

1 2 9 0



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Ana Sofia Fernandes Pais

PRESERVAÇÃO DO POTENCIAL
REPRODUTIVO NA DOENTE ONCOLÓGICA
ESTIMULAÇÃO DA ANGIOGÉNESE DO TECIDO
OVÁRICO CRIOPRESERVADO

Tese de Doutoramento do Programa de Doutoramento em Ciências da Saúde, ramo de Medicina, orientada pela Professora Doutora Ana Teresa Moreira de Almeida Santos e pela Professora Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho, apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2022

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

**PRESERVAÇÃO DO POTENCIAL
REPRODUTIVO NA DOENTE ONCOLÓGICA**

**ESTIMULAÇÃO DA ANGIOGÉNESE DO TECIDO
OVÁRICO CRIOPRESERVADO**

Ana Sofia Fernandes Pais

Tese de Doutoramento do Programa de Doutoramento em Ciências da Saúde, ramo de Medicina, orientada pela Professora Doutora Ana Teresa Moreira de Almeida Santos e pela Professora Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho, apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2022



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Tese de Doutoramento do Programa de Doutoramento em Ciências da Saúde, ramo de Medicina, orientada pela Professora Doutora Ana Teresa Moreira de Almeida Santos e pela Professora Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho, apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. O projeto foi premiado com o Prémio de Investigação da Sociedade Portuguesa de Ginecologia em 2015 e a Bolsa de Investigação do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra em 2016, no âmbito do I Encontro “A Ciência e os Internos”. O projeto foi ainda submetido e aceite para financiamento pela Merck, SA (CSD006003), no âmbito do apoio a projetos da iniciativa do investigador.



A Faculdade de Medicina não aceita qualquer responsabilidade em relação à doutrina e à forma desta tese.

(Regimento da Faculdade de Medicina de Coimbra, 1931, Artigo 108, parágrafo único)

Agradecimentos

Este projeto de investigação que conduziu a esta tese foi dirigido com o pensamento constante na translação clínica. O trabalho experimental de investigação resulta do empenho de uma equipa multidisciplinar, com contributos fundamentais que não podem deixar de ser destacados.

Em primeiro lugar, como orientadora principal deste projeto, os mais sinceros agradecimentos à Professora Doutora Teresa Almeida Santos, Diretora do Departamento de Ginecologia, Obstetrícia, Reprodução e Neonatologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra e Professora Auxiliar com Agregação da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Agradeço a excelência da sua orientação no meu percurso na investigação científica, bem como a atenção, a disponibilidade e a autoconfiança que sempre me transmitiu. Na minha formação clínica e académica tenho o privilégio de contar com os seus ensinamentos, a sua visão organizacional e o seu rigor científico que são para mim um estímulo constante e serão um alicerce profissional e pessoal. Reitero o orgulho em dispor dos seus ensinamentos que marcarão inevitavelmente a minha atitude na ciência e na vida.

Os meus sinceros agradecimentos também para a coorientadora deste trabalho, a Professora Doutora Maria Filomena Botelho, Diretora do Instituto de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e Professora Catedrática da mesma Faculdade. Agradeço pelo apoio incondicional da orientação do trabalho, por me ter integrado plenamente na sua equipa de investigação, por ter acompanhado todas as etapas deste estudo e por me ter permitido alargar a minha visão médica à investigação básica. Vinco a sua disponibilidade e apoio constantes, bem como os seus conselhos e críticas que marcarão incondicionalmente o meu pensamento científico.

À Doutora Mafalda Laranjo, que acompanhou este projeto desde o início e que foi essencial neste percurso. Agradeço pela amizade e por toda a ajuda na execução do trabalho experimental, sempre paciente, incansável, compreensiva e disponível em

todas as fases da investigação, o que permitiu que a minha inexperiência não fosse um obstáculo.

Aos elementos do Instituto de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra que me acolheram e apoiaram na realização deste trabalho experimental, em particular ao Mestre Miguel Marto e ao Mestre Ricardo Teixeira.

