

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

# **Xenotransplante de tecido ovárico bovino como modelo para testar novas drogas, analisar a angiogénese, a depleção prematura e a dinâmica folicular**

Ana Rita Faria Azevedo

Dissertação no âmbito do mestrado em investigação biomédica, na área de Oncobiologia orientada pela Professora Doutora Ana Teresa Moreira Almeida Santos e pelo Doutor Jorge Manuel Botelho Garcia Andrade Pimenta e apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Julho de 2019



FACULDADE DE MEDICINA  
UNIVERSIDADE DE  
COIMBRA



*Inteligência é a habilidade de se adaptar às mudanças.*  
Stephen Hawking

## Agradecimentos

Alcançar o sucesso profissional nunca será possível sem trabalho de equipa, não poderia deixar de expressar a minha gratidão a todos os que contribuíram para que fosse possível. Foi uma prazer trabalhar com todos os seguintes nomeados.

Agradeço ao Doutor Jorge Pimenta, por todo o acompanhamento ao longo do projeto, pela transmissão de conhecimentos, que me possibilitaram uma enorme aprendizagem em diversos campos do mundo da investigação e pelo senso crítico. Além do mais, não só como investigador e orientador externo, fico grata pela sua amizade construída ao longo dos 3 anos de trabalho conjunto, incentivando-me sempre a alargar horizontes.

Não poderia deixar de agradecer à Doutora Teresa Almeida Santos, orientadora interna e exemplo profissional, pela oportunidade de participar num projeto tão ambicioso, e pela sua clareza, rigor e disponibilidade prestada.

À Dra. Ana Sofia Pais (na área cirúrgica e imunohistoquímica), à Doutora Virgínia Pires (expressão genética) e Doutora Mafalda Laranjo (responsável pela logística dos animais do biotério e anestesia) as quais foram incansáveis, na partilha dos seus conhecimentos e na participação e colaboração da análise dos resultados.

Deixo um especial agradecimento à Doutora Rosa Lino Neto e Doutora Carla Marques, com quem tive a honra de trabalhar novamente, pelo profissionalismo, total apoio e pelos preciosos conselhos, que me encorajaram a crescer como investigadora e como pessoa.

Ao Professor Doutor Nuno Carolino, pela ajuda da análise estatística e ao Doutor Pedro Pessa, por toda a ajuda que me deu na imunohistoquímica das peças histológicas.

Ao Professor Doutor Carlos Fontes, pela possibilidade de usufruir do laboratório da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa.

À equipa do Centro de Preservação de Fertilidade e Centro de Neurociências e Biologia Celular (CNC) que não mencionei especificamente, um muito obrigado pela disponibilidade de recursos e por toda a paciência nos esclarecimentos concedidos a nível técnico.

A todo o Departamento de Reprodução e Fisiologia Animal, em particular ao Doutor João Pedro Barbas, Doutora Conceição Baptista, Sra. D. Isabel Santos e Dr. João Maria Nobre por toda a hospitalidade, gentileza e carinho, fazendo-me sempre sentir em casa.

A concretização deste trabalho não teria sido possível sem os meus principais alicerces, que são os meus pais, avós maternos e namorado, que me transmitiram sempre a confiança necessária para concluir mais uma etapa do meu percurso académico.

Por último, mas não menos importante agradeço aos meus amigos, que na sua maioria apesar de estarem do outro lado do oceano, acompanharam-me ao longo de todos estes anos com um apoio incondicional.

#### Financiamento

Este trabalho foi financiado pelos projetos UID/CVT/276/2019(CIISA) e ALT20-03-0246-FEDER-000021.

CNC.IBILI é apoiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia, Portugal (UID/NEU/04539/2013), e co-financiado pela FEDER-COMPETE (POCI-01-0145-FEDER-007440).

Agradeço ainda à Merck ®, a qual financiou diversos reagentes para o trabalho apresentado, no âmbito do apoio a projetos da iniciativa do investigador e à Triticum (Holanda) e Biolotus (Portugal), por facultarem de forma incondicional o produto L-Mesitran Soft utilizado, não existindo quaisquer conflitos de interesse.

## Resumo

O processo de criopreservação de tecido ovárico é atualmente considerado como um dos futuros métodos de eleição na preservação da fertilidade feminina. O tecido ovárico removido e criopreservado, pode, depois, ser transplantado de modo a restaurar a função endócrina e a fertilidade. No entanto, a exequibilidade desta técnica apresenta ainda grandes desafios para a manutenção da viabilidade folicular durante o processo de vitrificação/aquecimento e após o transplante.

Com a realização deste trabalho pretendeu-se consolidar os resultados preliminares obtidos pelo nosso grupo, em relação à aplicação *in vitro* de um produto comercial que possui na sua composição 40% de Mel de Grau Médico (L-Mesitran Soft) no incremento da densidade endotelial de tecido ovárico. Para tal foram usados fragmentos de córtex de ovários de bovino obtidos em matadouro, vitrificados, posteriormente desvitrificados, e colocados em meio de cultura durante 48 horas, suplementado com um dos seguintes produtos: L-Mesitran Soft, VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular) ou Vitamina D, sendo de seguida avaliados antes ou depois do xenotransplante em ratos fêmea imunodeprimidos (homozigóticos *Rowet nude*) com 10 a 12 semanas de idade e previamente ovariectomizados. Um grupo controlo sem suplementação foi igualmente implementado. Os enxertos foram removidos às 48 horas (*in vitro*) ao 7º e 28º dia (*in vivo*) após transplante e submetidos a análises de imunohistoquímica [marcadores de densidade endotelial (Fator VIII), apoptose (Caspase 3), proliferação celular (Ki-67)], expressão génica (genes AMH, AMHR2, VEGF, VEGFR1, VEGFR2, CYP11A1 e VASN) e de metilação do DNA (genes AMH e VASN).

Os resultados obtidos, por meio de imunohistoquímica, demonstraram que o processo de vitrificação não afetou o tecido ovárico, bem como que a passagem pela cultura *in vitro* previamente ao xenotransplante melhora a recuperação do próprio tecido. Em termos de densidade endotelial, os tratamentos com L-Mesitran *in vitro* e *in vivo* apresentaram a maior capacidade de estimulação angiogénica (Fator VIII), de estimulação da proliferação celular (Ki-67) e apoptose celular (caspase 3), no âmbito de um processo normal de *turnover* celular. Foi também observada expressão génica dos genes CYP11A1 e AMHR2, no grupo L-Mesitran *in vivo*, após 28 dias de transplante.

Finalmente, foi possível determinar pela primeira vez, uma região localizada numa ilha de dinucleótidos CpG do gene VASN, que apresentou uma correlação negativa forte com a expressão génica no córtex ovárico, em todos os grupos de estudo. No caso do gene AMH, foram também estudadas duas regiões genómicas, cuja ausência parcial de expressão foi associada a uma elevada percentagem de metilação. Foi assim possível verificar no modelo animal referido e através das diversas análises efetuadas, que a adição de L-Mesitran Soft, quer *in vitro* (meio de cultura) quer *in vivo* (no local de transplante), poderá constituir uma alternativa válida e menos dispendiosa, do que outros reagentes mais comumente utilizados para a eficácia da preservação de tecido ovárico.

**Palavras-chave:** Fertilidade, Preservação, Ovário, Criopreservação, Xenotransplante.

## Abstract

In the field of assisted reproductive technologies, the process of ovarian tissue vitrification is currently considered as one of the most promising methods to address female fertility preservation.

Cryopreserved ovarian tissue can then be transplanted in order to restore endocrine function and fertility. However, the feasibility of this technique presents major challenges for the maintenance of follicular viability during the vitrification /warming process and after transplantation.

The aim of this study was to consolidate preliminary results obtained by our group regarding the *in vitro* application of a commercial product containing 40% Medical Grade Honey (L-Mesitran Soft), in improving ovarian tissue endothelial density. For this purpose, ovarian cortical tissue, collected from slaughtered cows were vitrified, and then warmed and randomly assigned to *in vitro* cultured groups, supplemented with one of the following products: L-Mesitran Soft, VEGF (vascular endothelial growth factor) or Vitamin D, and then evaluated or xenotransplanted into immunodeficient (*Rowet* nude homozygous) ovariectomized rats with 10 to 12 weeks of age. A control group without supplementation was also constituted. These grafts were recovered after 48 hours (*in vitro*), 7 days and 28 days (*in vivo*) after transplantation and subjected to immunohistochemical [endothelial density (Factor VIII), apoptosis (Caspase 3), cell proliferation], gene expression (AMH, AMHR2, VEGF, VEGFR1, VEGFR2, CYP11A1 and VASN genes) and DNA methylation level (AMH and VASN genes) analysis.

Immunohistochemistry data showed that the vitrification process did not affect ovarian tissue and stressed the value of *in vitro* culture prior to transplantation.

With respect to endothelial density, treatments with L-Mesitran *in vitro* and *in vivo* showed the highest angiogenic (Factor VIII) and cell proliferation (Ki-67) stimulation, alongside with cellular apoptosis (caspase 3), within a healthy cellular turnover pathway. Also, in the L-Mesitran *in vivo* group, the CYP11A1 and AMHR2 genes were expressed after 28 days of transplantation.

Finally, it was possible to determine, for the first time, a region within a CpG rich genomic sequence of the VASN gene, which showed a strong negative correlation with ovarian cortex gene expression among all groups. In the case of the AMH gene, two genomic

regions presented high methylation levels, that were correlated with low (or absent) expression levels.

From the above data it was possible to conclude that the addition of L-Mesitran Soft, both *in vitro* and *in vivo*, should be considered as a potentially effective and less expensive strategy, which must be taken into account in relation to other more commonly used reagents, in ovarian tissue preservation efficiency.

**Keywords:** Fertility, Preservation, Ovary, Cryopreservation, Xenotransplantation.



## *Trabalhos realizados e apresentados no decurso desta dissertação*

Gene silencing (siRNA) of *Bos taurus* prion-like genes, and its relation to progesterone (P4) and 17 $\beta$ -estradiol (E2) concentrations. Pimenta J., Pires V.M., Nolasco S., Castelo-Branco P., Apolónio J.D., Marques C.C., Lopes-da-Costa, L., Prates, J.A., **Azevedo, A.R.**, Fonseca, E.A., Pereira, R.M.L.N. Apresentação oral. Congresso CIISA 2018, “Exploring the boundaries of animal, veterinary and biomedical sciences”, Lisboa (Faculdade de Medicina Veterinária) de 16 a 17 de novembro. Sessão 3; Livro de resumos (pg. 52).

Medical grade honey in ovarian cortex preservation: an *in vitro* animal model approach. J. Pimenta, P. Pessa, CC Marques, **A.R. Azevedo**; E. Fonseca; Almeida-Santos T., R.M.L.N. Pereira. Submetido à revista: Veterinary Medicine and Science (manuscript ID: VMS3-2018-Aug-0106).

IDENTIFICAÇÃO DE GENES ALVO NA ESTEROIDOGENESE BOVINA POR RNA DE INTERFERÊNCIA (RNAi). Pimenta, J., Nolasco, S., Pires, V., Marques, C.C., Castelo-Branco, P., Costa, L., Prates, J., **Azevedo, A.R.**, Fonseca, E., Pistola, M., Pereira, R.M.L.N. Apresentado no 8º Encontro de Formação da Ordem dos Médicos Veterinários (<http://www.efomv.pt/>) nos dias 14 e 15 de abril de 2018, no Centro de Congressos de Lisboa. Livro de resumos (pg 419).

CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO OVÁRIO: UMA TÉCNICA A APLICAR NA CONSERVAÇÃO DE RAÇAS EM RISCO. Autores: **Azevedo A.R.**; Marques C., Pimenta J., Pessa P., Almeida-Santos T.; Pereira R.M.L.N. Congresso Internacional. XI Congresso Ibérico sobre recursos genéticos animais, de 26 a 28 de setembro de 2018, Murcia, Espanha. Organização: Sociedad Española para los Recursos Genéticos Animales (S.E.R.G.A.), Sociedade Portuguesa de Recursos Genéticos Animais (SPREGA) e Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrário y Alimentario (IMIDA). Livro de resumos (pg 83).

COMPORTAMENTO EPIGENÉTICO DE GENES DO TIPO PRIÓNICO EM CÉLULAS DA GRANULOSA DE BOVINO. Autores: Pimenta J., Castelo-Branco P., Apolónio J., Pires V., Nolasco S., Marques C.C., Costa, L., Prates, J., **Azevedo, R.**, Fonseca, E., Pereira, R.M.L.N. Congresso Internacional. XI Congresso Ibérico sobre recursos genéticos animais, de 26 a 28 de setembro de 2018, Murcia, Espanha. Organização: Sociedad Española para los Recursos Genéticos Animales (S.E.R.G.A.), Sociedade Portuguesa de Recursos Genéticos Animais (SPREGA) e Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrário y Alimentario (IMIDA). Livro de resumos (pp. 69-70).

XENOTRANSPLANTE DE TECIDO OVÁRICO BOVINO NA PRESERVAÇÃO DA FERTILIDADE. Autores: **Azevedo, A.R.**, Pais, A.S., Pereira, R.M.L.N., Almeida-Santos, T., Pires, V.M.R., Pessa, P., Marques, C.C., Laranjo, M., Nolasco, S., Castelo-Branco P., Botelho, F., Prates, J.A., Lopes-da-Costa, L., Pimenta, J. Apresentado no 9º Encontro de Formação da Ordem dos Médicos Veterinários (<http://www.efomv.pt/>) nos dias 6 e 7 de abril de 2019, no Centro de Congressos de Lisboa.

APLICAÇÃO DA ECOGRAFIA NA AVALIAÇÃO DE CONDIÇÃO CORPORAL EM NOVILHAS E VACAS DAS RAÇAS MERTOLENGA E ALENTEJANA. Autores: Pimenta J., Romão R., Cancela D'Abreu M., Carolino N., **Azevedo, A.R.**, Marques C.C., Bettencourt, E., Henriques N., Pais J., Espadinha P., e Pereira R.M.L.N. Consórcio BovMais. Apresentado no 9º Encontro de Formação da Ordem dos Médicos Veterinários (<http://www.efomv.pt/>) nos dias 6 e 7 de abril de 2019, no Centro de Congressos de Lisboa. Este trabalho insere-se no âmbito de um projeto que visa avaliar a influência de vários fatores na atividade reprodutiva.

CISTINÚRIA TIPO III NA RAÇA SUL-AFRICANA BOERBOEL. Autores: Pimenta, J., Veloso, M.T., Marques, M.R., **Azevedo, A.R.**, Pereira, R.M.L.N. Apresentado no 9º Encontro de Formação da Ordem dos Médicos Veterinários (<http://www.efomv.pt/>) nos dias 6 e 7 de abril de 2019, no Centro de Congressos de Lisboa. Trabalho em que foi determinada uma mutação genética sob influência da presença de androgénios.

### **Trabalhos anteriores na área:**

MEDICAL GRADE HONEY IN OVARIAN CORTEX PRESERVATION: AN *IN VITRO* ANIMAL MODEL APPROACH FOR STUDYING ANGIOGENESIS. Pimenta, J., Nolasco, S., Pires, V., Marques, C.C., Castelo-Branco, P., Costa, L., Prates, J. **Azevedo, A. R.**, Fonseca, E., Pistola, M., Pereira, R.M.L.N. 5th World Congress of the International Society for Fertility Preservation (ISFP) (Vienna, Austria, November 16-18, 2017) (<http://www.isfp2017.cme-congresses.com/>)

### **Trabalhos a submeter em breve:**

Tem colaborado ativamente com a Faculdade de Medicina Veterinária, na extração de DNA, elaboração e análise dos dados relativos à análise do padrão de metilação e expressão em genes relacionados com diversos níveis de endometriose em éguas. O *abstract* está em fase final de preparação para submeter em breve a um congresso europeu da especialidade (em Varsóvia, Polónia).

Colabora atualmente na escrita de um artigo sobre a influência do silenciamento genético de genes da família priónica (por siRNAs), na expressão genética, padrão de metilação e níveis de progesterona e estradiol.

# Índice

Agradecimentos .....	3
Resumo .....	5
<i>Abstract</i> .....	7
<i>Trabalhos realizados e apresentados no decurso desta dissertação</i> .....	9
Índice de Figuras .....	15
Índice de Tabelas .....	17
Índice de Abreviaturas e Símbolos .....	18
Capítulo I - Introdução .....	20
1. Preservação da Fertilidade .....	21
1.1. Tratamento Oncológico e Toxicidade ovária.....	21
1.1.1. A Infertilidade.....	22
1.1.2. Oncofertilidade .....	23
1.2. Angiogénese, Esteroidogénese e Reserva Ovária .....	25
1.2.1. Regulação/ Estimulação da Angiogénese.....	25
1.2.2. A esteroidogénese.....	26
1.2.3. Falência Ovária Precoce .....	28
1.2.3.1. Marcadores da Reserva Ovária .....	29
2. Criopreservação.....	30
2.1. Métodos de Criopreservação .....	31
2.1.1. Congelação Lenta .....	32
2.1.2. Vitrificação .....	33
2.2. Criopreservação do Tecido Ovário .....	34
2.2.1. Cultura <i>in vitro</i> de tecido ovário criopreservado .....	35
2.3. Avaliação da Viabilidade dos tecidos .....	36
2.3.1. Avaliação Imunohistoquímica.....	36
2.3.2. Avaliação por LDH .....	38
2.3.3. Avaliação da expressão genética .....	38
2.3.4. Avaliação Epigenética .....	39
2.4. Resultados da criopreservação de tecido ovário .....	40
3. Transplante de Tecido Ovário .....	41
3.1. Longevidade do tecido ovário transplantado .....	44

Capítulo II - Objetivos .....	45
Capítulo III – Material e Métodos .....	47
1. Desenho Experimental .....	48
1.1. Aquisição e Preparação do Córtex Ovárico Bovino .....	49
1.1.1. Técnica de Corte e Cultura <i>in vitro</i> .....	49
1.1.2. Vitriificação/Desvitriificação do Córtex do Tecido Ovárico.....	50
1.1.3. Xenotransplante de Tecido Ovárico Bovino .....	51
1. Avaliação Histológica .....	52
2. Avaliação Imunohistoquímica.....	53
2.1. Determinação da Densidade Endotelial .....	54
2.2. Quantificação da Proliferação/Apoptose Celular .....	55
3. Quantificação de Lactato Desidrogenase .....	56
4. Avaliação da Expressão Genética .....	56
4.1. Extração total de RNA .....	57
4.2. Síntese do DNA complementar .....	57
4.3. Desenho dos <i>Primers</i> .....	58
4.4. Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR).....	59
5. Pirosequenciamento de bissulfito.....	59
6. Análise Estatística .....	61
Capítulo V – Resultados .....	62
1. Avaliação Histológica .....	63
2. Avaliação Imunohistoquímica.....	65
2.1. Densidade Endotelial (Factor VIII) .....	65
2.1.2. Entre Grupos .....	65
2.1.2. Ao longo do tempo .....	66
2.2. Proliferação Celular nos Folículos (Ki-67).....	67
2.2.1. Entre Grupos.....	67
2.2.2. Ao longo do tempo .....	67
2.3. Proliferação Celular no Estroma (Ki-67).....	68
2.3.1. Entre Grupos.....	68
2.3.2. Ao longo do tempo .....	69
2.4. Apoptose Celular nos Folículos (Caspase 3) .....	70
2.5. Apoptose Celular no Estroma (Caspase 3) .....	71

2.5.1. Entre Grupos.....	71
2.5.2. Ao longo do tempo .....	72
3. Citotoxicidade Celular.....	73
4. Expressão Genética .....	74
4.1. Gene CYP11A1 .....	74
4.2. Gene AMHR2 .....	75
5. Pirosequenciamento de Bissulfito .....	77
5.1. Gene VASN.....	77
5.1.1. Entre Grupos.....	77
5.1.2. Ao longo do tempo .....	78
5.2. Gene AMH.....	79
5.2.1. Fragmento 1 (Entre Grupos).....	79
5.2.2. Fragmento 1 (Ao longo do tempo) .....	80
5.2.3. Fragmento 2.....	81
5.3. Gene VASN conjuntamente com AMH .....	82
5.4. Expressão genética e padrão de Metilação de AMH e VASN.....	83
5.4.1. Gene VASN.....	83
5.4.2. Gene AMH .....	84
Capítulo VI – Discussão e Conclusão .....	86
Capítulo VII - Bibliografia .....	97
Anexos.....	114
Anexo I .....	115
Anexo II .....	116
Anexo III.....	117
Anexo IV.....	118
Anexo V .....	119
Anexo VI.....	121
Anexo VII .....	123
Anexo VIII.....	124
Anexo IX.....	126
Anexo X.....	129

## Índice de Figuras

<b>Figura 1-</b> Prevalência de infertilidade secundária em 2010 .....	23
<b>Figura 2-</b> Etapas da criopreservação pelo método de congelação lenta .....	33
<b>Figura 3 -</b> Duração do enxerto e ocorrência de nascimentos após autotransplante de tecido ovárico .....	41
<b>Figura 4-</b> Xenotransplante num ratinho de tecido ovárico bovino .....	43
<b>Figura 5-</b> A) Níveis de FSH e de AMH após alotransplante. B) Níveis de FSH e de AMH após autotransplante de tecido ovárico criopreservado .....	44
<b>Figura 6-</b> Descrição dos grupos em estudo .....	48
<b>Figura 7-</b> Desenho Experimental.....	49
<b>Figura 8-</b> Preparação dos fragmentos de tecido ovárico bovino .....	50
<b>Figura 9-</b> Desenho Experimental do xenotransplante de tecido ovárico bovino.....	52
<b>Figura 10 –</b> Marcação pelo fator VII num fragmento de tecido ovárico.....	54
<b>Figura 11 -</b> Quantificação Folicular: A) Folículos Primordiais; B) Folículos Primários; C) Folículos Secundários.....	64
<b>Figura 12-</b> Densidade Endotelial, com marcação de Factor VIII às 48h, 7 e 28 Dias ..	65
<b>Figura 13-</b> Densidade Endotelial, com marcação de Factor VIII ao longo do tempo ...	66
<b>Figura 14-</b> Proliferação Celular nos folículos, com marcação de Ki-67 às 48h, 7 e 28 Dias .....	67
<b>Figura 15-</b> Proliferação Celular nos folículos, com marcação de Ki-67 ao longo do tempo .....	68
<b>Figura 16-</b> Proliferação celular no estroma, com marcação de Ki-67 às 48h, 7 e 28 Dias .....	69
<b>Figura 17-</b> Qualidade do estroma, com marcação de Ki-67 ao longo do tempo .....	70
<b>Figura 18-</b> Apoptose Celular nos folículos, com marcação com Caspase 3: A) Às 48h, 7 e 28 Dias; B) Ao longo do tempo .....	71
<b>Figura 19-</b> Qualidade do estroma, com marcação de Caspase 3 às 48h, 7 e 28 Dias....	72
<b>Figura 20-</b> Qualidade do estroma, com marcação de Caspase 3 ao longo do tempo ....	73
<b>Figura 21-</b> Citotoxicidade Celular do tecido ovárico vitrificado/aquecidos, após 48 horas em cultura .....	73
<b>Figura 22-</b> Expressão Genética do gene CYP11A1: A) Entre as 48 horas e 7 dias; B) Ao longo do tempo .....	75

<b>Figura 23-</b> Expressão Genética do gene AMHR2: A) Entre as 48 horas e 7 dias; B) Ao longo do tempo .....	76
<b>Figura 24-</b> Padrão de Metilação do gene VASN às 48 horas e 7 Dias .....	78
<b>Figura 25-</b> Padrão de Metilação do gene VASN ao longo do tempo .....	79
<b>Figura 26-</b> Padrão de Metilação do gene AMH do Fragmento 1 às 48 horas e 7 Dias .	80
<b>Figura 27-</b> Padrão de Metilação do gene AMH do Fragmento 1 ao longo do tempo ...	80
<b>Figura 28-</b> Padrão de Metilação do gene AMH do Fragmento 2 às 48 horas e 7 Dias .	81
<b>Figura 29-</b> Padrão de Metilação do gene AMH do Fragmento 2 ao longo do tempo ...	81
<b>Figura 30-</b> (A) Analogia entre os padrões de metilação do gene VASN e o fragmento 1 e fragmento 2 do gene AMH; (B) Comparação entre os padrões de metilação do gene VASN e AMH no geral .....	83
<b>Figura 31-</b> Analogia entre os resultados de expressão genética e padrão de metilação do gene VASN.....	84
<b>Figura 32-</b> Analogia entre os resultados de expressão genética e de padrão de metilação do gene AMH .....	85
<b>Figura 33 -</b> Desenho Experimental das zonas de metilação analisadas do gene AMH e VASN .....	121
<b>Figura 34-</b> Comparação entre grupos/tempo: A) Densidade Endotelial; B) Proliferação Celular; C) Proliferação celular no estroma (Ki-67); D) Apoptose celular no estroma (Caspase 3) .....	125
<b>Figura 35-</b> Expressão Genética dos genes: A) VEGF-A; B) VEGFR1; C) VEGFR2; D) VASN e E) AMH .....	128
<b>Figura 36-</b> Comparação entre grupos/tempo, nos níveis de metilação: A) Gene VASN; B) Gene AMH (Fragmento 1); C) Gene AMH (Fragmento 2).....	130



## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1-</b> Classificação folicular de acordo com uma adaptação da classificação de Gougeon .....	53
<b>Tabela 2-</b> Expressão de Ki-67 e Caspase 3 nos folículos .....	55
<b>Tabela 3 –</b> Preparação da amostra para realização de RT-qPCR .....	58
<b>Tabela 4-</b> Regiões selecionadas para análise de pirosequenciamento de bissulfito. ....	60
<b>Tabela 5-</b> Sequências de pares de primers para PCR quantitativo em tempo real, desenhados especificamente para este estudo .....	118
<b>Tabela 6-</b> Sequência de pares de primers para a pirosequenciação de Bissulfito, desenhados especificamente para este estudo .....	122

## Índice de Abreviaturas e Símbolos

ACTB -  $\beta$ -actina

AMH – Hormona Anti-Muleriana

ART – Tecnologias de reprodução assistida

B2M - Microglobina beta-2

BSA – Albumina sérica bovina

CHUC – Centro Hospitalar Universitário de Coimbra

CPAs – Agentes crioprotetores

DMSO- Dimetilsulfóxido

EG- Etilenoglicol

FBS – Soro Bovino Fetal

FSH - Hormona Folículo estimulante

GAPDH - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GnRH - Gonadotrofinas

Gy - Gray (Unidade no Sistema Internacional de Unidades (SI) de dose absorvida)

h – Hora

HSP90 – Proteína Chaperona

IFs – Interferons

ILs – Interleucinas

IMM – Membrana mitocondrial interna

kDa – Unidade de massa atómica

LH – Hormona Luteinizante

M – Molar

mL - Mililitro

OHSS – Síndrome de hiperestimulação ovárica

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS - Solução Salina Fosfatada Tamponada

PCOS – Síndrome de ovário poliquístico

PROH - Propilenoglicol

SOCS - Soro de vaca em cio superovulada

TCM - Meio de cultura de tecido

TGF- $\alpha$  – Factores de Necrose Tumoral Alfa

TGF- $\beta$  – Fator de transformação do crescimento

VDR – Recetor da vitamina D

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

---

## *Capítulo I - Introdução*

---

## 1. Preservação da Fertilidade

A fertilidade depende da capacidade de maturação de células germinativas ao longo de todo o processo meiótico, assim como, no sexo feminino, da sua associação com as células da granulosa e teca envolventes e no masculino, com as células de Leydig e de Sertoli. Esta associação possibilita a produção de esteroides sexuais, os quais alteram os níveis de expressão de determinados genes por meio de recetores nucleares e/ou da membrana plasmática (1). Apesar dos avanços nos diagnósticos, prevenção e tratamentos, o declínio da fertilidade com o avanço da idade associado ao adiamento da idade de gravidez e aparecimento de diversas disfunções é considerada um problema de saúde pública (2).

Outra causa de infertilidade, para além das anteriormente referidas, é o desenvolvimento de diversas neoplasias, não obstante da grande evolução no diagnóstico e respetivo tratamento (3). De facto, dados de 2016 (4), apontam Portugal como sendo o segundo país da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE) com a mais baixa taxa de fertilidade, depois da Coreia do Sul, sendo a fertilidade em Portugal de 1,23 filhos por cada mulher entre os 15 e 49 anos, enquanto que a média dos 35 países da OCDE se situa nos 1,68 filhos. Desta forma, dada a elevada importância social de preservar a fertilidade e o interesse em melhorar a situação demográfica, técnicas como a fertilização *in vitro*, a criopreservação de embriões, ovócitos e tecido ovárico têm vindo a adquirir uma importância crescente (3,5,6).

### 1.1. Tratamento Oncológico e Toxicidade ovárica

De acordo com as estimativas do Globocan 2018, o risco de desenvolver cancro num determinado período da vida será de 1 em cada 8 homens e 1 em cada 10 mulheres (7). De uma forma global, tem ocorrido um aumento significativo do número de novos casos de cancro, uma vez que todos os anos são detetados aproximadamente 15.000 crianças e 20.000 jovens adultos com novas neoplasias. Porém, em relação às taxas de sobrevivência, apesar de variarem consoante a idade e o tipo de cancro, estas têm vindo a destacar-se de forma positiva, encontrando-se acima dos 80% (8). Adicionalmente, para além dos esforços para minimizar as taxas de morbilidade, uma das prioridades é a melhoria da qualidade de vida dos sobreviventes, assim como a redução de efeitos colaterais resultantes dos tratamentos realizados (3,5,9).

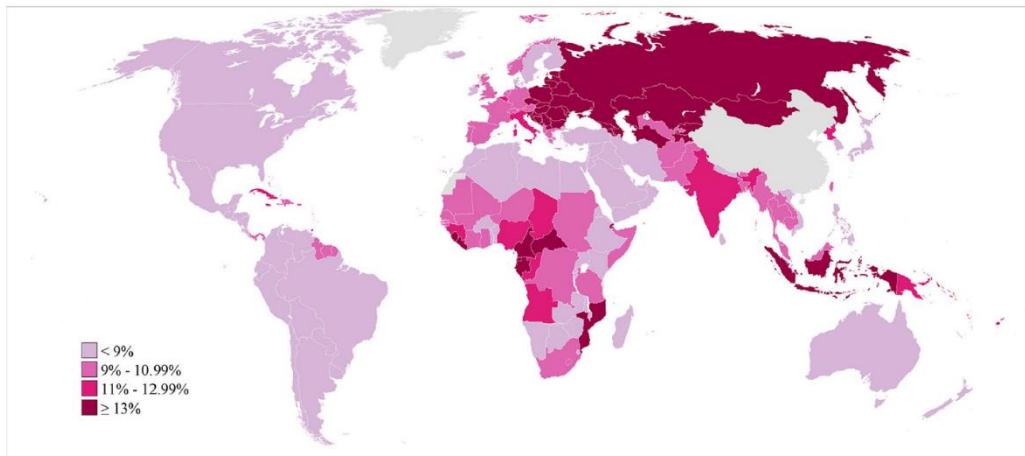
De um modo geral, um dos sistemas mais afetados pelas terapêuticas oncológicas citotóxicas é o sistema reprodutivo, que na mulher pode dar origem a insuficiência ovárica, comprometimento do crescimento uterino e/ou lesão vascular, fibrose ou estenose vaginal, disfunção sexual e menopausa precoce. Todos estes fatores contribuem para a infertilidade, dado que as mulheres possuem um *pool* de folículos ovários não renováveis, o qual atinge o pico de folículos primordiais (6-7 milhões) até aos 5 meses de gestação, seguido de uma atresia progressiva, na qual a quantidade de folículos decai para 1–2 milhões ao nascimento e 400.000–600.000 até ao início da vida reprodutiva, atingindo-se a menopausa com menos de 1.000 folículos remanescentes (9,10).

As diretrizes internacionais, nomeadamente da Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) e da Sociedade Europeia de Oncologia Médica (ESMO) recomendam que os médicos discutam o risco de infertilidade com todos os pacientes em idade reprodutiva diagnosticados com cancro, bem como os direcionem para consultas de preservação de fertilidade, o mais precocemente possível, uma vez que o sucesso terapêutico se encontra dependente da sua aplicação nas etapas iniciais das doenças oncológicas. Complementarmente, os sobreviventes de cancro que apresentam risco de infertilidade também deverão ter aconselhamento especializado e orientação, dado que poderão usufruir do uso de tecnologias de reprodução assistida (ART) para concretizar o seu desejo de parentalidade (11).

#### 1.1.1. A Infertilidade

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a infertilidade consiste na incapacidade de obter uma gravidez clínica após 12 meses de relações sexuais regulares e desprotegidas (12).

De acordo com vários estudos, estima-se que globalmente pelo menos 50 milhões de casais sofram de infertilidade. Em 2010, sensivelmente 10,5% das mulheres em todo o mundo apresentavam incapacidade de ter mais que um filho (**Figura 1**) e cerca de 2% incapacidade de ter um filho, sendo que a tendência será o aumento destes números (13).



**Figura 1-** Prevalência de infertilidade secundária em 2010. Adaptado de: Mascarenhas et al., (2012)

Sob outra perspectiva, a fertilidade encontra-se diretamente relacionada com a reserva ovárica, a qual é fortemente afetada pelas terapias oncológicas, levando à depleção e aceleração do término da reserva ovárica, dando assim origem a uma menopausa precoce (14).

#### 1.1.2. Oncofertilidade

Os últimos anos têm-se pautado por progressos notáveis, ao nível dos tratamentos oncológicos. No entanto, relativamente às complicações a longo prazo resultantes desses mesmos tratamentos, não é possível uma visão tão otimista. A infertilidade surge como um dos principais efeitos secundários mais devastadores em termos da estabilidade física e psicológica dos pacientes sobreviventes (15). O desejo de uma futura gravidez, pode assim tornar-se inatingível por diferentes motivos, isto é, pela doença em si ou resultar dos efeitos secundários de quimioterapia e/ou radioterapia, os quais se encontram dependentes da idade do paciente e do tipo de terapia aplicada (14).

Relativamente à quimioterapia, e no caso dos agentes alquilantes mais utilizados, a procarbazona, ciclofosfamida e o bussulfano apresentam características particularmente gonadotóxicas, sendo os principais responsáveis pela conseqüente insuficiência ovárica (14,16). A fração folicular em crescimento, ou seja, os folículos pré-antrais e antrais, é a mais afetada, provavelmente devido às elevadas taxas mitóticas e metabólicas que apresenta (17). Além disso, as ações citotóxicas não são específicas, tornando-as capazes de afetar o ciclo celular em diferentes estágios. Por outro lado, de acordo com alguns estudos, os inibidores da despolimerização de microtúbulos e agentes de intercalação de

DNA apresentam uma menor toxicidade do que os agentes alquilantes, bem como os compostos de platina, o metotrexato, o 5-fluorouracil e os alcaloides da vinca, que apresentam uma gonadotoxicidade bastante reduzida.

Sob outra perspectiva, a radioterapia pode ter um impacto direto ou indireto nos órgãos reprodutivos, dependendo da dose, idade do paciente, do local de tratamento e da terapia adjuvante (5). De acordo com Levine *et al.* (2015), os ovários apresentam diferentes níveis de sensibilidade de acordo com a idade da paciente, isto é, em adultos as doses superiores a 6 gray (Gy), em meninas pós-púberes, as superiores a 10 Gy e, em meninas pré-púberes, as doses maiores que 15Gy, envolvem um elevado risco de infertilidade. Adicionalmente, a radiação na região da pélvis (que pode provocar danos vasculares no útero), assim como a radiação sobre o cérebro em doses superiores a 35Gy, podem afetar de forma negativa o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal e, por conseguinte, a hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH) a qual é responsável pela libertação da hormona folículo estimulante (FSH) e pela hormona luteinizante (LH) (14). Mais recentemente, foram realizados estudos para determinar a dose de radiação necessária para destruir 50% dos ovócitos imaturos (DL<sub>50</sub>) sendo esta inferior a 2Gy, o que demonstra o elevado grau de sensibilidade dos ovócitos a radiações ionizantes (1,18).

A imunoterapia tem vindo a tornar-se uma abordagem cada vez mais difundida, uma vez que tem como princípio básico a utilização do próprio sistema imunológico do paciente para localizar e combater o cancro (imunoterapia inespecífica) ou por outro lado, estimular uma resposta imunitária adaptativa contra os antigénios tumorais (imunoterapia específica), permitindo que as células tumorais sejam eliminadas de forma seletiva e com menor toxicidade, induzindo memória imunológica, o que poderá teoricamente, retardar a recorrência destas neoplasias (13). Os tratamentos de imunoterapia utilizam maioritariamente citocinas, proteínas produzidas pelas próprias células do organismo como os interferões (IFs) e interleucinas (ILs), inibidores de *checkpoints* através do aumento da capacidade de resposta das células T, anticorpos monoclonais produzidos em laboratório e através de vacinas. Em relação aos efeitos colaterais apenas têm ocorrido reações cutâneas e sintomas semelhantes aos da gripe, não tendo sido ainda comprovado risco de infertilidade ou outra complicação a longo prazo (13).



## 1.2. Angiogénese, Esteroidogénese e Reserva Ovária

### 1.2.1. Regulação/ Estimulação da Angiogénese

A angiogénese consiste na formação de novos vasos sanguíneos, desempenhando assim um papel fulcral na embriogénese, na cicatrização de feridas e na progressão tumoral (19,20). Naturalmente, o crescimento das células endoteliais é regulado pelo equilíbrio entre os fatores endógenos pró-angiogénicos, tais como o VEGF e os fatores anti-angiogénicos, como a angiostatina e endostatina (20).

A via da angiogénese é também um fator importante a ter em conta nos tratamentos de preservação de tecido ovárico, mais propriamente na criopreservação, dado que a hipoxia e a isquémia são dois determinantes críticos para a sobrevivência pós-transplante. Em termos de depleção folicular, os resultados obtidos têm sido preocupantes, especialmente em espécies que contêm um córtex ovárico denso, o que poderá afetar a dinâmica do crescimento folicular, o ambiente hormonal e a restauração da fertilidade (21,22).

