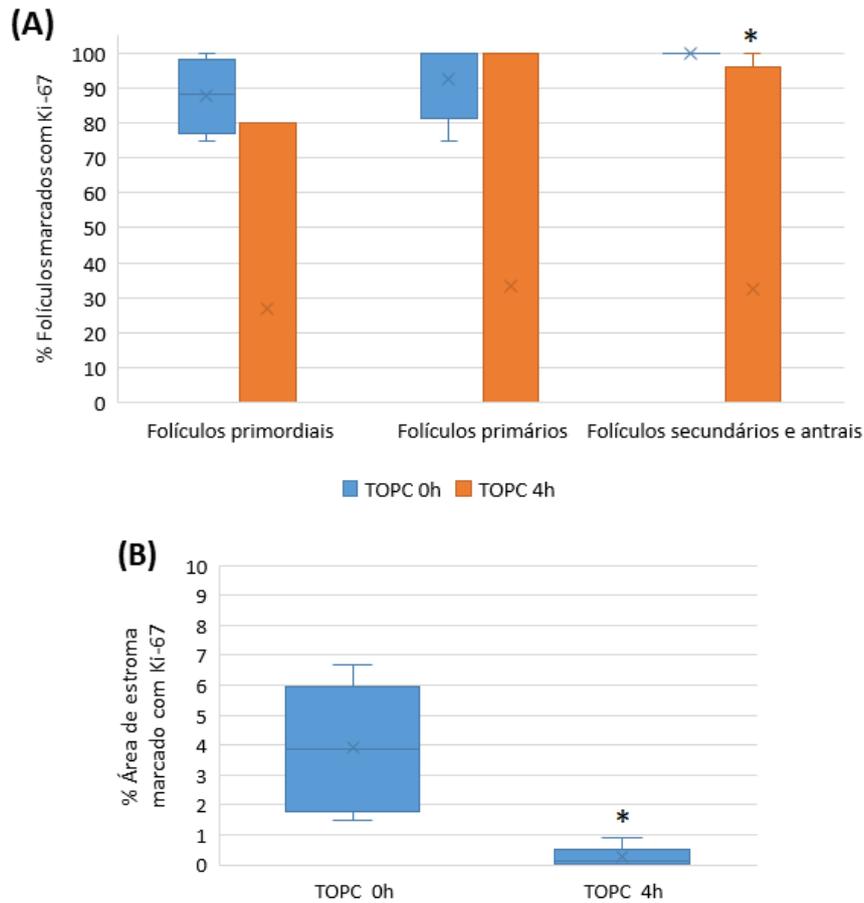


Figura 25. Representação (A) da percentagem de folículos marcados com Ki-67 e (B) da percentagem de área de estroma marcado com este marcador no tecido ovárico imediatamente após criopreservação (TOPC 0h) e no tecido ovárico após criopreservação cultivado durante 4h (TOPC 4h). A linha horizontal ao centro representa a mediana, a cruz (X) indica a média, a caixa corresponde ao intervalo interquartil (1º Quartil – 3º Quartil) e as linhas verticais indicam o máximo e o mínimo da distribuição. (* $p < 0,05$).

4.3.3 AC-3 e apoptose

Tal como descrito anteriormente, a expressão da AC-3 nos tecidos em estudo demonstrou-se fraca.

Para além disso, a percentagem de folículos marcados com este marcador não sofreu alterações ($p > 0,05$) comparando os tecidos às 0 horas e as 4 horas. Mais precisamente, a quantidade de folículos primordiais marcados manteve-se tanto em TOPC 0h (0,00% (0,00; 0,00)) como em TOPC 4h (0,00% (0,00; 37,5)). Nos tecidos criopreservados às 0h,

33,3% (0,00; 57,9) dos folículos marcados eram primários, mantendo-se semelhante à 4h (TOPC 4h=6,25% (0,00; 36,6). Já às 0h registaram-se 56,25% (0,00;100) de folículos secundários e antrais e 71,3 % (49,0; 100) em TOPC 4h.

De seguida, foi avaliada a percentagem de área marcada nos folículos que se contabilizaram como positivos. Na cultura dos tecidos criopreservados não se observaram nenhuns folículos primordiais marcados com AC-3 em TOPC 0h (n=0) e em TOPC 4h verificou-se apenas um folículo marcado (0,23%). A figura 26(A) mostra que a percentagem de área marcada nos folículos primários tendeu a diminuir ($p=0,05$) entre os TOPC 0h (2,67% (2,50; 7,81)) e os tecidos após cultura (1,68% (0,13; 2,20)). Já quanto aos folículos secundários e antrais a porção de marcação manteve-se similar ($p>0,05$) entre o tempo inicial (2,32% (1,01; 12,3)) e passadas 4 horas de cultura (0,782% (0,588;2,43)).

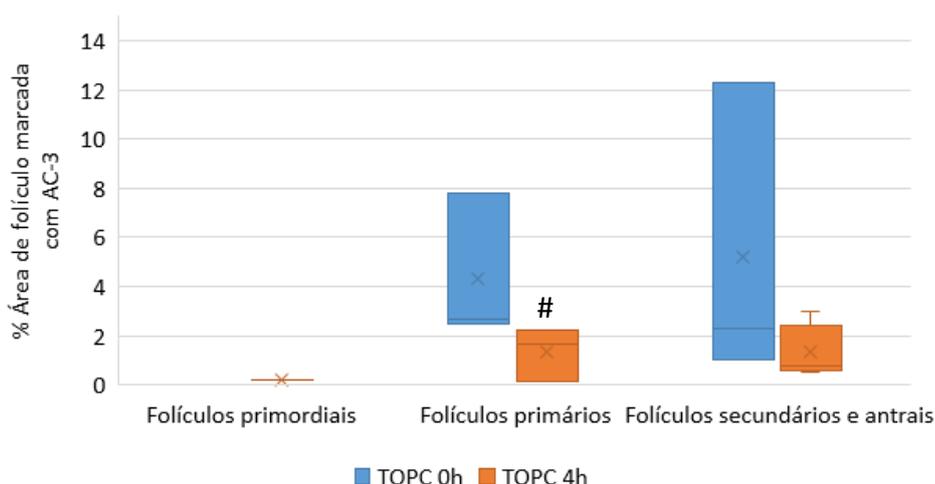


Figura 26. Percentagem de área de folículo marcada com AC-3 no tecido ovárico após criopreservação no tempo inicial (TOPC 0h) e no tecido ovárico criopreservado cultivado durante 4h (TOPC 4h). A linha horizontal ao centro representa a mediana, a cruz (X) indica a média, a caixa corresponde ao intervalo interquartil (1º Quartil – 3º Quartil) e as linhas verticais indicam o máximo e o mínimo da distribuição. (# $p=0,05$).

Relativamente à expressão de AC-3 no estroma dos tecidos criopreservados (figura 27) verifica-se uma diminuição ($p=0,025$) desta de 3,16% (2,09; 4,79) nos TOPC 0h para 0,417% (0,28; 0,86) nos TOPC 4h.

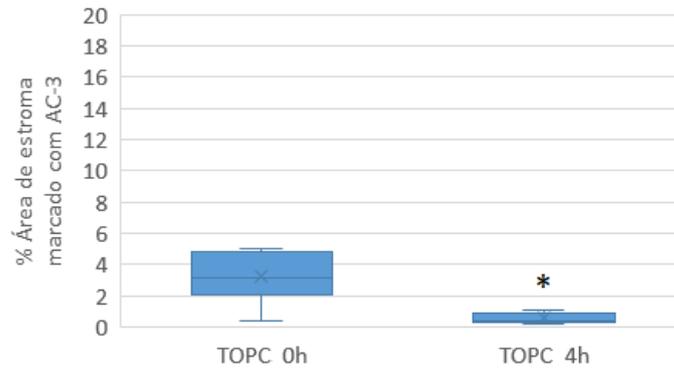


Figura 27. Grau de marcação do estroma dado pela percentagem de área de estroma marcado com AC-3. A linha horizontal ao centro representa a mediana, a cruz (X) indica a média, a caixa corresponde ao intervalo interquartil (1º Quartil – 3º Quartil) e as linhas verticais indicam o máximo e o mínimo da distribuição. (* $p < 0,05$)

4.3.4 Fator VIII, densidade e área vascular

Como demonstra o gráfico da figura 28 nos tecidos criopreservados, a densidade vascular aumentou ($p=0,002$) de $15,3 \pm 4,33$ vasos/ mm^2 às 0h para $27,7 \pm 4,58$ vasos/ mm^2 às 4h. Já a porção de área marcada (figura 28 (B)) com este marcador mostrou-se semelhante ($p>0,05$) entre os TOPC 0h 2,00% (1,45; 2,89) e os tecidos após cultura (TOPC 4h: 2,98% (2,55; 3,96)).

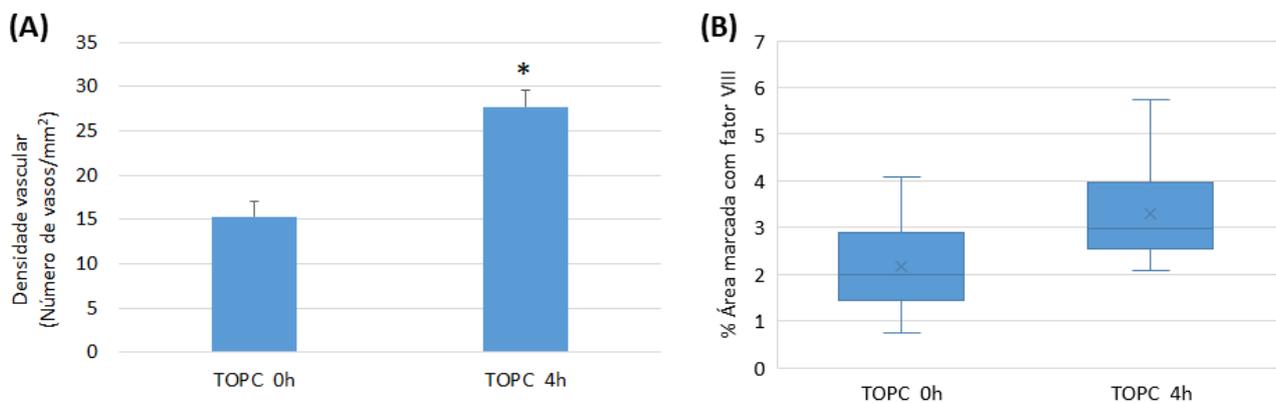


Figura 28. (A) Densidade vascular (número de vasos/ mm^2) e (B) percentagem de área vascular no tecido ovárico fresco após criopreservação (TOPC 0h) e no tecido ovárico pós criopreservado após 4h de cultura (TOPC 4h). O número de vasos/ mm^2 é apresentado como média \pm desvio padrão enquanto a percentagem de área marcada é dada pela mediana (1º Quartil; 3º Quartil). A linha horizontal ao centro representa a mediana, a cruz (X) indica a média, a caixa corresponde ao intervalo interquartil (1º Quartil – 3º Quartil) e as linhas verticais indicam o máximo e o mínimo da distribuição. (* $p < 0,05$).

Tabela 3. Resumo dos resultados da contagem folicular e da expressão imunohistoquímica no efeito da cultura na qualidade do tecido. As setas ↑ e ↓ indicam respetivamente um aumento ou diminuição significativos. No marcador Ki-67 está representada a percentagem de folículos marcados enquanto na AC-3 está a percentagem de área de folículo marcada. No fator VIII é apresentada a densidade folicular, isto é, percentagem de vasos marcados por mm².

		Folículos			Estroma
		Primordiais	Primários	Secundários e antrais	
TOPC 0h-TOPC 4h	Densidade folicular	-	-	-	
	Proporção folicular	↓	-	↑	
	Ki-67	-	-	↓	↓
	AC-3	-	-	-	↓
	Fator VIII	↑			

4.3.5 Perfil de expressão génica

Segundo o gráfico de dispersão da figura 29 que compara a expressão génica entre os tecidos criopreservados antes e após a cultura, é possível observar uma certa dispersão dos pontos relativamente à linha, efeito que é traduzido por um valor de score de dispersão de 0,486, afastado da unidade.