À equipa de Biologia da Reprodução e Células Estaminais do Centro de Neurociências e Biologia Celular (CNC), liderada pelo Professor Doutor João Ramalho-Santos, o meu agradecimento pelo apoio e espírito crítico na progressão do trabalho experimental. Em particular aos elementos do subgrupo de Infertilidade Feminina e Preservação da Fertilidade, a Doutora Ana Paula Sousa, a Doutora Mariana Moura Ramos, a Mestre Alexandra Carvalho, a Mestre Filipa Ferreira e Mestre Sandra Reis, agradeço a colaboração prestada na realização do trabalho experimental, reconheço a partilha de um ambiente de trabalho salutar, os incentivos diários e a ajuda prestada.

Aos alunos que colaboraram na realização do trabalho experimental, o meu agradecimento para a Mestre Carolina Reis, a Mestre Gabriela Barros e a Licenciada Joana Margarido.

Ao biotério do Instituto de Investigação Clínica e Biomédica de Coimbra da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra pelo apoio e disponibilidade.

À Professora Doutora Ana Bela Sarmento, orientadora de Mestrado, pelo voto de confiança no meu percurso de docência e investigação. À sua equipa do Laboratório de Oncologia e Hematologia e Clínica Universitária de Hematologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra pela colaboração neste projeto nos estudos de avaliação da expressão génica, em particular à Doutora Cristina Gonçalves, Mestre Joana Jorge e Doutora Raquel Alves.

Agradeço ao Professor Doutor Francisco Caramelo e à Professora Doutora Bárbara Oliveiros, pelo apoio na análise estatística.

Ao Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, agradeço o apoio no processamento e coloração das lâminas à Técnica Fátima Silva,

no sector de imunohistoquímica, e à Dra Graça Fernandes, no sector de citopatologia. Agradeço ainda à Dra. Teresa Simões da Silva e ao Dr. Rui Oliveira, pelo apoio e ensinamento na interpretação inicial do tecido ovárico do ponto de vista anatomopatológico.

Agradeço aos elementos com quem foram estabelecidas colaborações ao longo deste trabalho experimental, nomeadamente ao Professor Doutor Lino Ferreira e ao Doutor Miguel Lino, do *Biomaterials and Stem Cell-Based Therapeutics Lab* da UC-Biotech do Centro de Neurociências e Biologia Celular (CNC) da Universidade de Coimbra, bem como à Doutora Rosa Lino Neto Pereira, ao Doutor Jorge Pimenta e à Mestre Ana Rita Azevedo do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV).

Ao Professor Dave Tucker agradeço o apoio na revisão das publicações em língua inglesa.

Agradeço também aos Docentes da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra que acompanharam o meu percurso e apoiaram a minha progressão profissional, em particular ao Professor Doutor Sousa Barros, ao Professor Doutor Paulo Moura, à Professora Doutora Margarida Dias e à Professora Doutora Marília Dourado. Saliento também o incentivo das restantes docentes da Unidade Curricular de Ginecologia e Obstetrícia.

Agradeço a todos os colegas do Departamento de Ginecologia, Obstetrícia, Reprodução e Neonatologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra que me apoiaram neste percurso e que permitiram conciliar a atividade assistencial. Aos diretores dos Serviços que integro, Dra. Fernanda Águas, Professor Doutor Paulo Moura e Dr. Paulo Cortesão, pelo apoio incondicional. Aos meus orientadores de formação, Dr. Nuno Guerra e Dr. João Paulo Marques, o exemplo e apoio que me deram na Formação Específica em Ginecologia e Obstetrícia em paralelo com o Programa de Doutoramento. Não posso deixar de vincar o exemplo de dedicação da Doutora Maria João Carvalho, que sempre me fez acreditar que conseguiria atingir este objetivo e à qual agradeço a amizade e apoio incondicionais no meu percurso académico e profissional. Agradeço também aos Especialistas da equipa de urgência,

em particular da que integro presentemente, Dra. Clara Morais, Dra. Maria de São José Pais e Dra. Cristina Ferreira. Também agradeço a todos os colegas companheiros de internato e aos atuais internos que me ajudaram a acreditar que este projeto seria possível.

Pelo suporte financeiro agradeço o Prémio de Investigação da Sociedade Portuguesa de Ginecologia em 2015, a Bolsa de Investigação do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra em 2016, no âmbito do I Encontro “A Ciência e os Internos”, e o financiamento atribuído pela Merck, SA (CSD006003), no âmbito do apoio a projetos da iniciativa do investigador.