Como regulador chave da vascularização, o VEGF é fundamental para a regulação do crescimento e maturação foliculares, e na manutenção das funções ováricas. Conhecem-se três tipos de recetores diferentes para o VEGF: VEGFR-1 e VEGFR-2, que são expressos predominantemente em células endoteliais vasculares e o VEGFR-3, expresso principalmente em células endoteliais linfáticas (23).

O VEGFR-1 apresenta elevada recetividade aos tipos de VEGF-A, VEGF-B, PlGF e VEGF-F. Este recetor é essencial para a migração das células endoteliais e células estaminais, estando envolvido na mediação de processos de isquémia e inflamação, entre outros. Por outro lado, o VEGFR-2 apresenta elevada afinidade com o VEGF-A e VEGF-E e é expresso no início da vida embrionária durante a migração das células mesodérmicas, na diferenciação e proliferação de células endoteliais e na vasculogénese (23).

O VEGF-A, além de apresentar uma grande afinidade com os recetores é também um grande estimulador da angiogénese, ao contrário dos restantes tipos que apresentam uma baixa atividade angiogénica. De acordo com vários estudos, a ausência da expressão de VEGF-A origina um desenvolvimento do sistema vascular anormal e conseqüente morte durante o desenvolvimento embrionário (23,24). O desequilíbrio das suas concentrações

tem sido ainda implicado em diversos tipos de doença ovárica, como a síndrome do ovário poliquístico, a síndrome de hiperestimulação e o cancro de ovário.

O L-Mesitran Soft, que possui na sua composição 40% de mel de grau médico esterilizado com radiação gama, exibe uma capacidade de estimulação angiogénica comparável à do VEGF, através da expressão de níveis superiores de densidade endotelial e de uma aparente menor toxicidade celular, tornando-se uma alternativa viável em termos de tratamento de preservação de folículos primordiais *in vivo* e *in vitro* (21,25).

O mel de grau médico tem vindo a ser utilizado ao longo das últimas décadas no tratamento de feridas, dadas as suas propriedades antioxidantes e antibacterianas, as quais têm origem num fator "inibidor" - o peróxido de hidrogénio, formado pela reação enzimática da glicose oxidase (da abelha) com a glicose no mel diluído (26). Porém, apesar da sua longa utilização, são ainda pouco conhecidos os mecanismos envolvidos na sua atividade. Atualmente, existem evidências de que quando aplicado em feridas demonstra ser pró-angiogénico, visto que se observa um rápido desenvolvimento de tecido de granulação. Quando aplicado em córtex de tecido ovárico bovino *in vitro*, este apresentou uma densidade endotelial considerável (21,25) subsequentemente.

### 1.2.2. A esteroidogénese

A esteroidogénese é a via de conversão de colesterol em hormonas esteroides, de forma a assegurar o controlo de um vasto número de processos fisiológicos, desde o desenvolvimento fetal até à fase adulta (27). Este é um processo iniciado por duas proteínas fundamentais, que são produzidas nas células supra-renais e gonadais. Sendo assim, o processo é inicialmente mediado pela proteína reguladora aguda esteroidogénica (StAR) que promove uma rápida transferência do colesterol para a membrana mitocondrial interna (IMM). De seguida, a enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol (P450<sub>scc</sub>) ou CYP11A1, converte o colesterol em pregnenolona, o precursor de todas as hormonas esteroides (28). Uma deficiência na produção dessas duas proteínas impede assim a síntese das respetivas hormonas esteroides, ou no caso de deficiência no gene CYP11A1, a síntese de progesterona durante a gravidez com a consequente ausência da inibição da contração uterina (28).

O gene CYP11A1 catalisa três reações que ocorrem nos bovinos e em humanos, nomeadamente: 22-hidroxilação do colesterol, 20-hidroxilação do 22R-hidroxicolesterol

(bovino) e a cisão da ligação de carbono C20-22 do 20,22R-di-hidroxicolesterol (29). Estas estruturas cristalinas são úteis para a utilização de outros substratos para além do colesterol, como é o caso das vitaminas D2 e D3 (28,29) uma vez que este gene atua nestas duas formas, hidroxilando ambas em C20 e sendo regulado negativamente pela presença da vitamina D (30).

A vitamina D, é uma vitamina lipossolúvel composta por diversas formas que integra a família de hormonas esteroides. As vitaminas D2 (ergocalciferol) e D3 (colecalfiferol), constituem as formas essenciais na espécie humana. A vitamina D2 entra no organismo através da dieta, enquanto a vitamina D3 representa 95% da vitamina D produzida no corpo, sendo obtida através da exposição à radiação ultravioleta-B que promove a síntese do precursor da vitamina D (7-deidrocolesterol), sendo este convertido em colecalfiferol (31).

As ações biológicas da vitamina D estendem-se para além da regulação do metabolismo do cálcio, apresentando propriedades anticancerígenas, bem como capacidade para regular o sistema imunitário. Estas funções são aplicadas através do seu recetor VDR, que é um fator de transcrição dependente do ligante, localizado no núcleo das células alvo nos sistemas reprodutivo, endócrino e imunológico (31).

Segundo Parikh *et al.* (2016), o mRNA de VDR é expresso nas células da teca e nas células da granulosa, placenta e endométrio, o que sugere que a vitamina D se encontra relacionada com os processos de reprodução (31,32). De acordo com diversos autores, a deficiência de vitamina D é um problema a nível global, com grande impacto na fisiologia reprodutiva feminina (32–34), isto é, diferentes níveis de vitamina D podem promover uma desregulação do ciclo menstrual e aumentar o risco de formação de miomas uterinos. Os baixos níveis séricos são propícios ao desenvolvimento da síndrome do ovário poliquístico (SOP), um dos distúrbios endócrinos mais comuns em mulheres na idade reprodutiva (31,33).

Por outro lado, a vitamina D desempenha um papel importante na regulação da disfunção ovulatória (32). Todavia, os mecanismos envolvidos na regulação das quantidades necessárias de vitamina D ao nível da função reprodutiva, não são completamente conhecidos.

### 1.2.3. Falência Ovária Precoce

A função dos ovários dos mamíferos envolve o recrutamento cíclico, desenvolvimento e atresia dos folículos, ou seja, a manutenção da quiescência e a ativação de folículos primordiais que são fatores fulcrais para a reprodução (35). Contudo, apesar dos mecanismos de manutenção permanecerem desconhecidos, já foram identificados alguns reguladores, como é o caso da AMH, sintetizada pelas células da granulosa.

A AMH é uma glicoproteína dimérica produzida exclusivamente por folículos primordiais em desenvolvimento no ovário, através do seu recetor específico (AMHR2), que é responsável pela inibição do recrutamento excessivo de folículos em desenvolvimento pela FSH. A desregulação dos níveis séricos desta hormona provoca uma aceleração da depleção folicular e consequente redução de fertilidade (36,37).

Deste modo, surge a possibilidade de uma correlação entre a AMH e a vitamina D, uma vez que, de acordo com Merhi *et al.* (2014), a presença de vitamina D3 altera a sinalização da AMH e a esteroidogénese nas células do *cumulus*, em humanos (38). Além do mais, em casos de insuficiência ovária prematura ocorre uma diminuição significativa dos níveis de AMH. A administração de vitamina D poderá também ajudar a reduzir a velocidade de diminuição da reserva ovária (33). Por outro lado, em pacientes submetidos a transplante de tecido ovário, é frequente a deteção de níveis superiores de AMH antes da cirurgia comparativamente aos níveis relatados após 7 dias da intervenção. Este facto, aponta para uma provável isquémia dos folículos que segregam AMH (39).

A proteína membranar tipo I – VASN (Vasorina), é sobretudo expressa nas células musculares lisas vasculares, mas, recentemente foi detetada no ovário, em particular nas células da granulosa. A expressão de VASN é regulada positivamente pelos níveis de LH antes da ovulação, sendo esta proteína um regulador negativo dos folículos antrais, apresentando assim capacidade de manutenção da reserva ovária. Ao silenciar este gene, o número de folículos primordiais é significativamente reduzido em ovários pré-púberes de rato, o que reforça a importância da presença de VASN na capacidade protetora da reserva ovária (40).

### 1.2.3.1. Marcadores da Reserva Ovária

A foliculogênese depende da relação bidirecional entre o ovócito e as células somáticas adjacentes. A maioria das moléculas de sinalização responsáveis por esta interação pertence à superfamília do TGF- $\beta$ , dadas as suas capacidades de englobar processos como a proliferação, diferenciação, migração celular e apoptose. A superfamília TGF- $\beta$  é composta por várias subfamílias, como a AMH e o seu recetor AMHR2, a proteína VASN, fatores de crescimento e de diferenciação, entre outros (40).

Sob outro ponto de vista, a expressão de VEGF presente nas células da granulosa e da teca, através da ligação aos recetores de tirosina quinase, VEGFR1 e VEGFR2 no ovário, ocorre em resposta à estimulação de gonadotrofinas. De acordo com Serrano *et al.* (2016), a seleção de folículos ovários bovinos é influenciada pela expressão de VEGF, isto é, em termos de expressão dos níveis de mRNA de ambos os recetores, destaca-se a expressão nas células da teca, mais concretamente nos folículos não dominantes, o que permite concluir que a dominância folicular regula negativamente a expressão de mRNA de ambos os recetores e do próprio VEGF favorecendo, deste modo, o desenvolvimento folicular (24).

Consequentemente, uma desregulação de VEGF-A pode estar na origem de vários tipos de doenças ovárias, tornando assim o VEGF um importante regulador da expressão génica no útero e estando à semelhança de outros membros da superfamília TGF- $\beta$ , envolvidos na regulação do crescimento folicular, no desenvolvimento do corpo lúteo e na manutenção da função ovária (37).

Contudo, a inibição de VEGF pode influenciar vários fatores, entre os quais a AMH que é igualmente afetada pela supressão da secreção de gonadotrofinas. Neste contexto, os níveis séricos da AMH encontram-se intimamente relacionados com o número de folículos antrais e são independentes do eixo hipotálamo-hipófise-ovário. Logo, a tendência natural será os níveis desta hormona diminuírem com o envelhecimento até se tornarem indetetáveis após a menopausa o que permite, em termos clínicos, avaliar a reserva ovária (33,34). Por outro lado, o recetor AMHR2 é um único recetor da família TGF- $\beta$  expresso nas células da granulosa (37), sendo que os efeitos específicos da AMH são exercidos através deste recetor. É fulcral entender o mecanismo de ativação do gene AMHR2. De acordo com Kimura *et al.* (2017), ao contrário do que seria esperado, o

mecanismo não resulta diretamente da ação do promotor proximal mas sim de um RNA não codificante longo (lncRNA) transcrito a montante do gene AMHR2, uma vez que nas células da granulosa, o silenciamento de lncRNA-AMHR2 resulta na diminuição dos níveis de mRNA e aumento da atividade do promotor (41).

Por outro lado, e de acordo com trabalhos efetuados pelo nosso grupo, é de igual importância a avaliação da associação de genes da família priónica a genes ligados à esteroidogénese, dado que o silenciamento de genes priónicos está intimamente relacionado com a redução da expressão de genes essenciais à esteroidogénese como é o caso do CYP11A1 (42).

Por último, a proteína Vasorina, cujo domínio extracelular é constituído por séries ricas em serina à semelhança do fator de crescimento epidérmico e da fibronectina tipo III. Esta proteína é codificada por um gene altamente conservado, apresentando uma semelhança de 84% com os genes VASN humano e murino, sendo responsável por regular a sinalização de TGF- $\beta$  e foi recentemente detetada em análises de proteómica do fluido folicular humano de mulheres férteis. De acordo com Nitzan Rimon-Dahari *et al.* (2017), este gene é inclusivamente expresso em todos os estadios de desenvolvimento folicular nas células da granulosa (40).

Assim, através da avaliação das alterações nos níveis de expressão de VEGF, VEGFR2, AMH, AMHR2, VASN e CYP11A1 deverá ser possível avaliar a reserva ovárica, a regulação da sobrevivência dos folículos antrais e o estabelecimento do *pool* folicular ovárico.

## 2. Criopreservação

A criopreservação tem por base a preservação de material biológico, regra geral em nitrogénio líquido a temperaturas extremamente baixas (-130°C / -196°C), de modo a permitir interromper a atividade celular por tempo ilimitado (43). Porém, há que ter em conta que consoante o tipo de célula, tecido ou órgão é necessário ajustar um conjunto de condições, entre as quais a utilização de crioprotetores (CPAs), de forma a evitar criodanos causados pela formação de cristais de gelo e pelas alterações das concentrações dos fluídos intracelulares (44,45).

Os processos de vitrificação de ovócitos, embriões e de tecido ovárico são essenciais na preservação de fertilidade (46,47). A criopreservação atualmente é também umas das principais fontes de armazenamento do material biológico animal, permitindo restituir a diversidade genética que se encontra ameaçada (1,48,49). Contudo, apesar de ser uma técnica essencial na área da biotecnologia, os efeitos causados pela congelação/descongelação ao nível do genoma e das próprias células ainda não são totalmente conhecidos, sabendo-se apenas que alterações epigenéticas poderão associar-se a danos genéticos e conseqüentemente afetar a viabilidade celular (50). Assim, é fundamental desenvolver novos protocolos que para além da utilização de CPAs, recorrem a substâncias com menos riscos potenciais, como é o caso do mel de grau médico (*L-Mesitran Soft, Triticum*) que apresenta capacidade angiogénica e baixa toxicidade celular, no caso específico do córtex de tecido ovárico bovino (21).

Dadas as restrições éticas e práticas da investigação no campo da reprodução humana, são utilizados frequentemente modelos animais que apresentam semelhanças consideráveis, como é o caso do modelo bovino, o qual tem vindo a ser utilizado na área da embriologia como modelo *in vitro* de pré-implantação, dadas as suas analogias fisiológicas (ovulação única, maturação dos ovócitos e metabolismo embrionário) e o modelo do rato, o qual é mais apropriado para estudos de pós-implantação devido a semelhanças com a fase de placentação dos humanos (51).

## 2.1. Métodos de Criopreservação

A criopreservação de ovócitos e de embriões é fundamental nas técnicas de reprodução assistida e na preservação da fertilidade. No entanto, no que diz respeito à restauração da função endócrina ovárica, tal só é possível por meio de criopreservação do tecido ovárico e posterior transplante (52). Neste contexto, a técnica padrão tem consistido na congelação lenta com a utilização de CPAs, diminuindo assim a possibilidade de danos nas funções enzimáticas ou no desenvolvimento celular e/ou embrionário (1,53).

A técnica de vitrificação, consiste num método ultrarrápido que permite a solidificação intra e extracelular, sem requerer equipamento para programar a curva de congelação e possibilitando a criopreservação de um maior número de amostras. De facto tem vindo a demonstrar bons resultados ao nível da conservação morfológica das estruturas foliculares com a utilização de quatro CPAs (etilenoglicol, propilenoglicol, sacarose e

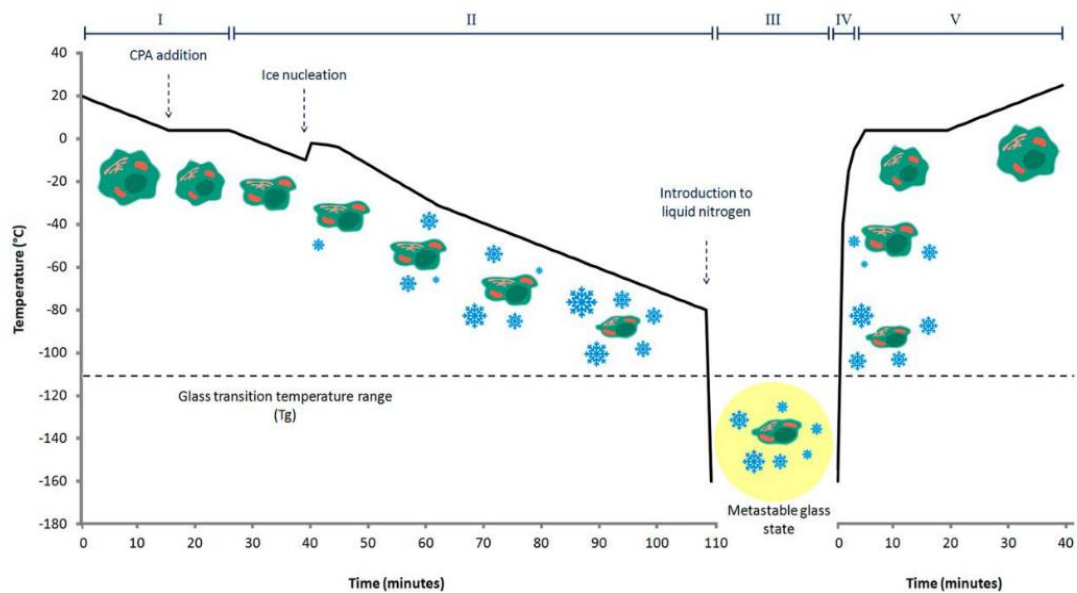
ficol), assim como com o equilíbrio das temperaturas extremamente baixas que permitem diminuir os efeitos tóxicos dos crioprotetores (54).

Recentemente, Suzuki *et al.* (2015), utilizaram o método de vitrificação para a criopreservação de tecido ovárico humano (55) e num estudo anterior, Amorim *et al.* (2012), demonstraram a possibilidade de criopreservação de folículos pré-antrais, de tecido ovárico de babuíno também através da vitrificação (56). Em conclusão, serão necessários mais estudos para comprovar que a vitrificação é um método eficaz para a restauração da fertilidade na espécie humana.

#### 2.1.1. Congelação Lenta

A congelação lenta envolve várias etapas distintas, apresentando como principal vantagem a utilização de concentrações baixas de CPAs, o que leva a uma taxa de formação de cristais de gelo bastante elevada, além de requerer a utilização de equipamentos dispendiosos (1). A primeira etapa consiste na preparação das amostras para a congelação, em que estas são submetidas a temperaturas de 0 a -4°C de forma gradual (-1°C/minuto) até se atingir o ponto de equilíbrio entre as amostras e as soluções de CPAs. Geralmente, a nucleação de gelo ocorre aos -7°C, o que pode ser induzido pela adição de um agente de nucleação à solução de CPAs ou por nucleação ativa. Na terceira fase, prossegue o arrefecimento até aos -80°C, momento em que a desidratação celular é atingida, seguindo-se a imersão das amostras em nitrogénio líquido (-196°C), atingindo o estado criogénico. As últimas duas etapas são a descongelação rápida das amostras e a remoção dos CPAs, a uma temperatura entre os 20°C e 40°C (57) (**Figura 2**).





**Figura 2-** Etapas da criopreservação pelo método de congelação lenta. Adaptado de: Gurruchaga et al., (2018).

### 2.1.2. Vitrificação

A vitrificação é um método que se destaca pela sua elevada eficácia na eliminação da formação de cristais de gelo através do uso de volumes mínimos, taxas ultrarrápidas de congelação/desvitrificação e altas concentrações de CPAs (58–60). Numa fase inicial, as amostras são expostas a CPAs permeáveis e não permeáveis, geralmente etilenoglicol (EG), dimetilsulfóxido (DMSO), 1,2-propanediol (PROH) e sucrose, durante um período de 25 segundos a 5 minutos. Posteriormente, o material biológico é colocado diretamente em contato com o nitrogénio líquido habitualmente num sistema aberto, assegurando o arrefecimento ultrarrápido e formando um sólido semelhante a vidro em que a água existente não se expande, mas solidifica (1,61,62). Em alternativa, são utilizados sistemas fechados em que, tal como o próprio nome indica, não ocorre contato direto entre a amostra e o nitrogénio líquido.

Todavia, o sucesso deste método não depende das taxas de solidificação mas sim da desvitrificação, uma vez que através dos sistemas abertos, este é realizado de forma ultrarrápida enquanto que nos sistemas fechados, as amostras são submetidas a uma fase intermédia durante a sua remoção dos dispositivos selados, o que pode dar origem à formação de cristais de gelo e condicionar a sobrevivência celular (63).

Estudos recentes apontam para taxas de sobrevivência em ovócitos humanos vitrificados de aproximadamente 100%, com 93% de clivagem e 56% de embriões a atingir o estágio de blastocisto, enquanto que no caso da congelação lenta, as taxas rondam os 89%, 90% e 51% respetivamente (62). De forma complementar, a utilização de EG, DMSO e sucrose tem demonstrado não afetar a morfologia, nem os níveis de expressão génica e vascularização pós transplante (64,65). Como resultado dos estudos *in vivo* em humanos e bovinos, a vitrificação tem vindo a assumir-se gradualmente como técnica de referência na preservação de ovócitos (47).

## 2.2. Criopreservação do Tecido Ovário

O sucesso do transplante de tecido ovário previamente colhido e conservado, nomeadamente a recuperação da função endócrina e de fertilidade, tem sido suportado amplamente na literatura, destacando-se a existência de mais de 130 nascimentos a nível global (54,66,67)

A criopreservação de tecido ovário pode ser aplicada antes de ser atingida a maturidade sexual, tornando-a a única técnica disponível para meninas pré-púberes. O tecido criopreservado pode posteriormente ser fixado no ovário remanescente, ligamento largo ou peritoneu da fossa ovárica, permitindo uma conceção natural e não necessitando de estimulação ovárica (3). O método mais utilizado para criopreservar tecido ovário é a congelação lenta apesar de, tal como referido anteriormente, o número de relatos de nascimentos após o transplante de tecido ovário vitrificado e aquecido ter vindo a aumentar (17,68).

Apesar de desde o ano 2000 ser possível a recuperação da atividade folicular em tecido ovário criopreservado humano (69) e de em 2013 ter ocorrido o nascimento de gémeos após transplante heterotópico de tecido ovário criopreservado (70), atualmente em Portugal esta técnica apenas se encontra disponível no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra – Centro de Preservação de Fertilidade, que em 2015 realizou com sucesso o primeiro autotransplante de tecido ovário.

Contudo, apesar de ser uma técnica promissora, ainda mantém o rótulo de experimental. É necessário aperfeiçoar os protocolos laboratoriais, bem como promover a eficácia da revascularização e diminuição da isquémia (59). De acordo com Adams e Pierson (2010), e tal como referido anteriormente, a espécie bovina é o melhor modelo para estes estudos,

apresentando semelhanças ao nível da fisiologia ovárica, desenvolvimento folicular e dos estádios iniciais da embriogênese, não tendo, por outro lado, as restrições éticas e práticas dos estudos com modelos humanos (71).

#### 2.2.1. Cultura *in vitro* de tecido ovárico criopreservado

O isolamento da região cortical, que envolve aproximadamente 90% da reserva folicular, a partir de tecido ovárico e a subsequente cultura *in vitro*, permite minimizar os riscos de transmissão e reimplantação de células malignas do tumor primário. Outra das formas de diminuir o risco será recorrendo a terapêuticas antineoplásicas, tais como técnicas de diagnóstico (histologia), de genética molecular, entre outras (72).

O aperfeiçoamento da cultura *in vitro*, irá contribuir para a recuperação da dinâmica folicular *in vitro*, após a sua interrupção por meio da criopreservação, para posterior maturação e fertilização *in vivo*. Têm vindo a ser otimizados *in vitro* processos de ativação folicular e cultura de folículos pré-antrais de ratinhos, humanos, animais domésticos de grande porte e em primatas não humanos (*macaco-rhesus*) (73).

Outra abordagem atualmente utilizada *in vitro*, são os sistemas de cultura tridimensional (3D), em que os folículos humanos ou de ratinho mantêm uma estrutura 3D intacta sem contato direto com o meio de cultura, conservando as ligações celulares e da matriz, as quais são fundamentais para a regulação do desenvolvimento folicular *in vivo*. Regra geral, são utilizados hidrogéis de alginato que proporcionam condições adequadas para o desenvolvimento folicular. Porém, para que esta técnica seja aplicada na espécie humana é necessário ter em conta diversos fatores, tais como as técnicas de isolamento aplicadas, as propriedades físicas da matriz, o conteúdo dos meios de cultura, a seleção folicular e os estádios dos restantes folículos que se encontram em crescimento, uma vez que na fase folicular precoce o número de folículos viáveis é considerável, o que, no entanto, não sucede após a seleção do folículo dominante (74). Por último, pacientes com insuficiência ovárica primária, poderão vir a usufruir da utilização de inibidores do gene PTEN (homólogo da fosfatase e tensina) simultaneamente com peptídeos estimuladores da via PI3K (Fosfoinosítideo 3-quinase), de modo a promover a ativação precoce de folículos primordiais *in vitro* para posterior transferência através do transplante dos fragmentos corticais, para dar origem a ovócitos maduros posteriormente submetidos a fertilização *in vitro* e transferência dos embriões (75,76). Em conclusão, a cultura *in vitro*, permite estudar diretamente diversos tratamentos (o que não seria possível *in vivo*), e é uma etapa

indispensável sempre que se venha a comprovar a necessidade de ativação folicular *in vitro*.

### 2.3. Avaliação da Viabilidade dos tecidos

A viabilidade dos tecidos e a integridade funcional dos mesmos, nomeadamente dos folículos, é essencial para preservar o potencial reprodutivo, dos tecidos criopreservados. De modo a avaliar o crescimento folicular *in vitro* ou a viabilidade celular são utilizadas diversas metodologias, tais como ensaios de proliferação e apoptose celular, de citotoxicidade, avaliação da expressão génica, entre outros (77).

A viabilidade celular é determinada pelo número de células viáveis presentes na amostra, baseando-se habitualmente na análise da atividade enzimática, permeabilidade da membrana celular, atividade de captação de nucleotídeos e produção de ATP. A escolha do ensaio de viabilidade e integridade estrutural adequado deve ter em conta o tipo de célula e as condições de cultura (77).

#### 2.3.1. Avaliação Imunohistoquímica

A utilização de tecido fixado em formalina e embebido em parafina para diagnóstico histológico, imunohistoquímico e por hibridização *in situ* (78), permanece ainda como o método de eleição para analisar tecidos.

Segundo Yuzhakov *et al.* (2018), para a realização de estudos morfofuncionais complexos, a utilização de marcadores histológicos como o Ki-67 continua a ser essencial (79). Ki-67 é uma proteína nuclear, que se encontra em todos os vertebrados e que é expressa nas células em proliferação. Este facto, permite a classificação de tumores através da análise da taxa de divisão celular, considerando-se um marcador de agressividade tumoral. A proteína Ki-67 possui uma semivida de apenas 1h-1,5h, tendo capacidade de codificar duas isoformas de proteínas com pesos moleculares entre os 345 e 395kDa (78).

O antígeno Ki-67 encontra-se presente em todas as fases do ciclo celular com exceção da fase G0. Durante a anáfase e telófase (G1 e S) verifica-se a diminuição dos seus níveis, seguida de um aumento acentuado no início da mitose e novamente de um decréscimo na fase seguinte. Relativamente ao ciclo celular das células somáticas, uma vez que incluem divisões nucleares e citoplasmáticas, citocinese e mitose é possível a avaliação do

desenvolvimento folicular através deste marcador, dado o facto de reconhecer um antígeno nuclear específico da proliferação celular (1,78).

Em resposta a *stress* celular e/ou danos no DNA são desencadeados mecanismos apoptóticos, os quais se subdividem em duas vias: a via extrínseca, em que ocorre a ligação de células que sofrerão apoptose a recetores localizados na membrana celular e a ligantes (sistema Fas-FasL) e a via intrínseca/mitocondrial que engloba genes anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-X, Bcl-in, Mcl-1) e genes pro-apoptóticos (Bax, Apaf-1, Noxa, caspase 3). Porém, em ambas as vias ocorre a ativação da família de proteases de cisteína, como a caspase 3 e caspase 8, que atuam na cascata proteolítica, de modo a remover as células em degeneração (64).

A caspase-3 é uma caspase efectora, clivada pelas caspases iniciadoras 8 e 9 nas subunidades p12 e p17. Posteriormente, uma vez ligadas às proteínas adaptadoras, a proteína caspase-3 dimeriza, o que origina a clivagem num dos seus domínios específicos de protease. Uma vez ativa, a caspase 3, ativa a caspase 2 e 6, desempenhando assim um importante papel na mediação da sinalização de apoptose (80). No tecido ovárico, a atresia folicular associa-se à apoptose. Em particular, o gene da caspase-3 é expresso nas células da granulosa de folículos em apoptose e especialmente nos folículos antrais (81).

O normal desenvolvimento dos folículos é dependente do processo angiogénico, o qual tem início com a proliferação capilar (composta pela fragmentação da membrana basal dos vasos existentes e migração e proliferação das células endoteliais) e termina na formação de arteríolas, capilares e vénulas. Ao longo do crescimento dos tecidos, as células endoteliais vasculares apresentam taxas mitóticas iguais ou superiores às taxas de crescimento de tumores bastante agressivos. No que se refere aos folículos ováricos, o aumento da sua vascularização é um fator crucial na dominância folicular, sendo capazes de produzir fatores angiogénicos, tais como o VEGF e FGF (82).

Para um melhor esclarecimento da função dos fatores de crescimento no desenvolvimento folicular, é necessária a utilização de antígenos como o Factor VIII, exclusivamente sintetizado pelas células endoteliais, mais especificamente nos corpos de *Weibel-Palade* e nos megacariócitos. O Factor VIII é uma glicoproteína presente no plasma humano, apresentando capacidade de coagulação do sangue, uma vez que geralmente se liga ao Fator de von Willebrand (glicoproteína multimérica), regulando a adesão de trombócitos ao tecido conjuntivo subendotelial (83). Desta forma, a marcação imunohistoquímica do

antígeno do Factor VIII poderá ser útil na avaliação da densidade endotelial em tecido ovárico de bovino (21,84).

### 2.3.2. Avaliação por LDH

É imprescindível o controle da integridade funcional dos tecidos criopreservados, o qual pode ser feito através de ensaios de fragmentação de DNA de células de ovócitos e/ou granulosa ou através de marcadores bioquímicos de citotoxicidade, como o ensaio de lactato desidrogenase (LDH) que é uma técnica de baixo custo que permite a obtenção de resultados de forma rápida (1,85). De acordo com Cirelli *et al.* (2000), aproximadamente 80% da liberação de LDH ocorre durante as primeiras três horas pós descongelação (86). Os ensaios de citotoxicidade como o de LDH são uma alternativa colorimétrica aos ensaios com liberação de Crômio-51 ( $^{51}\text{Cr}$ ), facilitando a análise da atividade enzimática citoplasmática através da avaliação da percentagem de lise celular caracterizada pela rotura da membrana citoplasmática, a qual é avaliada pela quantidade de enzima citosólica estável (LDH) libertada para o meio extracelular. Esta dá origem a uma reação de conversão de um sal de tetrazólio em formazano vermelho. Assim, os níveis de absorvância obtidos pela quantidade de cor existente correspondem ao número de células lisadas (87).

### 2.3.3. Avaliação da expressão genética

A técnica de PCR em tempo real e RT-qPCR envolve quatro etapas: extração de RNA, conversão do RNA em cDNA, qPCR e análise dos resultados obtidos. A técnica apresenta níveis de sensibilidade, precisão e velocidade muito elevados (88,89) .

Estes resultados são sempre padronizados através da utilização de genes de referência para normalizar os resultados (90), servindo também como controlos internos (88).

Ainda não são claros os efeitos da criopreservação por vitrificação na expressão genética do tecido ovárico. De acordo com Mazoochi *et al.* (2009), a vitrificação provoca alterações na expressão de genes anti-apoptóticos e pró-apoptóticos, o que não significa necessariamente que ocorra apoptose ao nível ultra estrutural (64). Apesar de a maioria dos estudos indicarem que a vitrificação afeta a expressão de genes essenciais da angiogénese é necessário ter em conta que a escolha dos genes de referência é essencial. No caso particular do tecido ovárico humano criopreservado, e relativamente aos genes

de referência, são as proteínas  $\beta$ -actina (ACTB), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), Ciclofilina B (Ciclo) e HSP90 (91,92), enquanto que no tecido ovárico bovino os mais adequados são a microglobina beta-2 (B2M), GAPDH, RPLP0 e ACTB (93,94), sendo que a escolha destes genes deverá ser sempre adaptada a cada caso em concreto (95).

Na avaliação da preservação do *pool* de folículos ováricos, a AMH e o seu recetor AMHR2 são de elevada importância, enquanto que no caso da vascularização se destaca o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e os seus recetores VEGFR1 e VEGFR2 (37) assim como a proteína VASN (40), e o gene CYP11A1 na síntese de hormonas esteroides (42,96,97).

#### 2.3.4. Avaliação Epigenética

A epigenómica, estuda os diversos mecanismos envolvidos na regulação da expressão génica. Tem vindo a ser demonstrado que as alterações das condições ambientais e dos padrões epigenéticos influenciam o desenvolvimento de diversas patologias. A regulação epigenética pode efetuar-se através de vários mecanismos entre os quais: metilação de DNA, modificações das histonas e nucleossomas, e expressão de microRNAs (miRNAs) (98).

A metilação do DNA consiste numa modificação química do mesmo, que afeta a transcrição genética (99). Até ao momento, a maioria dos estudos focaram-se na análise da metilação da região promotora adjacente ao local de início da transcrição e nos elevados níveis de 5-mC (citosina convertida em 5-metil-citosina) associados ao silenciamento da transcrição. Não obstante esse facto, recentemente foi comprovado que a metilação na região promotora não bloqueia na totalidade a transcrição e pode ainda regular o *splicing* (100). Ademais, a paisagem genómica apresenta uma variação marcante na distribuição de diversas características, incluindo elementos transponíveis, conteúdo CG, ilhas de dinucleótidos CpG, taxa de recombinação e inúmeros genes (101).

Sensivelmente, 70% de todos os genes humanos possuem ilhas CpG na região promotora, sendo estas suscetíveis a metilações que podem alterar a expressão genética. Ainda permanecem por esclarecer diversas questões, nomeadamente o momento em que ocorre a metilação nas ilhas CpG e a origem da metilação, isto é, se é uma consequência

secundária do envelhecimento ou das condições ambientais, assim como qual a função da metilação em ilhas CpG em regiões não promotoras (102).

Recentemente, têm vindo a ser publicados estudos que demonstram a relevância da regulação epigenética de regiões não promotoras (102). No âmbito da reprodução humana, para além de alterações genéticas dos ovócitos que podem associar-se à diminuição da função ovárica, esta situação poderá ter origem ao nível de alterações epigenéticas, responsáveis pelo processo de envelhecimento celular e desenvolvimento de doenças complexas. Uma vez que, a perda da função ovárica é um dos fenótipos de envelhecimento mais habituais em humanos, é fundamental compreender os mecanismos epigenéticos que se encontram envolvidos quer na reprodução humana quer no envelhecimento em geral (100), mas também desenvolver métodos que permitam a deteção de ilhas CpG úteis ao desenvolvimento de marcadores genómicos (99).

#### 2.4. Resultados da criopreservação de tecido ovárico

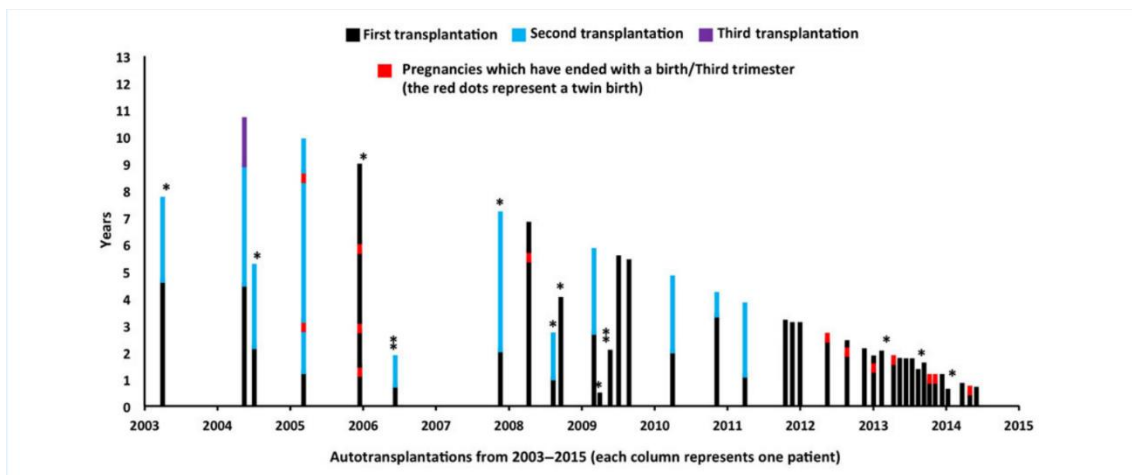
Ao longo dos últimos 60 anos têm sido estudadas diversas abordagens de modo a melhorar a criopreservação e o posterior transplante do tecido ovárico. Em 1999, foi realizado por Oktay o primeiro transplante de tecido ovárico criopreservado humano e, em 2004, Donnez *et al.*, descreveram o primeiro nascimento humano derivado de tecido ovárico criopreservado seguido de autotransplante ortotópico. Em 2011 ocorreu o primeiro nascimento após transplante heterotópico de tecido ovárico criopreservado (103).

De acordo com diversos autores, o autotransplante de tecido ovárico criopreservado permite a restauração da função endócrina, quer antes quer depois de atingida a maturidade sexual (103). Porém, apenas foi relatado um caso que evidência a maturação espontânea *in vivo* de ovócitos provenientes de fragmentos extraídos de meninas durante a puberdade e antes do início da vida reprodutiva (104).

Com base nos resultados obtidos por Van der Ven *et al.* (2016), de cerca de 74 transplantes ortotrópicos, aproximadamente 67% apresentaram actividade ovárica com nascimentos em 33% das pacientes (103). Apesar de ainda ser considerado um procedimento experimental a nível global, a criopreservação e transplante de tecido ovárico humano permitiu a recuperação da actividade ovárica em 95% dos casos e mais de 130 nascimentos (105,106).



Adicionalmente, segundo Jensen *et al.* (2015), o tecido ovárico criopreservado reimplantado por autotransplante ortotópico apresenta uma duração média de cerca de 4-5 anos (107) (**Figura 3**). Ambos os tipos de transplante podem ter longevidade maior atingindo os 10 anos, sendo contudo necessário ter em conta que a duração média da função ovárica se encontra diretamente relacionada com a densidade folicular no momento da criopreservação do tecido (105,108).