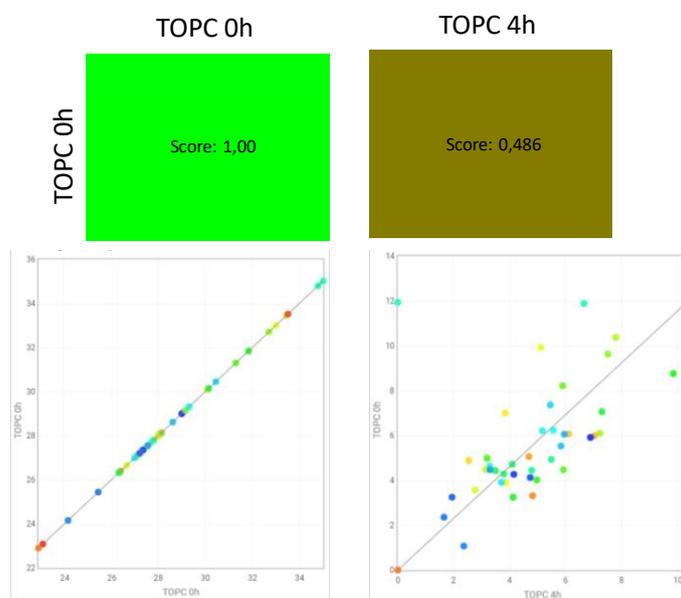


Figura 29. Gráfico de dispersão comparando os grupos TOPC 0h (ordenadas) e TOPC 4h (abscissas) respetivo score de dispersão. Cada ponto representa a expressão de um gene (ΔCt).

De seguida, procurou-se encontrar quais os genes diferentemente expressos entre as condições, que afetaram o score de dispersão. Através do gráfico *Volcano*, representado na figura 30, que relaciona o *fold change* com a sua significância, verifica-se que apenas os genes Col4a3 (Colagénio, tipo IV, alfa 3), EGF, Epas1 (*Endothelial PAS domain-containing protein 1*) e Tie1 (*Endothelial-Specific Receptor Tyrosine Kinase1*) apresentaram uma expressão significativamente aumentada em TOPC 4h relativamente a TOPC0h. No entanto, outros genes apesar de apresentarem expressão aumentada ($\text{fold} > 2$) ou diminuída ($\text{fold} < -2$), esta não era estatisticamente significativa.

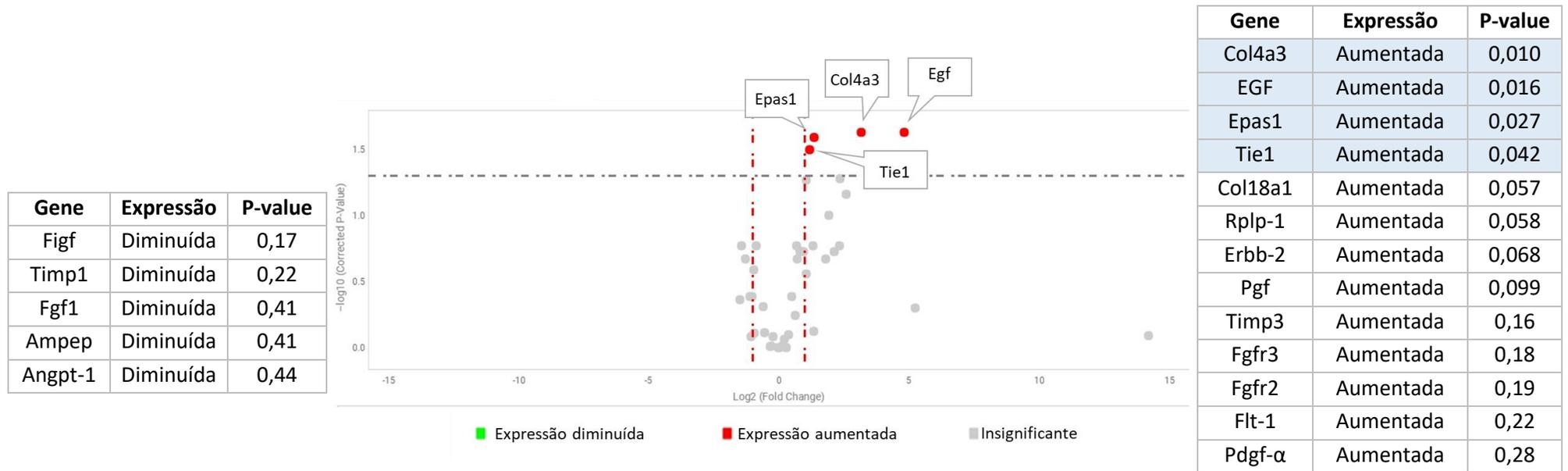


Figura 30. Gráfico Volcano de $\log_2(\text{fold-change})$ versus $-\log_{10}(\text{valor } p \text{ corrigido})$, comparando a expressão génica em TOPC 4h relativamente à expressão dos TOPC 0h. A linha a tracejado vermelha representa o fold change limite selecionado ($\text{fold} > 2$ e $\text{fold} < -2$) enquanto a linha tracejada a cinzento delimita a significância estatística, neste caso em $p=0,05$. Os pontos no quadrante de cima, à esquerda e à direita representam respetivamente genes com expressão aumentada e diminuída, com relevância estatística. Pontos nos quadrantes de baixo, à esquerda e à direita representam genes com expressão aumentada ou diminuída, mas sem relevância estatística. As tabelas resumem a expressão de certos genes e os seus valores de p , dados pelo gráfico.

4.4. Efeito do tratamento de tecido ovárico com fatores de crescimento VEGF, FGF e com hMG

De forma a estudar o impacto dos fatores VEGF, FGF e hMG na sobrevivência, manutenção, e estimulação da angiogénese em tecido ovárico após criopreservação-descongelamento estabeleceu-se uma comparação entre os tecidos cultivados durante 4 horas após a criopreservação sem nenhum tipo de tratamento (TOPC 4h), e os tecidos cultivados durante 4 horas em meio suplementado com os fatores de crescimento VEGF e bFGF (TOPC 4h, VEGF+FGF), bem como os tecidos em meio com apenas a hMG (TOPC 4h, hMG) e por fim, para avaliar o efeito conjunto, hemiovários pós criopreservados cultivados em meio suplementado com VEGF, bFGF e hMG (TOPC 4h, VEGF+FGF+hMG).

4.4.1 Densidade e proliferação folicular

A figura 31 demonstra que o tratamento com os fatores não influenciou ($p>0,05$) a densidade folicular dos folículos primordiais entre os tecidos sem tratamento (TOPC 4h: 0,413 (0,154; 0,758) folículos/mm², comparativamente com os grupos tratados (TOPC 4h+VEGF+FGF: 0,22 (0,092; 0,72); TOPC 4h+hMG: 0,32 (0,074; 0,513); TOPC 4h+VEGF+FGF+hMG: 0,25 (0,15; 0,35)), nem entre os grupos. Também nos secundários e antrais não foram observadas diferenças ($p>0,05$) entre os grupos (TOPC 4h: 0,90 (0,67; 1,39); TOPC 4h+VEGF+FGF: 0,73 (0,37; 1,79); TOPC 4h+hMG: 0,46 (0,29; 1,03); TOPC 4h+VEGF+FGF+hMG: 0,74 (0,35; 1,07). Na densidade dos folículos primários houve apenas uma diminuição ($p=0,016$) entre o número de folículos/mm² nos tecidos sem tratamento (TOPC 4h: 0,701 (0,31; 0,96)) e os tecidos cultivados em meio com hMG (TOPC+hMG: 0,25 (0,11; 0,33)). De resto, não foram encontradas diferenças entre as condições (TOPC 4h+VEGF+FGF: 0,49 (0,17; 1,46); TOPC 4h+VEGF+FGF+hMG: 0,35 (0,24; 0,40).

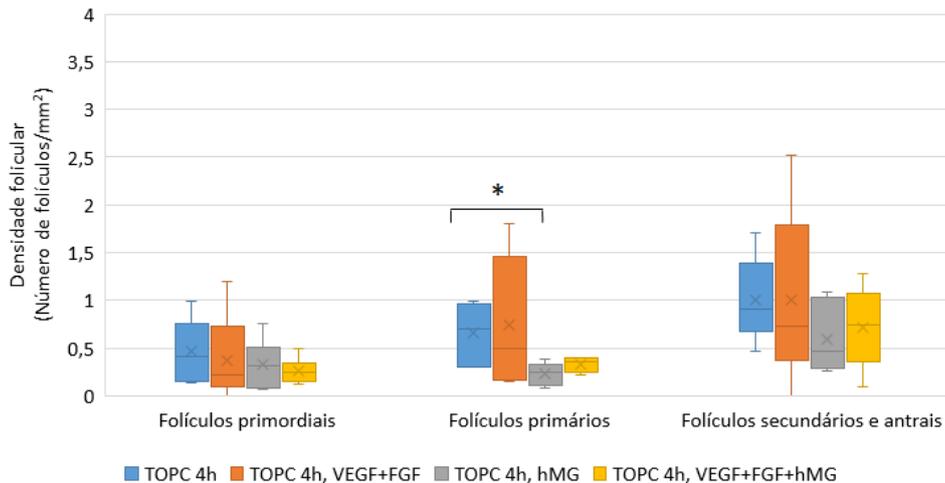


Figura 31. Representação da densidade folicular, expressa em número de folículos por mm^2 , nos tecidos ováricos criopreservados após 4 horas de cultura (TOPC 4h), nos tecidos ováricos criopreservados após cultura tratado com VEGF e FGF (TOPC 4h+VEGF+FGF), nos tecidos após cultura com apenas hMG (TOPC 4h+hMG) e nos tecidos cultivados com todos os fatores (TOPC 4h+VEGF+FGF+hMG). A linha horizontal ao centro representa a mediana, a cruz (X) indica a média, a caixa corresponde ao intervalo interquartil (1º Quartil – 3º Quartil) e as linhas verticais indicam o máximo e o mínimo da distribuição. (* $p < 0,05$).

Como visto pela análise do impacto da cultura, observou-se uma tendência para a diminuição da densidade dos folículos primordiais entre os TOPC 0h e os TOPC 4h. De facto, comparando este parâmetro entre os TOPC 0h com os TOPC 4h com tratamento, verifica-se uma diminuição dos folículos desta classe entre TOPC 0h (0,909 (0,635; 1,78) e TOPC 4h com hMG ($p = 0,016$) e também entre TOPC 0h com TOPC 4h+VEGF+FGF+hMG ($p = 0,006$).

É ainda importante avaliar a proporção folicular nestas condições. A figura 32 aponta que a proporção dos folículos primordiais foi semelhante ($p > 0,05$) em todos os grupos (TOPC 4h: 29,0% (6,32; 30,1); TOPC 4h+VEGF+FGF: 10,0% (4,51; 18,9); TOPC 4h+hMG: 28,5% (11,9; 31,8); TOPC 4h+VEGF+FGF+hMG: 19,7% (11,2; 25,0), tal como a proporção dos primários (TOPC 4h: 32,1% (25,2; 34,0); TOPC 4h+VEGF+FGF: 34,3% (21,3; 73,5); TOPC 4h+hMG: 21,0% (9,06; 32,2); TOPC 4h+VEGF+FGF+hMG: 25,6% (20,3; 37,1) e dos secundários e antrais (TOPC 4h: 46,0% (39,0; 60,3); TOPC 4h+VEGF+FGF: 45,7% (22,0; 64,8); TOPC 4h+hMG: 58,3% (38,4; 63,9); TOPC 4h+VEGF+FGF+hMG: 54,9% (39,7; 66,5)).