Por fim, o meu eterno agradecimento aos meus pais, que sempre me incentivaram e apoiaram em todos os desafios a que me proponho. Ao meu marido e à minha filha pelo amor, amizade e compreensão nesta caminhada. E a toda a minha família e amigos que me acompanharam.

Resumo

Os avanços no diagnóstico e no tratamento do cancro aumentaram significativamente a esperança de vida das doentes oncológicas. No entanto, o tratamento oncológico é frequentemente gonadotóxico e pode induzir falência ovárica prematura e infertilidade. A criopreservação de tecido ovárico (TO) prévia à terapêutica oncológica tem-se revelado uma técnica promissora, já que após o transplante do TO é possível repor a função endócrina e a fertilidade. No entanto, uma das limitações desta técnica é a sua curta longevidade, devido a perda de mais de 50% dos folículos primordiais, condicionada pela isquemia que se verifica até ser estabelecida a revascularização do enxerto.

A angiogénese é um processo complexo e fundamental em alguns processos da fisiologia da reprodução na mulher, nomeadamente no desenvolvimento folicular e na formação do corpo amarelo. A estimulação da angiogénese pode ser realizada através da utilização de fatores angiogénicos, designadamente o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF).

O objetivo deste trabalho foi otimizar a função e a duração do enxerto de TO criopreservado, através do desenvolvimento de estratégias para melhorar a angiogénese.

Em primeiro lugar, um modelo de cultura tridimensional (3D) com uma matriz de alginato foi comparado com a cultura convencional. O TO de rato pós-criopreservação foi mantido em cultura durante 72 horas. Posteriormente foi realizada a avaliação histológica e imunohistoquímica (IHQ) do tecido, com a análise dos folículos e do estroma e a quantificação da proliferação e da apoptose, bem como a avaliação da citotoxicidade pela quantificação de LDH no meio de cultura. Verificou-se mais degenerescência folicular, necrose e edema do tecido, bem como menor proliferação nas células do estroma na cultura 3D. Após 48 horas de cultura, a matriz de alginato não se revelou superior à cultura convencional. Porém, a matriz de alginato pode ser

uma estratégia para avaliar o efeito de um estímulo terapêutico *in vitro*, uma vez que permite um maior contacto das moléculas com as células ou o tecido.

Posteriormente foi validado o protocolo de criopreservação de TO para aplicação, em rato. Assim, foi comparado o TO fresco com o TO submetido a criopreservação lenta e descongelação, de acordo com o protocolo utilizado na prática clínica. O tecido também foi avaliado por histologia e IHQ, adicionando a análise da vascularização, bem como a realização de um *array* de angiogénese. Verificou-se que o protocolo utilizado não se mostrou deletério para o TO de rato, preservando a densidade folicular e a morfologia do TO, com diminuição da apoptose. Adicionalmente constatou-se um aumento da vascularização do TO após criopreservação, com alteração da expressão génica.

Por fim, foram avaliados vários estímulos angiogénicos, nomeadamente o VEGF, o FGF e a hMG, com estudo *in vitro* e *in vivo* em modelo de rato, bem como a exposição *in vitro* do TO humano a exossomas.

O efeito do VEGF, do FGF e da hMG foi estudado através da suplementação em cultura do TO de rato pós-criopreservação. Foi realizada a avaliação histológica e IHQ do tecido, bem como a avaliação da expressão génica no tecido e de angiopoietina-2 no meio de cultura. Tendo em conta os resultados do estudo *in vitro*, realizou-se o estudo *in vivo* com o autotransplante heterotópico de TO. A suplementação com hMG, isoladamente ou em associação a VEGF e a FGF, não condicionou a alteração da expressão dos genes relacionados com a foliculogénese e associou-se a maior proliferação no tecido, com a preservação dos folículos primordiais. Após o transplante, a suplementação tripla aumentou a densidade vascular, preservando a viabilidade do tecido. Neste trabalho experimental foi realizada, pela primeira vez, uma caracterização pormenorizada da expressão de genes relacionados com a angiogénese no TO após a cultura com os diferentes estímulos, tendo-se verificado a alteração da expressão de *Col4a3*, de *Coll8a1*, de *Egf*, de *Epas1*, de *FgFr-3*, de *Figf*, de *Hif1 α* , de *Kdr* e de *Tiel*.