*Figura 3 - Duração do enxerto e ocorrência de nascimentos após autotransplante de tecido ovárico. Um asterisco representa pacientes cujos enxertos deixaram de ter resultados positivos e dois asteriscos representam pacientes que faleceram. Adaptado de: Jensen et al., (2015)*

### 3. Transplante de Tecido Ovário

A criopreservação de tecido ovárico e seu posterior transplante, para além das vantagens anteriormente mencionadas, destaca-se pelo facto do tecido conter um elevado número de folículos primordiais e primários, os quais demonstram ser mais criotolerantes devido às baixas taxas metabólicas e à sua localização no córtex avascular mais externo, onde se encontram os principais fatores angiogénicos (VEGF, VEGFR1 e VEGFR2), permitindo uma eficiente vascularização. Isto é, numa primeira fase, dado o facto dos folículos pré-antrais não englobarem uma rede vascular específica, a nutrição e oxigenação ocorre maioritariamente através de uma única camada de finos vasos sanguíneos do estroma, ainda que ocorra a formação residual de uma rede capilar em torno dos folículos. Numa segunda fase, já em estágios mais tardios, ocorre uma reorganização do estroma, com a formação de uma camada interna composta por inúmeros vasos sanguíneos (teca interna) e uma camada externa constituída por tecido conjuntivo fibroso na sua grande maioria (teca externa) (109,110). O número e o diâmetro dos vasos sanguíneos é diretamente proporcional ao desenvolvimento folicular, o que permite a formação de redes capilares

que circundam os folículos e fornecem nutrientes, quer às células da teca, quer às células da granulosa (111).

Não está ainda esclarecido qual o mecanismo compensatório que permite o bom funcionamento do enxerto, mesmo com níveis reduzidos de AMH e elevados níveis de FSH após o transplante (47). De acordo com Winkler-Crepaz *et al.* (2016), a capacidade do tecido autotransplantado recrutar os folículos remanescentes poderá estar relacionada com a via PI3K/PTEN/Akt, já que a reserva ovárica e taxa de recrutamento de folículos primordiais vai diminuindo, de modo a manter a reserva ovárica e a dormência folicular (47,112).

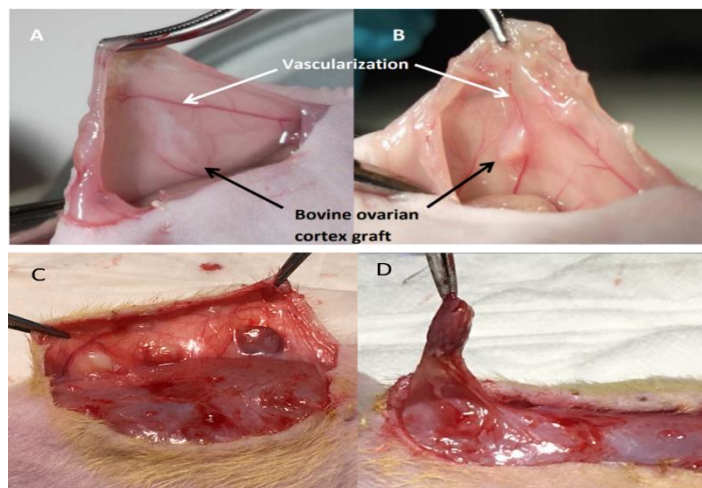
Um dos fatores, senão o mais crucial, para o êxito da técnica de transplante de tecido ovárico está diretamente relacionado com a velocidade de revascularização, de modo a evitar lesões isquémicas, as quais ocorrem maioritariamente ao longo dos primeiros dias após a cirurgia. De acordo com estudos recentes, apesar da deteção de regiões necróticas 7 dias após o transplante, parece haver uma recuperação da viabilidade dos enxertos, através da reoxigenação progressiva do tecido ovárico (113–115).

No âmbito do transplante ortotópico, o tecido é reimplantado no seu ambiente fisiológico, o que contribui consideravelmente para o sucesso da técnica. No caso do tecido ovárico, o facto de ser colocado na cavidade pélvica proporciona um ambiente ideal para o desenvolvimento folicular, dadas as condições de temperatura, pressão, irrigação sanguínea e fatores parácrinos. Todavia, esta opção apresenta algumas desvantagens, nomeadamente o risco de reimplantação de células neoplásicas, o qual poderá ser minimizado através do isolamento dos folículos antes e depois da criopreservação, mas nunca evitado por completo. Acresce que o número de fragmentos que podem ser transplantados em cada intervenção é limitado (116).

Embora tenham vindo a ser obtidos resultados encorajadores desde 1994 na área de produção animal, e nomeadamente em ovinos e caprinos, apenas em 2004 ocorreu o primeiro nascimento com sucesso em humanos por meio da criopreservação e posterior autotransplante do tecido ovárico (116). Liu *et al.* (2008), comprovaram, em ratinhos, a possibilidade de uma vida reprodutiva normal após autotransplante (117).

O transplante heterotópico pode ser realizado no ratinho na cavidade da bursa, na cápsula renal ou por via subcutânea. Contudo, independentemente do local do transplante haverá sempre um efeito de hipoxia responsável pelo processo de isquémia. Há vários casos

descritos que apresentam um declínio significativo da densidade folicular associado a um aumento do crescimento folicular. Estes fenómenos poderão estar relacionados com a interrupção da regulação do desenvolvimento folicular através da criopreservação e das baixas taxas metabólicas dos folículos primordiais mencionadas em capítulos anteriores (112,116).



**Figura 4-** Xenotransplante num ratinho de tecido ovárico bovino.  
A e B - Recuperação após 2 e 4 semanas, adaptado de: Langbeen *et al.*, (2015).  
C e D - Recuperação após 7 e 28 dias, obtidos durante este estudo.

Ao compararmos o autotransplante com o xenotransplante, tornam-se evidentes as vantagens do transplante heterotópico, dado ser uma técnica minimamente invasiva, que permite a recuperação de ovócitos e monitorização de processos neoplásicos. No entanto, ao contrário do que ocorre no transplante ortotópico, neste caso é necessária a utilização de técnicas de reprodução assistida para conseguir a produção de embriões (116,118).

Os transplantes heterotópicos não fornecem um ambiente fisiológico ideal e no caso particular da mulher, já foram testados diversos locais de transplante (no ligamento largo, músculo reto, antebraço, tecido subcutâneo do abdómen e tecido subperitoneal). O tecido subcutâneo do abdómen é, no ratinho, um dos locais que permite um ambiente fisiológico mais adequado para o desenvolvimento folicular, tal como é possível verificar na **Figura 4** em que foram transplantados fragmentos de tecido ovárico bovino em ratinho e rato e 7 dias após o transplante é visível a olho nu a envolvência do tecido no organismo (110,116). Luyckx *et al.* (2013), demonstrou a existência de elevadas taxas de sobrevivência folicular de tecido ovárico pré-púbere criopreservado de ratinhos, através da retenção de um grande *pool* de folículos primordiais dormentes no enxerto (119). Já na espécie humana, em 2013, foi relatada a primeira gravidez clínica, após transplante heterotópico de tecido ovárico criopreservado realizado na parede abdominal anterior (em

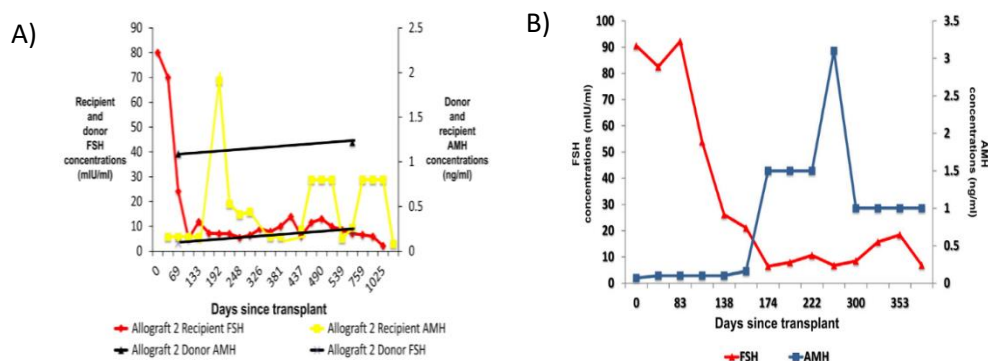
localização subperitoneal), numa paciente anteriormente submetida a ooforectomia bilateral (120).

### 3.1. Longevidade do tecido ovárico transplantado

A localização do transplante é um dos elementos chave para a sobrevivência do enxerto, sendo que no caso dos transplantes ortotópicos, o tecido ovárico pode ser colocado na bursa ovárica no ratinho, ou no antebraço na mulher, enquanto que nos transplantes heterotópicos é frequentemente colocado sob a pele do antebraço ou no abdómen, de modo a ser possível a sua monitorização por ultrassonografia (110).

O período de revascularização, é uma etapa fulcral para a sobrevivência folicular aos danos isquémicos, dado que os fragmentos de tecido implantados não contêm vasos sanguíneos.

Apesar de não ser possível determinar a longevidade do tecido ovárico transplantado, sabe-se que o enxerto necessita de 4 a 5 dias para ser reoxigenado. No caso dos ratos, foram detetados vasos funcionais a partir do 7º dia e em humanos desde o 5º dia após transplante, seguindo-se de uma gradual oxigenação nos 5 dias seguintes (121). Silber *et al.* (2015), referem que o reinício dos ciclos menstruais ovulatórios e níveis séricos normais de FSH ocorrem 77-142 dias após autotransplante e 130-170 dias após alotransplante. Os níveis de AMH, permanecem inicialmente baixos, aumentando em resposta ao desenvolvimento folicular estimulado pelas gonadotrofinas, voltando a níveis bastante reduzidos sensivelmente em 240 dias (**Figura 5**) (122–124).



**Figura 5-** A) Níveis de FSH e de AMH após alotransplante. B) Níveis de FSH e de AMH após autotransplante de tecido ovárico criopreservado. Adaptado de: Silber *et al.*, (2015)

---

## *Capítulo II - Objetivos*

---

Com este projeto, pretendemos avaliar a influência do L-Mesitran Soft, como alternativa a outros fármacos (VEGF e Vitamina D), na estimulação da angiogênese, preservação da reserva ovárica e esteroidogênese, em diferentes etapas do processo de criopreservação e posterior transplante.

Utilizaremos tecido ovárico bovino em cultura *in vitro* e posterior transplante em ratos fêmea *Rowett Nude* (RNU) imunodeprimidos, previamente ovariectomizados e avaliaremos:

- Os efeitos do processo de criopreservação e cultura *in vitro* com L-Mesitran, VEGF e Vitamina D, em termos de citotoxicidade celular.
- Os níveis de proliferação celular, apoptose celular e densidade endotelial com marcadores específicos (Ki-67, Caspase-3 e Fator VIII) durante a cultura *in vitro* e após remoção ao 7º e 28º dia do modelo *in vivo*.
- Analisar os padrões de metilação dos genes VASN e AMH, durante as 48 horas de cultura e 7 dias após transplante.
- A preservação do *pool* dos folículos ováricos, a angiogênese e a esteroidogênese através da análise de expressão genética, *in vitro* e 7 dias após o transplante (AMH, AMHR2, VEGF, VEGFR1, VEGFR2, CYP11A1 e VASN).

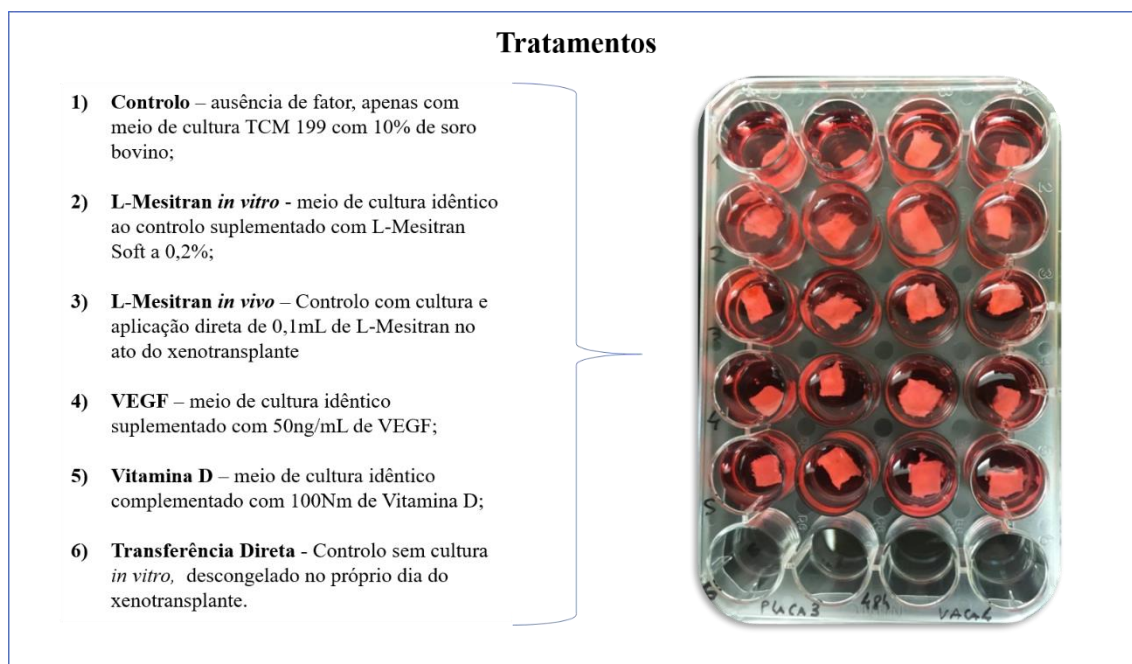
---

## *Capítulo III – Material e Métodos*

---

## 1. Desenho Experimental

O presente trabalho foi realizado *in vitro* e *in vivo* com objetivos idênticos, sendo os ensaios constituídos por seis grupos (**Figura 6**) e os fragmentos criopreservados distribuídos aleatoriamente pelos diversos grupos delineados:



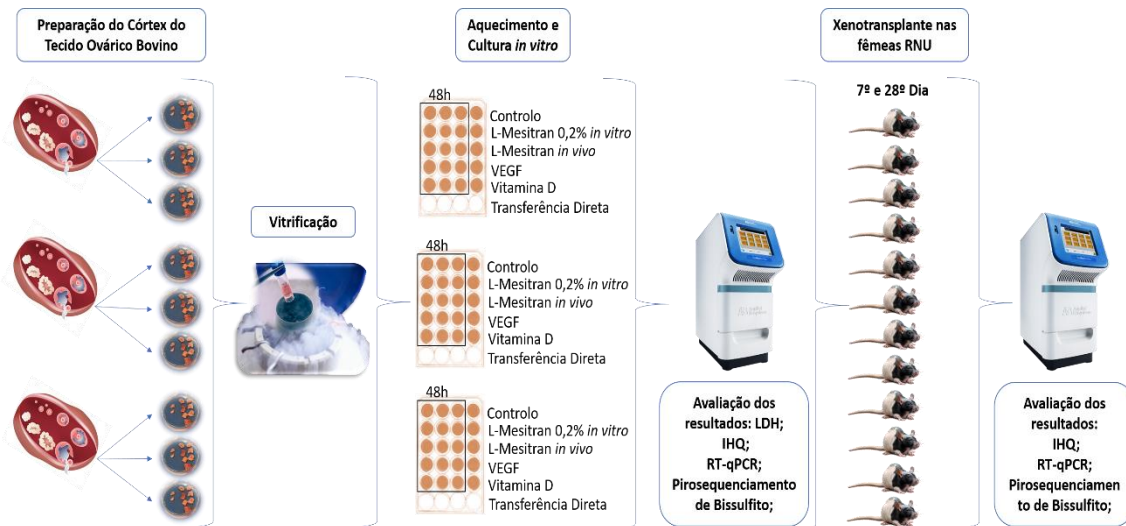
**Figura 6-** Descrição dos grupos em estudo.

Após a criopreservação e cultura *in vitro* durante 48 horas, o sobrenadante da cultura foi avaliado em termos de citotoxicidade celular através do doseamento da concentração de LDH no meio de cultura. Dos 187 fragmentos de tecido ovárico bovino criopreservado, 9 foram analisados ao tempo zero, 45 foram estudados *in vitro* durante 48 horas e 74 foram transplantados para ratos fêmea imunodeprimidos, previamente ovariectomizados, perfazendo um total de 12 fêmeas (2 fêmeas por tratamento) e removidos após 7 e 28 dias.

Os fragmentos *in vitro* e *in vivo* foram avaliados em termos histológicos, o que permitiu a contagem de folículos primordiais, primários e secundários, imunohistoquímicos, com o marcador Ki-67 (indicador de proliferação celular), o marcador da Caspase 3 (indicador de apoptose celular) e o Factor VIII (indicador da densidade endotelial), dos níveis de expressão genética, através da técnica de RT-qPCR, de genes envolvidos na angiogênese (VEGF, VEGFR1 e VEGFR2), da reserva ovárica (AMH, AMHR2 e VASN) e da



esteroidogénese (CYP11A1) e através da técnica de pirosequenciamento de bissulfito a avaliação dos níveis de metilação (controlo epigenético) dos genes AMH e VASN (Figura 7).



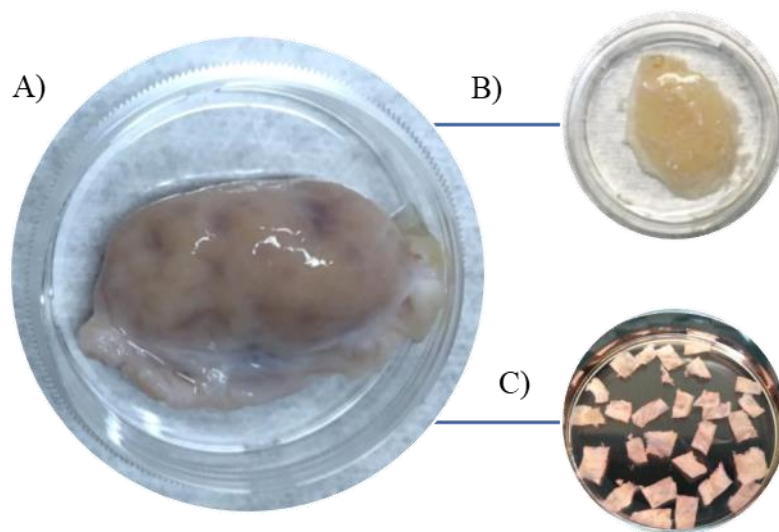
**Figura 7- Desenho Experimental.** Às 48 horas os resultados foram avaliados em termos de LDH, IHQ, RT-qPCR e Pirosequenciamento de Bissulfito; Aos 7 e 28 dias foram realizados todos as análises com exceção do LDH.

### 1.1. Aquisição e Preparação do Córtex Ovárico Bovino

Os ovários bovinos foram recolhidos no matadouro Regional do Ribatejo, em copos de amostra devidamente identificados, e transportados a 4°C para o laboratório de embriologia até sensivelmente 1 hora após o abate e a recolha. Durante o transporte, os ovários foram mantidos em contacto com uma solução salina fosfatada tamponada (PBS) enriquecida com 0.15% de albumina de soro bovino (BSA), 0.05mg/mL de sulfato de kanamicina e 0.025 mg/mL de anfotericina C.

#### 1.1.1. Técnica de Corte e Cultura *in vitro*

A primeira etapa, consistiu na divisão dos ovários em duas partes idênticas, seguido da remoção da zona medular, por meio de um corte suave com o intuito de não danificar o tecido cortical. De seguida, a zona cortical foi subdividida em fragmentos de aproximadamente 1 cm, perfazendo um total de 53, 61 e 73 fragmentos por cada par de ovários, alternando consoante o tamanho do tecido cortical (Figura 8).



**Figura 8-** Preparação dos fragmentos de tecido ovárico bovino. A) Ovário Bovino. B) Tecido Cortical Ovárico, após removida toda a zona medular. C) Zona cortical subdividida nos diversos fragmentos de 1cm.

À *posteriori*, os fragmentos, em contato com meio de cultura de tecido (TCM-199) (Gibco, ref. 22340-020) enriquecido com 10% de BSA, foram divididos pelos diversos grupos de cultura acima mencionados no desenho experimental, com exceção de alguns fragmentos que foram fixados em formaldeído tamponado 4% (VWR, Leuven, Bélgica), para posterior processamento no Serviço de Anatomia Patológica dos CHUC e avaliação imunohistoquímica (Grupo de Pós Descongelção).

#### 1.1.2. Vitriificação/Desvitriificação do Córtex do Tecido Ovárico

Após a aquisição e preparação do córtex do tecido ovário bovino procedeu-se à criopreservação, recorrendo à técnica de vitriificação. Numa primeira fase, os fragmentos foram transferidos para o meio base [TC199 com 20% de soro fetal bovino (NBCS) e antibióticos] e de seguida para um meio de equilíbrio, composto por TCM199, suplementado com 20% NBCS, 7,5% etilenoglicol (EG) e 7,5% DMSO, no qual permaneceram durante 15 minutos à temperatura ambiente. Após este período, os fragmentos foram colocados em contacto direto com a solução de vitriificação [15% EG, 15% DMSO, 0,5 M sucrose em TCM199 com 20% soro de vaca em cio superovulada (SOCS)] ao longo de 5 minutos, à temperatura ambiente. Por último, os fragmentos foram colocados em papel absorvente de modo a remover a solução de vitriificação excedentária e posteriormente foram transferidos para criotubos esterilizados de 1,8mL (Nunc CryoTubesT M, Ref.363401). Como foi utilizado um sistema aberto, o azoto líquido foi

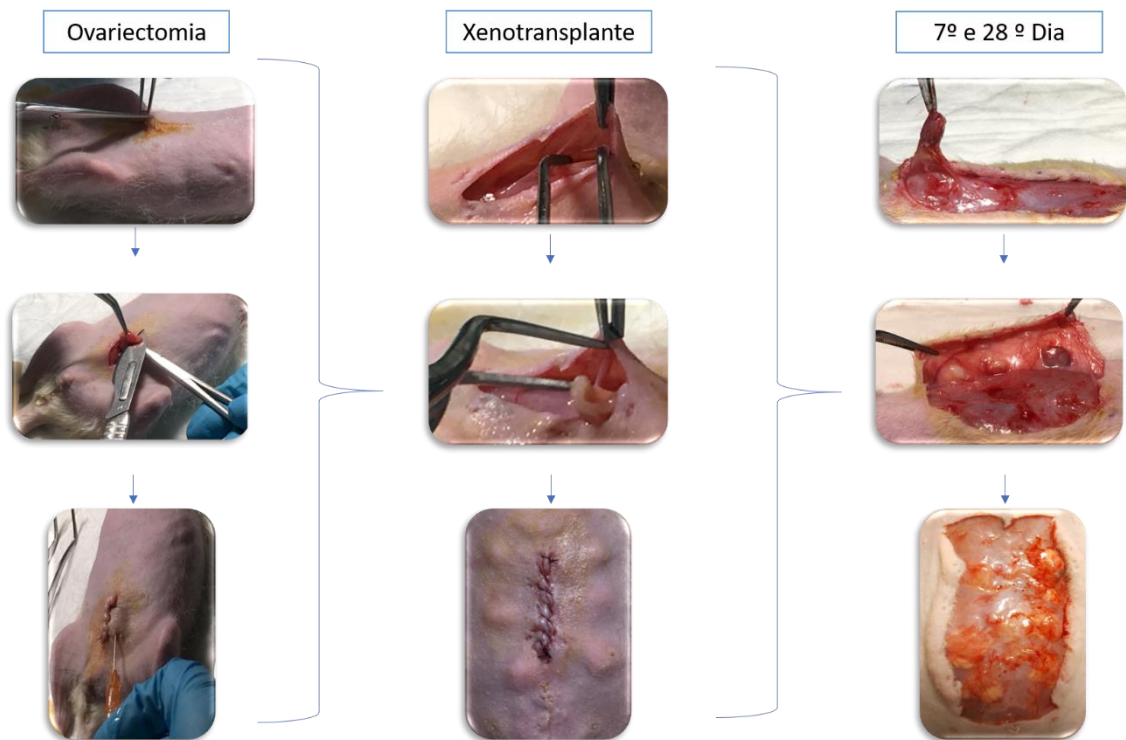
colocado diretamente em contato com o córtex do tecido ovárico e após a selagem dos criotubos, estes foram submersos em contentores específicos.

Por outro lado, em relação à descongelação, a primeira etapa referente ao aquecimento, consistiu na remoção dos criotubos dos contentores com azoto líquido, os quais foram mantidos à temperatura ambiente durante 20 segundos, seguido da submersão dos mesmos no banho termostático a 37°C, de modo a atingirem a cor rosada (indicação que os fragmentos se encontram descongelados). Numa segunda fase, foi adicionado aos criotubos 1 mL do primeiro meio de descongelação (TCM199 com 20% FBS suplementado com 1M de sucrose), com um período de incubação de 5 minutos. Por fim, os fragmentos foram transferidos para placas de cultura, nas quais permanecerem em contacto com 3 soluções de descongelação, constituídas por TCM199 com 20% de FBS suplementado com 0,5M, 0,1M e 0M de sucrose respetivamente, durante 5 minutos por cada solução.

### 1.1.3. Xenotransplante de Tecido Ovárico Bovino

Após a realização de 3 sessões de cultura *in vitro*, foram realizados xenotransplantes heterotópicos subcutâneos, em bolsas criadas junto à fáscia muscular abdominal de 12 ratos fêmeas *Rowet nude* (RNU, homozigóticos) (**Figura 9**), previamente ovariectomizadas, em acordo com as especificações da FMUC/ICBR (Coimbra *Institute for Clinical and Biomedical Research*) e do conselho de Bem-Estar Animal (ORBEA). A indução e manutenção anestésica foi obtida com sevoflurano (5%) e a analgesia com carprofeno (5mg/kg, perfazendo um total de 0,2 mL por animal). Ao longo de todo o processo, a cada 72 horas, o peso dos animais foi avaliado, assim como os restantes sinais de bem-estar.

Os fragmentos de córtex de ovário de bovino dos 6 grupos anteriormente descritos foram distribuídos aleatoriamente pelos animais, sendo que de cada grupo os enxertos foram recuperados ao 7º e 28º após o transplante e submetidos a análises de imunohistoquímica, RT-qPCR e pirosequenciamento de bissulfito, segundo os protocolos anteriormente descritos.



*Figura 9- Desenho Experimental do xenotransplante de tecido ovárico bovino.*


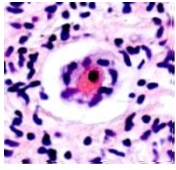

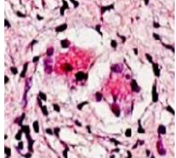

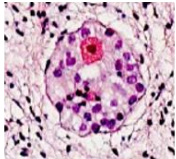
## 2. Avaliação Histológica

O método de avaliação histológica, habitualmente com o auxílio da coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E), permite-nos analisar morfológicamente o tecido ovárico. Neste caso em específico, através do protocolo de coloração com H&E do Serviço de Anatomia Patológica do CHUC (**Anexo I**), os fragmentos de tecido ovárico bovino foram fixados em paraformaldeído tamponado 4%, incluídos em bloco de parafina, e efetuados cortes (micrótomo) de 3  $\mu\text{m}$  de espessura.

A observação das lâminas foi realizada por meio de microscopia de transmissão (microscópio Axio Imager Z2), com uma ampliação de 20x, intensidade de luz de 3.81V, 0.8 de DIC e um brilho de 23% e fotografadas com o auxílio do programa Zen 2 blue edition (Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2011). De seguida, procedeu-se à classificação folicular por dois avaliadores distintos, através do programa Zen 2 Blue Edition (Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2011). A classificação foi realizada de acordo com o descrito na literatura, sendo os folículos classificados, em número absoluto, em primordiais (constituídos por uma única camada de células da granulosa num estado precoce e com

morfologia achatada), primários (apresentam uma única camada de células da granulosa cuboides) e secundários (compostos por duas ou mais camadas de células da granulosa cuboides em torno do ovócito) (125) (**Tabela 1**). Os folículos pré antrais e antrais foram agrupados aos folículos secundários.

*Tabela 1- Classificação folicular de acordo com uma adaptação da classificação de Gougeon (1986).*

Classificação Folicular		
Folículos	Imagem Representativa	Fotografia H&E
Primordiais		
Primários		
Secundários		

### 3. Avaliação Imunohistoquímica

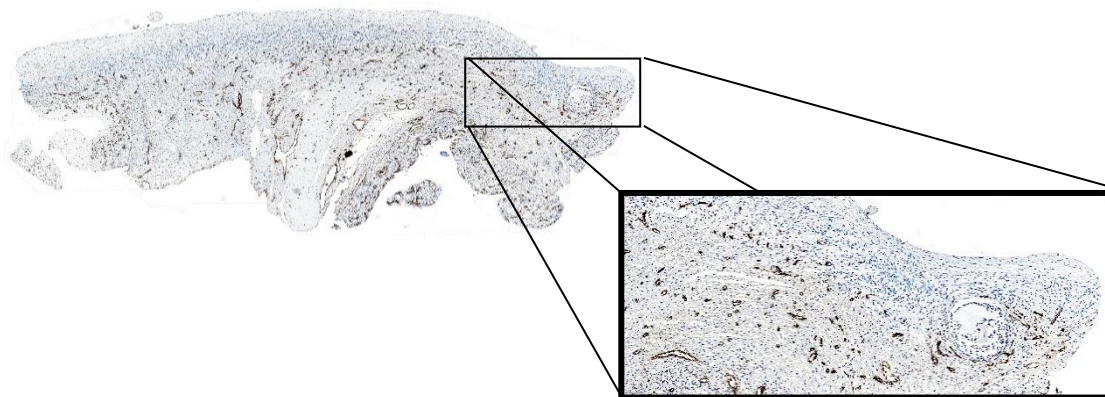
A técnica de imunohistoquímica é uma ferramenta poderosa, que tem como base a microscopia e consequente visualização/localização de proteínas-alvo de componentes celulares em amostras de tecido. Dado o elevado número de protocolos, para além da capacidade da aplicação de biomarcadores bastante específicos, a imunohistoquímica permite a deteção simultânea, com elevada sensibilidade, de múltiplas proteínas bem como a interação entre estas.

Neste estudo em particular, as amostras de córtex do ovário, foram fixadas em formaldeído tamponado 4% (VWR, Leuven, Bélgica) e inseridas em parafina com posterior incubação com o anticorpo primário específico (Fator VII, Ki-67 ou Caspase 3), de acordo com o protocolo do Serviço de Anatomia Patológica dos CHUC (**Anexo II**).

### 3.1. Determinação da Densidade Endotelial

Após a realização do protocolo de imunohistoquímica do Serviço de Anatomia Patológica dos CHUC, os resultados de densidade endotelial foram analisados no microscópio Axio Imager Z2, por meio da ativação do sistema de imagem ApoTome 2 e DIC-TLm (microscópio com lentes térmicas de contraste por interferência diferencial), com uma ampliação de 20x e fotografadas com o auxílio do programa Zen 2 blue edition (Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2011), aplicando as características de 0.8 de DIC, 4.0V de luz e com um brilho de 23% (**Figura 10**).

A quantificação da percentagem de área marcada pelo Fator VIII foi realizada através do programa *Image J* (versão *Fiji*, 1.8.0, E.U.A) por dois avaliadores distintos. Foram selecionadas aleatoriamente cinco zonas de cada amostra através da aplicação de uma grelha retangular (494x320 pixéis), sendo os resultados subsequentemente apresentados em forma de média.



**Figura 10** – Marcação pelo fator VII num fragmento de tecido ovárico. Resultados obtidos pelo Microscópio Axio Imager Z2 na ampliação de 20x. Marcação do Fator VII representada a castanho.

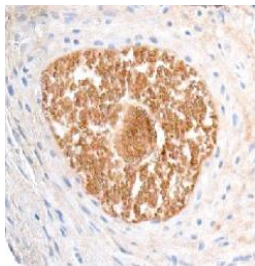
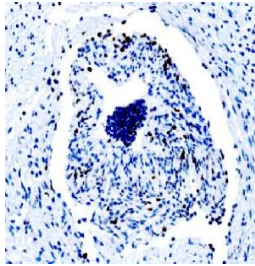
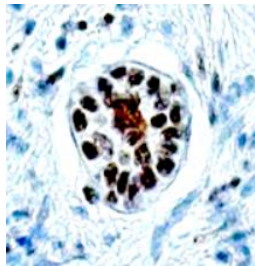
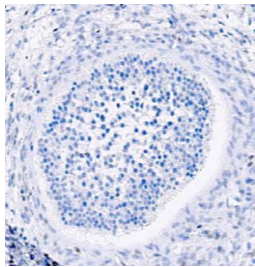
### 3.2. Quantificação da Proliferação e da Apoptose Celular

À semelhança do referido no subcapítulo anterior, após o protocolo de imunohistoquímica, no qual ocorreu separadamente a incubação com o indicador de proliferação celular (Ki-67) e de apoptose celular (Caspase 3), as lâminas foram analisadas no microscópio Axio Imager Z2, com os parâmetros normalizados para 0.8 de DIC, 4.0V de luz e com um brilho de 23% e fotografadas/analizadas com o auxílio do programa Zen 2 blue edition (Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2011).

Em termos de classificação, para além da determinação aleatória das diversas áreas pelos 2 observadores, procedeu-se à classificação por percentagem folicular positiva e/ou negativa correspondente à expressão dos marcadores, em folículos primordiais, primários e secundários dos respetivos tratamentos em estudo (**Tabela 2**).

Em relação ao estroma, a quantificação da percentagem de área marcada com Ki-67 foi realizada através do programa *Image J* (versão *Fiji*, 1.8.0, E.U.A) por dois avaliadores distintos. Foram selecionadas aleatoriamente cinco zonas de cada amostra através da aplicação de uma grelha retangular (494x320 pixéis), sendo os resultados subsequentemente apresentados em forma de média.

**Tabela 2-** Expressão de Ki-67 e Caspase 3 nos folículos. As imagens foram obtidas com uma ampliação de 20x, no microscópio Axio Imager Z2.

Classificação Folicular de Proliferação (Ki-67) e Apoptose (Caspase 3) Celular		
	Positivo	Negativo
Ki-67		
Caspase 3		

#### 4. Quantificação de Lactato Desidrogenase

De modo a aferir a citotoxicidade celular após a criopreservação e 48 horas de cultura, foi quantificada a concentração de lactato desidrogenase (LDH) nos sobrenadantes dos meios de cultura dos diversos tratamentos. Por meio do kit Non-Radioactive The 96 CytoTox®, (G1782), foi realizada uma avaliação colorimétrica com base na leitura de absorvâncias efetuadas pelo equipamento da Glomax (Promega GloMax Multi Detection System). Deste modo, foram retirados 50 µL do sobrenadante dos distintos meios de cultura e transferidos para uma placa de 96 poços, assim como 3 controlos negativos (50 µL de TCM199 + soro) e um controlo positivo (50 µL de uma diluição de 1:5000 de LDH). De seguida, foram adicionados 50 µL de uma mistura de substrato constituída pelo tampão de ensaio. Após um período de incubação de 30 minutos à temperatura ambiente e protegida da luz, foram adicionados outros 50 µL da solução de paragem por cada poço da placa. Posteriormente à leitura dos valores de absorvância, com o auxílio de dois filtros (1,450 mm e 2,560 mm), os resultados foram convertidos em valores de citotoxicidade aplicando a seguinte fórmula:

$$(1) \quad \frac{\text{Valor de absorvância da amostra} - \text{Média da absorvância dos 3 controlos negativos}}{\text{Valor de absorvância do controlo positivo}} \times 100$$

#### 5. Avaliação da Expressão Genética

Para a quantificação dos níveis de expressão (mRNA) dos genes AMH, AMHR2, VEGF, VEGFR1, VEGFR2, CYP11A1 e VASN foi utilizado o PCR quantitativo em tempo real (do inglês RT-qPCR; *real-time quantitative polymerase chain reaction*), de acordo com protocolos previamente descritos (95). Os genes de referência escolhidos foram os seguintes: GAPDH, RSP29 e Ciclofilina B.

No total foram analisadas 44 amostras, as quais foram armazenadas em *RNAlater* a -80°C, de modo a assegurar a estabilização e proteger o próprio RNA sem comprometer a qualidade/quantidade, necessária a todo o processo em seguida descrito.



### 5.1. Extração total de RNA

A preparação do RNA foi iniciada com a descongelamento das amostras, seguida da homogeneização das mesmas em meio de Trizol (1 mL/ 50 mg de amostra) com o homogeneizador *TissueLyser II* (Qiagen), durante 8 minutos a uma frequência de 25Hertz, com o auxílio de esferas de aço inoxidável estéreis. Complementarmente, foi efetuada uma digestão com cerca de 10 µL da enzima *Proteinase K* (serina protéase estável, caracterizada pela sua estabilidade e ampla especificidade de substrato que permite degradar proteínas inclusive na presença de detergentes), durante 2 horas em banho maria a 55°C. Após a disrupção do tecido e digestão com a enzima, foi adicionado 300 µL de clorofórmio às amostras e colocadas no vortex durante 5 minutos. De seguida, de modo a obter 3 fases distintas, as amostras foram centrifugadas durante 25 minutos a 12400 rpm. Posto isto, uma vez formadas as 3 fases, procedeu-se à remoção da fase superior (mais transparente) constituída pelo RNA. Numa segunda fase, o RNA total foi extraído e purificado de acordo com o protocolo de isolamento total de RNA (*Zymo*) descrito no **Anexo III**. De modo a excluir possíveis contaminações de DNA genómico, foi efetuado um passo adicional (etapa 9) de digestão com DNase I [RNase-Free DNase Set (50; ID: 79254); Qiagen].

Por último, os extratos de RNA total foram imediatamente avaliados em termos de quantidade (OD 260nm) e de nível de pureza (OD 260nm/ OD 280nm) com o auxílio do espectrofotómetro (NanoDrop ND-2000c, Peqlab GmbH, Erlangen, Alemanha).