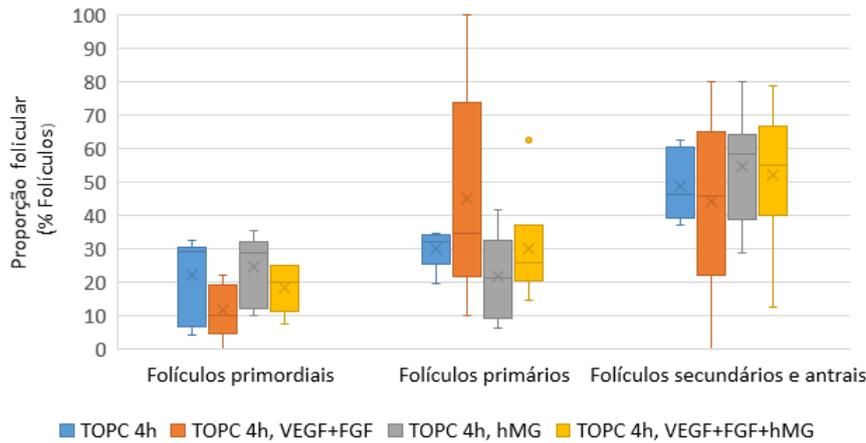


Figura 32. Proporção folicular, dada pela percentagem de folículos de cada classe, nos tecidos ováricos criopreservados após 4 horas de cultura (TOPC 4h), nos tecidos ováricos criopreservados após cultura tratado com VEGF e FGF (TOPC 4h+VEGF+FGF), nos tecidos após cultura com apenas hMG (TOPC 4h+hMG) e nos tecidos cultivados com todos os fatores (TOPC 4h+VEGF+FGF+hMG). A linha horizontal ao centro representa a mediana, a cruz (X) indica a média, a caixa corresponde ao intervalo interquartil (1º Quartil – 3º Quartil) e as linhas verticais indicam o máximo e o mínimo da distribuição. (* $p < 0,05$).

Na análise do efeito da cultura verificou-se uma diminuição da percentagem de folículos primordiais de TOPC 0h para TOPC 4h. De forma concordante também se obteve uma diminuição da percentagem de primordiais ($p < 0,05$) entre o TOPC 0h e todos as condições com tratamento. No entanto, o aumento da classe dos folículos secundários e antrais que se verificava entre TOPC 0h e TOPC 4h, não se verifica com os grupos tratados.

4.4.2 Ki-67 e proliferação celular

Relativamente à percentagem de folículos primordiais marcados, atendendo à figura 33, verifica-se que não há diferenças ($p > 0,05$) entre os tecidos em estudo (TOPC 4h: 0,00% (0,00;80); TOPC 4h+VEGF+FGF: 0,00%; TOPC 4h+hMG: 0,00% (0,00;75); TOPC 4h+VEGF+FGF+hMG: 25,0% (0,00;75,0). Os folículos primários apresentam um aumento ($p = 0,036$) da percentagem de estruturas marcadas entre o grupo TOPC 4h+VEGF+FGF (0,00% (0,00; 9,38)) e TOPC 4h+VEGF+FGF+hMG (85,4% (18,8;100)). A comparação entre os restantes grupos não evidenciou nenhuma diferença significativa ($p > 0,05$) (TOPC 4h: 0,00% (0,00;100); TOPC 4h+hMG: 25% (5; 79,2)).

No caso da percentagem de folículos secundários e antrais marcados com Ki-67, evidenciou-se ainda na representação da figura 33, um aumento ($p < 0,05$) entre TOPC 4h de (0,00% (0,00; 95,8)) e TOPC 4h+hMG: 100% (100;100), bem como entre TOPC 4h e TOPC 4h+VEGF+FGF+hMG: (100% (100;100)). A porção deste tipo de folículos marcados aumentou também de 31,3% (0,00; 31,3) em TOPC 4h+VEGF+FGF para 100% (100;100) em TOPC 4h+hMG e TOPC 4h+VEGF+FGF+hMG.

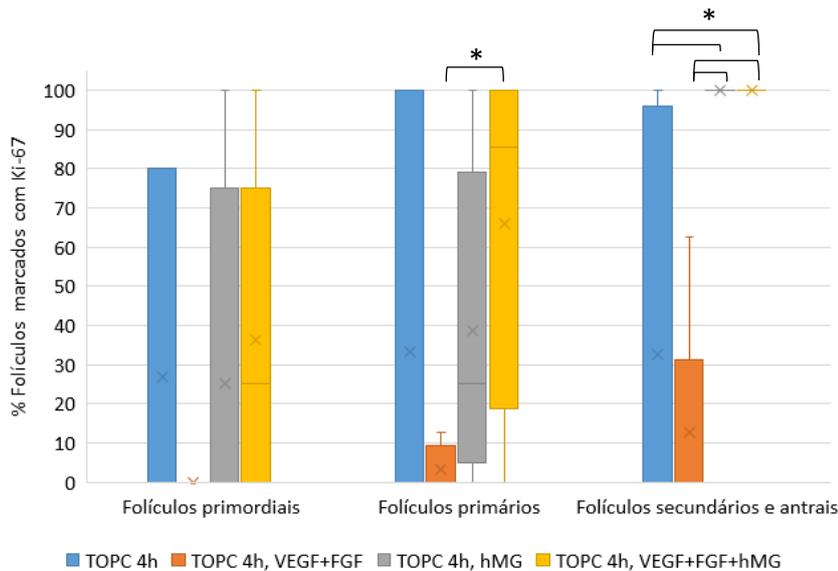


Figura 33. Representação da percentagem de marcação de cada classe folicular com Ki-67, nos tecidos criopreservados após 4 horas de cultura (TOPC 4h), nos tecidos ováricos criopreservados após cultura tratado com VEGF e FGF (TOPC 4h+VEGF+FGF), nos tecidos após cultura com apenas hMG (TOPC 4h+hMG) e nos tecidos cultivados com todos os fatores (TOPC 4h+VEGF+FGF+hMG). A linha horizontal ao centro representa a mediana, a cruz (X) indica a média, a caixa corresponde ao intervalo interquartil (1º Quartil – 3º Quartil) e as linhas verticais indicam o máximo e o mínimo da distribuição. (* $p < 0,05$).

A figura 33 apresenta a percentagem de área de estroma marcado com Ki-67, através do qual é possível ver que houve um aumento ($p=0,025$) de marcação dos tecidos criopreservados às 4h (TOPC 4h: 0,138% (0,004; 0,520)) para os tecidos tratados com todos os fatores (TOPC 4h+VEGF+FGF+hMG: (1,14% (0,466; 2,92)). Houve ainda um aumento ($p=0,028$) de 0,0110% (0,0015; 0,393) de área marcada dos tecidos cultivados com VEGF e FGF para 1,14% (0,466; 2,9267) de marcação nos tecidos com todos os fatores (TOPC 4h+VEGF+FGF+hMG).

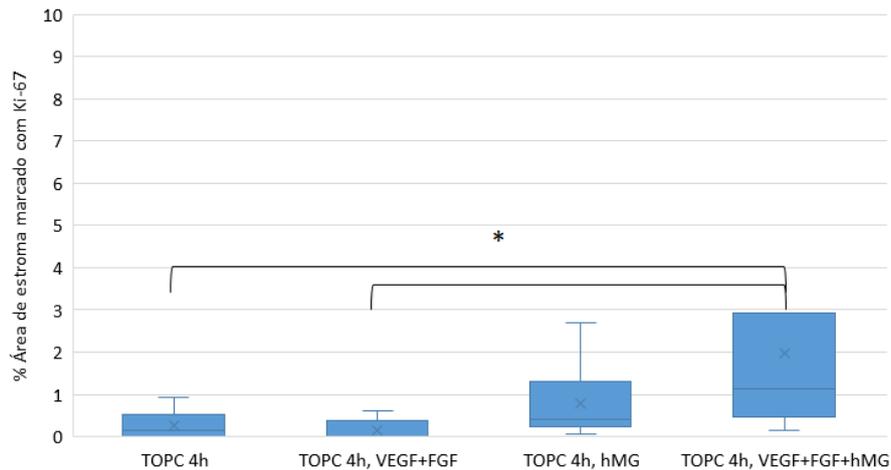


Figura 34. Percentagem da média de área de estroma marcado com Ki-67, nos tecidos ováricos criopreservados após 4 horas de cultura (TOPC 4h), nos tecidos ováricos criopreservados após cultura tratado com VEGF e FGF (TOPC 4h+VEGF+FGF), nos tecidos após cultura com apenas hMG (TOPC 4h+hMG) e nos tecidos cultivados com todos os fatores (TOPC 4h+VEGF+FGF+hMG). A linha horizontal ao centro representa a mediana, a cruz (X) indica a média, a caixa corresponde ao intervalo interquartil (1º Quartil – 3º Quartil) e as linhas verticais indicam o máximo e o mínimo da distribuição. (* $p < 0,05$).

Na figura 25(B) evidenciou-se uma diminuição ($p < 0,05$) da marcação do estroma com Ki-67 após a cultura. Esta diferença manteve-se entre o TOPC 0h (TOPC 0h: 3,86% (1,77; 5,95) e os tecidos ováricos criopreservados cultivados em meio apenas com os fatores de crescimento (TOPC 4h+VEGF+FGF) e os tecidos tratados com a hMG (TOPC 4h+hMG). O grupo que estatisticamente demonstrou uma percentagem de área de estroma marcada mais próxima ($p = 0,055$) do TOPC 0h foi aquele cuja cultura incluiu todos os fatores (TOPC 4h+VEGF+FGF+hMG).

4.4.3 AC-3 e apoptose

Tal como nas análises anteriores deste parâmetro, também nestas condições de cultura a expressão de AC-3 detetada nos folículos e no estroma era muito fraca.

Relativamente à marcação dos folículos, como visto no efeito da cultura (figura 35), foi apenas encontrado um folículo primordial marcado em TOPC 4h (0,23%), enquanto nas restantes condições de tratamento não se contabilizaram nenhuns folículos marcados desta classe.

A marcação nos folículos primários foi residual e não foram demonstradas diferenças significativas entre as condições ($p>0,05$). Em TOPC 4h estes folículos apresentaram uma mediana de marcação de 1,68% (0,126; 2,20), em TOPC 4h tratados com VEGF e FGF de 0,817% ($n=2$) e nos tecidos cultivados com hMG 0,684% ($n=1$). Na condição em que foram administrados todos os fatores (TOPC 4h+VEGF+FGF+hMG) não foram observados nenhuns folículos primários marcados.

Quanto aos folículos secundários e antrais, também a expressão de AC-3 nos folículos se manteve similar entre os grupos em estudo ($p>0,05$): em TOPC 4h apresentavam 0,78% (0,59; 2,43) de área marcada, em TOPC 4h+VEGF+FGF 0,46% (0,43; 1,74), em TOPC 4h+hMG 0,25% (0,13; 0,43) e nos TOPC 4h+VEGF+FGF+hMG 1,41% (0,85; 1,65).

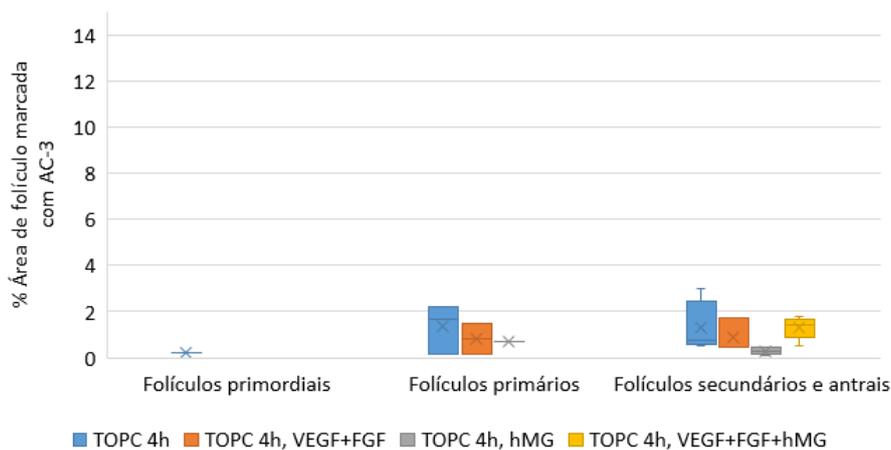


Figura 35. Representação da percentagem de área de folículo marcado com AC-3 nos tecidos ováricos criopreservados após 4 horas de cultura (TOPC 4h), nos tecidos ováricos criopreservados após cultura tratado com VEGF e FGF (TOPC 4h+VEGF+FGF), nos tecidos após cultura com apenas hMG (TOPC 4h+hMG) e nos tecidos cultivados com todos os fatores (TOPC 4h+VEGF+FGF+hMG). A linha horizontal ao centro representa a mediana, a cruz (X) indica a média, a caixa corresponde ao intervalo interquartil (1º Quartil – 3º Quartil) e as linhas verticais indicam o máximo e o mínimo da distribuição.