A cultura de TO pós-criopreservação com exossomas foi realizada pela primeira vez

neste trabalho experimental, em que o TO humano foi avaliado por histologia e IHQ, como referido previamente, e por imunofluorescência para análise da internalização dos exossomas no TO. A aplicação *in vitro* de exossomas derivados de células mononucleares do cordão umbilical aumentou a área vascular no tecido, sendo uma estratégia promissora para melhorar a angiogénese do TO.

Em suma, com este trabalho experimental foi possível desenvolver uma metodologia de cultura 3D de TO, validar o protocolo de criopreservação para aplicação em TO de rato e identificar diferentes estratégias para estimular a angiogénese no TO. Estes resultados permitem perspetivar trabalhos futuros, com o intuito translacional de melhorar a longevidade do transplante e otimizar a técnica de criopreservação de TO para preservação da fertilidade feminina.

Abstract

Advances in cancer diagnosis and treatment have significantly increased the survival of cancer patients. However, cancer treatment is often gonadotoxic and can induce premature ovarian failure and infertility. Ovarian tissue (OT) cryopreservation prior to cancer therapy has proved to be a promising technique, since endocrine function and fertility can be restored after OT transplantation. However, one of the limitations of this technique is its short longevity, due to the loss of more than 50% of primordial follicles, influenced by the ischaemia that occurs until graft revascularization is established.

Angiogenesis is a complex and fundamental process in the physiology of reproduction in women, namely in follicular development and in the formation of the corpus luteum. Stimulation of angiogenesis can be performed using angiogenic factors, namely vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF).

The objective of this work was to optimize the function and duration of cryopreserved OT graft, by developing strategies to improve angiogenesis.

First, a three-dimensional (3D) culture model with an alginate matrix was compared with the conventional culture. Post-cryopreservation rat OT was maintained in culture for 72 hours. Subsequently, the histological and immunohistochemical (IHC) evaluation of the tissue was performed, with the analysis of follicles and stroma and the quantification of proliferation and apoptosis, as well as the evaluation of cytotoxicity by quantification of LDH in the culture medium. There was greater follicular degeneration, tissue necrosis and oedema, as well as less proliferation in stromal cells in the 3D culture. After 48 hours of culture, the alginate matrix did not prove to be superior to the conventional culture. However, the alginate matrix can be a strategy to evaluate the effect of a therapeutic stimulus in vitro since it allows greater contact of the molecules with cells or tissue.

Subsequently, the OT cryopreservation protocol was validated for application in rats. Thus, fresh OT was compared with OT submitted to slow cryopreservation and thawing, according to the protocol used in clinical practice. The tissue was also evaluated by histology and IHC, adding

vascularization analysis, as well as performing an angiogenesis array. It was found that the protocol used was not deleterious to rat OT and preserved the follicular density and OT morphology, with decreased apoptosis. Additionally, an increase in OT vascularization was observed after cryopreservation, with altered gene expression.

Finally, several angiogenic stimuli were evaluated, namely VEGF, FGF and hMG, with an in vitro and in vivo study in a rat model, as well as the in vitro exposure of human OT to exosomes.

The effect of VEGF, FGF and hMG was studied through the supplementation in culture of the post-cryopreservation rat OT. Histological and IHC evaluation of the tissue was performed, as well as the evaluation of gene expression in the tissue and of angiopoietin-2 in the culture medium. Considering the results of the in vitro study, the in vivo study was carried out with the heterotopic autotransplantation of TO. Supplementation with hMG, alone or in association with VEGF and FGF, did not affect the expression of genes related to folliculogenesis and was associated with greater proliferation in the tissue, with preservation of primordial follicles. After transplantation, triple supplementation increased vascular density while preserving tissue viability. In this experimental work, for the first time, a detailed characterization of the expression of genes related to angiogenesis in the OT after culture with the different stimuli was performed, with alteration of the expression of Col4a3, Col18a1, Egf, Epas1, FgFr-3, Figf, Hif1a, Kdr and Tie1 being found.

Post-cryopreservation OT culture with exosomes was performed for the first time in this experimental work, in which, as previously mentioned, human OT was evaluated by histology and IHC and by immunofluorescence to analyse the internalization of exosomes in OT. The in vitro application of exosomes derived from umbilical cord mononuclear cells increased the vascular area in the tissue and is a promising strategy for improving OT angiogenesis.