### 5.2. Síntese do DNA complementar

O DNA complementar de cadeia simples foi sintetizado utilizando o kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), o qual é caracterizado pela sua capacidade de iniciação aleatória da síntese de cDNA. Posto isto, para cada reação de 20 µL, foi utilizado 10 µL da reação de mistura de transcrição reversa (RT) composta pelos reagentes descritos na **Tabela 3**. Após a adição de 10 µL da mistura de RT a 10 µL de cada amostra de RNA (com concentração previamente homogeneizada), as alíquotas foram transferidas para o termociclador a temperaturas de 25°C por 10 min, 37°C por 120 min, 85°C por 5 min e 4°C até serem armazenadas a -20°C.

**Tabela 3** – Preparação da amostra para realização de RT-qPCR.  
 Reagentes necessários para a preparação da mistura de transcrição reversa, descrita no protocolo High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Componentes	Volume	
	Com RT	Sem RT (controlo negativo)
10x RT Buffer	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L
25x dNTPs Mix	0,8 $\mu$ L	0,8 $\mu$ L
10x Random Primers	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1 $\mu$ L	-
RNase Inhibitor	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O (Nuclease free)	3,2 $\mu$ L	4,2 $\mu$ L
Total por reação	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L

### 5.3. Desenho dos *Primers*

O desenho dos primers foi, numa primeira fase, concebido através da utilização do programa *Primer-Blast* (**Anexo IV**). De seguida, com o intuito de evitar amplificações inespecíficas [como por exemplo ligações entre os próprios primers (*hairpins* e *self dimers*) ou entre primers diferentes (*cross dimers*)], os primers selecionados foram analisados com o programa *Primer Express* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

#### 5.4. Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR)

A reação de RT-qPCR foi realizada com recurso ao sistema de PCR em tempo real StepOne Plus™ e com a aplicação da mistura comercial Power SYBR® Green (ambos da Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) que permite uma maior sensibilidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos. As amostras foram analisadas em duplicado e com recurso a controlos RT-negativos, com o objetivo de uniformizar os resultados e corrigir possíveis erros de leitura.

Previamente, procedeu-se à preparação da reação de qPCR constituída por 12,5µL da mistura Power SYBR® Green, 2µL de primers *forward* e *reverse* (160 nM), 6µL de cDNA diluído (1:10) e 2,5µL de H<sub>2</sub>O para um volume total de 25µL. De seguida, a reação foi rapidamente pipetada para placas de reação ótica de 96 poços (MicroAmp™), as quais foram seladas com tampas óticas (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e transferidas para o termociclador de tempo real, no qual iniciaram a desnaturação inicial a uma temperatura de 95°C durante 10 minutos, seguida de 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C, 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C e por último 15 segundos a 95°C (40 ciclos). Os dados foram recolhidos e analisados pelo Software StepOne™ v2.2.2 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

## 6. Pirosequenciamento de bissulfito

O epigenoma é caracterizado por uma ampla dinâmica responsável por diversos mecanismos de regulação epigenética, como é o caso das metilações do DNA. Com o intuito de avaliar os possíveis efeitos dos vários grupos de tratamento no padrão de metilação do gene AMH e VASN, numa primeira fase, foi realizado o isolamento de DNA dos diversos grupos em estudo e posterior extração total, de acordo com o protocolo do *Kit Quick-DNA Miniprep Plus* (Zymo Research) (**Anexo V**). A escolha do Kit encontrou-se diretamente relacionada com a capacidade de obtenção de DNA ultrapuro e concentrado, adequado para o uso direto em análises de metilação, como é o caso da técnica de pirosequenciamento de bissulfito.

Após a execução do protocolo de purificação, as amostras foram quantificadas (OD260nm) e avaliadas quanto ao nível de pureza (OD260nm/ OD280nm) de cada

amostra através do espectrofotômetro (NanoDrop ND-2000c, Peqlab GmbH, Erlangen, Alemanha).

Posteriormente, com o auxílio do aparelho *PyroMark Q96 ID pyrosequencer* procedeu-se ao pirosequenciamento de bissulfato de sódio dos genes AMH e VASN, uma vez que o bissulfato de sódio promove a conversão das citosinas não metiladas em uracilos permitindo assim a identificação posterior por pirosequenciamento das regiões metiladas e não metiladas nas ilhas CpG. As sequências dos genes propostos para pirosequenciamento de bissulfato, assim como os *primers* utilizados, encontram-se descritos respetivamente na **Tabela 4 e no Anexo VI e VII**.

*Tabela 4- Regiões selecionadas para análise de pirosequenciamento de bissulfato.*

Nome	Sequência	CpGs
AMH – Fragmento 1	CGCAGGGCCAGGTCAACCTGTCGGACCCCGCG GCCCTGGAGCGCCTGCTGGACGGC	6
AMH – Fragmento 2	TCCCAAACATGGTGGCCACCGAATGCGGCTGC CGGTGACCTCGCGCCGTGCTCCTCGTGCTGCCC CGGCCCGTATTTATTTCGGACCCCGT	11
VASN	CCCGGGGTGAGGGCGCGCGCGCGCGCGCGCG CGCGCGCGCGTACGCGGCTCACCGGCCTGCG GGGCTGCGAGCAGACGAAATAAACA	21

A percentagem de metilação dos genes analisados foi calculada através do programa *PyroMark Assay Design Software 1.0 (Qiagen)*.

## 7. Análise Estatística

Os dados de 3 sessões de cultura de tecido ovárico *in vitro* e *in vivo* foram analisados usando o PROC MIXED e PROC GLIMMIX do SAS (Statistical Analysis Systems, SAS Inst., Inc., Cary, NC, USA) para os dados de imunohistoquímica e para os valores de absorvância (LDH), de expressão genética (RT-qPCR) e percentagem de metilação (Pirosequenciamento de Bissulfito). Adicionalmente foi aplicado o modelo de correlação de *Pearson* entre os resultados de expressão genética e níveis de metilação. As médias de cada tratamento foram calculadas e comparadas pelo teste PDIFF de comparações múltiplas. As diferenças foram consideradas significativas para  $P \leq 0,05$ .

Ao longo do texto serão descritas as diferenças significativas obtidas entre grupos e ao longo do tempo e estas serão representadas por letras diferentes. Adicionalmente, em anexo é possível a observação das diversas comparações múltiplas entre interações grupos/tempo.

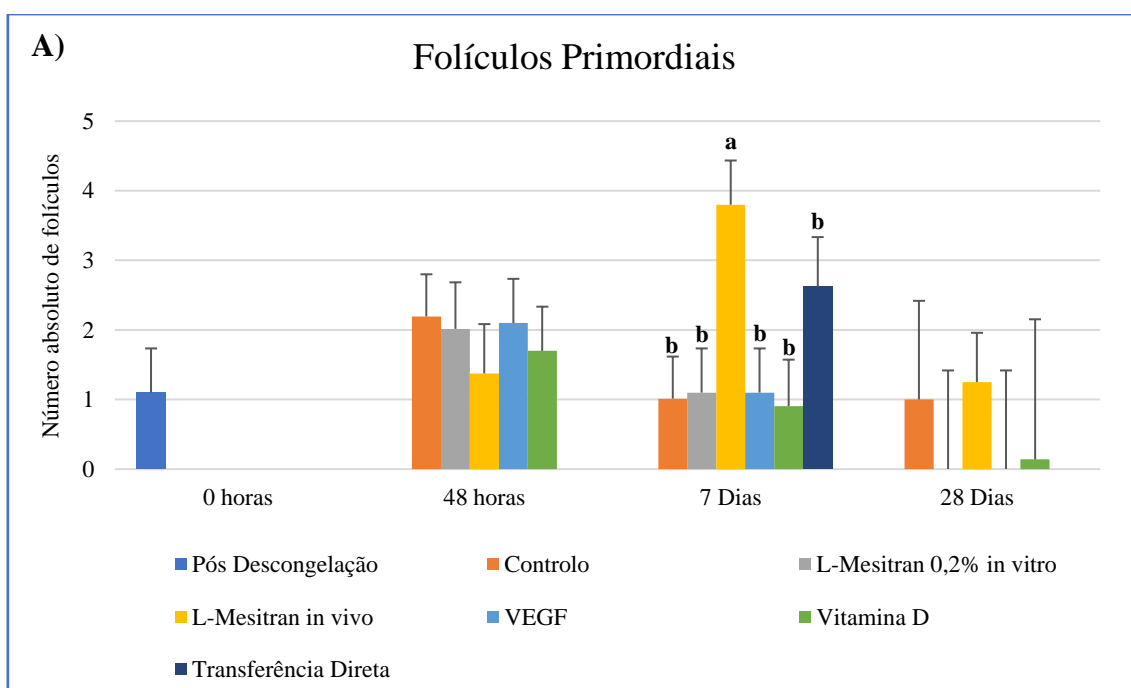
---

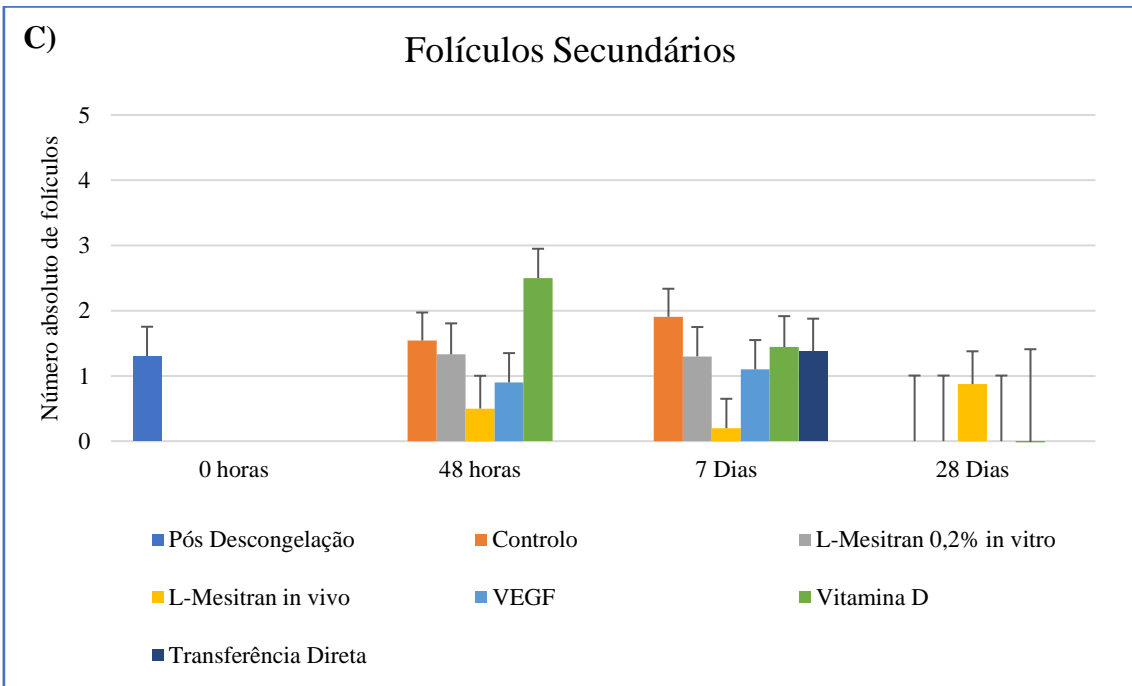
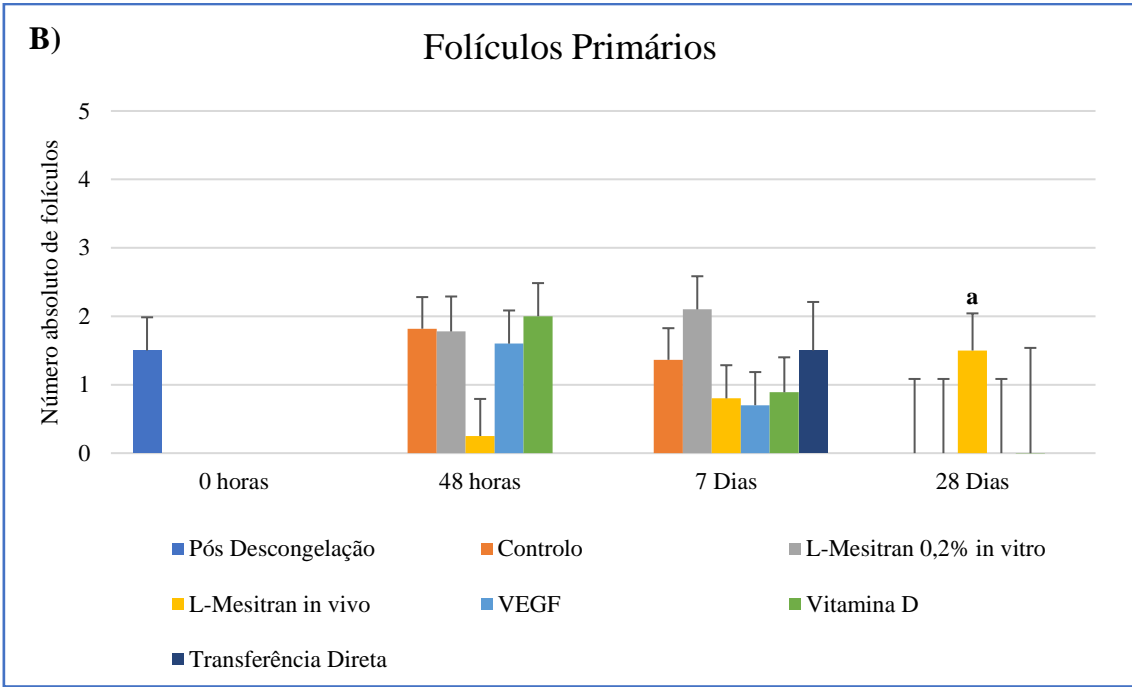
## *Capítulo V – Resultados*

---

## 1. Avaliação Histológica

Foi efetuada a identificação dos folículos, em termos de número absoluto, presentes nas imagens adquiridas, apenas tendo sido obtidas diferenças significativas no caso dos folículos primordiais, aos 7 dias, sendo o número do grupo de L-Mesitran *in vivo*, significativamente superior aos restantes grupos ( $P < 0,01$ ) (**Figura 11-A**). No caso dos folículos primários, apenas foram observadas diferenças aos 28 dias, sendo o grupo L-Mesitran *in vivo* novamente superior aos restantes tratamentos ( $P < 0,03$ ), conforme é possível de verificar na **Figura 11-B**. No caso dos folículos secundários não foram obtidas diferenças significativas (**Figura 11-C**).





**Figura 11** - Quantificação Folicular: A) Folículos Primordiais; B) Folículos Primários; C) Folículos Secundários. **a,b:** indicam diferenças estatísticas ( $p \leq 0,05$ ).



## 2. Avaliação Imunohistoquímica

### 2.1. Densidade Endotelial (Factor VIII)

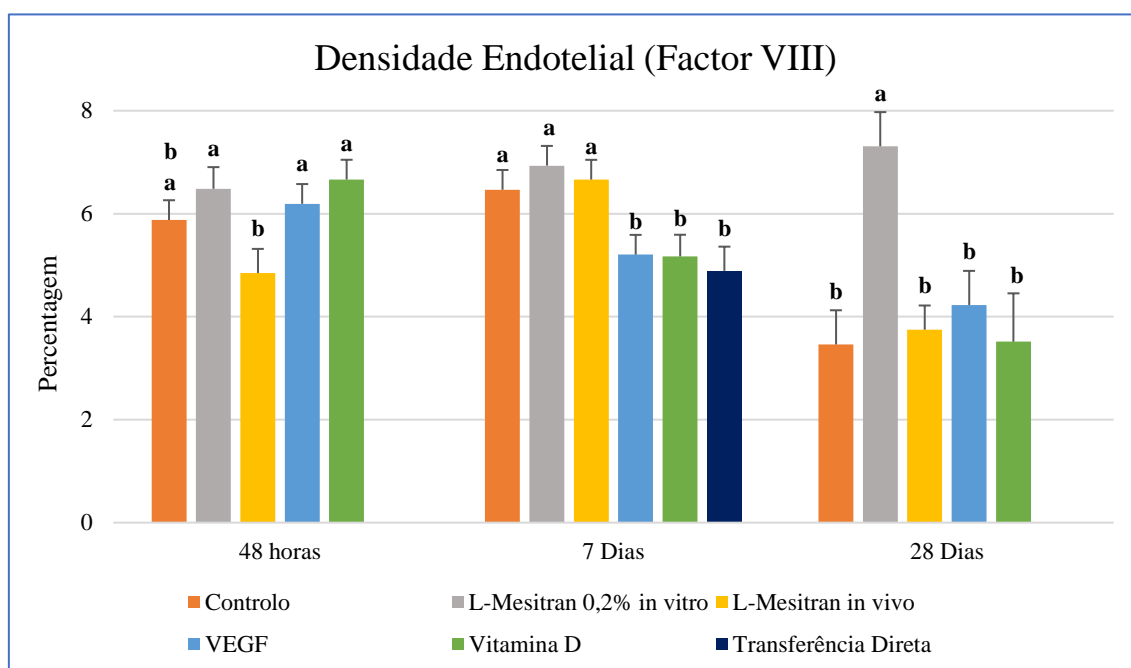
A densidade endotelial foi avaliada através da percentagem de área com marcação pelo fator VIII, tendo-se verificado diferenças significativas ao longo do tempo e entre grupos (**Figura 12 e Figura 13 e Anexo VIII**).

#### 2.1.2. Entre Grupos

Às 48 horas de cultura (**Figura 12**), os grupos L-Mesitran 0,2% *in vitro* (P=0,0096), VEGF (P=0,027) e Vitamina D (P=0,0028) exibiram uma densidade endotelial superior quando comparados com o Controlo e L-Mesitran *in vivo* (que neste caso é igual ao grupo Controlo).

Aos 7 dias (**Figura 12**), os grupos L-Mesitran 0,2% *in vitro* e *in vivo* apresentam uma densidade endotelial tendencialmente superior ao grupo Controlo, porém sem diferenças estatisticamente significativas.

Por último, aos 28 dias, salienta-se a elevada densidade endotelial do grupo L-Mesitran 0,2% *in vitro* em relação a todos os outros grupos (P<0,001) (**Figura 12**).

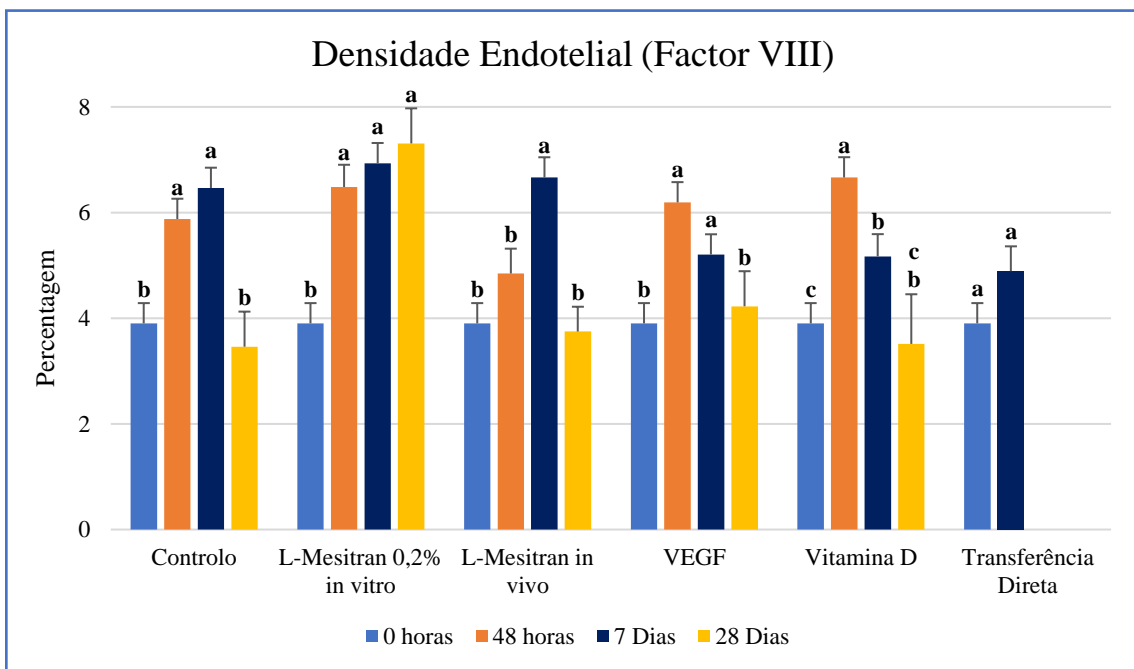


**Figura 12-** Densidade Endotelial, com marcação de Factor VIII às 48h, 7 e 28 Dias.  
**a-b:** indicam diferenças estatísticas ( $p \leq 0,05$ ).

### 2.1.2. Ao longo do tempo

Foi possível observar que o grupo de L-Mesitran 0,2% *in vitro* foi o único a apresentar valores superiores ao tempo zero, ao longo dos 3 períodos analisados ( $P=0,0001$ ). Adicionalmente, no âmbito dos grupos dos 7 dias, apenas o grupo de Transferência Direta não apresentou valores superiores em relação ao tempo zero, o que realça a importância de efetuar a cultura *in vitro*, previamente ao transplante (**Figura 13**).

Por outro lado, o grupo L-Mesitran *in vivo* apresentou um aumento significativo das 48h para os 7 dias ( $P=0,0028$ ), contrariamente aos restantes tempos. No caso da Vitamina D observou-se uma redução da marcação com Fator VIII, entre os tempos mencionados ( $P=0,0089$ ) (**Figura 13**).



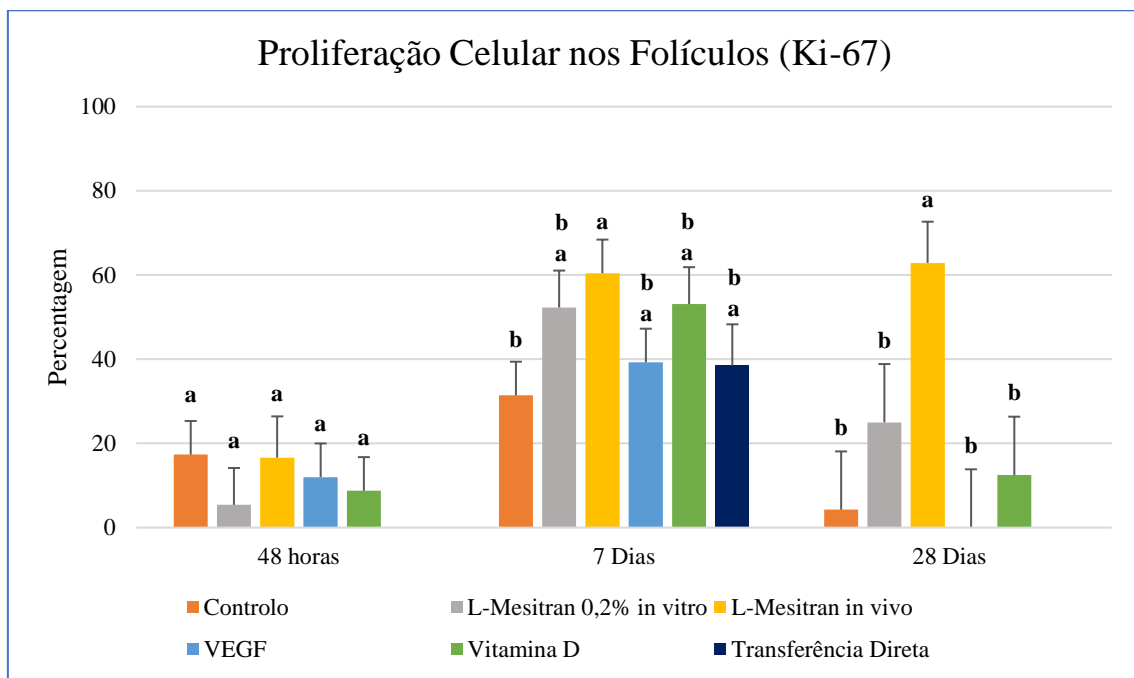
**Figura 13-** Densidade Endotelial, com marcação de Factor VIII ao longo do tempo. **a-c:** indicam diferenças estatísticas ( $p \leq 0,05$ ).

## 2.2. Proliferação Celular nos Folículos (Ki-67)

### 2.2.1. Entre Grupos

A proliferação celular (**Figura 14 e Figura 15 e Anexo VIII**) foi estimada mediante a avaliação da marcação dos folículos com o anticorpo anti-Ki-67, não tendo sido verificadas diferenças significativas às 48 horas entre grupos. Porém, aos 7 dias, distinguiu-se o grupo de L-Mesitran *in vivo*, como sendo o único que apresentou uma marcação imunohistoquímica significativamente superior em relação ao grupo Controlo (P=0,011).

Aos 28 dias, o grupo L-Mesitran *in vivo* apresentou um valor superior aos restantes grupos (P<0,02), incluindo novamente o grupo Controlo (P=0,0007) (**Figura 14**).

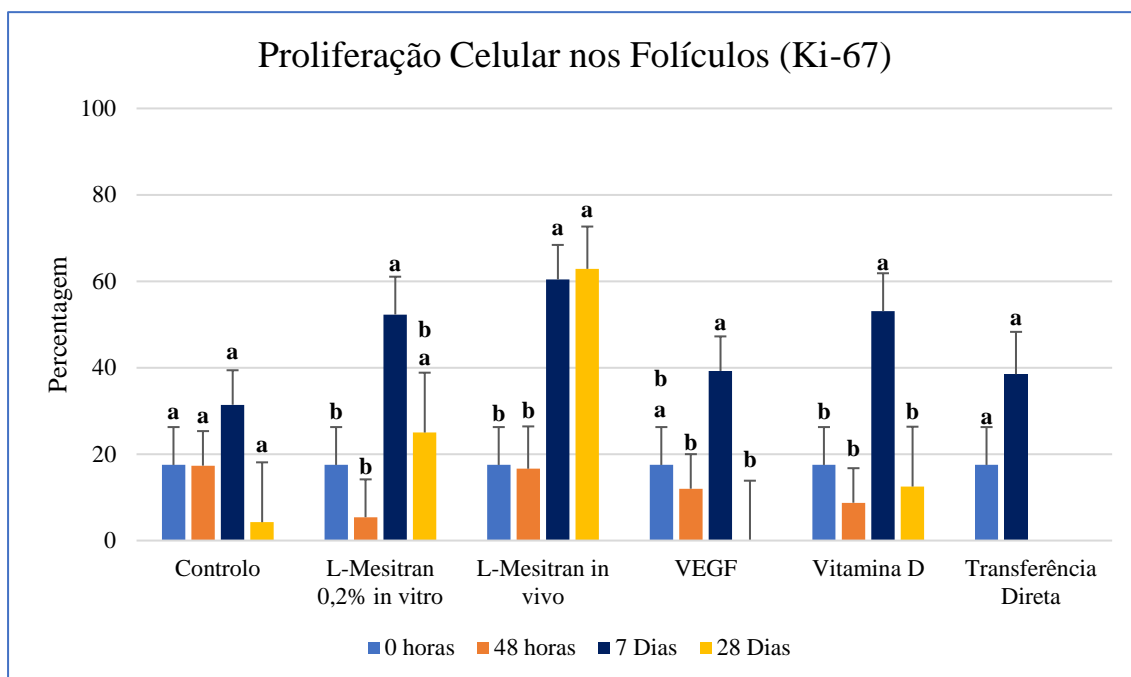


**Figura 14-** Proliferação Celular nos folículos, com marcação de Ki-67 às 48h, 7 e 28 Dias.  
*a-b*: indicam diferenças estatísticas ( $p \leq 0,05$ ).

### 2.2.2. Ao longo do tempo

Constatámos que todos os grupos aumentaram de forma significativa (P<0,05), entre as 48 horas e os 7 dias, com exceção do grupo Controlo. No caso do grupo L-Mesitran *in vivo*, este aumento estendeu-se ainda para os 28 dias (P=0,0007), sendo assim o grupo a apresentar um aumento da marcação de proliferação celular, mais consistente ao longo do tempo (**Figura 15**).

Novamente, o grupo de Transferência Direta não apresentou um aumento significativo do tempo zero para os 7 dias, o que está de acordo com o observado no caso da marcação de Densidade Endotelial (Fator VIII) (**Figura 15**).



**Figura 15-** Proliferação Celular nos folículos, com marcação de Ki-67 ao longo do tempo. **a-b:** indicam diferenças estatísticas ( $p \leq 0,05$ ).

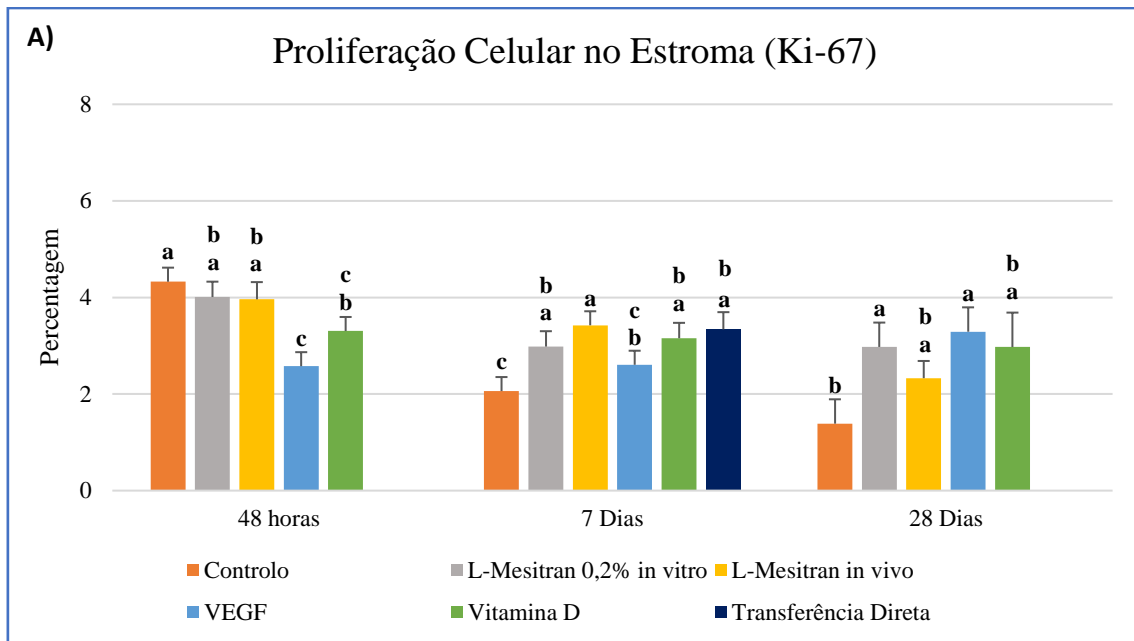
### 2.3. Proliferação Celular no Estroma (Ki-67)

#### 2.3.1. Entre Grupos

De forma complementar, foi avaliado a marcação no estroma com o anticorpo anti-Ki-67 (**Figura 16 e Figura 17 e Anexo VIII**), na qual se verificou, às 48 horas, que o grupo VEGF apresentou um valor inferior ao grupo Controlo e em relação aos grupos L-Mesitran 0,2% *in vitro* e *in vivo* ( $P < 0,003$ ). Adicionalmente, o grupo Vitamina D foi de igual forma inferior ao grupo Controlo ( $P = 0,013$ ).

Aos 7 dias, de realçar a superioridade de todos os grupos em relação ao Controlo ( $P < 0,05$ ), com exceção para o tratamento de VEGF, bem como a superioridade do grupo de L-Mesitran *in vivo* relativamente ao VEGF ( $P = 0,048$ ) (**Figura 16**).

Por fim, aos 28 dias, destacou-se uma marcação da proliferação celular superior nos grupos L-Mesitran 0,2% *in vitro* e VEGF, em comparação com o grupo Controlo ( $P = 0,0026$  e  $P = 0,0077$ , respetivamente) (**Figura 16**).



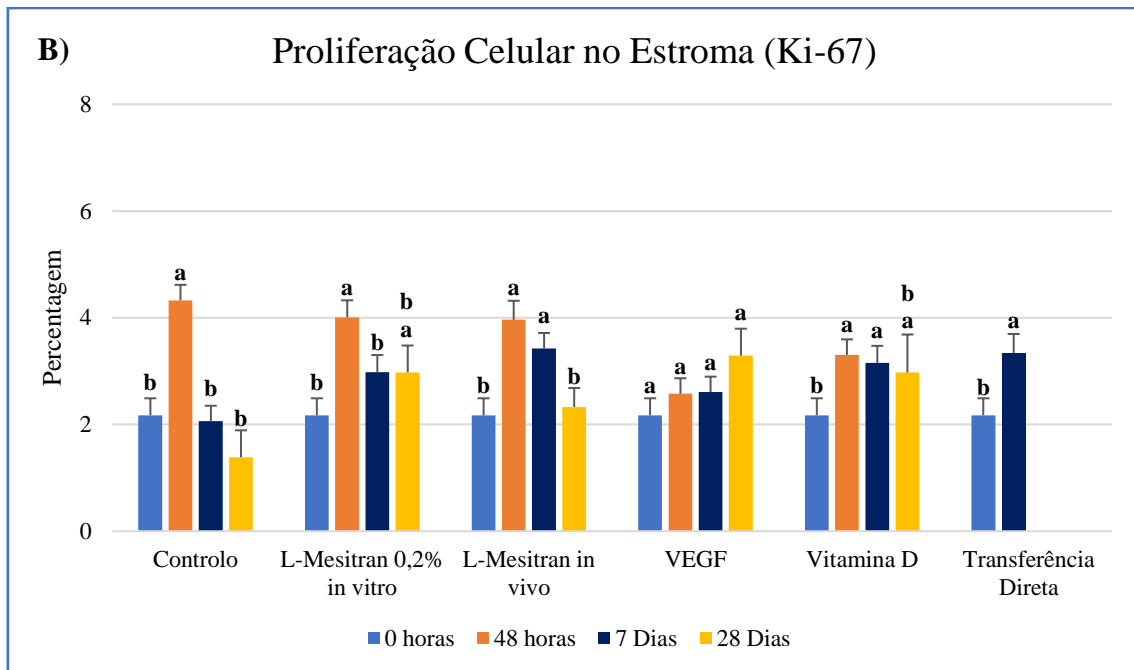
**Figura 16-** Proliferação celular no estroma, com marcação de Ki-67 às 48h, 7 e 28 Dias.  
*a-c:* indicam diferenças estatísticas ( $p \leq 0,05$ ).

### 2.3.2. Ao longo do tempo

Verificou-se (**Figura 17**) um aumento inicial de marcação entre o tempo zero e as 48 horas ( $P < 0,008$ ) em todos os grupos, com exceção do grupo VEGF. Por outro lado, os grupos L-Mesitran *in vivo*, Vitamina D e Transferência Direta, apresentaram valores superiores aos 7 dias, relativamente ao tempo zero ( $P < 0,03$ ).

Entre as 48 horas e os 7 dias, os grupos L-Mesitran *in vivo*, Vitamina D e VEGF foram os únicos onde não foi observado um decréscimo da marcação (Ki-67), sendo que no caso do VEGF, estes valores não foram superiores ao grupo Controlo (**Figura 17**).

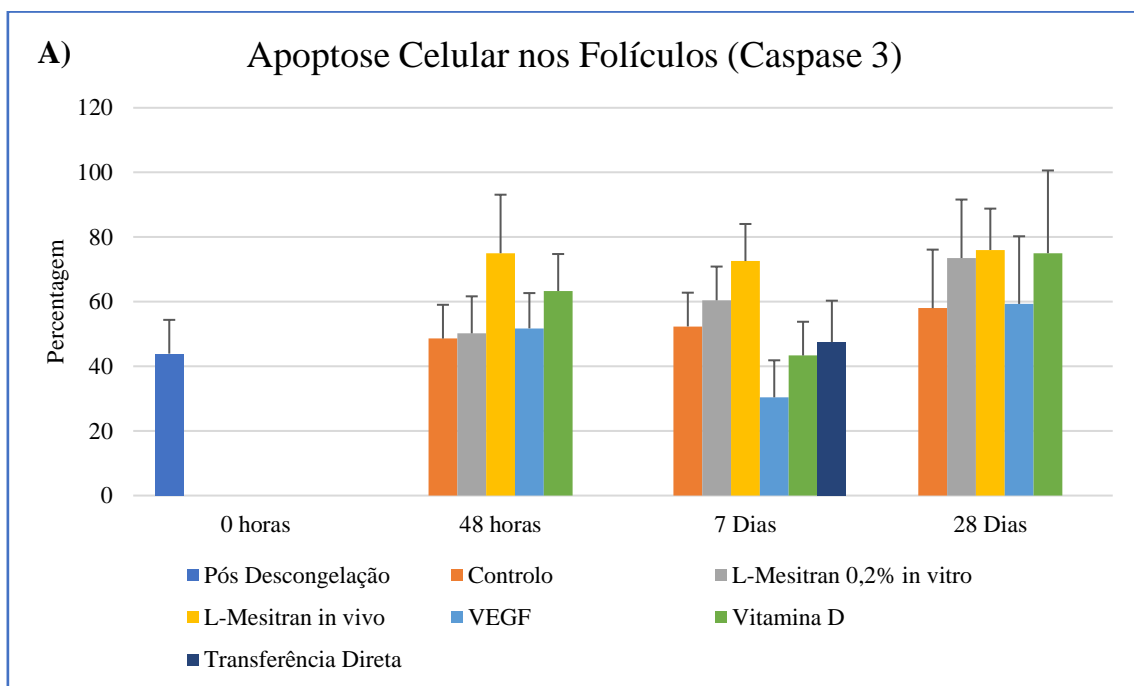
Relativamente ao período entre os 7 e 28 dias, ocorreu uma estabilização da marcação estromal de acordo com o observado na **Figura 17**, apenas com uma diminuição do grupo L-Mesitran *in vivo* ( $P = 0,018$ ).