Apesar de residual, a marcação do estroma aumentou ($p=0,045$) de 0,32% (0,22; 0,60) nos tecidos tratados apenas com os fatores VEGF e FGF (TOPC 4h+VEGF+FGF) para 0,66% (0,55; 0,76) nos TOPC 4h+VEGF+FGF+hMG. A expressão de AC-3 no estroma apresentou uma tendência para aumentar ($p=0,055$) entre os TOPC 4h+hMG=0,13%(0,072; 0,49) e os TOPC 4h+VEGF+FGF+hMG (figura 36).

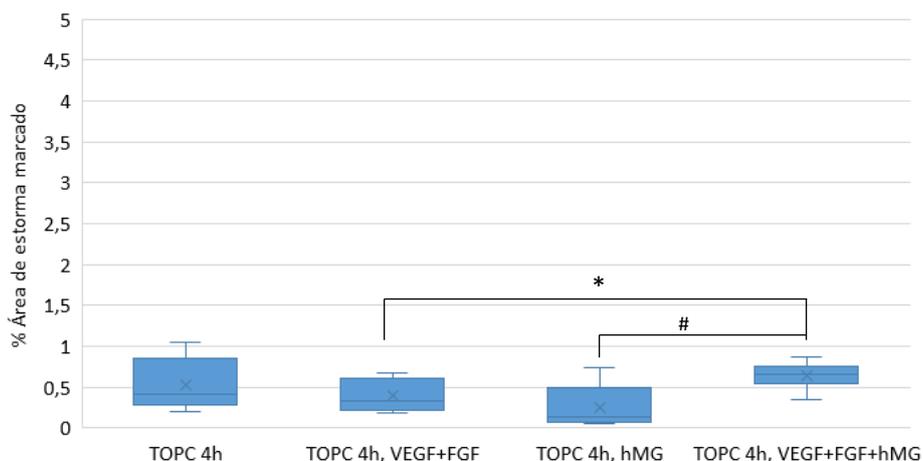


Figura 36. Percentagem de área de estroma marcado com AC-3 nos tecidos ováricos criopreservados após 4 horas de cultura (TOPC 4h), nos tecidos ováricos criopreservados após cultura tratado com VEGF e FGF (TOPC 4h+VEGF+FGF), nos tecidos após cultura com apenas hMG (TOPC 4h+hMG) e nos tecidos cultivados com todos os fatores (TOPC 4h+VEGF+FGF+hMG). A linha horizontal ao centro representa a mediana, a cruz (X) indica a média, a caixa corresponde ao intervalo interquartil (1º Quartil – 3º Quartil) e as linhas verticais indicam o máximo e o mínimo da distribuição. (* $p < 0,05$); # $p = 0,055$).

Na análise estabelecida na figura 27, verificou-se uma diminuição da expressão de AC-3 entre o tecido após criopreservação analisado imediatamente após a descongelação (TOPC 0h: 3,16% (2,09; 4,79)) para o tecido criopreservado após a cultura (TOPC 4h: 0,417% (0,275; 0,860)). Esta diminuição foi mantida entre o TOPC 0h e os tecidos de todas as condições de tratamento, cujo valor de $p < 0,05$.

4.4.4 Fator VIII, densidade e área vascular

Através da marcação com o fator VIII foi possível investigar tanto a densidade vascular, dada pelo número de vasos por mm^2 , como uma noção da área que estes vasos ocupam.

A figura 28(A) demonstrou que antes e após cultura houve um aumento na densidade vascular nos tecidos criopreservados. No entanto, a figura 37 indica que não houve diferenças ($p > 0,05$) na densidade vascular entre as diferentes condições: TOPC 4h=27,7±1,87; TOPC 4h+VEGF+FGF: 25,4±2,57; TOPC 4h+hMG: 24,1±2,21; TOPC 4h+VEGF+FGF+hMG: 28,4±2,77.

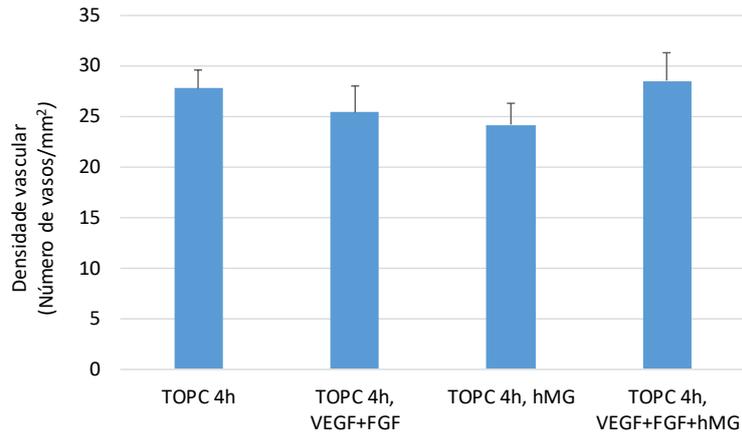


Figura 37. Densidade vascular (número de vasos/mm²) nos tecidos ováricos criopreservados após 4 horas de cultura (TOPC 4h), nos tecidos ováricos criopreservados após cultura tratado com VEGF e FGF (TOPC 4h+VEGF+FGF), nos tecidos após cultura com apenas hMG (TOPC 4h+hMG) e nos tecidos cultivados com todos os fatores (TOPC 4h+VEGF+FGF+hMG). O número de vasos/mm² é apresentado como média ± desvio padrão enquanto a percentagem de área marcada é dada pela mediana (1^o Quartil; 3^o Quartil). A linha horizontal ao centro representa a mediana, a cruz (X) indica a média, a caixa corresponde ao intervalo interquartil (1^o Quartil – 3^o Quartil) e as linhas verticais indicam o máximo e o mínimo da distribuição.

Quanto à área de marcação com fator VIII, já a figura 28(B) demonstrava que não havia diferenças entre o TOPC 0h e os tecidos após cultura (TOPC 4h). Tal como observado na figura 38, a área marcada foi similar ($p > 0,05$) entre as condições em estudo: TOPC 4h: 2,98% (2,55; 3,96); TOPC 4h+VEGF+FGF 2,77% (2,33; 3,06); TOPC 4h+hMG: 3,60% (2,54; 4,98); TOPC 4h+VEGF+FGF+hMG 3,86% (2,64; 5,23).

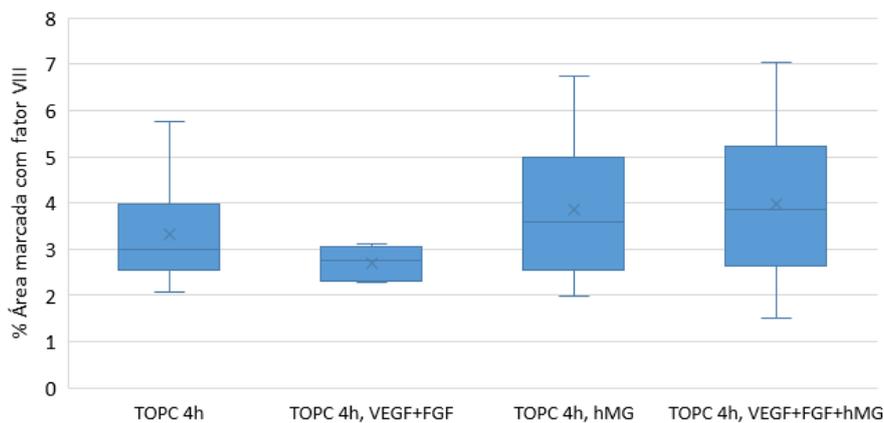


Figura 38. Percentagem de área vascular nos tecidos ováricos criopreservados após 4 horas de cultura (TOPC 4h), nos tecidos ováricos criopreservados após cultura tratado com VEGF e FGF (TOPC 4h+VEGF+FGF), nos tecidos após cultura com apenas hMG (TOPC 4h+hMG) e nos tecidos cultivados com todos os fatores (TOPC 4h+VEGF+FGF+hMG). A linha horizontal ao centro representa a mediana, a cruz (X) indica a média, a caixa corresponde ao intervalo interquartil (1^o Quartil – 3^o Quartil) e as linhas verticais indicam o máximo e o mínimo da distribuição.

Tabela 4. Resumo dos resultados da contagem folicular no efeito do tratamento na qualidade do tecido. As setas ↑ e ↓ indicam respetivamente um aumento ou diminuição significativos.

			Folículos		
			Primordiais	Primários	Secundários e antrais
<i>Densidade folicular</i>	TOPC 4h	TOPC4h+VEGF+FGF	-	-	-
		TOPC4h+hMG	-	↓	-
		TOPC4h+VEGF+FGF+hMG	-	-	-
	TOPC4h+VEGF+FGF	TOPC4h+hMG	-	-	-
		TOPC4h+VEGF+FGF+hMG	-	-	-
	TOPC4h+hMG	TOPC4h+VEGF+FGF+hMG	-	-	-
<i>Proporção folicular</i>	TOPC 4h	TOPC4h+VEGF+FGF	-	-	-
		TOPC4h+hMG	-	-	-
		TOPC4h+VEGF+FGF+hMG	-	-	-
	TOPC4h+VEGF+FGF	TOPC4h+hMG	-	-	-
		TOPC4h+VEGF+FGF+hMG	-	-	-
	TOPC4h+hMG	TOPC4h+VEGF+FGF+hMG	-	-	-

Tabela 5. Resumo dos resultados da expressão imunohistoquímica no efeito do tratamento na qualidade do tecido. As setas ↑ e ↓ indicam respetivamente um aumento ou diminuição significativos. No marcador Ki-67 está representada a percentagem de folículos marcados enquanto na AC-3 está a percentagem de área de folículo marcada.

			Folículos			Estroma
			Primordiais	Primários	Secundários e antrais	
Ki-67	TOPC 4h	TOPC4h+VEGF+FGF	-	-	-	-
		TOPC4h+hMG	-	-	↑	-
		TOPC4h+VEGF+FGF+hMG	-	-	↑	↑
	TOPC4h+VEGF+FGF	TOPC4h+hMG	-	-	↑	-
		TOPC4h+VEGF+FGF+hMG	-	↑	↑	↑
	TOPC4h+hMG	TOPC4h+VEGF+FGF+hMG	-	-	-	-
AC-3	TOPC 4h	TOPC4h+VEGF+FGF	-	-	-	-
		TOPC4h+hMG	-	-	-	-
		TOPC4h+VEGF+FGF+hMG	-	-	-	-
	TOPC4h+VEGF+FGF	TOPC4h+hMG	-	-	-	-
		TOPC4h+VEGF+FGF+hMG	-	-	-	↑
	TOPC4h+hMG	TOPC4h+VEGF+FGF+hMG	-	-	-	-

Tabela 6. Resumo dos resultados da expressão imunohistoquímica do fator VIII no efeito do tratamento na qualidade do tecido. As setas ↑ e ↓ indicam respetivamente um aumento ou diminuição significativos.

			Densidade vascular	Área dos vasos
Fator VIII	TOPC 4h	TOPC4h+VEGF+FGF	-	-
		TOPC4h+hMG	-	-
		TOPC4h+VEGF+FGF+hMG	-	-
	TOPC4h+ VEGF+FGF	TOPC4h+hMG	-	-
		TOPC4h+VEGF+FGF+hMG	-	-
	TOPC4h+hMG	TOPC4h+VEGF+FGF+hMG	-	-

4.4.5 Perfil de expressão génica

Segundo o gráfico de dispersão da figura 39, que compara a expressão génica entre os tecidos criopreservados após a cultura sem nenhum tratamento (TOPC 4h) com o perfil das condições que cultivadas com os fatores em estudo: TOPC 4h+VEGF+FGF; TOPC 4h+hMG; TOPC4h+VEGF+FGF+hMG, é possível verificar que a condição TOPC 4h+VEGF+FGF foi a que teve uma dispersão de pontos mais próxima da diagonal, correspondendo a um score de 0,81. Os tecidos com expressão génica mais afastada do painel de expressão do TOPC 4h foram o TOPC4h+VEGF+FGF+hMG com um score de 0,57 e o TOPC 4h+hMG, com um score de 0,46. Seria de esperar que nestes grupos os *outliers*, genes mais afastados da linha de referência, fossem bons alvos de seleção para posterior análise, no entanto apesar de apresentarem expressão aumentada ou diminuída pelo *fold*, não demonstraram relevância estatística.