In short, by means of this experimental work, it was possible to develop a methodology for 3D OT culture, to validate the cryopreservation protocol for application in rat OT and to identify different strategies to stimulate angiogenesis in OT. These results allow us to predict future work, with the translational aim of improving the longevity of the transplant and optimizing the OT cryopreservation technique for the preservation of female fertility.

Índice

Agradecimentos.....	vii
Resumo	xi
<i>Abstract</i>	xv
Índice	17
PARTE I - Enquadramento teórico.....	23
CAPÍTULO I. Preservação da fertilidade na mulher	25
I.1. Indicações para preservação da fertilidade	32
I.2. Técnicas de preservação da fertilidade	33
I.3. Criopreservação de tecido ovárico.....	35
I.4. Limitações da criopreservação de tecido ovárico.....	39
CAPÍTULO II. Angiogénese	43
II.1. O processo de angiogénese	47
II.2. Estímulo angiogénico	48
II.3. Formação do novo vaso.....	50
II.3.1. <i>Sprouting</i>	50
II.3.1. Intussusceção.....	53
II.3.2. Estabilização ou regressão	56
II.4. A angiogénese e fisiopatologia do desenvolvimento.....	57
II.5. A angiogénese no aparelho reprodutor feminino	59
II.6. Tratamentos pró-angiogénicos	63
CAPÍTULO III. Estimulação da angiogénese no tecido ovárico.....	67
III.1. Fatores de crescimento.....	69
III.2. Modulação através de hormonas	75

III.3.	Agentes antioxidantes	77
III.4.	Terapia celular	80
III.5.	Estratégias alternativas	86
CAPÍTULO IV. Objetivos.....		89
PARTE II - Trabalho Experimental.....		93
CAPÍTULO V. Modelo 3D de cultura de tecido ovárico		95
V.1.	Materiais e Métodos.....	97
V.1.1.	Desenho experimental.....	98
V.1.2.	Animais.....	99
V.1.3.	Ovariectomia	99
V.1.4.	Protocolos de criopreservação e de descongelação	102
V.1.5.	Cultura de tecido ovárico	105
V.1.6.	Avaliação histológica	107
V.1.7.	Avaliação da morfologia e da viabilidade do tecido	108
V.1.8.	Avaliação folicular	109
V.1.9.	Avaliação da proliferação e da apoptose no tecido por imunohistoquímica.....	110
V.1.10.	Avaliação da citotoxicidade.....	113
V.1.11.	Análise estatística.....	113
V.2.	Resultados	114
V.2.1.	Morfologia e viabilidade do tecido.....	114
V.2.2.	Efeito nos folículos	117
V.2.3.	Proliferação e apoptose no tecido ovárico	120
V.3.	Discussão.....	122
CAPÍTULO VI. Criopreservação de tecido ovárico		129
VI.1.	Materiais e Métodos	132

VI.1.1.	Desenho experimental	132
VI.1.2.	Animais	133
VI.1.3.	Ovariectomia e preparação dos hemiovários.....	134
VI.1.4.	Protocolos de criopreservação e de descongelação.....	134
VI.1.5.	Cultura de tecido ovárico.....	134
VI.1.6.	Avaliação histológica.....	134
VI.1.7.	Avaliação folicular.....	135
VI.1.8.	Avaliação por imunohistoquímica	136
VI.1.9.	Análise da expressão génica dos tecidos.....	139
VI.1.10.	Extração de ácidos nucleicos do tecido	141
VI.1.11.	Quantificação dos ácidos nucleicos.....	141
VI.1.12.	Transcrição reversa do RNA em cDNA	142
VI.1.13.	Perfil de transcrição através de <i>array</i> de nucleótidos	142
VI.1.14.	Análise estatística.....	144
VI.2.	Resultados.....	144
VI.2.1.	Avaliação folicular.....	144
VI.2.2.	Avaliação do estroma	149
VI.2.3.	Avaliação vascular	150
VI.3.	Discussão	153
CAPÍTULO VII. Avaliação de fatores pró-angiogénicos e de hormonas		159
VII.1.	Materiais e Métodos	161
VII.1.1.	Desenho experimental	162
VII.1.2.	Animais	163
VII.1.3.	Ovariectomia.....	164
VII.1.4.	Protocolos de criopreservação e descongelação.....	165
VII.1.5.	Cultura de tecido ovárico.....	165