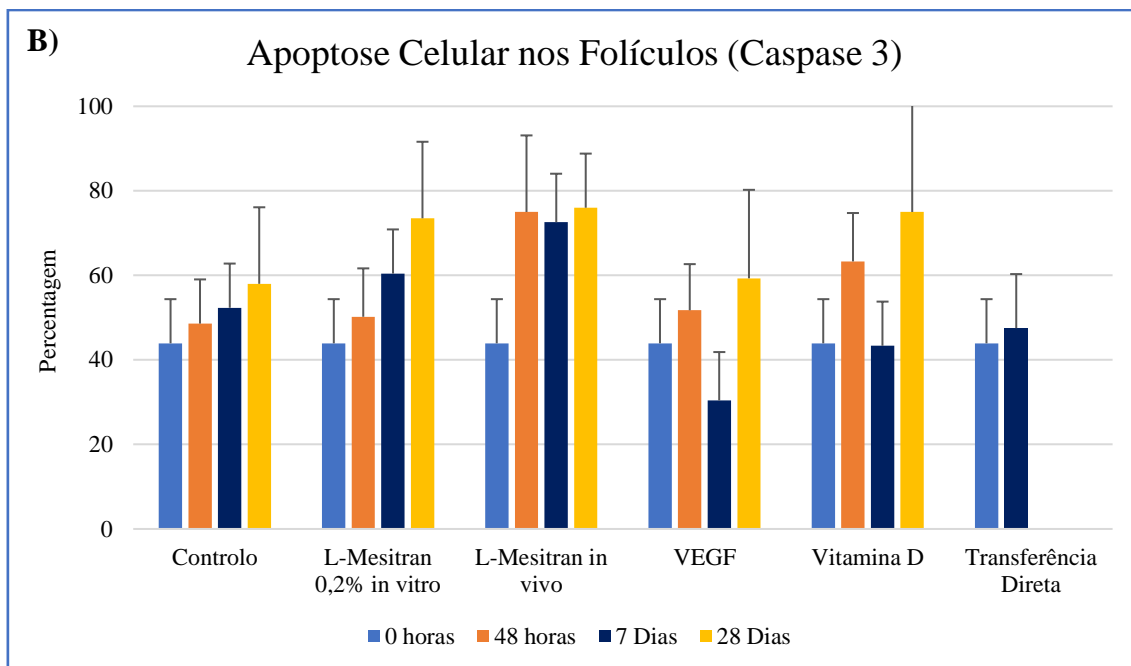


*Figura 17- Qualidade do estroma, com marcação de Ki-67 ao longo do tempo. a-b: indicam diferenças estatísticas ( $p \leq 0,05$ ).*

#### 2.4. Apoptose Celular nos Folículos (Caspase 3)

Relativamente aos resultados de apoptose celular, avaliada pela marcação com o anticorpo anti-caspase 3 ao nível dos folículos não foram obtidas diferenças significativas, independentemente do grupo e tempo ( $P=0,8480$ ) (**Figura 18**).





**Figura 18-** Apoptose Celular nos folículos, com marcação com Caspase 3: A) Às 48h, 7 e 28 Dias; B) Ao longo do tempo.

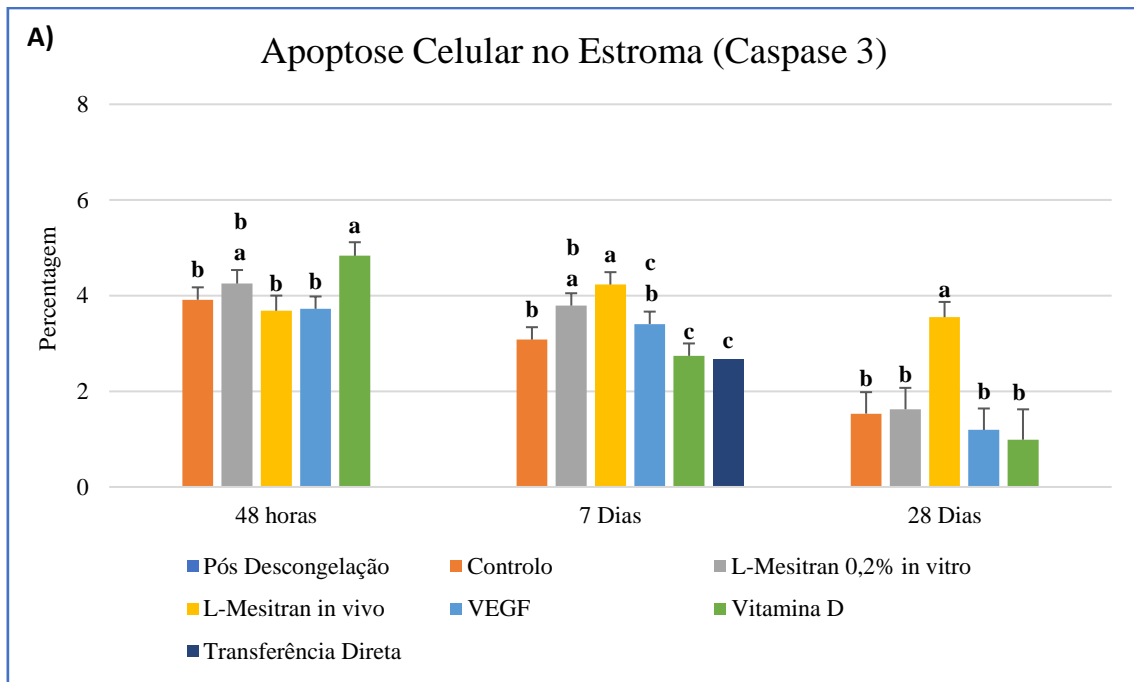
## 2.5. Apoptose Celular no Estroma (Caspase 3)

Relativamente à marcação do estroma pelo anticorpo anti-caspase 3 foram obtidas diversas diferenças significativas entre grupos e ao longo do tempo (**Figura 19 e Figura 20 e Anexo VIII**).

### 2.5.1. Entre Grupos

Às 48 horas, o grupo da Vitamina D apresentou maior percentagem de estroma marcado com Caspase 3 ( $P < 0,01$ ), salvo em comparação com o grupo L-Mesitran 0,2% *in vitro* (**Figura 19**).

Aos 7 dias, distinguiu-se o grupo de L-Mesitran *in vivo*, com valores superiores em relação aos restantes grupos ( $P < 0,02$ ), com exceção do grupo L-Mesitran 0,2% *in vitro*. De igual modo, aos 28 Dias, o grupo de L-Mesitran *in vivo* apresentou a maior percentagem de marcação ( $P < 0,0005$ ) (**Figura 19**).

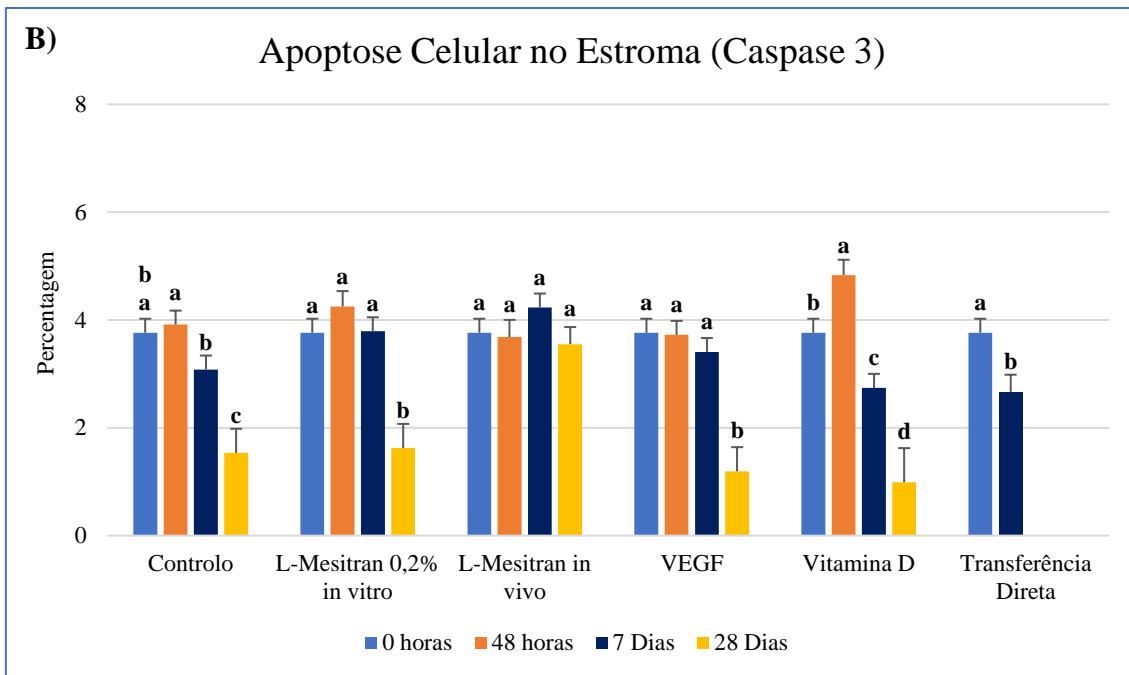


**Figura 19-** Qualidade do estroma, com marcação de Caspase 3 às 48h, 7 e 28 Dias.  
*a-c: indicam diferenças estatísticas ( $p \leq 0,05$ ).*

#### 2.5.2. Ao longo do tempo

De acordo com a **Figura 20**, verificou-se que o grupo da Vitamina D foi o único em que a marcação por Caspase-3 aumentou do tempo zero para as 48 horas ( $P=0,0055$ ). Por outro lado, o grupo L-Mesitran *in vivo*, foi o único em que não ocorreu uma diminuição da marcação entre os 7 dias e 28 dias ( $P=0,0001$ ).

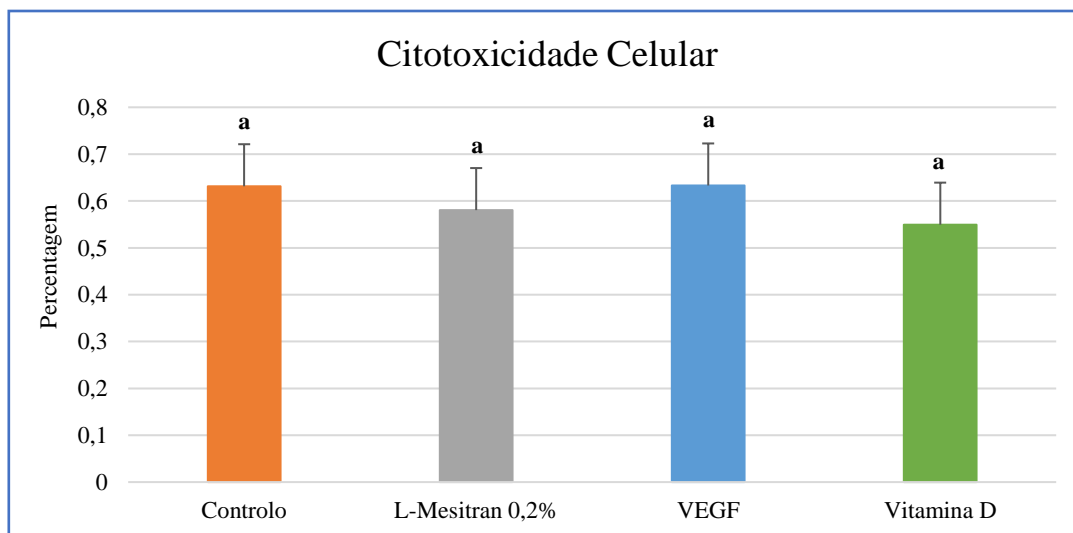




**Figura 20-** Qualidade do estroma, com marcação de Caspase 3 ao longo do tempo. *a-d*: indicam diferenças estatísticas ( $p \leq 0,05$ ).

### 3. Citotoxicidade Celular

Como se pode verificar na **Figura 21**, a análise da citotoxicidade celular após 48 horas em cultura não mostrou diferenças significativas entre os grupos, apesar do grupo L-Mesitran 0,2% e Vitamina D apresentarem os menores valores absolutos.



**Figura 21-** Citotoxicidade Celular do tecido ovário vitrificado/aquecidos, após 48 horas em cultura. O grupo L-Mesitran in vivo é idêntico ao Controlo nesta fase (48h), pelo que não foi analisado. *a*: indica que não foram identificadas diferenças estatísticas ( $p \leq 0,05$ ).

## 4. Expressão Genética

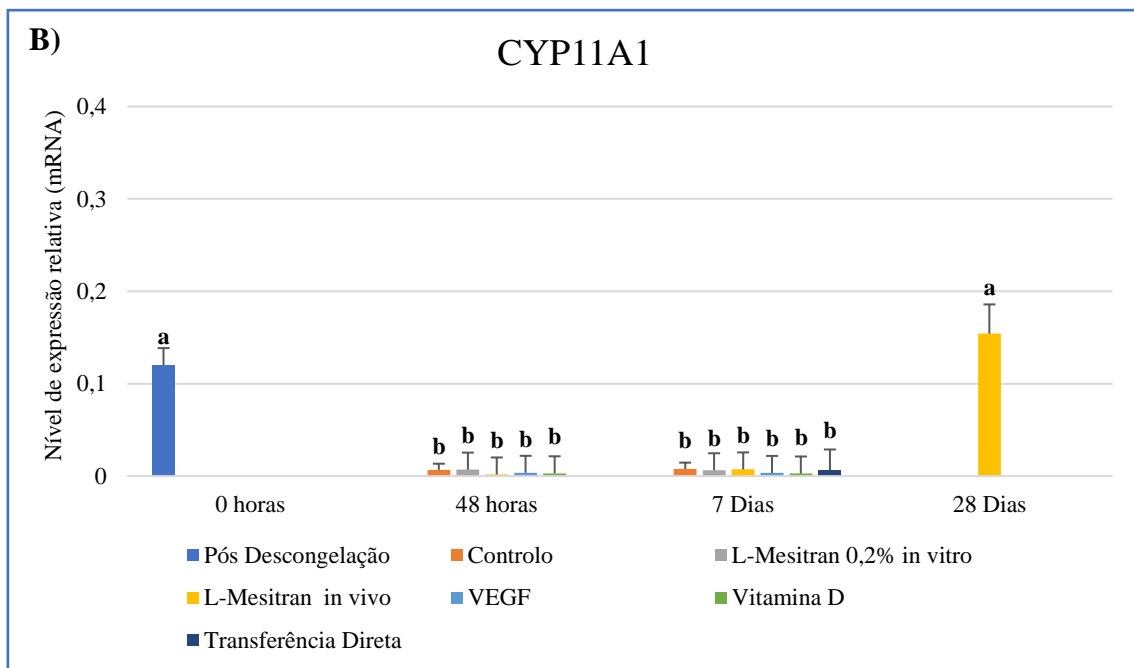
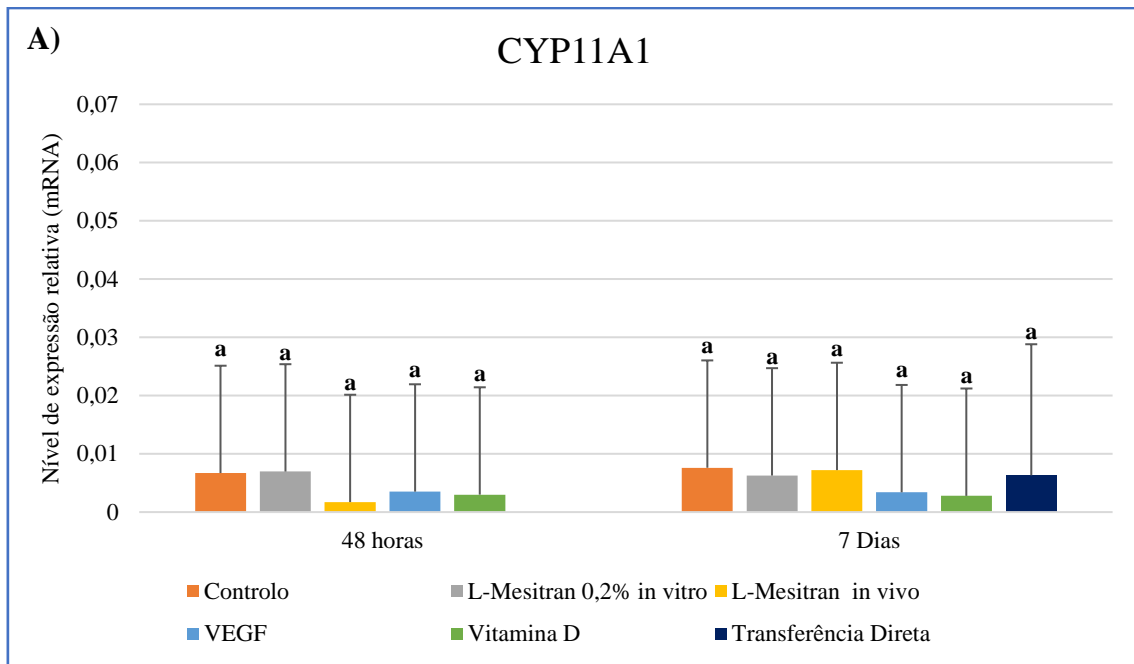
Em relação aos resultados de RT-qPCR em tempo real, apenas foram obtidas diferenças significativas entre grupos e ao longo do tempo, no caso dos genes CYP11A1 e AMHR2, conforme é possível verificar pelos resultados dos restantes genes (VASN, VEGFA, VEGFR1, VEGFR2 e AMH) apresentados no **Anexo IX**.

No caso dos 28 dias, apenas foi possível analisar a expressão genética do grupo do L-Mesitran *in vivo*, pelo que este grupo é o único representado nos gráficos de análise de expressão genética, dado o reduzido número disponível do modelo *in vivo*. De salientar, que no caso da expressão genética, as diferenças apresentadas nos gráficos resultam da comparação múltipla entre Grupos e Tempos.

### 4.1. Gene CYP11A1

No caso do gene CYP11A1 apesar de não terem sido verificadas diferenças entre grupos às 48 horas e aos 7 dias, quando analisamos apenas estes dois períodos (48 horas e 7 dias), os grupos com valores de expressão mais elevados (embora não significativos;  $P=0,6839$  e  $P=0,6997$ ), foram os grupos Controlo e L-Mesitran *in vivo* dos 7 dias (**Figura 22-A**).

No entanto, quando incluímos o Tempo zero (grupo de Pós-Descongelação) e 28 dias (apenas grupo L-Mesitran *in vivo*), observou-se uma expressão maior no grupo de Pós-Descongelação (tempo zero) e aos 28 dias (grupo de L-Mesitran *in vivo*), relativamente aos restantes Grupos/Tempos ( $P<0,0001$ ) (**Figura 22-B**).



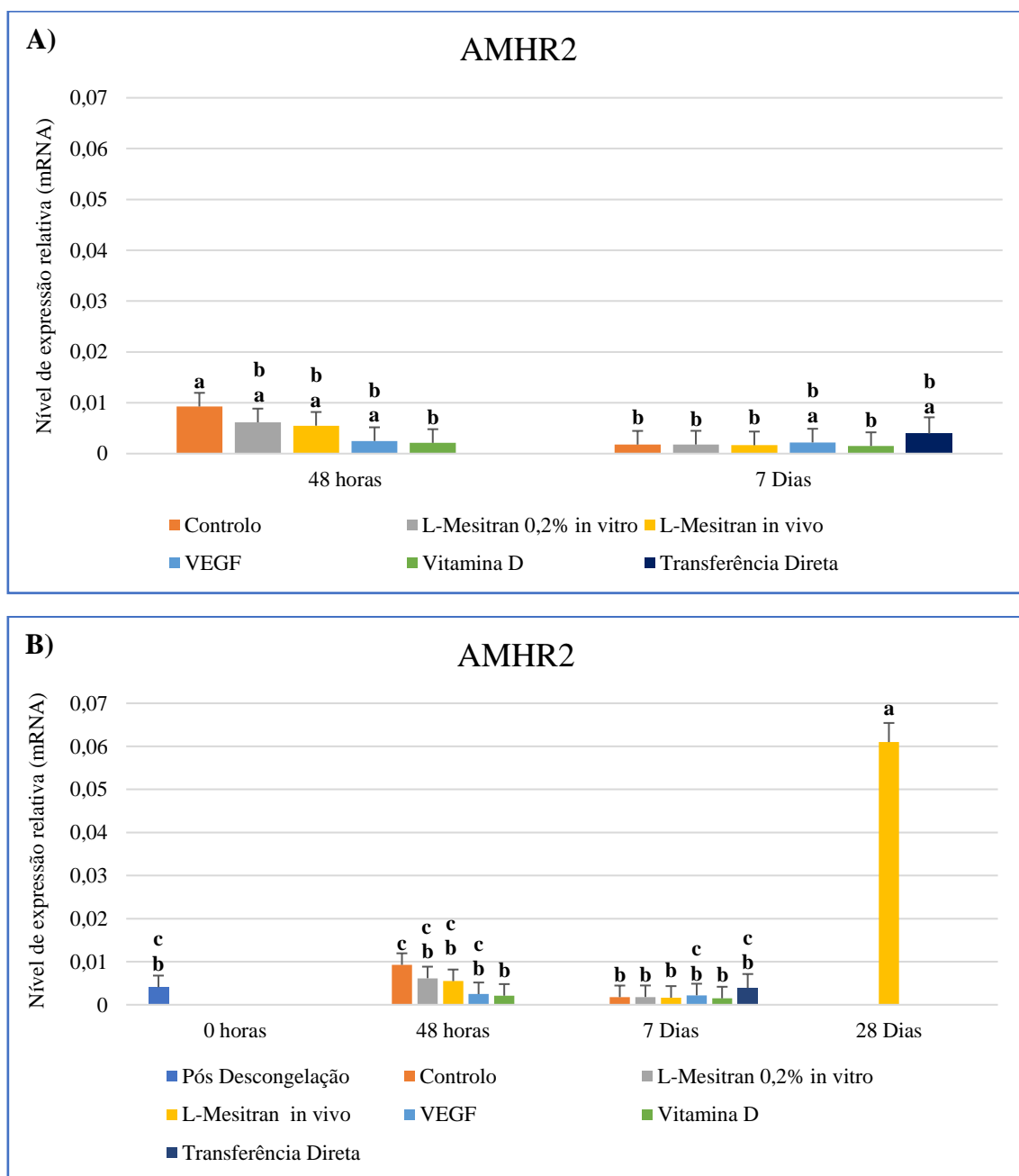
**Figura 22-** Expressão Genética do gene CYP11A1: A) Entre as 48 horas e 7 dias; B) Ao longo do tempo. **a,b:** indicam diferenças estatísticas ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.2. Gene AMHR2

No que se refere ao gene AMHR2 (**Figura 23-A**) às 48 horas, o grupo Controlo apresentou uma transcrição superior ao tratamento com Vitamina D ( $P=0,050$ ).

À semelhança com o sucedido no gene CYP11A1 (**Figura 23-B**), o grupo L-Mesitran *in vivo* aos 28 dias, apresentou uma expressão superior aos restantes grupos/tempos ( $P < 0,002$ ).

Ao longo do tempo, o grupo Controlo das 48 horas manteve-se superior em relação aos grupos dos 7 dias ( $P < 0,04$ ), exceto em relação ao VEGF e Transferência Direta dos 7 dias.



**Figura 23-** Expressão Genética do gene AMHR2: A) Entre as 48 horas e 7 dias; B) Ao longo do tempo. **a-c:** indicam diferenças estatísticas ( $p \leq 0,05$ ).

## 5. Pirosequenciamento de Bissulfito

O padrão de metilação foi analisado ao nível dos genes VASN e AMH. Estes genes foram selecionados com base na sua importância no âmbito do controlo da reserva ovária, e por apresentarem regiões ricas em dinucleótidos CG.

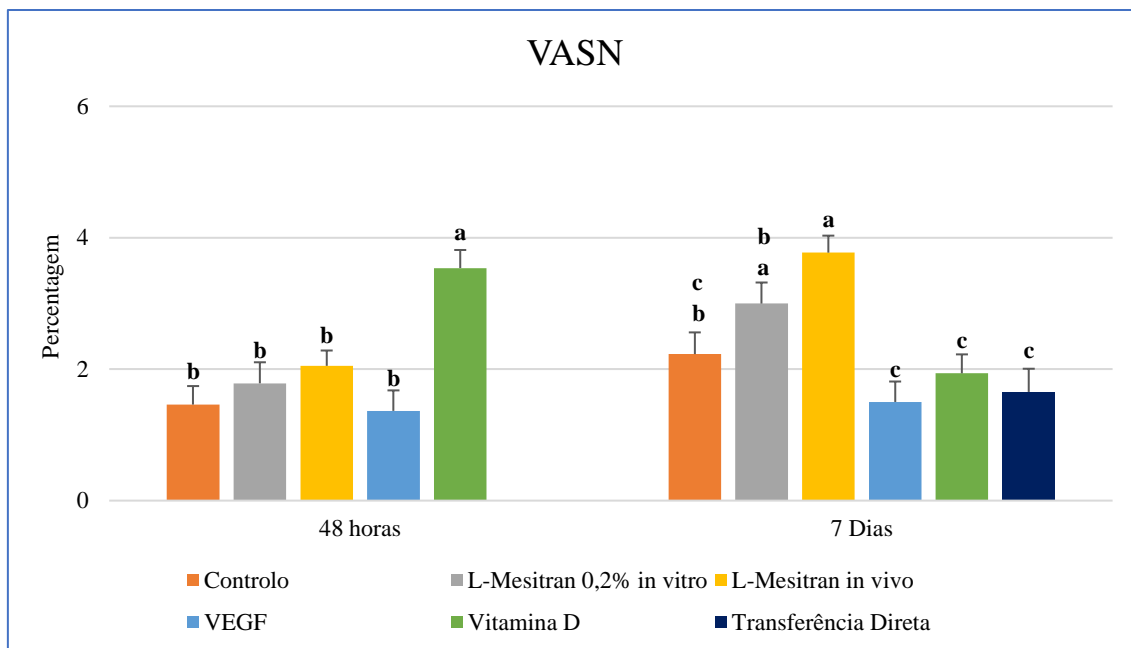
### 5.1. Gene VASN

Relativamente ao gene VASN (**Figura 24 e Figura 25**), foram obtidas diferenças significativas entre grupos/tempos ( $P < 0,01$ ).

#### 5.1.1. Entre Grupos

Às 48 horas, o grupo da Vitamina D foi o que apresentou os valores mais elevados de metilação, em comparação com os restantes grupos ( $P = 0,0001$ ) (**Figura 24**), sendo que o grupo VEGF, apresentou o menor valor absoluto.

Aos 7 dias, os grupos L-Mesitran 0,2% *in vitro e in vivo*, apesar de não serem diferentes entre si, apresentavam uma percentagem de metilação significativamente superior a todos os grupos ( $P < 0,01$ ), excetuando a comparação entre o grupo Controlo e L-Mesitran 0,2% *in vitro* (**Figura 24**). Destacou-se assim, a maior percentagem de metilação do grupo L-Mesitran *in vivo*, neste tempo, relativamente aos restantes grupos ( $P < 0,05$ ).

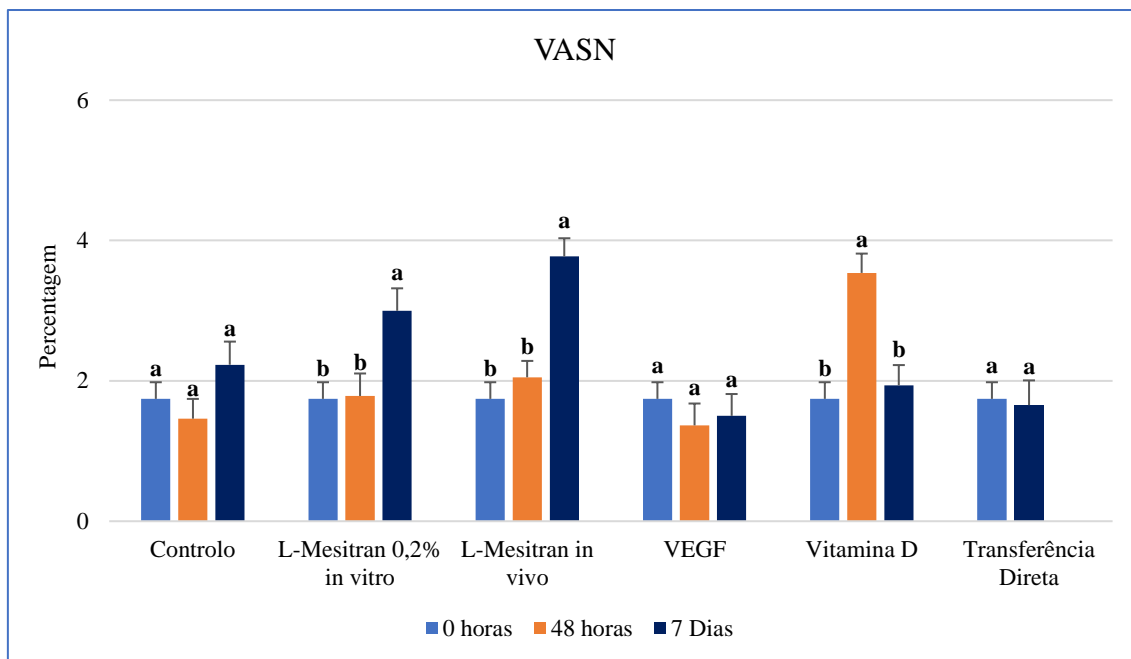


**Figura 24-** Padrão de Metilação do gene VASN às 48 horas e 7 Dias. a-c: indicam diferenças estatísticas ( $p \leq 0,05$ ).

#### 5.1.2. Ao longo do tempo

O momento zero apresentou uma percentagem de metilação significativamente inferior à obtida no grupo de Vitamina D às 48 horas ( $P=0,0001$ ) assim como em relação aos grupos L-Mesitran 0,2% *in vitro* e *in vivo* aos 7 Dias ( $P=0,0019$  e  $P<0,0001$ , respetivamente) (**Figura 25**).

Por outro lado, os grupos L-Mesitran 0,2% *in vitro* e *in vivo*, foram os únicos que apresentaram percentagens de metilação superiores aos 7 dias, relativamente às 48 horas ( $P<0,02$ ), contrariamente ao que ocorre com o tratamento da Vitamina D, no qual foi observada uma redução do nível de metilação das 48 horas para os 7 dias ( $P=0,0001$ ) (**Figura 25**).



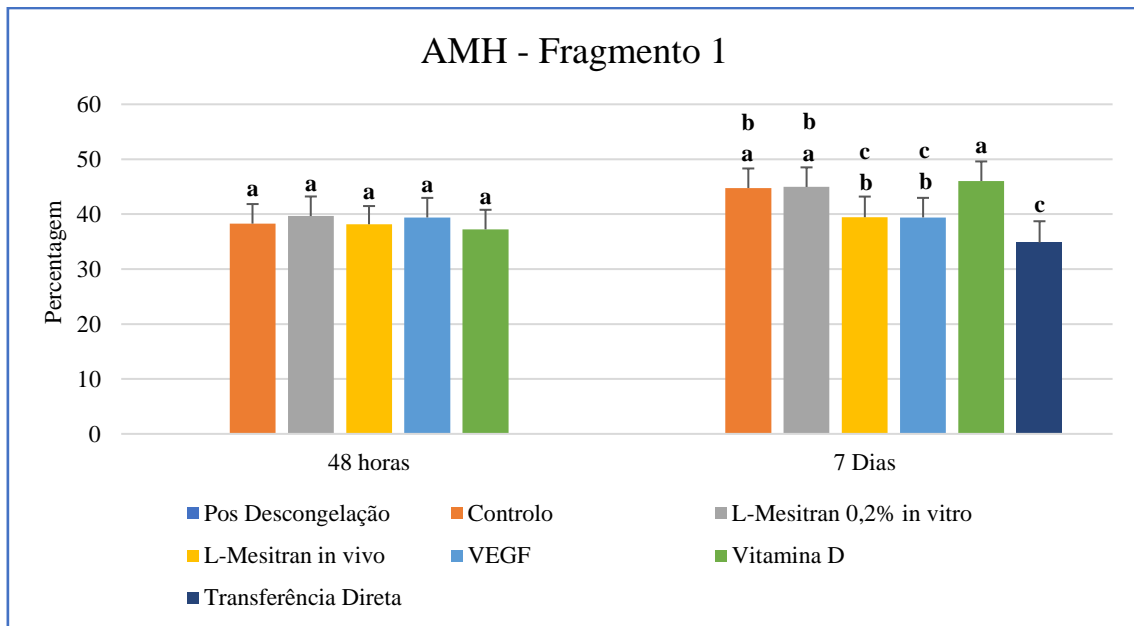
**Figura 25-** Padrão de Metilação do gene VASN ao longo do tempo. **a-b:** indicam diferenças estatísticas ( $p \leq 0,05$ ).

## 5.2. Gene AMH

No âmbito da avaliação da percentagem de metilação do gene AMH, foram testados 2 fragmentos do gene distintos (**Figura 26, Figura 27, Figura 28 e Figura 29 e Anexo X**), sendo que em relação ao período em cultura às 48 horas não foram obtidas diferenças significativas entre grupos.

### 5.2.1. Fragmento 1 (Entre Grupos)

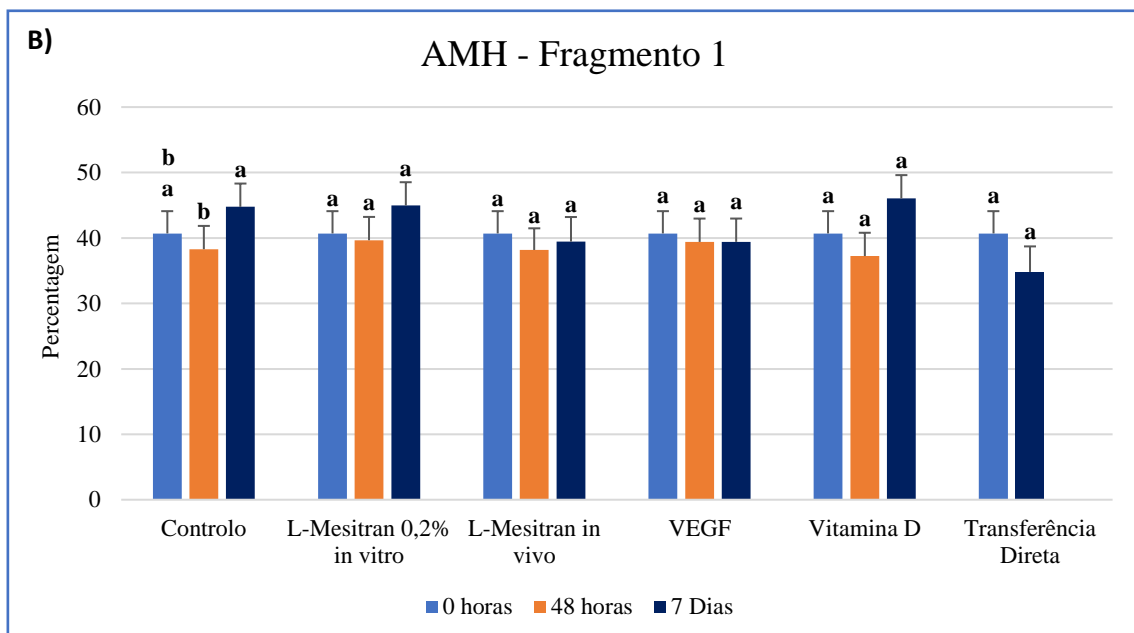
No que concerne o fragmento 1 aos 7 dias, o grupo de Transferência Direta apresentou a menor percentagem de metilação comparativamente com o grupo Controlo ( $P=0,0042$ ), L-Mesitran 0,2% *in vitro* ( $P=0,0035$ ) e Vitamina D ( $P=0,0013$ ). Em contrapartida, o grupo Vitamina D, apresentou um nível de metilação superior em relação aos grupos L-Mesitran *in vivo* ( $P=0,04$ ) e VEGF ( $P=0,03$ ) (**Figura 26**).



**Figura 26-** Padrão de Metilação do gene AMH do Fragmento 1 às 48 horas e 7 Dias.  
*a-c:* indicam diferenças estatísticas ( $p \leq 0,05$ ).

### 5.2.2. Fragmento 1 (Ao longo do tempo)

Neste âmbito, evidenciou-se apenas um aumento da percentagem de metilação do grupo Controlo, das 48 horas para os 7 Dias ( $P=0,034$ ) (**Figura 27**).

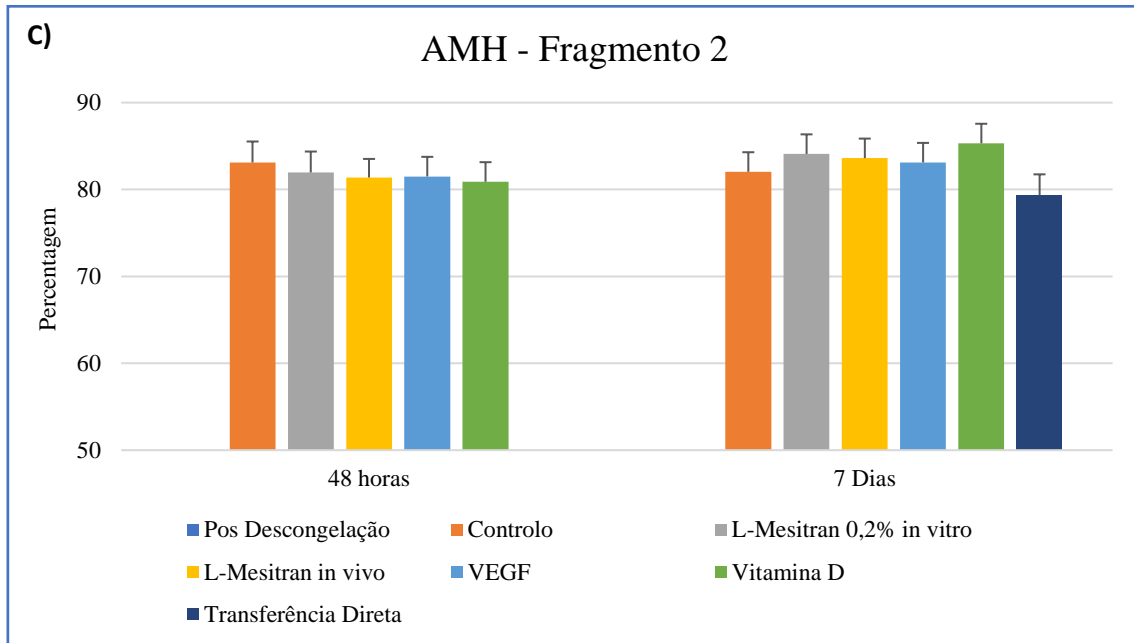


**Figura 27-** Padrão de Metilação do gene AMH do Fragmento 1 ao longo do tempo.  
*a-b:* indicam diferenças estatísticas ( $p \leq 0,05$ ).