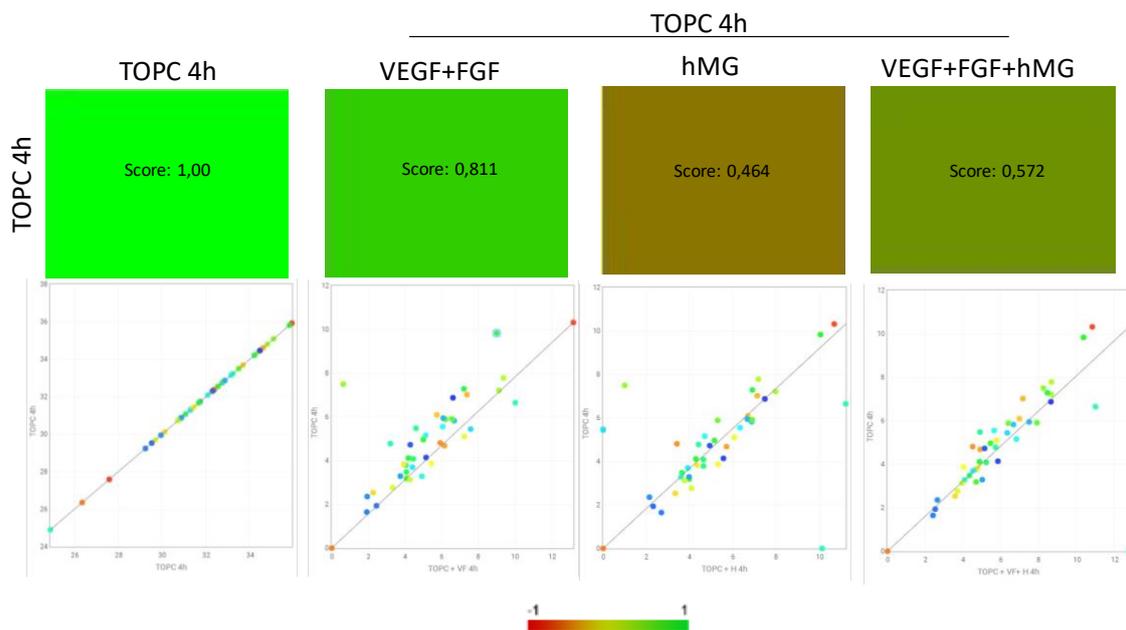


Figura 39. Gráfico de dispersão tendo como referência o TOPC 4h (ordenadas) com os vários grupos com tratamento nas abcissas (TOPC 4h+VEGF+FGF; TOPC 4h+hMG; TOPC4h+VEGF+FGF+hMG) e respetivos score de dispersão.

Tendo em conta que o efeito da cultura, dado pela comparação entre TOPC 0h e TOPC 4h, denotou certos genes com a expressão significativamente aumentada, procurou-se investigar qual o impacto na expressão génica entre o TOPC 0h e a cultura com os fatores suplementados.

Através da figura 40, verifica-se que nos tecidos em cultura com VEGF e bFGF houve um aumento de expressão da Col18a1 (Colagénio tipo XVIII Alfa 1) e uma diminuição do Figf (fator de crescimento indutor de c-fos ou VEGF-D), ($p=0,026$ para ambos).

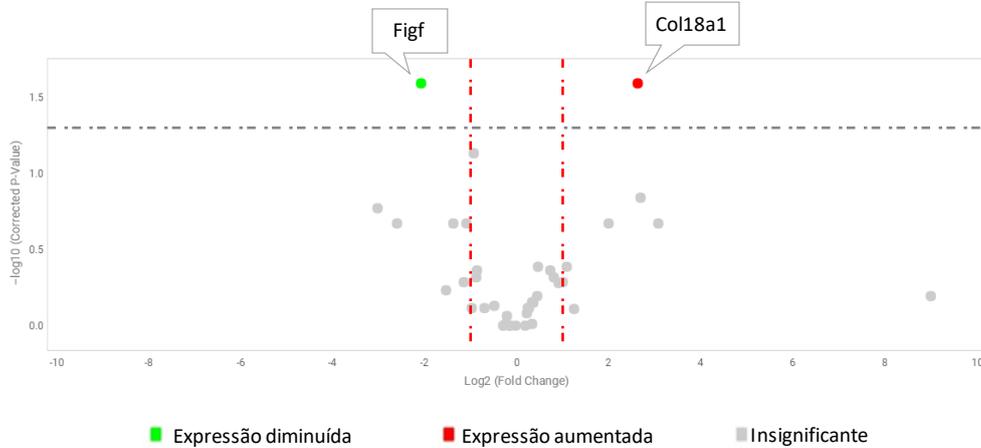


Figura 40. Gráfico Volcano de $\log_2(\text{fold-change})$ versus $-\log_{10}(\text{valor } p \text{ corrigido})$, comparando a expressão génica em TOPC 0h relativamente à expressão dos TOPC 4h+VEGF+bFGF. A linha a tracejado vermelha representa o fold change limite selecionado ($\text{fold}>2$ e $\text{fold}<-2$) enquanto a linha tracejada a cinzento delimita a significância estatística, neste caso em $p=0,05$.

Tabela 7. Resumo dos genes e da sua expressão e valores de p , dados pelo gráfico Volcano da figura 40.

Gene	Expressão	P-value
Figf	Diminuída	0,026
HIF-1 α	Diminuída	0,074
Fgf1	Diminuída	0,169
Anpep	Diminuída	0,213
Angpt1	Diminuída	0,213
Angpt2	Diminuída	0,213

Gene	Expressão	P-value
Col18a1	Aumentada	0,026
EGF	Aumentada	0,14
Col4a3	Aumentada	0,21
Fgfr3	Aumentada	0,21

A figura 41 dá a indicação de que a expressão do EGF se encontra aumentada em TOPC 4+hMG relativamente ao TOPC 0h que será resultado do efeito da cultura e o Fgfr3 (Recetor 3 do fator de crescimento fibroblástico) também aumenta de forma significativa ($p=0,032$ e $p=0,024$, respetivamente).

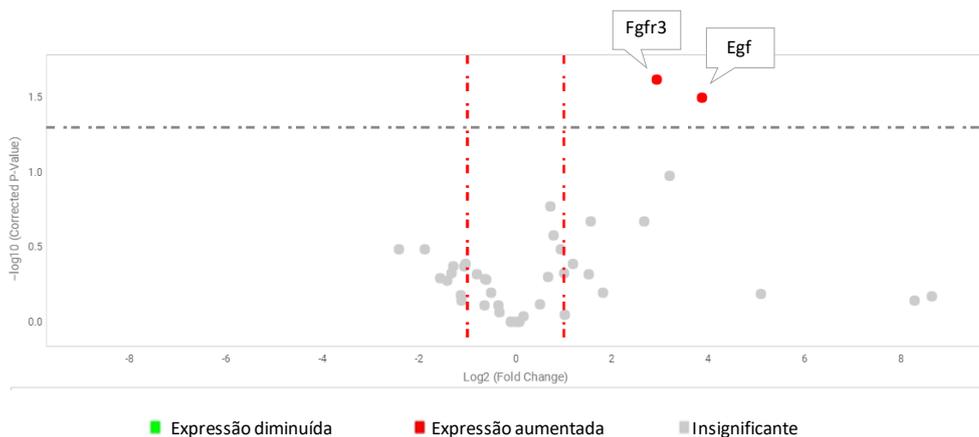


Figura 41. Gráfico Volcano de $\log_2(\text{fold-change})$ versus $-\log_{10}(\text{valor } p \text{ corrigido})$ comparando a expressão génica em TOPC 0h relativamente à expressão dos TOPC 4h+hMG. A linha a tracejado vermelha representa o fold change limite selecionado ($\text{fold} > 2$ e $\text{fold} < -2$) enquanto a linha tracejada a cinzento delimita a significância estatística, neste caso em $p=0,05$.

Tabela 8. Resumo dos genes e da sua expressão e valores de p, dados pelo gráfico Volcano da figura 41.

Gene	Expressão	P-value
Fgf1	Diminuída	0,327
Fgf	Diminuída	0,327

Gene	Expressão	P-value
Fgfr3	Aumentada	0,024
EGF	Aumentada	0,032
Erbb2	Aumentada	0,106
Col18a1	Aumentada	0,213
Col4a3	Aumentada	0,213

Segundo a figura 42, apenas o EGF se encontra aumentado em TOPC 4+VEGF+bFGF+hMG ($p=0,03$) relativamente ao TOPC 0h que será resultado novamente do efeito da cultura. Genes como por exemplo o Fgfr3 que mostrou aumento significativo da expressão em TOPC 4h+hMG, nestes tecidos, apesar de terem um *fold* superior a 2, não são significantes ($p > 0,05$).

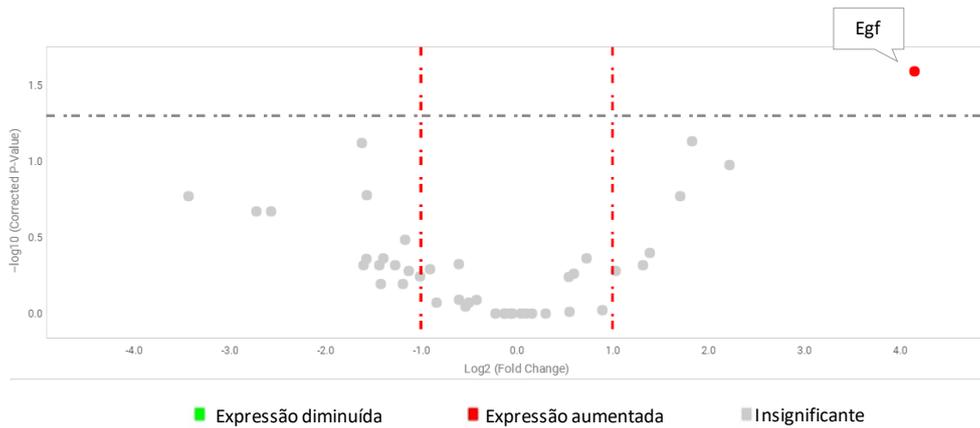


Figura 42. Gráfico Volcano de $\log_2(\text{fold-change})$ versus $-\log_{10}(\text{valor } p \text{ corrigido})$, comparando a expressão génica em TOPC 0h relativamente à expressão dos TOPC 4h+VEGF+bFGF+hMG. A linha a tracejada vermelha representa o fold change limite selecionado ($\text{fold} > 2$ e $\text{fold} < -2$) enquanto a linha tracejada a cinzento delimita a significância estatística, neste caso em $p=0,05$.

Tabela 9. Resumo dos genes e da sua expressão e valores de p , dados pelo gráfico Volcano da figura 42.

Gene	Expressão	Valor p
HIF-1 α	Diminuída	0,08
Timp1	Diminuída	0,17
Figf	Diminuída	0,17
Fgf1	Diminuída	0,21
VEGfC	Diminuída	0,21

Gene	Expressão	Valor p
EGF	Aumentada	0,03
Fgfr3	Aumentada	0,07
Col4a3	Aumentada	0,11
ErbB2	Aumentada	0,17

Pela análise acima realizada, observa-se que a expressão do Col4a3 e do EGF que se encontrou aumentada em TOPC 4h sem tratamento foi também observada em todos os tecidos de forma significativa ou não. No entanto o mesmo não aconteceu com os genes Epas1 e Tie1, que foram detetados apenas em TOPC 4h. Genes como Col18a1, Fgfr3, o Erbb2 e como os Figf e Fgf1 encontraram-se aumentados ou diminuídos respetivamente em todos os tecidos em estudo após a cultura, o que leva a inferir que essas alterações são resultado da cultura. Entre as condições TOPC 4h+VEGF+FGF, TOPC 4h+hMG e TOPC+VEGF+FGF+hMG não foram encontradas diferenças na expressão dos genes, a não ser o HIF-1 α que se apresentou diminuído ($\text{fold} < -2$) tanto em TOPC 4h+VEGF+FGF como em TOPC+VEGF+FGF+hMG.

CAPÍTULO 5: DISCUSSÃO

Atualmente, a indução e potenciação da angiogénese no enxerto do tecido ovárico antes do transplante tem sido um grande objeto de estudo no campo da preservação da fertilidade feminina, procurando reduzir o dano induzido pela isquemia inicial resultante do tempo necessário para o estabelecimento da rede vascular entre o tecido e o local de transplantação.

O presente trabalho procurou fazer um pré-tratamento curto *in vitro* do tecido ovárico com fatores de crescimento e hormona hMG exógenos, de forma a estimular os passos mais iniciais da angiogénese, para que nos primeiros momentos após o transplante o tecido tivesse já enriquecido em fatores angiogénicos e recebido um estímulo inicial. É de interesse estimular a angiogénese mantendo a estrutura normal do tecido, sem provocar morte deste nem provocar a maturação e desenvolvimento dos folículos. Para isso, foram observados diversos parâmetros do tecido antes do transplante. O estudo fornece evidências relativamente à densidade e proporção folicular, bem como relativamente ao estado proliferativo e apoptótico, densidade vascular e marcadores moleculares no tecido após cultura e antes do transplante.

O atual consenso é de que no transplante de tecido ovárico, a perda folicular e dano no estroma, verificados em diversos estudos, não são resultantes do processo de criopreservação mas principalmente pela isquemia inicial que ocorre no tecido (Dath *et al.*, 2010; David *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2016). Nisolle *et al.*, 2000 demonstra que efetivamente a criopreservação em si não é responsável pela diminuição da densidade folicular, sendo esta resultado do transplante. Diversos estudos indicam que o dano causado pela isquemia consequente do transplante induz a perda de 60 a 95% da reserva total folicular (Demeestere *et al.*, 2009). Curiosamente, os folículos primordiais são os que melhor resistem a este processo visto que estão num estado metabolicamente quiescente. No entanto, esta depleção folicular é problemática na medida em que pode afetar a dinâmica do crescimento folicular bem como o restabelecimento do ciclo hormonal e recuperação da fertilidade.

Em primeiro lugar, foi avaliado o impacto da criopreservação no tecido. De forma concordante com Fabbri *et al.* (Fabbri *et al.*, 2003) no presente estudo o tecido após criopreservação lenta apresentou uma morfologia muito semelhante à do tecido fresco, não tendo sido observados sinais de edema intersticial ou necrose e onde os folículos

mostraram uma morfologia normal. A densidade e a proporção folicular mantiveram-se semelhantes antes e depois da criopreservação, tal como o estado apoptótico dos folículos e do estroma. Contudo, apesar de não se encontrarem diferenças com Ki-67, comparando o tecido criopreservado e o tecido não criopreservado, é importante referir que a maior parte dos folículos contabilizados possuíam pelo menos uma célula da granulosa marcada e que o estroma apresentou uma elevada marcação em ambas as condições. Por sua vez, em comparação com o presente trabalho, Fabbri *et al.* (Fabbri *et al.*, 2003) encontraram menos folículos marcados tanto nos tecidos a fresco e nos criopreservados. Ao contrário do que foi verificado no nosso estudo *in vitro*, Wang *et al.* (Wang *et al.*, 2013) observaram marcação principalmente nas células da granulosa dos folículos e poucas células do estroma no tecido fresco antes do transplante. No entanto, verificaram que após transplantação houve um aumento de células marcadas no estroma e com marcação mais forte do que nas células da granulosa. É de salientar que estes estudos foram realizados em enxertos de ovário humano, e no presente trabalho tratou-se tecido de rato, que possui um ciclo bastante mais rápido. Por isso, sendo estes os valores de proliferação encontrados no ovário ao instante inicial (TOF 0h), foram considerados como sendo basais.

Através da marcação com AC-3, verificou-se que o grau de apoptose foi residual em todos os tecidos em estudo. De facto, mesmo nos folículos que se encontravam positivos, a sua percentagem de marcação foi residual (máximo de marcação de 8,26%). De forma concordante, a expressão de AC-3 no estroma foi muito baixa. Estes resultados permitem-nos inferir que a apoptose nos tecidos foi residual, e mais uma vez indicar que o processo inicial de criopreservação não parece ser prejudicial, por si só.

Pela avaliação da morfologia do tecido foram observadas algumas alterações no tecido, nomeadamente edema e alguma perda de arquitetura dos folículos, provocadas pelas 4 horas de cultura. No entanto, apenas através da histologia não é possível verificar a funcionalidade dos folículos, que pode ter capacidade de regeneração. Em Wang *et al.* (Wang *et al.*, 2012) verificou-se recuperação do ciclo do estro após transplante de tecido cultivado onde também se observaram folículos com alguma perda arquitetónica.

Por seu turno, diversos estudos já demonstraram que as 48 horas são um período crítico para o tecido após o transplante, uma vez que é durante este período que o tecido se encontra mais sujeito à isquemia pois a angiogénese ainda se encontra em fase de iniciação. Este intervalo de tempo provocou prevalência de edema no estoma, tornando a sua estrutura solta (Wu *et al.*, 2010), com apoptose dos folículos primordiais e redução da sua *pool* (Wu *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2008). No entanto, ao final de uma semana de transplantação o edema já não era detetado (Wu *et al.*, 2010) e os folículos apoptóticos mostravam-se recuperados (Wu *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2008). Apesar de estes dados comprovarem a capacidade de recuperação do tecido após o transplante, os tecidos do presente estudo em cultura durante 48 horas apresentaram um nível de degradação consideravelmente grande, assim este modelo de cultura neste espaço temporal não parece ser o mais indicado para uma eventual aplicação clínica.

A cultura de 4 horas nos tecidos criopreservados não teve impacto na densidade folicular. No entanto, relativamente à proporção, houve uma diminuição na quantidade de folículos primordiais e um aumento dos folículos secundários e antrais, indicando que neste espaço temporal pode ter ocorrido alguma ativação de desenvolvimento folicular. Apesar disso, a percentagem de folículos primordiais marcados com Ki-67 manteve-se contante neste período.

Com a cultura houve também uma diminuição da proliferação no estroma.

As células do estroma têm uma importância significativa na manutenção da sobrevivência do tecido, não só dando estrutura e suporte aos folículos permitindo o seu crescimento e desenvolvimento como também facultam vasos sanguíneos aos folículos primordiais e primários que não possuem rede independente e produzem ainda fatores parácrinos para a sobrevivência e desenvolvimento dos folículos (Dath *et al.*, 2010; Nilsson *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2013). A diminuição da proliferação do estroma relativamente ao valor basal pode indicar a perda de alguma destas características e estar a afetar a sobrevivência e função do tecido.

Quanto à densidade vascular, com a cultura verifica-se um aumento desta, embora não haja diferenças na percentagem de área marcada. Adicionalmente, comparando o perfil de expressão de genes, verificou-se o aumento da expressão de alguns genes após

cultura do tecido ovárico, sendo estes o EGF, a Col4a3, o Tie1 e o Epas1. O EGF não só é um fator de sobrevivência folicular como o bFGF (Markström et al., 2002) mas também um fator de crescimento pró-angiogénico que, quando ligado ao seu recetor, induz a proliferação e a migração das células endoteliais (Rundhaug, 2005). O colagénio tipo 4 alfa 3 (col4a3), constituinte de uma rede de colagénio, que faz parte das membranas basais em torno dos vasos sanguíneos onde estão embebidas as células endoteliais. Esta membrana vascular tem de ser degradada e remodelada por forma a permitir a angiogénese (Carmeliet, 2011; Rundhaug, 2005). O Epas1 (HIF-2 α) é um fator de indução de hipoxia que tal como HIF-1 α está envolvido na resposta à hipoxia. Este expressa-se nas células endoteliais e é um dos principais reguladores da expressão do VEGF, regulando também a Ang-1, Ang-2 e Tie-2, tendo sido ainda descrito como promotor da remodelação e maturação vascular (Krock, 2011). O recetor Tie1 está envolvido na sinalização por angiopoietinas-receptores Tie. Este é essencial para o desenvolvimento vascular, atuando como regulador do Tie2, onde se ligam as angiopoietinas. Foi demonstrado o aumento da sua expressão em tecido tumoral e a sua importância na angiogénese do tumor (Porta et al., 2018). Posto isto, os presentes resultados dão a entender que passadas 4 horas de cultura, os tecidos estão a responder à hipoxia.

Um dos principais objetivos do presente estudo foi avaliar o impacto do tratamento *in vitro* do tecido ovário com moléculas exógenas, nomeadamente com os fatores de crescimento VEGF e bFGF e com a hMG. Alguns estudos já descreveram o efeito sinérgico do tratamento do tecido ovárico com VEGF e bFGF na potenciação da angiogénese verificada após transplante (Gao et al., 2015; Kang et al., 2016; Li et al., 2016; Wang et al., 2013). Por outro lado, o papel das gonadotrofinas tem sido também estudado neste âmbito, principalmente a FSH, uma vez que é conhecida a sua relação com a sobrevivência dos folículos, com o aumento da expressão de VEGF e bFGF (Liu et al., 2002; Ma et al., 2017; Wang et al., 2012). Para além disso, a cultura com hMG promoveu uma precoce revascularização e o aumento do número de folículos sobreviventes (Wang et al., 2012). No entanto, ainda nenhum estudo foi feito para avaliar o nível de impacto conjunto que estas três moléculas possam ter no tecido.

No presente trabalho, verificou-se que as 4 horas de cultura não alteraram a densidade dos folículos primordiais. Ao contrário do que seria de esperar os folículos

primários apresentaram-se diminuídos na condição tratada apenas com hMG relativamente à quantidade de primários presentes nos tecidos sem tratamento. Sendo a hMG uma solução de FSH e LH no rácio de 1:1, poder-se-ia pensar que a quantidade de hMG adicionada teria sido elevada demais e ter levado à sobre-estimulação folicular e consequente esgotamento, no entanto, sabe-se que os folículos primários ainda não respondem à FSH. Para além disso, não há diferenças ao nível dos folículos secundários e antrais nem ao nível da proporção folicular, pelo que não será esta a explicação para os resultados obtidos.

No entanto, é possível verificar que o tratamento com hMG (sozinha ou em conjunto com os fatores de crescimento) leva a um aumento de folículos secundários e antrais proliferativos, quer quando comparado com o tecido cultivado sem tratamentos quer comparado com os tecidos tratados apenas com os fatores de crescimento, o que demonstra o papel da hMG na proliferação dos folículos desta classe.

De forma semelhante, a proliferação das células do estroma nos tecidos cultivados com todos os fatores aumentou relativamente ao tecido cultivado sem tratamentos e aos tecidos tratados apenas com os fatores de crescimento. Dada a importância do estroma para a sobrevivência dos folículos, este efeito poderá ser responsável pelo aumento da proliferação de folículos primários verificado entre o grupo tratado apenas com VEGF e bFGF para a condição com as três moléculas. Sendo a combinação com os três fatores a condição que apresenta maior proliferação tanto nos folículos como no estroma, será supostamente nesta que o estroma terá maior competência para suportar a evolução dos folículos e estes, maior capacidade de crescimento e de desenvolvimento. Tal como verificado anteriormente, também estes tecidos demonstraram um estado de apoptose residual.

Ao contrário do que seria esperado, a cultura com os fatores de capacidade pró-angiogénica não provocou diferenças nem na densidade vascular nem na percentagem de área ocupada pelos vasos. Tendo em conta que as 48 horas são o período crítico para o início da angiogénese, a cultura de apenas 4 horas demonstrou não ser tempo suficiente para que se observassem alterações visíveis ao nível das células endoteliais. No entanto, seria necessário avaliar este marcador após transplante pois molecularmente pode ter havido algum estímulo que influencie a densidade vascular após transplante.