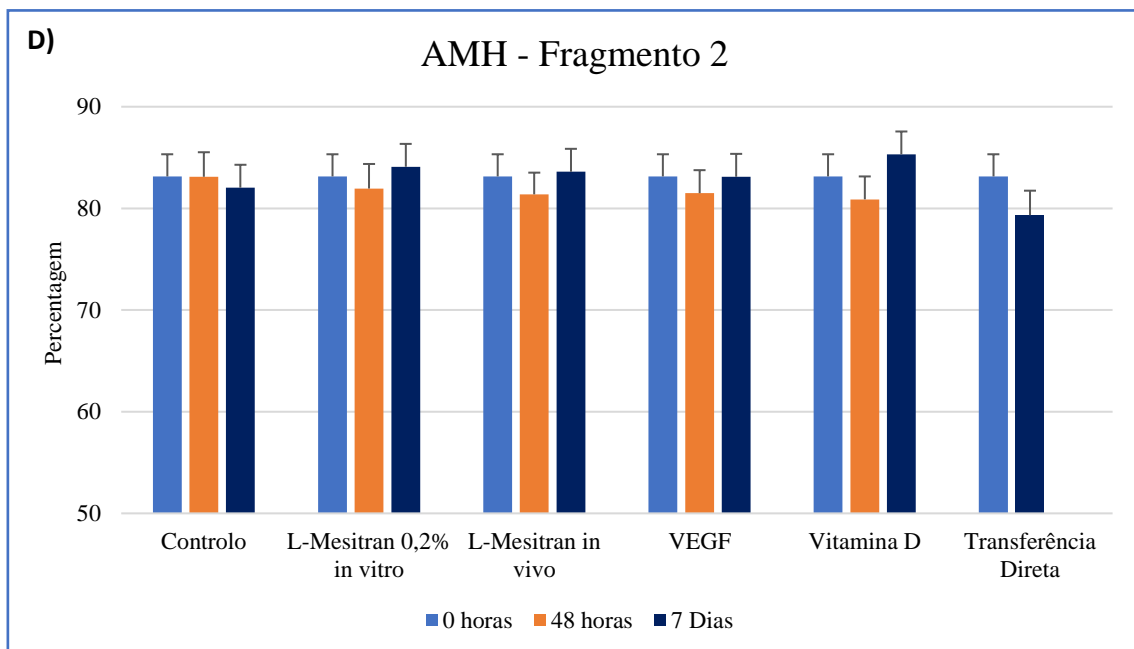


### 5.2.3. Fragmento 2

No que se refere ao fragmento 2 do gene da AMH não foram observadas diferenças significativas ao nível do modelo (interação Grupos/Tempos) (**Figura 28 e Figura 29 e Anexo X**).



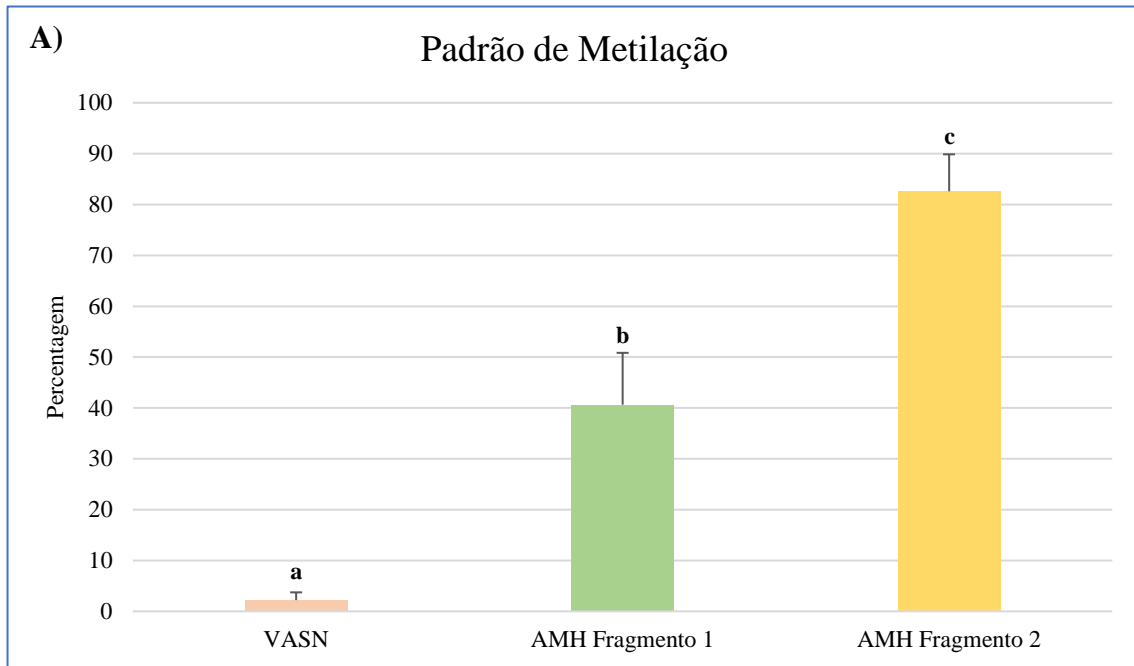
**Figura 28-** Padrão de Metilação do gene AMH do Fragmento 2 às 48 horas e 7 Dias.

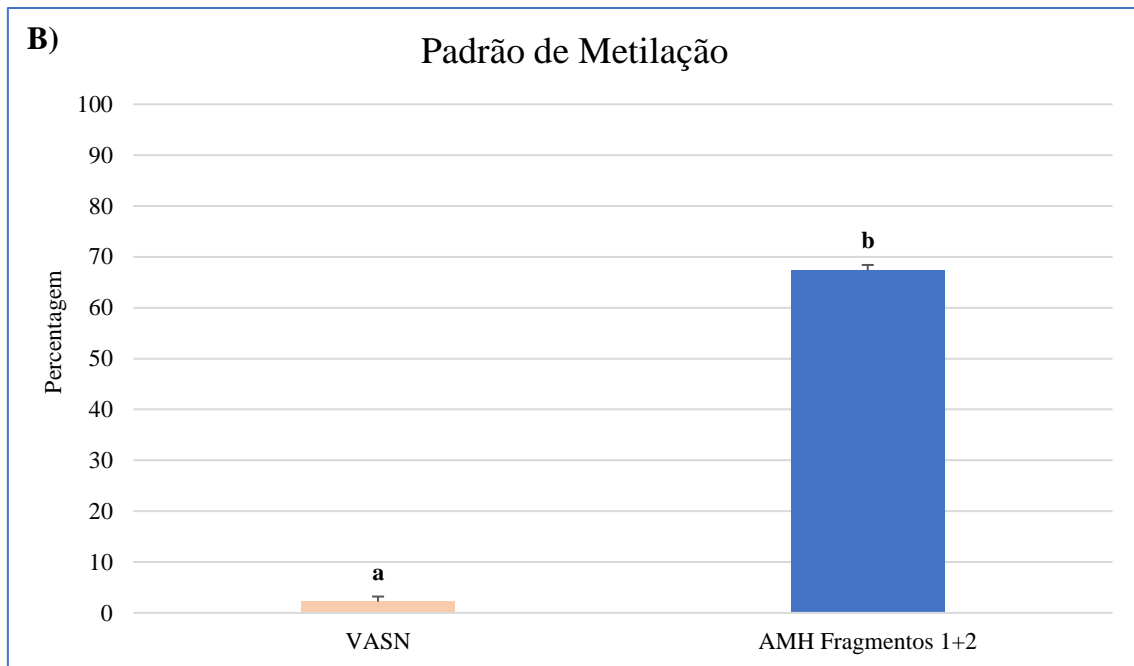


**Figura 29-** Padrão de Metilação do gene AMH do Fragmento 2 ao longo do tempo.

### 5.3. Gene VASN conjuntamente com AMH

Ao compararmos ambos os genes é notória a percentagem de metilação mais elevada apresentada pelo gene AMH nas regiões estudadas (particularmente evidente no fragmento 2), isto é, o gene VASN é hipometilado ( $P < 0,01$ ) relativamente ao AMH, seja em relação a cada um dos fragmentos analisados no AMH, seja entre ambos os genes (VASN e AMH), como é possível verificar pela **Figura 30**.





**Figura 30-** (A) Analogia entre os padrões de metilação do gene VASN e o fragmento 1 e fragmento 2 do gene AMH; (B) Comparação entre os padrões de metilação do gene VASN e AMH no geral. **a-c:** indicam diferenças estatísticas ( $p \leq 0,05$ ).

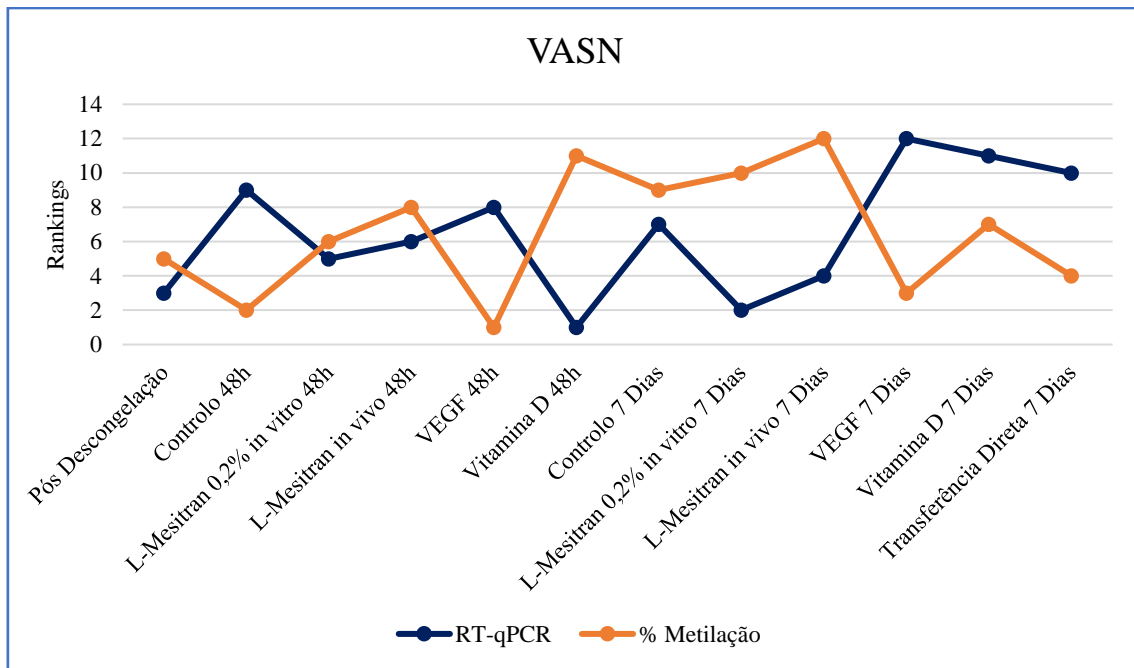
#### 5.4. Expressão genética e padrão de metilação de AMH e VASN

O coeficiente de correlação de *Pearson* foi avaliado para verificar se existia uma associação entre os resultados de metilação e os de expressão genética, através da comparação entre *rankings* de 1 a 12.

##### 5.4.1. Gene VASN

De acordo com a **Figura 31**, no caso do gene VASN, ao analisar todos os grupos em conjunto, observou-se uma correlação negativa muito forte às 48 horas ( $r = -0,813$ ) tendencialmente significativa ( $P = 0,094$ ). Aos 7 dias, a correlação negativa mantém-se forte, embora com um coeficiente de correlação de *Pearson* menor ( $r = -0,565$ ) e não significativo ( $P = 0,243$ ).

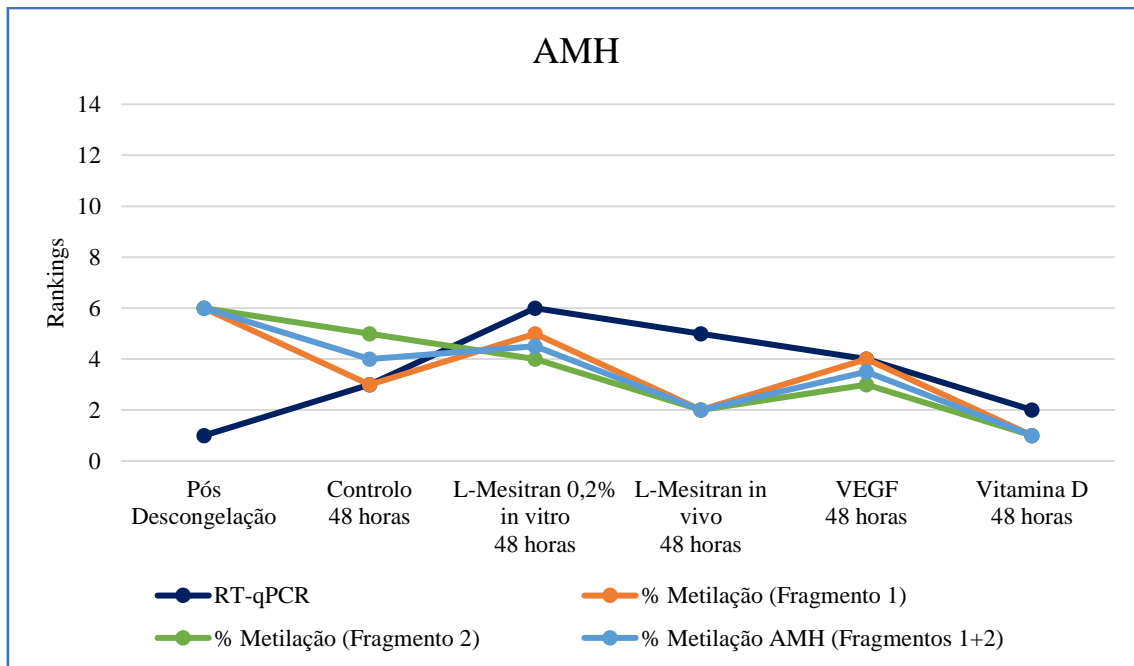
Ao longo do tempo, isto é, desde o momento zero, até aos 7 dias após xenotransplante, ao analisar todos os grupos em conjunto, ocorre sempre uma correlação negativa moderada ( $r = -0,332$ ).



**Figura 31-** Analogia entre os resultados de expressão genética e padrão de metilação do gene VASN. Comparação entre rankings.

#### 5.4.2. Gene AMH

Relativamente ao Fragmento 1 do gene AMH, não foram obtidas correlações significativas entre a metilação e a expressão. Por outro lado, ao contrário do observado no gene VASN, neste caso foi apurada uma correlação positiva ( $r= 0,666$ ) às 0 e 48 horas, ou seja, quando a expressão genética aumenta, o nível de metilação também aumenta e vice-versa. Os mesmos resultados foram obtidos no Fragmento 2, às 48h ( $r= 0,134$ ). Porém, ao longo do tempo, verificou-se uma correlação próxima de zero ( $r= -0,064$ ). Ao analisar o comportamento do gene AMH, sem distinção dos fragmentos, observa-se também uma correlação próxima de zero ( $r= 0,005$ ), não significativa (**Figura 32**).



**Figura 32-** Analogia entre os resultados de expressão genética e de padrão de metilação do gene AMH.

---

*Capítulo VI – Discussão e  
Conclusão*

---

A técnica de criopreservação de tecido ovárico com posterior transplante é o tratamento de preservação da fertilidade a aplicar em pacientes nos quais as abordagens mais tradicionais não são possíveis (126). Todavia, para que seja viável alcançar o sucesso desta técnica, é necessário aprofundar o conhecimento científico relativo às técnicas de criopreservação utilizadas, aos diversos mecanismos genéticos e epigenéticos envolvidos na depleção folicular e consequente diminuição da reserva ovárica, assim como em termos de capacidade de estimulação angiogénica. Ao longo deste trabalho foram analisados diversos parâmetros por meio de diferentes técnicas, com o objetivo de consolidar resultados anteriormente obtidos, assim como desenvolver novas estratégias de preservação de fertilidade.

Foi necessário adaptar o modelo *in vivo* e a logística necessária a este estudo em particular, que envolveu o transplante de córtex ovárico de bovino para uma espécie diferente (xenotransplante), especificamente, para 12 ratos imunodeprimidos e previamente ovariectomizados. Após análise dos resultados, podemos concluir que o local escolhido para colocar os xenotransplantes (junto à fáscia muscular abdominal) é apropriado para os objetivos deste trabalho. De igual forma, foi evidente a importância da cultura *in vitro* em todos os métodos de avaliação, uma vez que permitiu estabelecer condições (aumento de densidade endotelial e proliferação celular ao nível dos folículos, entre outros) para a recuperação do tecido e consequentemente, o desenvolvimento folicular e vascular, cumprindo assim o objetivo principal, que de acordo com Walker *et al.* (2019), consiste na possibilidade do desenvolvimento folicular *in vitro* para posterior crescimento e maturação *in vivo*, essencial no caso particular de pacientes com insuficiência ovárica prematura (126).

Um dos principais fatores críticos para o transplante de tecido ovárico depende da capacidade de minimização das lesões isquémicas ao longo do processo angiogénico. Por meio da avaliação imunohistoquímica, foi possível determinar a evolução do tecido ovárico, em termos vasculares e ao nível da dinâmica folicular, através da utilização de 6 ovários de 3 vacas, perfazendo um total de 811 imagens histológicas analisadas.

A densidade endotelial, avaliada pelo Factor VIII, demonstrou um desenvolvimento progressivo do endotélio vascular, essencialmente até aos 7 dias após xenotransplante. Estes resultados coincidem com o descrito na literatura (82,115) dado que as células endoteliais apresentam taxas mitóticas bastante elevadas até atingirem a fase madura,

proporcionando a vascularização adequada (82). Adicionalmente, foi possível verificar que o processo de vitrificação não afeta o tecido, assim como a cultura *in vitro* e permite que o tecido ovárico inicie novamente a sua atividade sem danos vasculares acentuados, habitualmente responsáveis por situações de isquemia e morte do próprio tecido.

Destaca-se ainda, a capacidade de estimulação angiogénica do tratamento de L-Mesitran 0,2% *in vitro* até aos 28 dias após xenotransplante, o que consolida os resultados anteriormente obtidos pelo grupo, demonstrando mais uma vez a sua importância como alternativa a abordagens que envolvem o uso de VEGF. Não poderá também deixar de ser sublinhado que se trata de um produto económico e de fácil manuseamento, o que também por esse motivo constitui uma vantagem relativamente a outros produtos atualmente utilizados (21).

No âmbito da proliferação celular, foi analisada a expressão proteica de Ki-67, a qual para além da capacidade de expressão durante a cultura *in vitro*, apresentou elevados níveis de expressão *in vivo*. Foi possível constatar que ocorre uma recuperação celular ao longo do tempo, revelando-se nos valores obtidos aos 7 dias. Este achado vai de encontro aos resultados de Gastal *et al.* (2019), que alcançaram potencial proliferativo e capacidade de sobrevivência do tecido após 7 dias em cultura (127).

Além do mais, apesar de vários autores (113–115) descreverem a presença de regiões necróticas nos primeiros dias após transplante, com base nestes resultados é possível afirmar que, a existir, se trata de um evento transitório, uma vez que logo após 7 dias é visível a recuperação do córtex do tecido ovárico. O grupo de L-Mesitran *in vivo*, evidenciou-se pela capacidade de estimulação de desenvolvimento folicular que se manteve até aos 28 dias (**Figura 14** e **Figura 15**), ao contrário do que se verificou nos restantes tratamentos.

Segundo Yang *et al.* (2008), o processo angiogénico necessita de mais de 48 horas para estar concluído. Durante o seu desenvolvimento, o tecido está sujeito a situações de hipoxia responsáveis pela perda folicular. A sobrevivência e desenvolvimento foliculares dependem em parte do crescimento vascular, o qual, por sua vez, se encontra dependente da capacidade de estimulação pelos fatores angiogénicos (128). De forma a solidificar os resultados acima mencionados e determinar de que forma a qualidade do estroma (e dos folículos) acompanhava o observado ao nível do endotélio, foi também avaliada a



marcação com Ki-67 (proliferação celular). A nível do endotélio foi possível verificar a presença de elevadas taxas de vascularização, atingidas essencialmente até aos 7 dias após transplante, consolidando-se o que era esperado e o descrito previamente por outros autores (129). Não se verificaram diferenças significativas entre os diferentes tratamentos. Todavia, ao longo do tempo verificou-se que os grupos L-Mesitran 0,2% *in vitro* e *in vivo* apresentaram os valores mais elevados em termos de densidade endotelial e proliferação celular nos folículos.

A qualidade do estroma demonstrou ser superior após cultura *in vitro* comparativamente com o momento de Pós-Descongelção, o que reforça a importância da cultura *in vitro* neste contexto.

A apoptose celular, é um dos mecanismos essenciais na homeostase, fisiopatologia e normal desenvolvimento dos ovários. Porém, os resultados obtidos não apresentaram diferenças significativas no âmbito da marcação com Caspase 3 ao nível dos folículos (**Figura 18**), apresentando apenas diferenças ao nível do estroma (**Figura 19 e Figura 20**). O grupo com maior marcação foi o de L-Mesitran *in vivo*, o que poderá estar correlacionado com a elevada atividade celular, observada através da marcação com Ki-67, no âmbito de um mecanismo de *turnover* celular, isto é, dos processos de remodelação celulares necessários à diferenciação e enucleação, os quais se encontram intimamente correlacionados com a ativação da Caspase 3. Embora as Caspases estejam relacionadas com a apoptose celular, a proteólise mediada por caspases controla igualmente diversas atividades celulares não letais, tais como a proliferação, reorganização do citoesqueleto, entre outras. De facto, nas células estaminais embrionárias, um aumento da atividade das Caspases possibilita a ativação de fatores de transcrição fulcrais na diferenciação e, por conseguinte, na regulação da pluripotência (130). Assim, uma maior densidade endotelial e proliferação celular geral, acompanhada por uma apoptose superior, parece poder estar relacionada com processos normais ao nível da adaptação e remodelação de um enxerto de córtex ovárico.

Em relação à qualidade do estroma, avaliada por meio da caspase 3, os resultados observados vão ao encontro dos níveis de apoptose celular observados nos folículos às 48 horas e 7 dias. Em particular, para além do grupo de L-Mesitran *in vivo*, o tratamento com a Vitamina D em cultura (48h) apresenta níveis significativamente elevados em comparação com os 7 e 28 dias após xenotransplante, indicando assim uma recuperação

do tecido ao longo do tempo. De acordo com Winkler-Crepaz *et al.* (2008), após o transplante de córtex de tecido ovárico é improvável que ocorra perda folicular apenas devido à apoptose isquémica, sendo o elevado recrutamento de folículos primordiais um mecanismo a considerar. Deste modo, a densidade e viabilidade dos folículos presentes no córtex do tecido ovárico transplantado é fundamental, dado que os enxertos deverão apresentar uma densidade intermédia, de modo a prevenir a depleção dos folículos, resultante da pressão intrínseca após o transplante e permitindo, assim, uma longa duração do normal funcionamento ovárico (47). Adicionalmente, a presença de fibrose estromal poderá estar associada de forma positiva à ativação folicular, uma vez que a rigidez estromal aparenta contribuir para a dinâmica folicular (129), explicando assim os elevados níveis de proliferação e apoptose celular observados.

A avaliação de citotoxicidade celular que permite a avaliação dos efeitos letais dos tratamentos aplicados em cultura, foi avaliada por meio do doseamento de Lactato Desidrogenase (LDH) presente nas células que sofreram danos na membrana, e por sua vez libertaram o conteúdo celular para o meio de cultura. Ainda que não tenham sido identificadas diferenças significativas entre grupos (LDH no sobrenadante da cultura *in vitro*), os grupos Controlo e VEGF, apresentaram os valores absolutos mais elevados, enquanto que o L-Mesitran 0,2% *in vitro* e Vitamina D apresentaram os menores valores (menor citotoxicidade). Pretendemos no futuro, vir a alargar esta análise *in vitro*, com a incorporação de um maior número de amostras, de modo a poder validar o que já tinha sido anteriormente verificado pelo nosso grupo (21) ao nível do potencial angiogénico e de redução da citotoxicidade do L-Mesitran 0,2% *in vitro* no tecido ovárico. A redução da citotoxicidade poderá também vir a ser alcançada através da melhoria do processo de vitrificação e com a utilização de crioprotetores como a sucrose, em concentrações de 0,1M ou 0,05M (1).

Contrariamente ao esperado, em termos de expressão genética nos 7 genes avaliados (VASN, CYP11A1, AMHR2, VEGFA, VEGFR1, VEGFR2 e AMH), apenas foram observadas diferenças significativas nos genes CYP11A1 e AMHR2. A proteína expressa pelo gene CYP11A1, catalisa a conversão de colesterol para pregnenolona, possibilitando, entre outros, a produção de progesterona essencial durante a gravidez. Embora sem diferenças significativas à 48h e 7 dias, os grupos VEGF e Vitamina D, apresentaram os valores absolutos menores aos 7 dias, sendo que o grupo de Vitamina D (D3) foi o que apresentou o valor menor destes dois. Sabe-se que o CYP11A1 está

relacionado com a produção de metabolitos a partir da Vitamina D3 (131) (ou seja a maior expressão de CYP11A1 induz uma menor concentração de Vitamina D3) e assim, a confirmar-se em estudos posteriores, poderá esta menor expressão observada de CYP11A1 estar relacionada com um mecanismo de *feedback* negativo em relação à presença de Vitamina D3 no meio de cultura que terá que ser explorada. Aos 28 dias apenas foi possível avaliar a expressão no grupo L-Mesitran *in vivo*, que apresenta valores significativamente superiores aos restantes grupos às 48h e aos 7 dias, mas não em relação ao momento de Pós-Descongelação (0 horas). Poderemos inferir assim que, pelo menos no que concerne o grupo L-Mesitran *in vivo*, parece existir uma redução na expressão do gene CYP11A1 durante o tempo de incubação *in vitro* e até aos 7 dias após transplante, que é posteriormente recuperada após 28 dias *in vivo*, podendo sugerir que neste grupo existe uma recuperação da atividade esteroidogénica *in vivo*.

Quanto ao recetor AMHR2 verificou-se uma expressão muito reduzida desde o momento pós-descongelação até aos 7 dias após transplante, sendo o grupo da Vitamina D às 48h, o único a apresentar valor menor que o Controlo para o mesmo tempo. No entanto, aos 7 dias, os grupos VEGF e Transferência Direta, são os únicos que não apresentam uma expressão menor que o grupo Controlo às 48h. Aos 28 dias, o grupo L-Mesitran *in vivo*, apresenta uma recuperação da expressão, com valor superior a todos os restantes grupos, e ao longo do tempo (**Figura 23**), não tendo no entanto sido possível correlacionar este aumento de expressão (do recetor AMHR2) com a expressão da AMH no mesmo tempo, uma vez que apenas foi detetada expressão de AMH até às 48 horas, não sendo esta significativa (**Anexo IX**). Em 2018, foi identificada em ovários de ratinhos, a expressão de AMHR2 antes de AMH, indicando que existem outros mecanismos de ativação do recetor durante o período inicial de maturação folicular (132). De acordo com Chan *et al.* (2018), a redução dos níveis de AMHR2 poderá resultar numa perda do mecanismo que inibe a ativação e crescimento folicular primordial, o que significa que ao atingir níveis elevados de expressão deste recetor será possível preservar a reserva ovárica o que no caso de pacientes com infertilidade por insuficiência ovárica prematura é fundamental (132). Recentemente foi detetado em linhagens celulares de cancro ovárico uma resposta positiva ao tratamento com AMH recombinante na presença de AMHR2, demonstrando a sua importância no diagnóstico e/ou terapêutica (37). Como referido, pudemos constatar que no caso do único grupo observado aos 28 dias (fruto do reduzido número de animais disponíveis), a expressão de AMHR2 foi significativamente superior ao grupo do tempo

zero (Pós-Descongelamento) e de todos os grupos às 48h e aos 7 dias. Tal, parece indicar que, no caso do L-Mesitran *in vivo*, existe uma ativação da expressão deste gene após 28 dias de transplante, que é superior inclusivamente à expressão detetada no momento inicial. Por último, sabe-se que a expressão de AMHR2 não coincide com a presença de VEGF-A, é descrito na literatura como estimulador deste recetor na superfície de células da granulosa isoladas de folículos maduros (37), permanecendo desconhecido o mecanismo responsável pela ativação do recetor. Nós apenas pudemos constatar que a expressão de VEGF-A no grupo L-Mesitran *in vivo* aos 28 dias (onde a expressão de AMHR2 é superior), foi o que apresentou valores absolutos mais baixos (embora sem diferenças significativas para os outros tratamentos/tempos).

O facto do mediador molecular VEGF não apresentar diferenças significativas entre grupos/tempos ao nível da expressão, poderá resultar da ausência de estimulação por parte de outros fatores durante estes períodos, como é o caso das gonadotrofinas, uma vez que a hormona folículo estimulante, além de induzir o crescimento folicular, ativa simultaneamente a produção de VEGF no ovário (109). Acresce que os elevados níveis de VEGF descritos na literatura são maioritariamente obtidos nas camadas teca e da granulosa dos estadios finais de desenvolvimento.

O predomínio de folículos naturalmente mais avasculares (primordiais e primários), comparativamente aos mais vascularizados (secundários) (da avaliação histológica efetuada, em 393 fragmentos analisados, apenas foram detetados 107 folículos primordiais, 87 folículos primários e 79 folículos secundários), poderá também estar correlacionado com a expressão observada do VEGF e respetivos recetores. Sabe-se que a ausência de expressão deste fator poderá ser positiva, uma vez que a administração subcutânea de VEGF-A em macacos marmos adultos durante a fase folicular inibiu a ovulação, assim como se associou um nível bastante elevado de folículos atresicos (133). Num estudo desenvolvido por Renee *et al.* (2012), foi demonstrado que a regulação positiva do VEGF-A promove a supressão do recrutamento de folículos primordiais (133).

Sob outra perspectiva, a ação de VEGF ocorre no ovário através da ligação aos recetores de tirosina quinase VEGFR1 e VEGFR2 (37), sendo o seu funcionamento em cascata. Logo, se não ocorrer a ativação de VEGF não haverá expressão dos seus recetores. De acordo com Guzmán *et al.* (2015), foi possível demonstrar que ocorre um aumento da

expressão de VEGFR2 durante o desenvolvimento do corpo lúteo, e que a ausência de expressão deste fator, quando ocorre, poderá ser um fator revelador do recrutamento folicular (134).

Relativamente ao gene VASN, habitualmente expresso nas células musculares lisas vasculares, foi recentemente identificado como regulador da foliculogénese ovárica no âmbito da proteção das células, em oposição à apoptose induzida pela via TNF- $\alpha$  e hipoxia, com translocação da proteína vasorina para as mitocôndrias em fibroblastos embrionários de ratinhos (135) e regulando a oxidação/redução da enzima antioxidante mitocondrial, tioredoxina 2 e produção de ROS (136). Adicionalmente, Bonnet *et al.* (2018), demonstraram a existência de uma regulação negativa da expressão de VASN induzida por lesão vascular e associada à resposta fibroproliferativa subsequente (135), indicando assim que a expressão do VASN, nem sempre poderá ser entendida como estando relacionada com uma reação tecidual desejável. Por outro lado, na ausência de VASN, segundo Dahari *et al.* (2018), o número de folículos primordiais e antrais atresicos é consideravelmente menor, sendo a expressão do gene um regulador negativo da sobrevivência de folículos antrais, afetando por sua vez a ovulação (40).

Ao longo do tempo, a proteína AMH, produzida pelas células da granulosa dos folículos em crescimento, tem vindo a ser associada à regulação negativa da ativação folicular primordial. Porém, recentemente foram detetados níveis reduzidos de expressão de AMH, em transplantes de córtex ovárico humano nos quais o ciclo ovárico e função hormonal foram normais (137). Da avaliação que efetuámos do padrão de metilação deste gene, foi possível verificar que, ao nível das regiões analisadas, o gene parece estar hipermetilado, o que poderá explicar a ausência de expressão que detetámos aos 7 e 28 dias, e que está de acordo com o reportado previamente por outros autores (100). De facto, de acordo com Laing *et al.* (2018), a transcrição de AMH e o nível de metilação na região promotora apresentam-se inversamente relacionados (138), o que origina uma transcrição praticamente nula do gene quando apresenta elevados níveis de metilação.

A análise de metilação incluiu igualmente a avaliação do gene VASN, que está relacionado com a regulação da foliculogénese (135). Como referido anteriormente, ao analisarmos a associação entre a expressão genética e a percentagem de metilação da região do gene VASN, foi possível identificar uma correlação negativa muito forte às 48 horas ( $r = -0,813$ ) apesar de apenas tendencialmente significativa ( $P = 0,094$ ). Aos 7 dias,

a correlação negativa forte mantém-se, embora com um coeficiente de correlação de *Pearson* menor ( $r = -0,565$ ) e não significativo ( $P = 0,243$ ) e ao longo do tempo, isto é, entre o momento de Pós Descongelção, as 48 horas em cultura e os 7 dias após xenotransplante, ocorre sempre uma correlação negativa moderada ( $r = -0,332$ ). Em termos de tratamentos, a Vitamina D às 48 horas e L-Mesitran *in vivo* aos 7 dias apresentaram os níveis mais elevados de metilação, diminuindo a expressão do gene. Desta forma, uma vez que a expressão de VASN se encontra associada à inibição de TNF- $\beta$  e do recrutamento folicular, com estes tratamentos poderemos estar a diminuir a ação do gene, proporcionando um recrutamento folicular elevado e favorecendo a estimulação angiogénica, através da ativação da via de sinalização TNF- $\beta$ .

Consideramos que a identificação pela primeira vez de uma região localizada numa ilha CpG do gene VASN (em *Bos taurus*), com uma associação forte com os níveis de expressão genética ao nível do córtex ovárico e com um nível de significância tendencialmente significativo ( $P = 0,094$ ), terá que ser alvo de novos estudos, possivelmente com um maior número de amostras, de forma a podermos confirmar a sua aplicação na população geral. A confirmar-se, poderá servir de marcador para a análise do comportamento do gene VASN, cuja função só muito recentemente foi reconhecida como estando ligada à regulação da foliculogénese (139).

No caso do gene AMH, observaram-se em geral, níveis de metilação elevados nos dois fragmentos analisados e significativamente superiores relativamente à região analisada do gene VASN. Tal parece estar de acordo (como referido anteriormente) com a ausência total de expressão do gene AMH verificada aos 7 e 28 dias.

Este não é, no entanto, um fator determinante para a eliminação do AMH como marcador da reserva ovárica e/ou insucesso de gravidez por meio de técnicas de fertilização *in vitro*, uma vez que tal como demonstrado por Sefrioui *et al.* (2018), ao contrário do que seria esperado com baixos níveis de AMH não ocorre uma resposta ovárica imperfeita, assim como a recetividade endometrial não parece ser afetada (140). De facto, e embora sem diferenças significativas, o tratamento L-Mesitran *in vivo* aos 7 dias exibiu o maior número absoluto de folículos primordiais entre todos os grupos e períodos de tempo. Estes resultados vão de encontro ao descrito por diversos autores, que afirmam que os níveis dos recetores de FSH apresentam uma recuperação lenta (cerca de 150 dias) assim como os níveis de AMH que apresentam um período de recuperação de sensivelmente 130-170

dias, uma vez que esta hormona se encontra regulada positivamente pelo recrutamento de folículos maduros. Após o enxerto, ocorre um recrutamento massivo de folículos, os quais se encontram num período de “dormência” e iniciam o seu processo de desenvolvimento até atingirem o estágio ovulatório, sendo que os níveis de AMH apenas atingem valores regulares após o retorno completo da pressão tecidual e do recrutamento regular dos folículos.

Em suma, como mencionado anteriormente, este modelo de bioensaio permitiu estender a avaliação preliminar realizada previamente pelo nosso grupo sobre a influência positiva do L-Mesitran Soft no córtex ovárico bovino, em tecido fresco, criopreservado, *in vitro* e *in vivo*, assim como comparar esta eficácia com a de outras drogas atualmente utilizadas, com um papel potencial na reprodução, em animais e humanos. Além do mais, para além do seu potencial de revascularização e aparente menor citotoxicidade demonstrada [trabalho atual e anterior (28)], os resultados obtidos em termos de proliferação celular são também muito promissores e parecem estar em sintonia com a análise dos índices de apoptose que foram detetados, numa perspetiva de *turnover* celular, necessário à remodelação tecidual do transplante ovárico. Foi também possível verificar que, pelo menos no Grupo L-Mesitran *in vivo*, existia uma recuperação da atividade de esteroidogénese aos 28 dias (expressão do gene CYP11A1), assim como da expressão do recetor do gene AMH (AMHR2), que se encontra envolvido na regulação e manutenção da reserva folicular. Parece assim, que o L-Mesitran Soft, além da sua valência no âmbito da angiogénese, poderá também ter um papel na regulação da esteroidogénese e no controlo da reserva ovárica. O modelo animal utilizado, que envolveu o xenotransplante de córtex ovárico bovino para ratos imunodeprimidos ovariectomizados, ao nível da fáscia muscular abdominal, ficou também consolidado como um modelo aplicável a outros estudos e produtos que visem também a utilização destes dois modelos animais, face à sua utilidade como modelos para o estudo da fertilidade humana. Foi também, tal como referido anteriormente, identificada pela primeira vez uma região no gene VASN, cujo padrão de metilação poderá vir a ser usado na avaliação do comportamento deste gene em situações diversas e no âmbito da fertilidade feminina, uma ação que só muito recentemente lhe foi atribuída. Para tal, será necessário estender esta avaliação a uma região mais alargada, ao longo da ilha CpG que abarca o primeiro exão (não codificante) deste gene.