Através da análise do impacto da cultura nos perfis de expressão angiogénica dos tecidos, observou-se que a expressão do Col4a3 e do EGF se encontrou aumentada na cultura sem tratamento, tal como em todos os tecidos das condições tratadas, de forma significativa ou não. No entanto, o mesmo não aconteceu com os genes *Epas1* e *Tie1*. Estes resultados indicam que, possivelmente, os fatores suplementados através da cultura possam ter tido um impacto na expressão destes dois genes. O aumento do Col4a3 e do EGF aponta um possível início angiogénico. Genes como os *Col18a1*, *Fgfr3*, o *ErbB2* e como os *Figf* e *Fgf1* encontraram-se aumentados ou diminuídos respetivamente em todos os tecidos em estudo, o que leva a inferir que será resultado da cultura. Entre as condições de cultura com os diferentes fatores, sozinhos ou combinados, não foram encontradas diferenças na expressão dos genes, a não ser o *Hif1- α* que se apresentou diminuído ($\text{fold} < -2$) nas culturas onde estavam presentes os fatores VEGF e FGF. Apesar do aumento ou diminuição destes genes não ser significativa em certos tecidos, estes podem ter interesse em estudos futuros, devendo ser confirmado aumentando o número de amostras e por RT-PCR.

Yang *et al.* demonstraram o aumento de VEGF em enxertos de rato após dois dias de transplantação (Yang *et al.*, 2008). Van Langendonck *et al.*, no seu estudo de expressão de genes no tecido ovárico, verificou haver um aumento da expressão das *mmp-9*, *mmp-14*, da interleucina-8, TGF-1 7 dias após transplantação em comparação com os tecidos não transplantados (Van Langendonck *et al.*, 2014). No entanto, há falta de estudos que avaliem a expressão dos tecidos antes da transplantação, que permitam a comparação com os resultados obtidos.

Segundo os resultados obtidos, a próxima etapa a realizar seria o transplante do tecido ovárico tratado com as mesmas condições de forma a avaliar não só a funcionalidade e sobrevivência do tecido, determinada pelo restauro da função endócrina e a sua manutenção ao longo do tempo, mas também a capacidade de recuperação do tecido ovárico. Para além disso, seria importante ver qual o impacto da transplantação na densidade folicular, de forma a verificar se a perda folicular pela isquemia seria minimizada pelo tratamento com os fatores e na proliferação do tecido, visto que é observada com frequência uma ativação folicular decorrente da transplantação. Visto que o objetivo é a potenciação da angiogénese, o estudo da

revascularização do tecido e de marcadores moleculares após transplante em diferentes *timepoints*, incluindo o período crítico das 48h é de extrema importância.

Atendendo a que se trata de amostras biológicas com variabilidade entre elas, seria igualmente necessário aumentar o número de amostras para estabelecer conclusões mais sólidas, tanto ao nível do imunohistoquímica como para o *microarray*.

O presente desenho experimental apresenta também algumas limitações. Em primeiro lugar, a cultura em duas dimensões não se demonstrou muito eficaz, havendo a total degradação do tecido às 48h. Os períodos temporais escolhidos para a cultura não foram também os mais apropriados, 4h de cultura foi pouco tempo para se observarem alterações em marcadores do processo angiogénico e as 48h em cultura foi demasiado tempo, claramente inútil do ponto de vista terapêutico.

No processo angiogénico também o local de transplantação tem um papel na estimulação da angiogénese. Por exemplo, o VEGF é importante tanto no enxerto como no recetor, promovendo a proliferação das células endoteliais para criar e readaptar a rede vascular entre o enxerto e o local de transplantação. Por outro lado, isto aumenta a permeabilidade dos capilares no tecido hospedeiro de forma a facilitar a formação de um estroma temporário que proporciona nutrientes necessários antes do estabelecimento do fornecimento sanguíneo, aspeto importante para a sobrevivência do implante (Jain, 2011; Wang *et al.*, 2012). Posto isto, e sendo as 48 horas um período crítico para a estimulação da angiogénese, faria sentido dar um curto estímulo antes do transplante, no entanto ao manter o tecido estritamente em cultura durante este período, pode haver alguma consequência negativa.

Um outro aspeto diz respeito ao material biológico escolhido, uma vez que o trabalho foi realizado com ovários de rato. Apesar da vantagem de não ser necessário suprimir o sistema imunitário antes da transplantação para rato, o ovário e o ciclo hormonal são bastante diferentes do humano. Para além disso, devido à limitação de material biológico e dificuldade de isolar apenas o córtex do ovário de rato, o ensaio foi realizado com hemiovários inteiros, isto é, córtex e medula, o que na prática clínica não acontece. Assim, a extrapolação dos resultados é mais difícil.

Por forma a criar um microambiente propício para o desencadeamento da angiogénese bem como a aumentar a eficiência do acesso dos fatores angiogénicos ao tecido ovárico têm sido vários os estudos que propõem o encapsulamento do tecido numa matriz com os fatores antes do transplante (por exemplo em extratos de membrana basal, em hidrogel de fibrina (Gao et al., 2013; Gao et al., 2015). Por outro lado, vários grupos fazem a cultura do tecido com fatores em 3D, através da utilização de matriz gel (Kang et al., 2016).

CAPÍTULO 6: CONCLUSÃO

O presente estudo veio demonstrar que fazer um pré-tratamento *in vitro* com fatores de crescimento e hormona hMG exógenos do tecido ovárico num modelo de duas dimensões não será o mais adequado para realizar uma cultura de maior duração, visto que após 48 horas de cultura o tecido se apresentou totalmente degradado. No entanto, comprovou-se que a criopreservação e uma cultura de 4 horas não parecem afetar visivelmente o tecido, validando os atuais procedimentos em oncofertilidade feminina.

Os resultados obtidos vieram corroborar a importância da hMG para a manutenção do tecido e do estroma para os folículos, tendo sido a condição de cultura em que associou a hMG ao VEGF e FGF aquela em que se observou maior proliferação tanto nos folículos como no estroma. No entanto, a cultura de 4 horas com os fatores de crescimento não provocou alterações na densidade vascular antes do transplante, demonstrando que a cultura durante este tempo não terá sido suficiente para que se observassem alterações visíveis ao nível das células endoteliais. Como referido, só após o transplante é que alguns destes aspetos podem ser confirmados de forma mais robusta.

O trabalho deu a indicação de alguns genes alvo como o EGF, a Col4a3, o Tie1 e o Epas1, que podem servir de ponto de partida para verificar e confirmar o que acontece molecularmente após as 4h de cultura. Durante a execução, sentiu-se a necessidade de obter mais estudos relativos ao estado do tecido antes dos transplantes, para verificar qual o impacto do pré-tratamento, seja este através de que forma for, tanto no perfil de expressão angiogénica mas também na densidade folicular e estado proliferativo dos tecidos.

Tendo em consideração as limitações apresentadas e de forma a ultrapassá-las será necessário prolongar um pouco o tempo de cultura, mas de forma a garantir a manutenção da qualidade do tecido. Uma das hipóteses passa pela substituição da cultura em 2D, para uma cultura em 3D recorrendo-se a um material que seja biocompatível de forma a ter aplicabilidade na clínica, por exemplo através de uma matriz de alginato, um polissacárido isolado de algas. Este trabalho está em curso neste momento.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFIA

- Carmeliet P, Jain RK (2011). Molecular Mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 473(7347), 298–307.
- Cell Signaling Technology Inc. Angiogenesis Signaling Interactive Pathway. [Imagem consultada a 5julho.2017]. Disponível em: <https://www.cellsignal.com/contents/science-cst-pathways-angiogenesis>
- Chan J (2014). The wonderful colors of the hematoxylin-eosin stain in diagnostic surgical pathology. *International Journal of Surgical Pathology*, 22(1), 12–32.
- Dako. (2009). Immunohistochemical Staining Methods. In *Education Guide*.
- Damous, L. L., Nakamuta, J. S., de Carvalho, A. E. T. S., Soares-Jr, J. M., de Jesus Simões, M., Krieger, J. E., Baracat, E. C. (2015). Adipose tissue-derived stem cell therapy in rat cryopreserved ovarian grafts. *Stem Cell Research & Therapy*, 6(1), 57.
- Dath C, Van Eyck AS, Dolmans MM, Romeu L, Delle Vigne L, Donnez J, Van Langendonck A (2010). Xenotransplantation of human ovarian tissue to nude mice: Comparison between four grafting sites. *Human Reproduction*, 25(7), 1734–1743.
- David A, Langendonck A, Dolmans M, Donnez J, Amorim CA (2018). Effect of cryopreservation and transplantation on the expression of kit ligand and anti-Müllerian hormone in human ovarian tissue, 27(4), 1088–1095.
- Deanesly R (1954). Immature rat ovaries grafted after freezing and thawing. *The Journal of Endocrinology*, 11(2), 197–200.
- Demeestere I, Simon P, Emiliani S, Delbaere A (2009). Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation. *Human Reproduction Update*, 15(6), 649–665.
- Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, Martinez-Madrid B and Van Langendonck A (2004) Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 364,1405–1410.
- Elmore S (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516.
- Fabbri R, Venturoli S, D’Errico A, Iannascoli C, Gabusi E, Valeri B, Grigioni WF (2003). Ovarian tissue banking and fertility preservation in cancer patients: Histological and immunohistochemical evaluation. *Gynecologic Oncology*, 89(2), 259–266.
- Francavilla C, Maddaluno L, Cavallaro U (2009). The functional role of cell adhesion molecules in tumor angiogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 19(5), 298–309.
- Fraser HM (2006). Regulation of the ovarian follicular vasculature. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 4, 1–9.
- Gao J, Huang Y, Li M, Zhao H, Zhao Y, Li R, Qiao J (2015). Effect of local basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor on subcutaneously

- allotransplanted ovarian tissue in ovariectomized mice. *PLoS ONE*, *10*(7), 1–11.
- Gao J, Yan J, Li R, Li M, Yan L, Wang T, Qiao J (2013). Improvement in the quality of heterotopic allotransplanted mouse ovarian tissues with basic fibroblast growth factor and fibrin hydrogel, *28*(10), 2784–2793.
- Gerwins P, Sköldenberg E, Claesson-Welsh L (2000). Function of fibroblast growth factors and vascular endothelial growth factors and their receptors in angiogenesis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *34*(3), 185–194.
- Glamoclija V, Saraga-babic M (2005). Apoptosis and active caspase-3 expression in human granulosa cells, *83*(2).
- Gougeon A, Busso D (2000). Morphologic and functional determinants of primordial and primary follicles in the monkey ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *163*(1–2), 33–41.
- Hawes D, Shi SR, Dabbs DJ, Taylor CR, Cote RJ (2009). Immunohistochemistry. In *Modern Surgical Pathology*.
- Hsueh AJW, Billing H, Tsafirri A (1994). Ovarian Follicle Atresia: A Hormonally Controlled Apoptotic Process, *15*(6).
- Hyder SM, Stancel GM (1999). Regulation of angiogenic growth factors in the female reproductive tract by estrogens and progestins. *Molecular Endocrinology*, *13*(6), 806–811.
- Jain RK (2003). Molecular regulation of vessel maturation. *Nature Medicine*, *9*(6), 685–693.
- Jiang J, Cheung CKM, Wang Y, Tsang BK (2003). Regulation of cell death and cell survival gene expression during ovarian follicular development and atresia. *Frontiers in Bioscience* *8*, 222–237.
- Johnson AL (2003). Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles. *Animal Reproduction Science*, *78*(3-4), 185–201.
- Johnson AL, Bridgham JT (2002). Caspase-mediated apoptosis in the vertebrate ovary. *Reproduction*, *124*, 19–27.
- Johnson MJ (2013). Making men and women; Preparing for pregnancy. In *Essential Reproduction* (7th Edition) (33-102; 103-172). Oxford: Wiley-Blackwell.
- Kalocsai P, Shams S (1999). Visualization and Analysis of Gene Expression Data. *Journal of the Association for Laboratory Automation*, *4*(5), 58–61.
- Kang BJ, Wang Y, Zhang L, Xiao Z, Li SW (2016). bFGF and VEGF improve the quality of vitrified-thawed human ovarian tissues after xenotransplantation to SCID mice. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *33*(2), 281–289.

- Kato T, Kameoka S, Kimura T, Nishikawa T, Kasajima T (2001). Angiogenesis and blood vessel invasion as prognostic indicators for node-negative breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 65(3), 203–215.
- Kim SS, Soules MR, Battaglia DE (2002). Follicular development, ovulation, and corpus luteum formation in cryopreserved human ovarian tissue after xenotransplantation. *Fertility and Sterility*, 78(1), 77–82.
- Kitajima M, Dolmans MM, Donnez O, Masuzaki H, Soares M, Donnez J (2014). Enhanced follicular recruitment and atresia in cortex derived from ovaries with endometriomas. *Fertility and Sterility*, 101(4), 1031–1037.
- Koebele SV, Bimonte-nelson HA (2017). Modeling menopause: The utility of rodents in translational behavioral endocrinology research, *Maturitas: The European Menopause Journal*, 5–17.
- Koeppen BM, Stanton BA (2008). The endocrine and reproductive systems. In *Berne & Levy Physiology (6th edition) (651-798)*. Philadelphia: Mosby Elsevier
- Krock BL, Skuli N, Simon MC (2011). Hypoxia-Induced Angiogenesis: Good and Evil. *Genes and Cancer*, 2(12), 1117–1133.
- Ladanyi C, Mor A, Christianson MS, Dhillon N, Segars JH (2017). Recent advances in the field of ovarian tissue cryopreservation and opportunities for research. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 1–14.
- Lane G (2012). Principles and Practice of Fertility Preservation edited by Jacques Donnez and S Samuel Kim. In *The Obstetrician & Gynaecologist (14)*. Blackwell Publishing Inc.
- Lee J, Kong HS, Kim EJ, Youm HW, Lee JR, Suh CS, Kim SH (2016). Ovarian injury during cryopreservation and transplantation in mice: A comparative study between cryoinjury and ischemic injury. *Human Reproduction*, 31(8), 1827–1837.
- Levine JE (2014). *Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction: Two-Volume Set (4th Edition, Volume 2)*. Philadelphia: Elsevier
- Li SH, Hwu YM, Lu CH, Chang HH, Hsieh CE, Lee RKK (2016). VEGF and FGF2 Improve Revascularization, Survival, and Oocyte Quality of Cryopreserved, Subcutaneously-Transplanted Mouse Ovarian Tissues. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(8), 1–13.
- Liu J, Van der Elst J, Van den Broecke R, Dhont M (2002). Early massive follicle loss and apoptosis in heterotopically grafted newborn mouse ovaries. *Human Reproduction*, 17(3), 605–11.
- Ma W, Zheng X, Hei C, Zhao C, Xie S, Chang Q, Wang Y (2017). Optimal FSH usage in

- revascularization of allotransplanted ovarian tissue in mice. *Journal of Ovarian Research*, 1–10.
- Markström E, Svensson EC, Shao R, Svanberg B, Billig H (2002). Survival factors regulating ovarian apoptosis – dependence on follicle differentiation. *Reproduction*, 123, 23–30.
- Meirow D, Nugent D (2001). The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. *Human Reproduction Update*, 7(6), 535–543.
- Melo C, Canavarro MC, Almeida Santos, T (2017). Optimizing the decision-making process about fertility preservation in young female cancer patients: The experience of the portuguese Centre for Fertility Preservation. In *Pediatric and adolescent oncofertility: Best practices and emerging technologies*, ed. T. K. Woodruff & Y. C. Gosiengfiao, 269 - 284. Switzerland: Springer International Publishing.
- Newton H, Aubard Y, Rutherford A, Sharma V, Gosden R (1996). Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Human Reproduction*, 11:1487 – 1491.
- Nilsson E, Parrott J, Skinner MK (2001). Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 175(1–2), 123–130.
- Nisolle M, Casanas-Roux F, Qu J, Motta P, Donnez J (2000). Histologic and ultrastructural evaluation of fresh and frozen-thawed human ovarian xenografts in nude mice. *Fertility and Sterility*, 74(1), 122–129.
- Oktay KKG (2000). Ovarian Function after Transplantation of Frozen, Banked Autologous Ovarian Tissue. *New England Journal of Medicine*, 342(25), 1919.
- Orisaka M, Tajima K, Tsang BK, Kotsuji F (2009). Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development. *Journal of Ovarian Research*, 2(1), 1–7.
- Peyvandi F, Garagiola I, Baronciani L (2011). Role of von Willebrand factor in the haemostasis. *Blood Transfusion*, 9, 3–8.
- Planer, Ovarian Tissue Freezing (2017). Retirado de: <https://planer.com/company/news/latest-news/290-2018/927-ovarian-tissue-freezing.html>
- Porta S, Roth L, Singhal M, Mogler C, Spegg C, Schieb B, Augustin HG (2018). Endothelial Tie1 – mediated angiogenesis and vascular abnormalization promote tumor progression and metastasis. *Journal of Clinical Investigation*, 128(12), 1–12.
- Rizzi A, Enagiano V, Ibatti D (2017). Angiogenesis versus arteriogenesis, 58(1), 15–19.

- Robinson RS, Woad KJ, Hammond A J, Laird M, Hunter MG, Mann GE (2009). Angiogenesis and vascular function in the ovary. *Reproduction*, 138(6), 869–881.
- Rundhaug JE (2005). Matrix metalloproteinases and angiogenesis Angiogenesis Review Series. *J. Cell. Mol. Med*, 9(2), 267–285.
- Salama M, Winkler K, Murach KF, Seeber B, Ziehr SC, Wildt L (2013). Female fertility loss and preservation: Threats and opportunities. *Annals of Oncology*, 24(3), 598–608.
- Sarah Lee. *Diagram of some of the changes of the menstrual cycle*. [Imagem consultada a 15fevereiro.2018]. Disponível em: <http://histocutup.co.uk/Gynaecology/Menstrual.aspx>
- Scalercio S, Pharm B, Jadoul P (2013). Evaluation of cryopreserved ovarian tissue from prepubertal patients after long-term xenografting and, 100(5).
- Silva C, Almeida-Santos, Ana T, Melo C, Ribeiro Rama AC (2017). Decision on Fertility Preservation in Cancer Patients: Development of Information Materials for Healthcare Professionals. *Journal of Adolescent and Young Adult Oncology*, 0, 1–5.
- Traut W, Endl E, Scholzen T, Gerdes J, Winking H (2002). The temporal and spatial distribution of the proliferation associated Ki-67 protein during female and male meiosis. *Chromosoma*, 111(3), 156–164.
- Treuting PM, Dintzis SM (2012). Female Reproductive System. In *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas* (253-284). Academic Press.
- Van Eyck AS, Bouzin C, Feron O, Romeu L, Van Langendonck A, Donnez J, Dolmans MM (2010). Both host and graft vessels contribute to revascularization of xenografted human ovarian tissue in a murine model. *Fertility and Sterility*, 93(5), 1676–1685.
- Van Langendonck A, Romeu L, Ambroise J, Amorim C, Bearzatto B, Gala JL, Dolmans MM (2014). Gene expression in human ovarian tissue after xenografting. *Molecular Human Reproduction*, 20(6), 514–525.
- Vanderhyden B (2002). Molecular basis of ovarian development and function. *Frontiers in Bioscience*, 7(1–3), d2006.
- Ventana. (2011). OptiView DAB IHC Detection Kit, 1–40.
- Wang L, Ying YF, Ouyang YL, Wang JF, Xu J (2013). VEGF and bFGF increase survival of xenografted human ovarian tissue in an experimental rabbit model. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 30(10), 1301–1311.
- Wang Y, Chang Q, Sun J, Dang L, Ma W, Hei C, Cai Y (2012). Effects of HMG on revascularization and follicular survival in heterotopic autotransplants of mouse ovarian tissue. *Reproductive BioMedicine Online*, 24(6), 646–653.
- Wu D, Lei Y, Tong Y, Tang F, Qian Y, Zhou Y (2010). Angiogenesis of the frozen-thawed

human fetal ovarian tissue at the early stage after xenotransplantation and the positive effect of *Salviae miltiorrhizae*. *Anatomical Record*, 293(12), 2154–2162.

Yang H, Le HH, Lee HC, Ko DS, Kim SS (2008). Assessment of vascular endothelial growth factor expression and apoptosis in the ovarian graft: can exogenous gonadotropin promote angiogenesis after ovarian transplantation? *Fertility and Sterility*, 90(4 SUPPL.), 1550–1558.

Yoshida M, Sanbuissyo A, Hisada S, Takahashi M, Ohno Y, Nishikawa A (2009). Morphological characterization of the ovary under normal cycling in rats and its viewpoints of ovarian toxicity detection. *The Journal of Toxicological Sciences*, 34 Suppl 1(1), SP189-97.

Zimna A, Kurpisz M (2015). Hypoxia-Inducible factor-1 in physiological and pathophysiological angiogenesis: Applications and therapies. *BioMed Research International*.

ANEXOS

Tabela 10. Genes em estudo por microarray e referências dos respetivos primers dispostos na placa.

Nome dos genes	Símbolos	Referência
-	18s rRNA	Hs99999901_s1
actin, beta	Act β	Rn00667869_m1
hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	Hprt1	Rn01527840_m1
lactate dehydrogenase A	Ldha	Rn00820751_g1
ribosomal protein, large, P1	Rplp1	Rn03467157_gH
angiopoietin 1	Angpt1	Rn01504818_m1
angiopoietin 2	Angpt2	Rn01756774_m1
alanyl (membrane) aminopeptidase	Anpep	Rn00578763_m1
cadherin 5	Cdh5	Rn01536708_m1
collagen, type XVIII, alpha 1	Col18a1	Rn01428995_m1
collagen, type IV, alpha 3	Col4a3	Rn01400991_m1
connective tissue growth factor	Ctgf	Rn01537279_g1
epidermal growth factor	Egf	Rn00563336_m1
endoglin	Eng	Rn01438763_m1
endothelial PAS domain protein 1	Epas1	Rn00576515_m1
v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene 2	ErbB2	Rn00566561_m1
fibroblast growth factor 1 (acidic)	Fgf1	Rn00689153_m1
fibroblast growth factor 2	Fgf2	Rn00570809_m1
fibroblast growth factor 6	Fgf6	Rn00590927_m1
fibroblast growth factor receptor 3	Fgfr3	Rn00584799_m1
c-fos induced growth factor	Figf	Rn00582193_m1
FMS-related tyrosine kinase 1	Flt1	Rn01409533_m1
fibronectin 1	Fn1	Rn00569575_m1
hepatocyte growth factor	Hgf	Rn00566673_m1
hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)	HIF-1 α	Rn01472831_m1
integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)	Itga5	Rn01761831_m1
integrin, alpha V	Itgav	Rn01485633_m1
integrin, beta 3	Itgb3	Rn00596601_m1

Tabela 10. (Continuação) Genes em estudo por microarray e referências dos respetivos primers dispostos na placa.

Nome dos genes	Símbolos	Referência
matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)	Mmp14	Rn00579172_m1
matrix metalloproteinase 19	Mmp19	Rn01756324_m1
matrix metalloproteinase 2	Mmp2	Rn01538170_m1
matrix metalloproteinase 3	Mmp3	Rn00591740_m1
matrix metalloproteinase 9	Mmp9	Rn00579162_m1
nitric oxide synthase 3, endothelial cell	Nos3	Rn02132634_s1
platelet-derived growth factor alpha polypeptide	Pdgf- α	Rn00709363_m1
platelet-derived growth factor beta polypeptide	Pdgf- β	Rn01502596_m1
platelet/endothelial cell adhesion molecule 1	Pecam1	Rn01467262_m1
placental growth factor	Pgf	Rn00677739_m1
TEK tyrosine kinase, endothelial	Tek	Rn01433346_m1
transforming growth factor alpha	Tgfa	Rn00446234_m1
tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1	Tie1	Rn01417182_m1
TIMP metalloproteinase inhibitor 1	Timp1	Rn01430873_g1
TIMP metalloproteinase inhibitor 2	Timp2	Rn00573232_m1
TIMP metalloproteinase inhibitor 3	Timp3	Rn00441826_m1
vascular endothelial growth factor A	Vegf-A	Rn01511602_m1
vascular endothelial growth factor B	Vegf-B	Rn01454585_g1
vascular endothelial growth factor C	Vegf-C	Rn01488076_m1