Contudo, embora tenham sido alcançados resultados que nos parecem ser bastante promissores, seria interessante aprofundar no futuro o mecanismo envolvido na ativação da angiogénese por parte do L-Mesitran Soft. De facto, face à ausência de diferenças significativas entre grupos nos genes que foram avaliados com ligação à angiogénese, importa agora estender esta análise a um maior número de genes com atividade nesta área, tais como os genes FGF2 (fator de crescimento fibroblástico-2), PDGF (Fator de crescimento derivados das plaquetas) e ANGPT2 (Angiopietina 2).

Será também importante aumentar o número de fragmentos analisados, particularmente no período dos 28 dias, ao nível da expressão genética. De facto, embora apenas tivéssemos previsto inicialmente realizar a análise dos fragmentos de tecido ovárico até aos 7 dias após transplante, foi possível realizar também análises imunohistoquímicas em todos os grupos e de expressão genética no grupo L-Mesitran *in vivo*, após 28 dias. Do que foi possível observar, parece-nos que será muito importante a inclusão deste tempo de estudo em trabalhos futuros.

Finalmente, e dos dados obtidos, poderemos concluir que a incorporação de L-Mesitran Soft, quer *in vitro* (meio de cultura) quer *in vivo* (local de transplante), poderá constituir uma alternativa válida no âmbito da preservação da fertilidade feminina.



---

## *Capítulo VII - Bibliografía*

---

1. Azevedo A.R. Criopreservação de Tecido Ovário de Bovino para transplante. 2017;(20130332).
2. George FHM. Francisco Henrique Moura George. Norma Da Direção - Geral Da Saúde [Internet]. 2013;1(1):9. Available from: <http://www.dgs.pt/upload/membro.id/ficheiros/i018596.pdf>
3. Rajabi Z, Aliakbari F, Yazdekhashti H. Review Article Female Fertility Preservation, Clinical and Experimental Options. 2018;19(3):125–32.
4. Society at a Glance AS on Y. Society at a Glance 2016: OECD Social Indicators. Paris: OECD Publishing; 2016.
5. Yasmin E, Balachandren N, Davies MC, Jones GL, Lane S, Mathur R, et al. Fertility preservation for medical reasons in girls and women: British fertility society policy and practice guideline. Hum Fertil [Internet]. 2018;0(0):1–24. Available from: <https://doi.org/10.1080/14647273.2017.1422297>
6. Standards and Practice Committee. International Federation of Fertility Societies Global Standards of Infertility Care. Standard 2. Access to infertility care. Recommendations for Practice. 2015;(June 2011):1–5.
7. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin [Internet]. 2018;68(6):394–424. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30207593>
8. Rodriguez-Wallberg KA, Oktay K. Fertility preservation during cancer treatment: Clinical guidelines. Cancer Manag Res. 2014;6(1):105–17.
9. Źulpaitė R, Bumbulienė Ź. Reproductive health of female childhood cancer survivors. Ginekol Pol [Internet]. 2018;89(5):280–6. Available from: [https://journals.viamedica.pl/ginekologia\\_polska/article/view/57490](https://journals.viamedica.pl/ginekologia_polska/article/view/57490)
10. Jensen JR, Morbeck DE, Coddington CC. Fertility preservation. Mayo Clin Proc [Internet]. 2011;86(1):45–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.4065/mcp.2010.0564>
11. Lopategui DM, Ibrahim E, Aballa TC, Brackett NL, Yechieli R, Barredo JC, et al. Effect of a formal oncofertility program on fertility preservation rates—first year

- experience. *Transl Androl Urol* [Internet]. 2018;7(S3):S271–5. Available from: <http://tau.amegroups.com/article/view/19630/20192>
12. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Dyer S, Racowsky C, De Mouzon J, Sokol R, et al. The international glossary on infertility and fertility care, 2017. *Hum Reprod* [Internet]. 2017;32(9):1786–801. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.06.005>
  13. Noveiry BB, Hirbod-Mobarakeh A, Khalili N, Hourshad N, Greten TF, Abou-Alfa GK, et al. Specific immunotherapy in Hepatocellular cancer: a Systematic Review. *J Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2016;8:1193–204. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jgh.13449>
  14. Levine JM, Kelvin JF, Quinn GP, Gracia CR. Infertility in reproductive-age female cancer survivors. *Cancer*. 2015;121(10):1532–9.
  15. Ussher JM, Perz J, Miller A, Patterson P, Wain G, Hobbs K, et al. Threat of biographical disruption: The gendered construction and experience of infertility following cancer for women and men. *BMC Cancer*. 2018;18(1):1–17.
  16. Algarroba GN, Sanfilippo JS, Valli-Pulaski H. Female fertility preservation in the pediatric and adolescent cancer patient population. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* [Internet]. 2018;48:147–57. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2017.10.009>
  17. Oktem O, Kim SS, Selek U, Schatmann G, Urman B. Ovarian and Uterine Functions in Female Survivors of Childhood Cancers. *Oncologist* [Internet]. 2017;theoncologist.2017-0201. Available from: <http://theoncologist.alphamedpress.org/lookup/doi/10.1634/theoncologist.2017-0201>
  18. Critchley HOD. Impact of Cancer Treatment on Uterine Function. *J Natl Cancer Inst Monogr* [Internet]. 2005;2005(34):64–8. Available from: <https://academic.oup.com/jncimono/article-lookup/doi/10.1093/jncimonographs/lgi022>
  19. Chen Y, Ye L, Guan L, Fan P, Liu R, Liu H, et al. Physiological electric field works via the VEGF receptor to stimulate neovessel formation of vascular endothelial cells in a 3D environment. *Biol Open* [Internet]. 2018;7(9):bio035204.

Available from: <http://bio.biologists.org/lookup/doi/10.1242/bio.035204>

20. Srinivasan S, Chitalia V, Meyer RD, Hartsough E, Mehta M, Harrold I, et al. Hypoxia-induced expression of phosphocyanin-like 3 regulates expression of VEGFR-2 and promotes angiogenesis. *Angiogenesis*. 2015;18(4):449–62.
21. Pimenta J., Pessa P., Marques C., Azevedo R., Fonseca E., Almeida-Santos T. PRMLN. Medical Grade Honey in ovarian cortex preservation: an in vitro animal model approach for studying angiogenesis. The 5th World Congress of the INTERNATIONAL SOCIETY FOR FERTILITY PRESERVATION.
22. Cho IA, Lee YJ, Lee HJ, Choi IY, Shin JK, Lee SA, et al. Angiopoietin-1 and -2 and vascular endothelial growth factor expression in ovarian grafts after cryopreservation using two methods. 2018;45(3):143–8.
23. Elincoşici CASTM, Ca ADBİBOŞ, Man SEŞUŞ, Rginean MAMĂ, Ihu CAM, Strate MII, et al. Vascular endothelial growth factor ( VEGF ) – key factor in normal and pathological angiogenesis. 2018;59(2):455–67.
24. Ortega Serrano P V., Guzmán A, Hernández–Coronado CG, Castillo–Juárez H, Rosales-Torres AM. Reduction in the mRNA expression of sVEGFR1 and sVEGFR2 is associated with the selection of dominant follicle in cows. *Reprod Domest Anim*. 2016;51(6):985–91.
25. Rossiter K, Cooper AJ, Voegeli D, Lwaleed BA. Honey promotes angiogenic activity in the rat aortic ring assay. *J Wound Care* [Internet]. 2010 Oct 1;19(10):440–6. Available from: <https://doi.org/10.12968/jowc.2010.19.10.79091>
26. Molan PC. The potential of honey to promote oral wellness. *Gen Dent*. 2001;49(6):584–9.
27. Miller WL, Auchus RJ. The Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology of Human Steroidogenesis and Its Disorders. *Endocr Rev* [Internet]. 2011 Feb 4;32(1):81–151. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3365799/>
28. Goursaud C, Mallet D, Janin A, Menassa R, Tardy-Guidollet V, Russo G, et al. Aberrant Splicing Is the Pathogenicity Mechanism of the p.Glu314Lys Variant in CYP11A1 Gene. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 2018;9(September):1–9.

- Available from:  
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2018.00491/full>
29. Galloway DA, Laimins LA, Division B, Hutchinson F. HHS Public Access. 2016;87–92.
  30. Tuckey RC, Cheng CYS, Slominski AT. The serum vitamin D metabolome: What we know and what is still to discover. *J Steroid Biochem Mol Biol* [Internet]. 2018; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960076018302206>
  31. Shahrokhi SZ, Ghaffari F, Kazerouni F. Role of vitamin D in female Reproduction. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2016;455:33–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2015.12.040>
  32. Xu J, Hennebold JD, Seifer DB. Direct vitamin D3 actions on rhesus macaque follicles in three-dimensional culture: assessment of follicle survival, growth, steroid, and antimüllerian hormone production. *Fertil Steril* [Internet]. 2016;106(7):1815-1820.e1. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.08.037>
  33. Naderi Z, Kashanian M, Chenari L, Sheikhsari N. Evaluating the effects of administration of 25-hydroxyvitamin D supplement on serum anti-müllerian hormone (AMH) levels in infertile women. *Gynecol Endocrinol* [Internet]. 2018;34(5):409–12. Available from: <https://doi.org/10.1080/09513590.2017.1410785>
  34. Kim S, Ju Kim J, Kim M-J, Hee Han K, Ryeol Lee J, Suk Suh C, et al. Gynecological Endocrinology Relationship between serum anti-Müllerian hormone with vitamin D and metabolic syndrome risk factors in late reproductive-age women Relationship between serum anti-Müllerian hormone with vitamin D and metabolic syndrome risk fa. *Gynecol Endocrinol* [Internet]. 2017;0(0):327–31. Available from: <http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=igye20>  
<http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=igye20>
  35. Kim JY. Control of ovarian primordial follicle activation. *Clin Exp Reprod Med*. 2012;39(1):10–4.

36. Dennis NA, Houghton LA, Pankhurst MW, Harper MJ, McLennan IS. Acute supplementation with high dose vitamin D3 increases serum anti-müllerian hormone in young women. *Nutrients*. 2017;9(7).
37. Fang Y, Lu X, Liu L, Lin X, Sun M, Fu J, et al. Vascular endothelial growth factor induces anti-Müllerian hormone receptor 2 overexpression in ovarian granulosa cells of in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection patients. *Mol Med Rep*. 2016;13(6):5157–62.
38. Merhi Z, Doswell A, Krebs K, Cipolla M. Vitamin D Alters Genes Involved in Follicular Development and Steroidogenesis in Human Cumulus Granulosa Cells. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2014 Jun 1;99(6):E1137–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2013-4161>
39. Sánchez M, Alamá P, Gadea B, Soares SR, Simón C, Pellicer A. Fresh human orthotopic ovarian cortex transplantation : long-term results. 2007;22(3):786–91.
40. Rimon-Dahari N, Heinemann-Yerushalmi L, Hadas R, Kalich-Philosoph L, Ketter D, Nevo N, et al. Vasorin: A newly identified regulator of ovarian folliculogenesis. *FASEB J* [Internet]. 2017 Jan 5;(4). Available from: <https://doi.org/10.1096/fj.201700057RRR>
41. Kimura AP, Yoneda R, Kurihara M, Mayama S, Matsubara S. A long noncoding RNA, lncRNA-Amhr2, plays a role in Amhr2 gene activation in mouse ovarian granulosa cells. *Endocrinology*. 2017;158(11):4105–21.
42. Pimenta, J., Nolasco, S., Pires, V., Marques, C.C., Castelo-Branco, P.; Costa, L., Prates, J., Azevedo, R., Fonseca, E., Pistola, M., Pereira RMLN. Identificação de genes alvo na esteroidogênese bovina por RNA de interferência (RNAi). 2018;
43. Rajan R, Matsumura K. Development and Application of Cryoprotectants. In: Iwaya-Inoue M, Sakurai M, Uemura M, editors. *Survival Strategies in Extreme Cold and Desiccation: Adaptation Mechanisms and Their Applications* [Internet]. Singapore: Springer Singapore; 2018. p. 339–54. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-981-13-1244-1\\_18](https://doi.org/10.1007/978-981-13-1244-1_18)
44. Tobergte DR, Curtis S. Cryopreservation. Vol. 53, *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2013. 1689–1699 p.

45. Mandawala AA, Harvey SC, Roy TK, Fowler KE. Cryopreservation of animal oocytes and embryos: current progress and future prospects. *Theriogenology* [Internet]. 2016; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.07.018>
46. Kokotsaki M, Mairhofer M, Schneeberger C, Marschalek J, Pietrowski D. Impact of vitrification on granulosa cell survival and gene expression. *Cryobiology* [Internet]. 2018;0–1. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.09.006>
47. Silber S. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: scientific implications. *J Assist Reprod Genet* [Internet]. 2016;33(12):1595–603. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10815-016-0814-1>
48. BPGA. Banco Português de Germoplasma Animal. 2007;
49. Pegg DE. Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol*. 2015;1257:3–19.
50. Kratochvilova I, Kope O, Ba A, Pagá E, Falková I, Follett SE, et al. Biological and Environmental Phenomena at the Interface Changes in cryopreserved cell nuclei serve as indicators of processes during freezing and thawing. 2018;
51. Langbeen A, De HFM, Bartholomeus E, Leroy JLMR, Bols EJ. Bovine in vitro reproduction models can contribute to the development of (female) fertility preservation strategies. *Theriogenology* [Internet]. 2015; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.04.009>
52. Basile S. Fertility Preservation : Current and Future Perspectives for Oncologic Patients at Risk for Iatrogenic. 2018;2018.
53. Best BP. Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions. *Rejuvenation Res*. 2015;18(5):422–36.
54. Nikiforov D, Russo V, Nardinocchi D, Bernabò N, Mattioli M, Barboni B. Innovative multi-protectoral approach increases survival rate after vitrification of ovarian tissue and isolated follicles with improved results in comparison with conventional method. *J Ovarian Res*. 2018;11(1):1–15.
55. Suzuki N, Yoshioka N, Takae S, Sugishita Y, Tamura M, Hashimoto S, et al. Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients

- with primary ovarian insufficiency. *Hum Reprod.* 2015;30(3):608–15.
56. Amorim CA, Jacobs S, Devireddy R V., Van Langendonckt A, Vanacker J, Jaeger J, et al. Successful vitrification and autografting of baboon (*Papio anubis*) ovarian tissue. *Hum Reprod.* 2013;28(8):2146–56.
  57. Gurruchaga H, Saenz del Burgo L, Hernandez RM, Orive G, Selden C, Fuller B, et al. Advances in the slow freezing cryopreservation of microencapsulated cells. *J Control Release* [Internet]. 2018;281:119–38. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.05.016>
  58. Rienzi L, Gracia C, Maggiulli R, LaBarbera AR, Kaser DJ, Ubaldi FM, et al. Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance. *Hum Reprod Update.* 2017;23(2):139–55.
  59. Campos ALM, Souza J De, Jhenifer G, Rodrigues K, Antônio W, Pace P, et al. Comparison between Slow Freezing and Vitrification in Terms of Ovarian Tissue Viability in a Bovine Model. 2016;
  60. De Munck N, Vajta G. Safety and efficiency of oocyte vitrification. *Cryobiology* [Internet]. 2017;78:119–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.07.009>
  61. Pereira RM, Marques CC. Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell Tissue Bank.* 2008;9(4):267–77.
  62. Edgar DH, Gook DA. A critical appraisal of cryopreservation (slow cooling versus vitrification) of human oocytes and embryos. *Hum Reprod Update.* 2012;18(5):536–54.
  63. Cobo A, Garcia-Velasco JA, Domingo J, Remohí J, Pellicer A. Is vitrification of oocytes useful for fertility preservation for age-related fertility decline and in cancer patients? *Fertil Steril.* 2013;99(6):1485–95.
  64. Abdollahi M, Salehnia M, Salehpour S, Ghorbanmehr N. Human ovarian tissue vitrification/warming has minor effect on the expression of apoptosis-related genes. *Iran Biomed J.* 2013;17(4):179–86.
  65. Herraiz S, Novella-Maestre E, Rodríguez B, Díaz C, Sánchez-Serrano M, Mirabet



- V, et al. Improving ovarian tissue cryopreservation for oncologic patients: Slow freezing versus vitrification, effect of different procedures and devices. *Fertil Steril*. 2014;101(3).
66. Kuo C-Y, Baker H, Fries MH, Yoo JJ, Kim PCW, Fisher JP. Bioengineering Strategies to Treat Female Infertility. *Tissue Eng Part B Rev* [Internet]. 2017;23(3):294–306. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.teb.2016.0385>
  67. Amorim CA, Donnez J, Dehoux JP, Scalercio SR, Squifflet J, Dolmans MM. Long-term follow-up of vitrified and autografted baboon (*Papio anubis*) ovarian tissue. *Hum Reprod*. 2019;34(2):323–34.
  68. Angarita AM, Johnson CA, Fader AN, Christianson MS. Fertility Preservation: A Key Survivorship Issue for Young Women with Cancer. *Front Oncol* [Internet]. 2016;6(April):1–10. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fonc.2016.00102/abstract>
  69. Sonmezer M, Oktay K. Fertility preservation in female patients. *Hum Reprod Update*. 2004;10(3):251–66.
  70. Stern CJ, Gook D, Hale LG, Agresta F, Oldham J, Rozen G, et al. First reported clinical pregnancy following heterotopic grafting of cryopreserved ovarian tissue in a woman after a bilateral oophorectomy. *Hum Reprod*. 2013;28(11):2996–9.
  71. Bols PEJ, Aerts JMJ, Langbeen A, Goovaerts IGF, Leroy JLMR. Xenotransplantation in immunodeficient mice to study ovarian follicular development in domestic animals. *Theriogenology* [Internet]. 2010;73(6):740–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.10.002>
  72. Silva CSM e. Preservação da fertilidade em mulheres com doença oncológica [Internet]. 2019. Available from: <https://estudogeral.sib.uc.pt/handle/10316/79875>
  73. Yin H, Kristensen SG, Jiang H, Rasmussen A, Andersen CY. Survival and growth of isolated pre-antral follicles from human ovarian medulla tissue during long-term 3D culture. *Hum Reprod*. 2016;31(7):1531–9.
  74. Xu M, West-Farrell ER, Stouffer RL, Shea LD, Woodruff TK, Zelinski MB. Encapsulated Three-Dimensional Culture Supports Development of Nonhuman

- Primate Secondary Follicles<sup>1</sup>. *Biol Reprod* [Internet]. 2009;81(3):587–94. Available from: <https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.108.074732>
75. Chen C, Tzeng C. Ovarian Tissue Transplantation : Current State and Research Advancement. 2013;202–10.
  76. Kawamura K, Cheng Y, Suzuki N, Deguchi M, Sato Y, Takae S, et al. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. 2013;110(43).
  77. Adan A, Baran YK and Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays [Internet]. Vol. 17, *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2016. p. 1213–21. Available from: <http://www.eurekaselect.com/node/144610/article>
  78. Li LT, Jiang G, Chen Q, Zheng JN. Predict Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (Review). *Mol Med Rep*. 2015;11(3):1566–72.
  79. Yuzhakov V V, Malinova I V, Kiseleva M V, Fomina NK, Bandurko LN, Komarova E V, et al. Effect of Vitrification on Functional Morphology and Viability of the Ovarian Tissue. *Bull Exp Biol Med* [Internet]. 2018 Mar;164(4):502–7. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10517-018-4021-1>
  80. Laboratoire B-R. Datasheet : AHP2717. Rabbit anti caspase-3. 2018. p. 2–3.
  81. Fenwick MA HP. Immunohistochemical localization of active caspase-3 in the mouse ovary: growth and atresia of small follicles. *England*; 2002. p. 124(5):659-65.
  82. Redmer DA, Reynolds LP. Angiogenesis in the ovary. *Rev Reprod*. 1996;1:182–92.
  83. Van de Goot FRW, Korkmaz HI, Fronczek J, Witte BI, Visser R, Ulrich MMW, et al. A new method to determine wound age in early vital skin injuries: A probability scoring system using expression levels of Fibronectin, CD62p and Factor VIII in wound hemorrhage. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2014;244(0):128–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.08.015>
  84. Moonmanee T, Navanukraw C, Aiumlamai S. Quantitative vascularity of antral follicle in *Bos indicus* using Factor VIII immunolocalization. *Livest Sci* [Internet].

- 2012;150(1–3):128–34. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2012.08.010>
85. Merdassi G, Mazoyer C, Guerin JF, Saad A, Salle B, Lornage J. Examination of viability and quality of ovarian tissue after cryopreservation using simple laboratory methods in ewe. *Reprod Biol Endocrinol* [Internet]. 2011;9(1):78. Available from:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3128841&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
86. Cirelli N, Lebrun P, Gueuning C, Moens A, Delogne-Desnoeck J, Dictus-Vermeulen C, et al. Secretory characteristics and viability of human term placental tissue after overnight cold preservation. *Hum Reprod*. 2000 Apr;15(4):756–61.
87. Promega. CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Protocol, Instruction for use of product G1780. [Online document]. 07.2016 [zuletzt aufgerufen am 05.09.2017]. Verfügbar unter: <https://www.promega.de/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/c>.
88. Kozera B, Rapacz M. Reference genes in real-time PCR. *J Appl Genet*. 2013;54(4):391–406.
89. Chapman JR, Waldenström J. With reference to reference genes: A systematic review of endogenous controls in gene expression studies. *PLoS One*. 2015;10(11):1–18.
90. Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR - A perspective. *J Mol Endocrinol*. 2005;34(3):597–601.
91. Nikishin DA, Filatov MA, Kiseleva M V, Bagaeva TS, Konduktorova V V, Khramova Y V, et al. Selection of stable expressed reference genes in native and vitrified/thawed human ovarian tissue for analysis by qRT-PCR and Western blot. *J Assist Reprod Genet* [Internet]. 2018;35(10):1851–60. Available from:  
<https://doi.org/10.1007/s10815-018-1263-9>
92. Zhong H, Simons JW. Direct comparison of GAPDH,  $\beta$ -actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;259(3):523–6.

93. Toda K, Tasaka M, Mashima K, Kohno K, Uchida T, Takeuchi I. Structure of expression of elongation factor 2 gene during development of Dictyostelium discoideum. *J Biol Chem* [Internet]. 1989;264(26):15489–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.repbio.2012.10.010>
94. Schoen K, Plendl J, Gabler C, Kaessmeyer S. Identification of Stably Expressed Reference Genes for RT-qPCR Data Normalization in Defined Localizations of Cyclic Bovine Ovaries. *J Vet Med Ser C Anat Histol Embryol*. 2015;44(3):200–11.
95. da Costa ASH, Pires VMR, Fontes CMGA, Mestre Prates JA. Expression of genes controlling fat deposition in two genetically diverse beef cattle breeds fed high or low silage diets. *BMC Vet Res*. 2013;9.
96. Slominski AT, Li W, Kim TK, Semak I, Wang J, Zjawiony JK, et al. Novel activities of CYP11A1 and their potential physiological significance. *J Steroid Biochem Mol Biol* [Internet]. 2015;151:25–37. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.11.010>
97. Bakhshalizadeh; S, Amidi; F, Alleyassin; A, Soleimani; M, Shirazi; R, Shabani Nashtaei; M. Modulation of steroidogenesis by vitamin D3 in granulosa cells of the mouse model of polycystic ovarian syndrome. *Syst Biol Reprod Med* [Internet]. 2017;63(3):150–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/19396368.2017.1296046>
98. Gescher DM, Kahl KG, Hillemacher T, Frieling H, Kuhn J, Frodl T. Epigenetics in Personality Disorders: Today’s Insights. *Front Psychiatry* [Internet]. 2018;9(November). Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpsy.2018.00579/full>
99. Yang CH, Lin Y Da, Chiang YC, Chuang LY. A hybrid approach for CpG island detection in the human genome. *PLoS One*. 2016;11(1):1–16.
100. MD BY, Russanova VR, Gravina S, Hartley S, Mullikin JC, Iqbal A, et al. DNA methylome and transcriptome sequencing in human ovarian granulosa cells links age-related changes in gene expression to gene body methylation and 3’-end GC density. *Oncotarget* [Internet]. 2015;6(6):3627–43. Available from: <http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=>

article&op=view&path%5B%5D=2875&path%5B%5D=6274

101. Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* [Internet]. 2001;409(6822):860–921. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11237011?ordinalpos=4&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed\\_ResultsPanel.Pubmed\\_RVDocSum](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11237011?ordinalpos=4&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum)
102. Yu D-H, Ware C, Waterland RA, Zhang J, Chen M-H, Gadkari M, et al. Developmentally Programmed 3' CpG Island Methylation Confers Tissue- and Cell-Type-Specific Transcriptional Activation. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2013;33(9):1845–58. Available from: <http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.01124-12>
103. Levine JP, Marcus I, Sorenson JA, Spaide RF, Cooney MJ, Freund KB. Macular hemorrhage in neovascular age-related macular degeneration after stabilization with antiangiogenic therapy. *Retina*. 2009;29(8):1074–9.
104. Demeestere I, Simon P, Dedeken L, Moffa F, Tsépidis S, Brachet C, et al. Live birth after autograft of ovarian tissue cryopreserved during childhood. *Hum Reprod*. 2015;30(9):2107–9.
105. Donnez, Jacques and Dolmans M-M. Fertility preservation in women. *Med Ther Med la Reprod Gynecol Endocrinol*. 2018;20(1):4–10.
106. Amorim CA, Leonel ECR, Afifi Y, Coomarasamy A, Fishel S. Cryostorage and retransplantation of ovarian tissue as an infertility treatment. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2018; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.beem.2018.09.002>
107. Donnez J, Dolmans M. Gonadal Tissue Cryopreservation in Fertility Preservation [Internet]. 2016. 95–104 p. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-4-431-55963-4>
108. Jensen AK, Kristensen SG, MacKlon KT, Jeppesen J V., Fedder J, Ernst E, et al. Outcomes of transplantations of cryopreserved ovarian tissue to 41 women in Denmark. *Hum Reprod*. 2015;30(12):2838–45.
109. Martelli A, Russo V, Mauro A, O DG, Nardinocchi D, Mattioli M. Insights into

- Ovarian Follicle Angiogenesis: Morphological and Chronological Vascular Remodeling from Primordial to Ovulating Follicles. *SM Vasc Med*. 2017;2(1):1–10.
110. Langbeen A, De HFM, Bartholomeus E, Leroy JLMR, Bols EJ, De Porte HFM, et al. Bovine in vitro reproduction models can contribute to the development of (female) fertility preservation strategies. *Theriogenology* [Internet]. 2015;84(4):477–89. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X15001910>
  111. Araújo VR, Duarte ABG, Bruno JB, Pinho Lopes CA, De Figueiredo JR. Importance of vascular endothelial growth factor (VEGF) in ovarian physiology of mammals. *Zygote*. 2013;21(3):295–304.
  112. Ayuandari S, Winkler-Crepaz K, Paulitsch M, Wagner C, Zavadil C, Manzl C, et al. Follicular growth after xenotransplantation of cryopreserved/thawed human ovarian tissue in SCID mice: dynamics and molecular aspects. *J Assist Reprod Genet* [Internet]. 2016;33(12):1585–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10815-016-0769-2>
  113. Israely T, Dafni H, Granot D, Nevo N, Tsafiriri A, Neeman M. Vascular Remodeling and Angiogenesis in Ectopic Ovarian Transplants: A Crucial Role of Pericytes and Vascular Smooth Muscle Cells in Maintenance of Ovarian Grafts 1. 2003;2064(January):2055–64.
  114. Dath C, Dethy A, Langendonck A Van, Eyck AS Van, Amorim CA, Luyckx V, et al. Endothelial cells are essential for ovarian stromal tissue restructuring after xenotransplantation of isolated ovarian stromal cells. 2011;0(0):1–9.
  115. Eyck A Van, Bouzin C, Pharm D, Ph D, Feron O, Pharm D, et al. Both host and graft vessels contribute to revascularization of xenografted human ovarian tissue in a murine model. *Fertil Steril* [Internet]. 2010;93(5):1676–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.04.048>
  116. Donfack NJ, Alves KA, Araújo VR, Cordova A, Figueiredo JR, Smitz J, et al. Expectations and limitations of ovarian tissue transplantation. *Zygote*. 2017;25(4):391–403.
  117. Liu LJ, Xie XY, Zhang RZ, Xu P, Bujard H, Jun M. Reproduction and fertility in

- wild-type and transgenic mice after orthotopic transplantation of cryopreserved ovaries from 10-d-old mice. *Lab Anim (NY)*. 2008;37(8):353–7.
118. Damásio LCVC, Soares-Júnior JM, Iavelberg J, Maciel GAR, De Jesus Simões M, Dos Santos Simões R, et al. Heterotopic ovarian transplantation results in less apoptosis than orthotopic transplantation in a minipig model. *J Ovarian Res* [Internet]. 2016;9(1):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13048-016-0223-1>
  119. Luyckx V, Scalercio S, Jadoul P, Amorim CA, Soares M, Donnez J, et al. Evaluation of cryopreserved ovarian tissue from prepubertal patients after long-term xenografting and exogenous stimulation. *Fertil Steril*. 2013;100(5).
  120. Stern CJ, Gook D, Hale LG, Agresta F, Oldham J, Rozen G, et al. First reported clinical pregnancy following heterotopic grafting of cryopreserved ovarian tissue in a woman after a bilateral oophorectomy. *Hum Reprod*. 2013;28(11):2996–9.
  121. Wang L, Ying YF, Ouyang YL, Wang JF, Xu J. VEGF and bFGF increase survival of xenografted human ovarian tissue in an experimental rabbit model. *J Assist Reprod Genet*. 2013;30(10):1301–11.
  122. Nagy ZP, Varghese AC. Cryopreservation of Mammalian Gametes and Embryos [Internet]. Vol. 1568. 2017. 177–194 p. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-6828-2>
  123. Silber SJ, Derosa M, Pineda J, Lenahan K, Grenia D, Gorman K, et al. A series of monozygotic twins discordant for ovarian failure: Ovary transplantation (cortical versus microvascular) and cryopreservation. *Hum Reprod*. 2008;23(7):1531–7.
  124. Silber S, Pineda J, Lenahan K, Derosa M, Melnick J. Fresh and cryopreserved ovary transplantation and resting follicle recruitment. *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2015;30(6):643–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.02.010>
  125. Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Hum Reprod* [Internet]. 1986 Feb 1;1(2):81–7. Available from: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a136365>
  126. Walker CA, Bjarkadottir BD, Fatum M, Lane S, Walker CA, Bjarkadottir BD, et

- al. Variation in follicle health and development in cultured cryopreserved ovarian cortical tissue: a study of ovarian tissue from patients undergoing fertility preservation. *Hum Fertil* [Internet]. 2019;0(0):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1080/14647273.2019.1616118>
127. Gastal GDA, Aguiar FLN, Ishak GM, Cavinder CA, Willard ST, Ryan PL, et al. Effect of cryopreservation techniques on proliferation and apoptosis of cultured equine ovarian tissue. *Theriogenology* [Internet]. 2019; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.11.034>
  128. Yang H, Ph D, Lee H, Sc M, Lee C, Sc M, et al. Assessment of vascular endothelial growth factor expression and apoptosis in the ovarian graft: can exogenous gonadotropin promote angiogenesis after ovarian transplantation? *Fertil Steril*. 2008;90(October).
  129. Gavish Z, Peer G, Hadassa R, Yoram C, Meirou D. Follicle activation and ‘ burn-out ’ contribute to post-transplantation follicle loss in ovarian tissue grafts: the effect of graft thickness. 2014;0(0):1–8.
  130. Nakajima Y, Kuranaga E. Caspase-dependent non-apoptotic processes in development. *Nat Publ Gr* [Internet]. 2017;1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2017.36>
  131. Andrzej T. Slominska, Tae-Kang Kima, Wei Lic, Ae-Kyung Yid, Arnold Postlethwaiteb, f and RCT. The role of CYP11A1 in the production of vitamin D metabolites and their role in the regulation of epidermal functions. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014;
  132. Chan KA, Jazwiec PA, Gohir W, Petrik JJ SD. Maternal nutrient restriction impairs young adult offspring ovarian signaling resulting in reproductive dysfunction and follicle loss. *Biol Reprod*. 2018;98(5):664–82.
  133. Mcfee RM, Rozell TG, Cupp AS. The balance of proangiogenic and antiangiogenic VEGFA isoforms regulate follicle development. 2012;635–47.
  134. Guzmán A, Gutiérrez CG. The corpora lutea proangiogenic state of VEGF system components is turned to antiangiogenic at the later phase of the oestrous cycle in cows. 2015;301–7.



135. Bonnet A, Chaussain C, Broutin I, Rochefort GY. From Vascular Smooth Muscle Cells to Folliculogenesis: What About Vasorin? 2018;5(December):1–6.
136. Dimitrova N, Zamudio JR, Jong RM, Soukup D, Resnick R, Sarma K, et al. A HIF-1 Target, ATIA, Protects Cells from Apoptosis by Modulating the Mitochondrial Thioredoxin, TRX2. *Mol Cell*. 2011;42(5):597–609.
137. Weghofer A, Dietrich W, Barad DH, Gleicher N. Live birth chances in women with extremely low-serum anti-Mullerian hormone levels. 2011;26(7):1905–9.
138. Laing L V, Viana J, Dempster EL, Webster TMU, Aerle R Van, Mill J. Comparative Biochemistry and Physiology , Part A Sex-specific transcription and DNA methylation profiles of reproductive and epigenetic associated genes in the gonads and livers of breeding zebra fish. 2018;222(April):16–25.
139. Rimon-Dahari N, Heinemann-Yerushalmi L, Hadas R, Kalich-Philosoph L, Ketter D, Nevo N, et al. Vasorin: a newly identified regulator of ovarian folliculogenesis. *FASEB J* [Internet]. 2018 Jan 5;32(4):2124–36. Available from: <https://doi.org/10.1096/fj.201700057RRR>
140. Sefrioui O, Madkour A, Aboulmaouahib S, Kaarouch I, Louanjli N, Sefrioui O, et al. Women with extreme low AMH values could have in vitro fertilization success. *Gynecol Endocrinol* [Internet]. 2018;0(0):1–4. Available from: <https://doi.org/10.1080/09513590.2018.1505850>

---

## *Anexos*

---

## Anexo I

### **Protocolo de coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E) realizado no Serviço de Anatomia Patológica do CHUC.**

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

## Anexo II

### **Protocolo de imunohistoquímica utilizado pelo Serviço de Anatomia Patológica dos CHUC para marcação de Ki-67 e Caspase 3.**

1) Desparafinação por aquecimento da lâmina até aos 72°C a partir de temperaturas médias;

2) *Cell conditioning (cc)* por aquecimento da lâmina a 100 °C e incubação durante 4 minutos;

3) Ultra CC, durante 3 ciclos de 8, 16 e 24 minutos;

4) Adição do inibidor de peroxidase pré-primário;

5) Adição do anticorpo primário por aquecimento da lâmina até aos 36°C seguido da aplicação de uma gota de anticorpo anti Caspase 3 (Ref. AHP2717, *Bio-rad*) ou anticorpo anti ki-67 (Ref. 790-4286, Ventana) e incubação durante 36 minutos;

6) Reação de otimização da coloração com recurso ao sistema *Optiview* (Ventana, E.U.A.) que inclui a adição de DAB (3,3'-*Diaminobenzidine*), durante 16 minutos;

7) Incubação com peroxidase *HRP Multimer* (Ventana, E.U.A.);

8) Aplicação de uma gota de hematoxilina (contrastante) e incubação durante 8 minutos;

9) Aplicação de uma gota de *BLUING REAGENT* (pós-contrastante) e incubação durante 4 minutos.

## Anexo III

### **Protocolo de Isolamento total de RNA, adaptado do kit Direct-zol™ RNA MiniPrep (Zymo Research).**

- 1) Adicionar 350µL de tampão NR e 3,5µL β-mercaptoetanol a cada amostra e homogeneizar gentilmente;
- 2) Adicionar 350µL de etanol a 70% e homogeneizar sem a utilização da pipeta;
- 3) Transferir cada amostra para colunas ***IICR Zymo-Spin™ IICR*** com o respetivo tubo de recolha e centrifugar. De seguida, descartar o fluxo e colocar num novo tubo de recolha;
- 4) Adicionar 400µL de ***RNA Wash Buffer*** a cada coluna e centrifugar á velocidade máxima;
- 5) Para o isolamento, preparar a mistura de digestão (70 µL Buffer de digestão (RDD) + 10µL de DNase I) num eppendorf esterilizado de 1.5mL;
- 6) Aplicar 80µL da mistura de digestão diretamente na membrana de sílica da coluna NzySpin Binding e incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente;
- 7) Adicionar 400µL de ***Direct-zol™ RNA PreWash*** e centrifugar durante 30 segundos à velocidade máxima. Descartar o fluxo, colocar a coluna num novo tubo de recolha e repetir esta etapa;
- 8) Adicionar 700µL de ***RNA Wash Buffer*** e centrifugar durante 2 minutos a 12400g. Descartar o fluxo e colocar a coluna num novo tubo de recolha, isento de RNase;
- 9) De modo a eluir o RNA, adicionar 55µL de ***DNase/RNase-Free Water*** diretamente na membrana de sílica da coluna e incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- 10) De seguida centrifugar e voltar a colocar o fluxo na matriz, centrifugando novamente;
- 11) O RNA extraído poderá ser avaliado imediatamente ou armazenado a -80°C.

## Anexo IV

*Tabela 5- Sequências de pares de primers para PCR quantitativo em tempo real, desenhados especificamente para este estudo*

<b>Gene</b>	<b>Nome Completo</b>	<b>ID do gene</b>	<b>Pares de Primers (5'-3')<sup>2</sup></b>	<b>Exões</b>	<b>Tamanho do produto (bp)</b>	<b>Housekeeping</b>
<i>GAPDH</i>	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	NC_007303.3/281181	F: ctc tca agg gca ttc tag gc R: ccc agc atc gaa ggt aga ag	9-10	89	X
<i>Ciclo</i>	Ciclofosfamida	NC_007308.3/281419	F: tcc gtc ttc ttc ctg ctg ttg R: cca att cgc agg tca aag tac	1-2	98	X
<i>RPS 29</i>	Proteína Ribossomal S29	NC_037337.1	F: gca ctg ctg aga gca aga tg R: ata ggc agt gcc aag gaa ga		49	X
<i>VASN</i>	Vasorina	NC_037352.1	F: ctg teg caa aac cag atc gc R: cgg teg aac aca tca aag gc	2	200	
<i>AMH</i>	Hormona Anti-Mulleriana	NC_037334.1	F: acc cca gcc ctg tta ctc ttg R: gag tct cca gga agg gat cag c	5	148	
<i>AMHR2</i>	Receptor hormonal anti-mülleriano tipo 2	NC_037332.1	F: cat acg gga agg agg tca cg R: tgt agg cct ggc agc teg ta	11	135	
<i>VEGFA</i>	Factor de Crescimento Endotelial Vascular A	NC_037350.1	F: ctg ggt aca ttg gag cct tg R: atc cat gaa ctt cac cac ttc gt	6-8	116	
<i>VEGFR1</i>	Tirosina quinase 1 relacionada com FLT1	NC_037339.1	F: tgg aag act cgg gca cct atg R: ggt cac tga ggt ttc gca gga	15-30	126	
<i>VEGFR2</i>	Receptor de domínio de inserção quinase KDR	NC_037333.1	F: tga cat ctt gat ctt gga gct gc R: tgt cgt ctg att ctc cag gtt tc	29-30	169	
<i>CYP11A1</i>	Citocromo P450, família 11, subfamília A, polipeptídeo 1	NC_037348.1	F: ggc aat aaa gaa ctt cat ccc ac R: ggg gtt cac tgt ctc ctc ca		199	

## Anexo V

### Protocolo de purificação e extração de DNA (Quick-DNA Miniprep Plus; Zymo Research).

- 1) Descongelar as amostras que se encontram a  $-80^{\circ}\text{C}$  de modo a transferir os fragmentos para tubos de 2mL. Adicionar 95 $\mu\text{L}$  de *Blue Buffer* e 95 $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ ;
- 2) Colocar dentro dos tubos esferas de aço inoxidável e selar com parafina;
- 3) De seguida posicionar as amostras de forma equilibrada no Tissue Lyser II, para que ocorra a disrupção do tecido;
- 4) Adicionar 10 $\mu\text{L}$  de Proteinase K, vortexar durante 10-15 segundos e incubar a  $55^{\circ}\text{C}$  durante 1-3 horas;
- 5) De modo a remover os detritos insolúveis, centrifugar a  $\geq 12.000x$  g durante 1 minutos. Transferir o sobrenadante para um novo tubo;
- 6) Adicionar 400 $\mu\text{L}$  de *Genomic Binding Buffer* e vortexar durante 10-15 segundos;
- 7) Transferir as amostras para colunas *Zymo-Spin™ IIC-XL* com os respetivos tubos de recolha. Centrifugar a  $\geq 12.000x$  g durante 1 minutos. Descartar o sobrenadante presente no tubo de recolha;
- 8) Adicionar 400 $\mu\text{L}$  do tampão de pré-lavagem de DNA à coluna de centrifugação num novo tubo de recolha. Centrifugar a  $\geq 12.000x$  g durante 1 min. Descartar o sobrenadante;
- 9) Adicionar 700 $\mu\text{L}$  de tampão de lavagem g-DNA à coluna de centrifugação. Centrifugar a  $\geq 12.000x$  g durante 1 min. Limpar novamente o tubo de recolha;
- 10) Adicionar 200 $\mu\text{L}$  de tampão de lavagem g-DNA à coluna de centrifugação. Centrifugar a  $\geq 12.000x$  g durante 1 min. Descartar o tubo de coleta com o fluxo;
- 11) Transferir a coluna de centrifugação para um tubo de microcentrifugação limpo. Adicionar  $\geq 50\mu\text{L}$  de Tampão de Eluição de DNA ou água diretamente na matriz

12) Incubar durante 5 min. à temperatura ambiente, e de seguida centrifugar à velocidade máxima durante 1 minuto para eluir o DNA;

13) O DNA eluído pode ser utilizado imediatamente para aplicações baseadas em moléculas ou armazenado a  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  para uso futuro.



Anexo VI

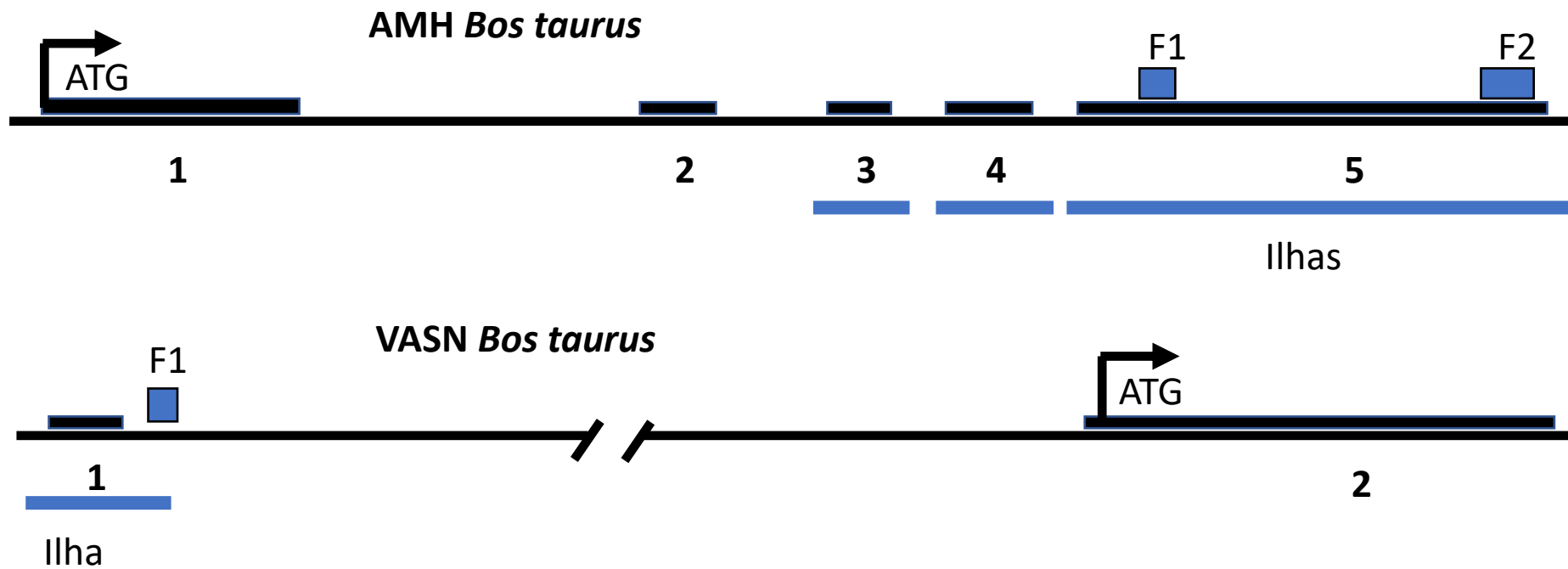


Figura 33 - Desenho Experimental das zonas de metilação analisadas do gene *AMH* e *VASN*.

**Tabela 6-** Sequência de pares de primers para a pirosequenciação de Bissulfito, desenhados especificamente para este estudo

<i>Gene</i>	<b>Nome Completo</b>	<b>Pares de Primers (5'-3')<sup>2</sup></b>	<b>Bases</b>	<b>Escala de Síntese</b>	<b>Purificação</b>
<i>AMH</i> <i>Fragmento 1</i>	Hormona Anti-Mulleriana	F: AACCCCAACCCACTAATTAATTTCC	29	50 nmol	HPLC
<i>AMH</i> <i>Fragmento 1</i>	Hormona Anti-Mulleriana	S: CCAACCCTAATCCCTTCCTAAAACTCTC	25	50 nmol	HPLC
<i>AMH</i> <i>Fragmento 2</i>	Hormona Anti-Mulleriana	F: TGTGTTTTTTAGTGTTTAATGGGGTAAT	28	50 nmol	HPLC
<i>AMH</i> <i>Fragmento 2</i>	Hormona Anti-Mulleriana	S: GTGTTTAATGGGGTAATG	18	50 nmol	HPLC
<i>VASN</i>	Vasorina	F: AAGTTTTTGTAAGATTATTTGGGTAA	27	50 nmol	HPLC
<i>VASN</i>	Vasorina	S: TTTTGGGAGTAGATAGTTTTATAG	25	50 nmol	HPLC

## Anexo VII

### Sequências genômicas onde foram avaliados os padrões de metilação:

- **AMH-Fragmento 1 (6 CpGs)**

**CGCAGGGCCAGGTCAACCTGTCGGACCCCGCGGCCCTGGAGCGCCTGCTGGACGGC**

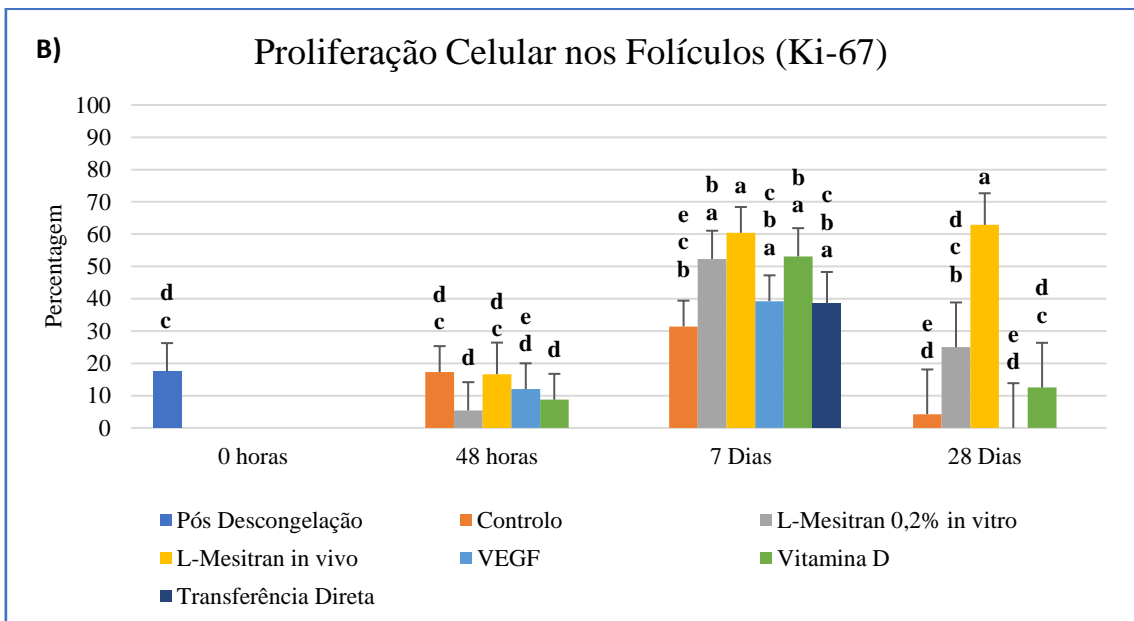
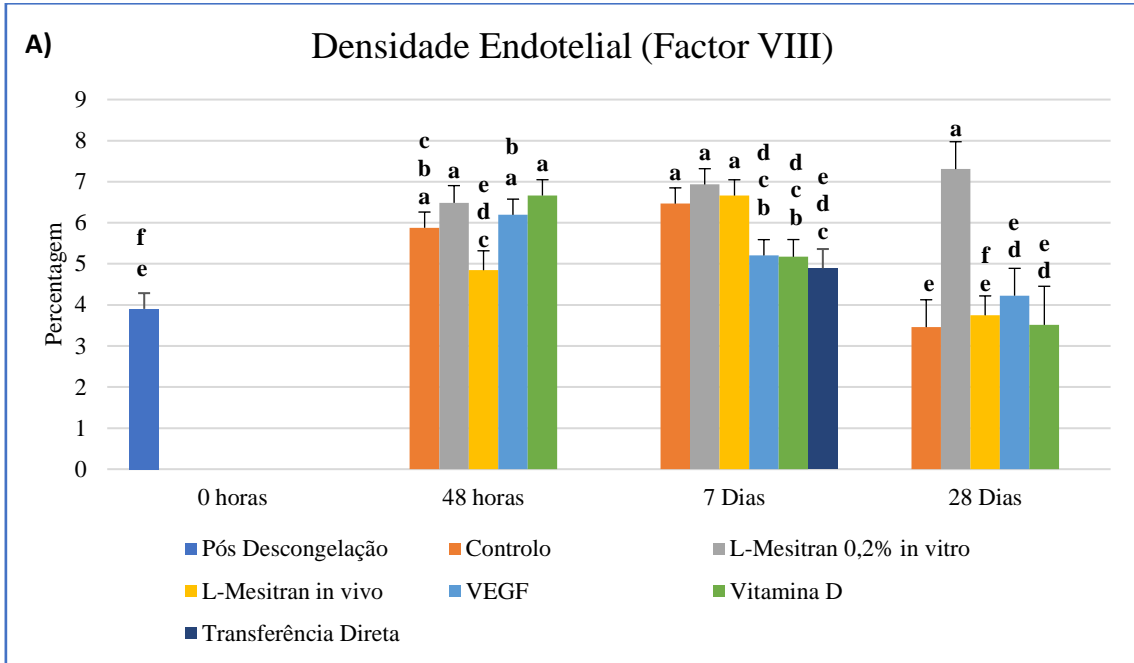
- **AMH-Fragmento 2 (11 CpGs)**

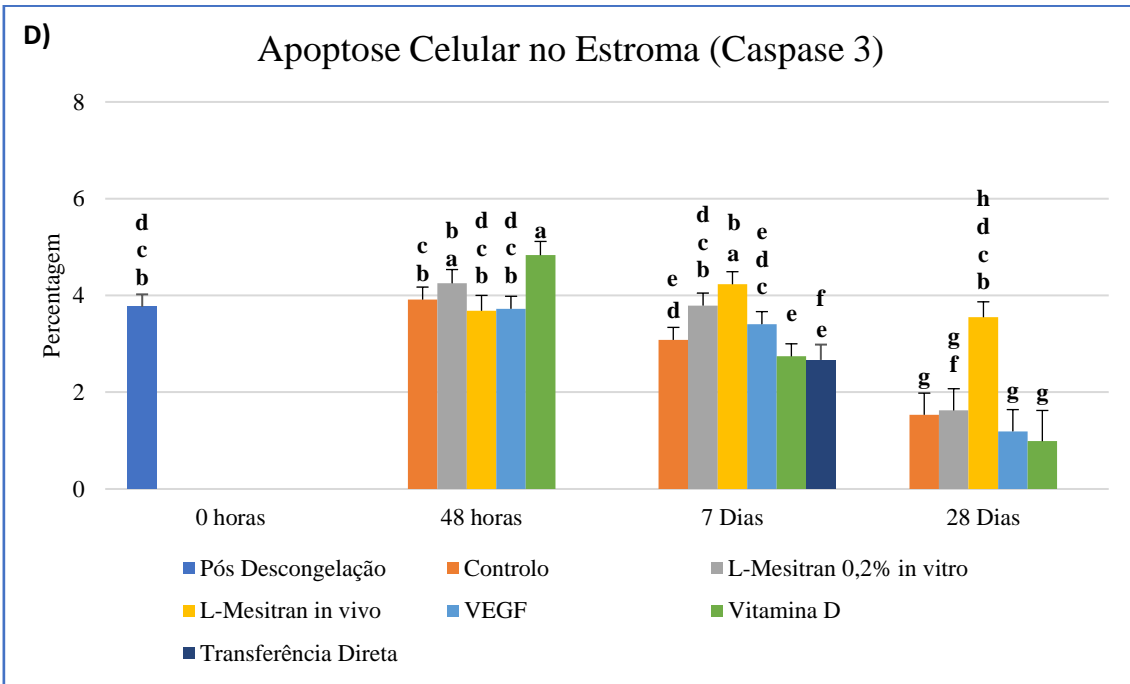
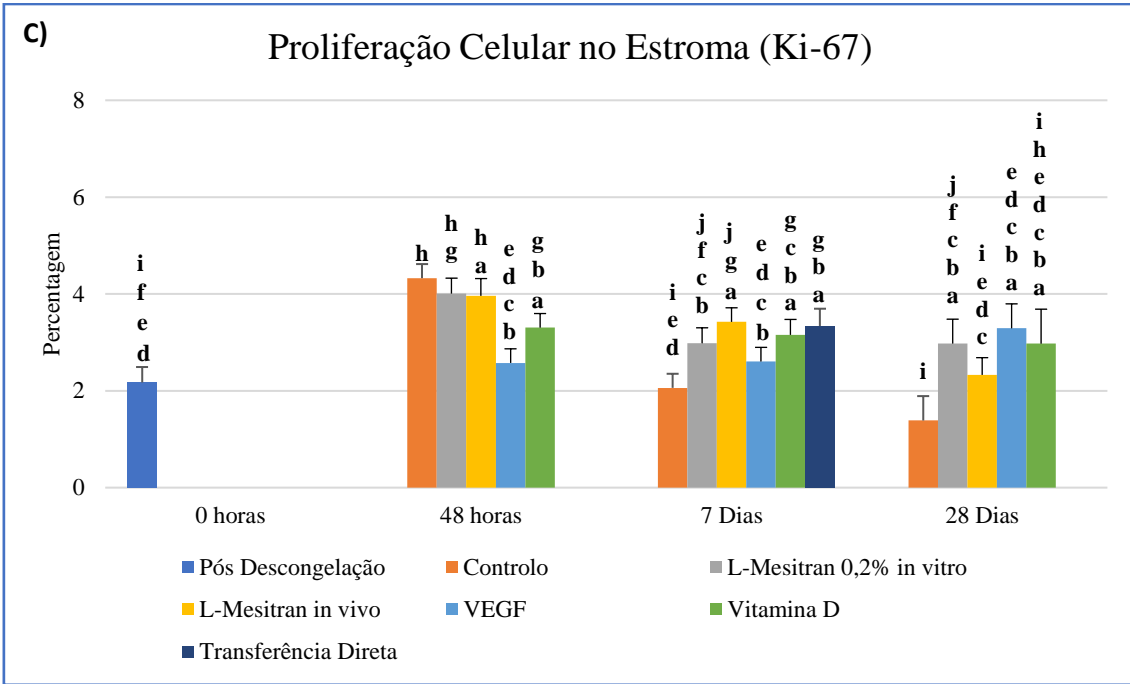
**TCCCAAACATGGTGGCCACCGAATGCGGCTGCCGGTGACCTCGCGCCGTGCTCCTCGTGCTGCCCCGGGCCGTATTTATTGGACCCCGT**

- **VASN (21 CpGs)**

**CCCGGGGTGAGGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGTACGCGGCTCACCGGCCTGCGGGGCTGCGAGCAGACGAAATAACA**

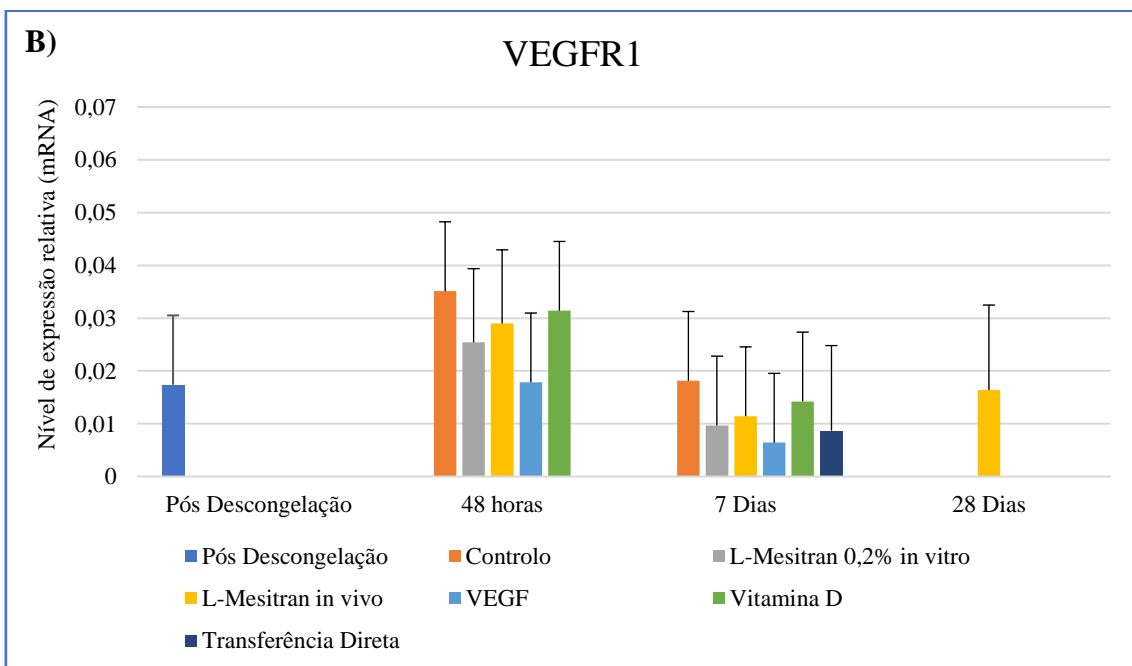
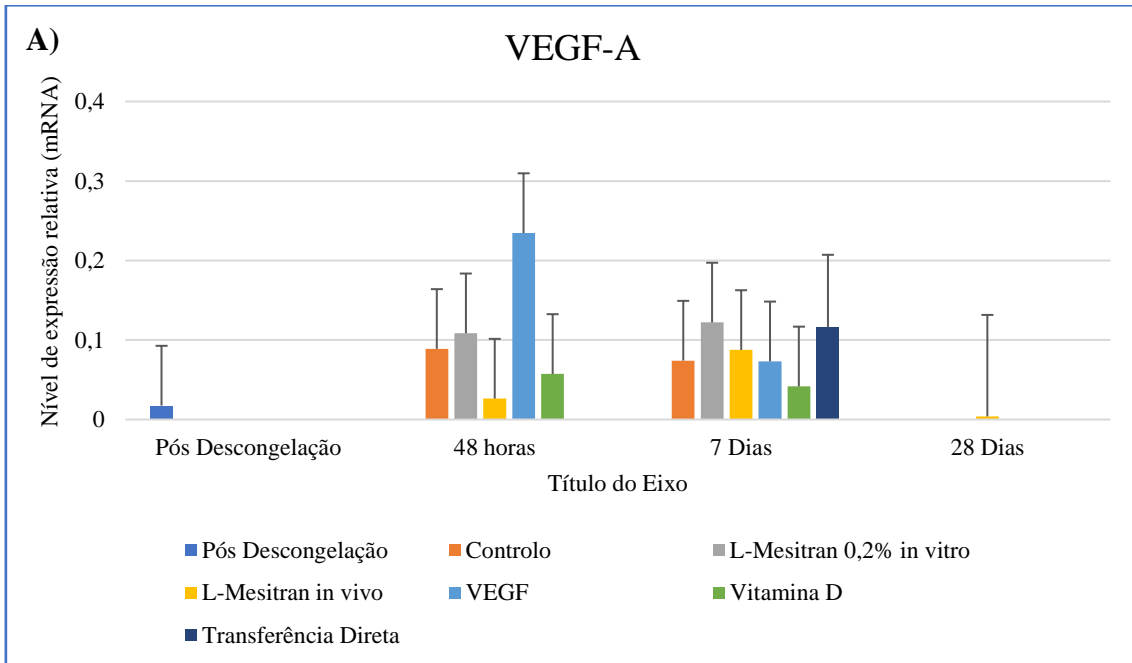
Anexo VIII

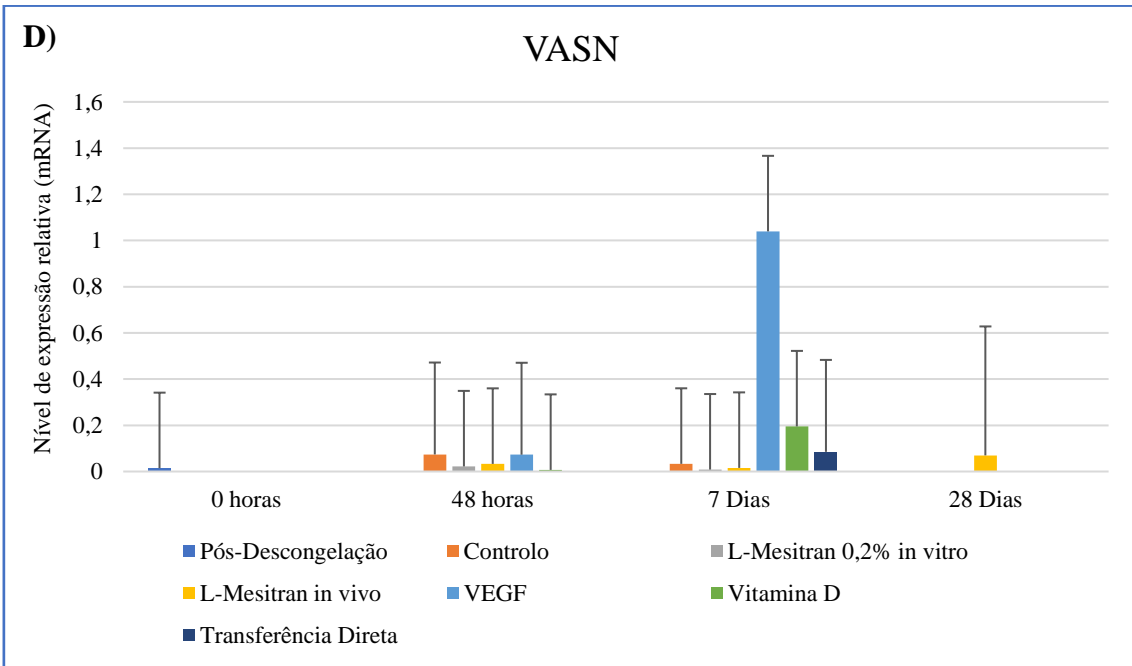
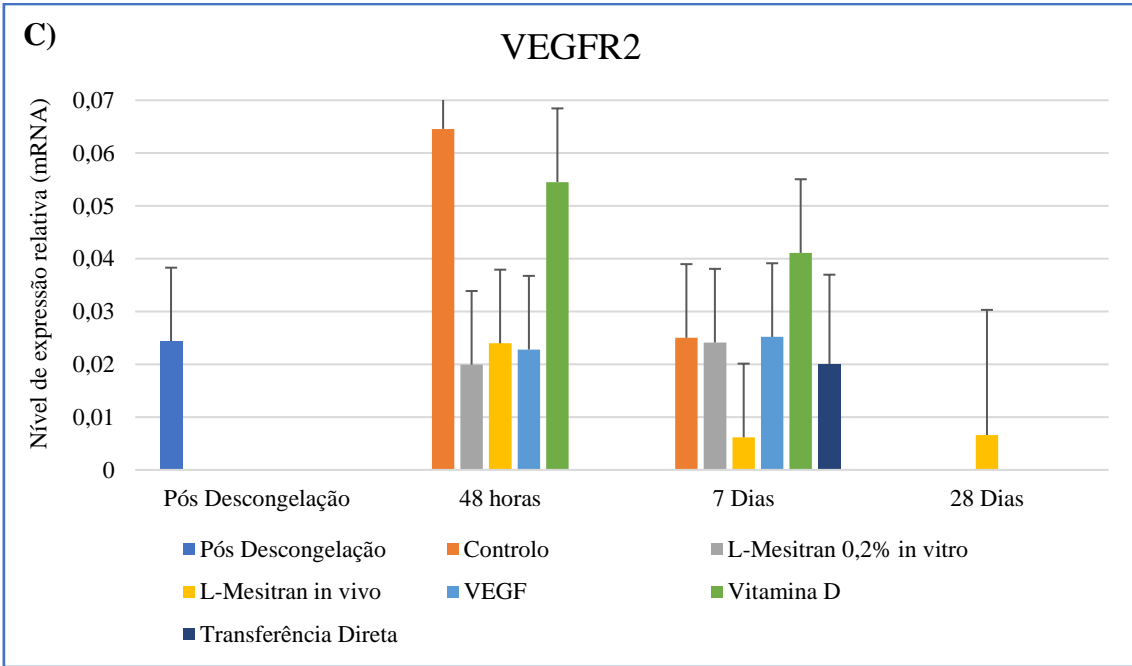


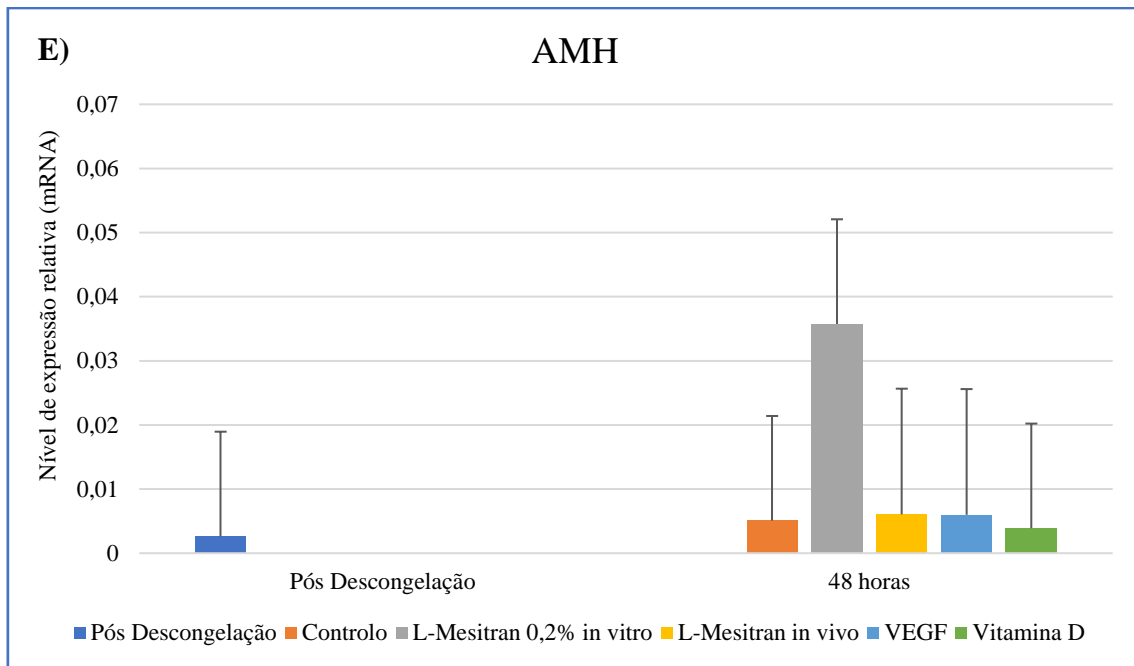


**Figura 34-** Comparação entre grupos/tempo: A) Densidade Endotelial; B) Proliferação Celular; C) Proliferação Celular no estroma (Ki-67); D) Apoptose celular no estroma (Caspase 3). **a-i:** indicam diferenças estatísticas ( $p \leq 0,05$ ).

## Anexo IX



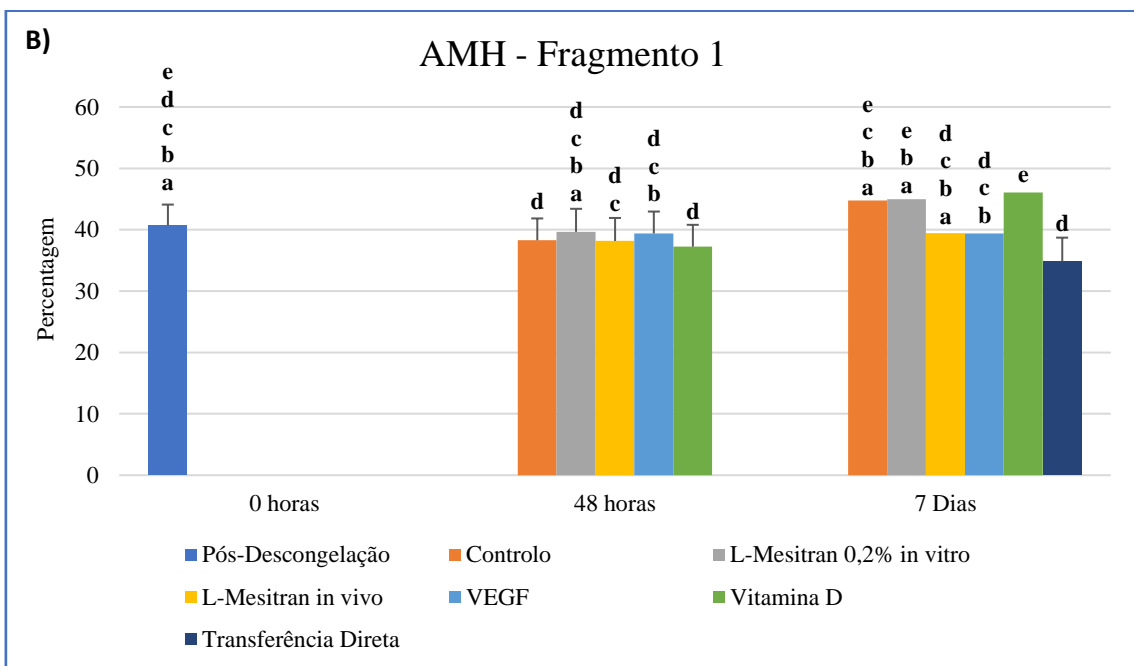
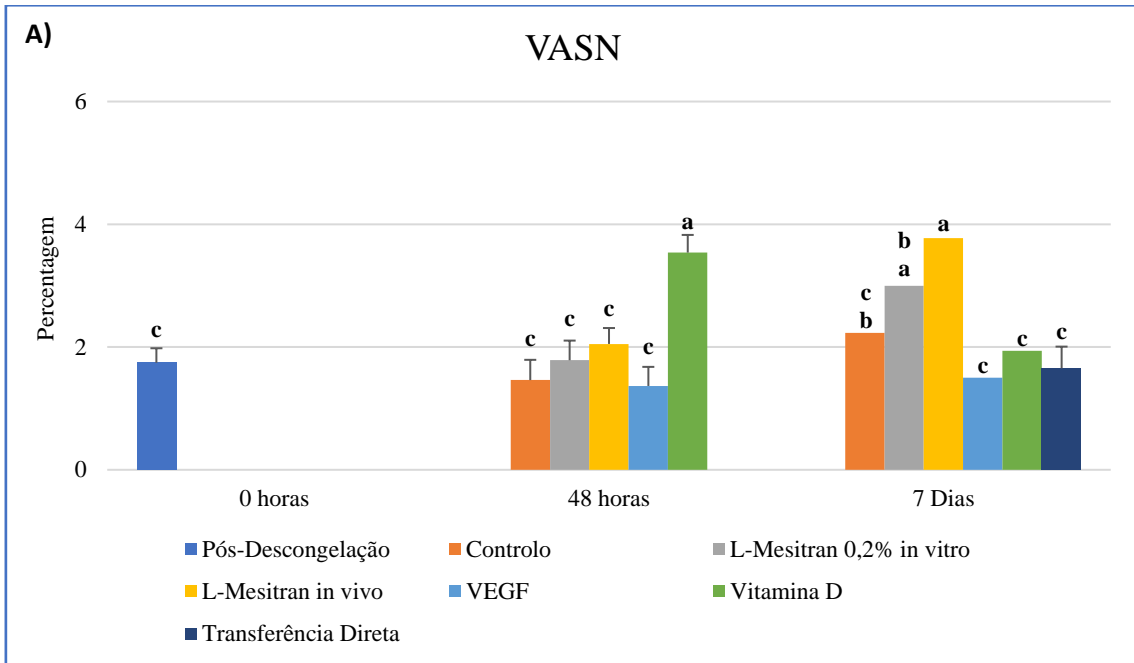


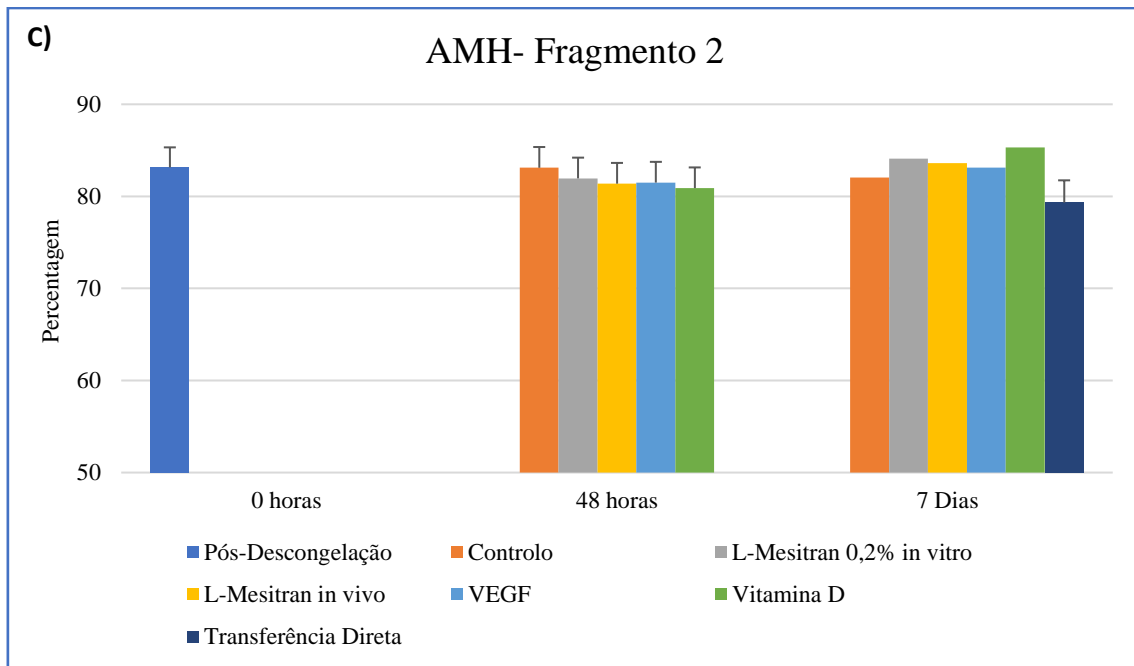


**Figura 35-** Expressão Genética dos genes: A) VEGF-A; B) VEGFR1; C) VEGFR2; D) VASN e E) AMH.



# Anexo X





**Figura 36-** Comparação entre grupos/tempo, nos níveis de metilação: A) Gene VASN; B) Gene AMH (Fragmento 1); C) Gene AMH (Fragmento 2).  
*a-i:* indicam diferenças estatísticas ( $p \leq 0,05$ ).