VII.1.6.	Transplante de tecido ovárico.....	166
VII.1.7.	Avaliação histológica e imunohistoquímica.....	167
VII.1.8.	Análise da expressão génica dos tecidos.....	168
VII.1.9.	Avaliação da angiopoietina-2 no meio de cultura.....	169
VII.1.10.	Doseamentos hormonais.....	170
VII.1.11.	Citologia vaginal.....	173
VII.1.12.	Análise estatística.....	175
VII.2.	Resultados.....	176
VII.2.1.	Estudo <i>in vitro</i>	176
VII.2.2.	Estudo <i>in vivo</i>	195
VII.3.	Discussão.....	205
CAPÍTULO VIII. Estimulação da angiogénese com exossomas.....		217
VIII.1.	Materiais e Métodos.....	219
VIII.1.1.	Desenho experimental.....	220
VIII.1.2.	Tecido ovárico humano.....	221
VIII.1.3.	Exossomas.....	222
VIII.1.4.	Cultura de tecido ovárico.....	223
VIII.1.5.	Avaliação histológica e imunohistoquímica.....	223
VIII.1.6.	Avaliação da citotoxicidade.....	224
VIII.1.7.	Avaliação por imunofluorescência.....	224
VIII.1.8.	Análise estatística.....	225
VIII.2.	Resultados.....	226
VIII.2.1.	Estímulo angiogénico.....	226
VIII.2.2.	Avaliação folicular.....	228
VIII.2.3.	Viabilidade do tecido ovárico humano em cultura.....	232
VIII.2.4.	Internalização dos exossomas no tecido.....	234

VIII.3. Discussão.....	235
PARTE III – Conclusões e perspectivas futuras.....	239
PARTE IV – Referências bibliográficas.....	243
PARTE V – Símbolos e abreviaturas.....	283
PARTE VI – Anexos.....	291
Anexo I – Publicações relacionadas com a Tese de Doutoramento.....	293
Anexo II – Procedimentos cirúrgicos.....	403
Anexo III – Aprovação da DGAV.....	405
Anexo IV – Aprovação da Comissão de Ética.....	441

PARTE I - Enquadramento teórico

CAPÍTULO I. Preservação da fertilidade na mulher

O potencial reprodutivo na mulher está intimamente relacionado com o número de ovócitos existente no ovário num determinado momento. Este número é limitado e diminui natural e progressivamente com a idade, existindo aproximadamente 450 ciclos ovulatórios na vida reprodutiva humana normal. Este declínio progressivo é atribuído à morte dos folículos, através do processo de atresia. Assim, o número máximo de ovócitos (6 a 7 milhões) é atingido antes do nascimento, às 20 semanas de gestação. Posteriormente, este número diminui progressivamente até à menopausa, sendo de aproximadamente 1 a 2 milhões ao nascimento, 300.000 a 500.000 na puberdade, 25.000 aos 37 anos, e cerca de 1.000 aos 51 anos, a idade média da menopausa (The American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Gynecologic Practice, 2002; Wallace & Kelsey, 2010).

Além da idade, o potencial reprodutivo da mulher pode ser afetado por diversos fatores externos. Com a idade aumenta a probabilidade de surgirem condições que podem afetar adversamente a fertilidade, nomeadamente a endometriose. Adicionalmente, os antecedentes de cirurgia ovárica, quimioterapia, radioterapia, tabagismo ou infeção pélvica, bem como a história familiar de menopausa precoce, cursam com um risco aumentado de diminuição prematura do *pool* folicular e conseqüente declínio na fertilidade (Park *et al.*, 2022; The American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Gynecologic Practice, 2002; Y. Wang *et al.*, 2021).

Assim, o potencial reprodutivo está relacionado com a fertilidade, que se define pela capacidade de estabelecer uma gravidez clínica, e que se distingue da fecundidade, que é definida clinicamente como a capacidade de ter um filho vivo (Zegers-Hochschild *et al.*, 2017). A fecundidade diminui gradualmente com o aumento da idade, sendo a redução significativa a partir dos 32 anos e mais rápida após os 37 anos. Este padrão reflete a diminuição da qualidade ovocitária que se associa ao aumento gradual da concentração da hormona folículo-estimulante (FSH, do inglês, *follicle-stimulating hormone*) e à diminuição da hormona anti-Mülleriana e da inibina B (The American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Gynecologic Practice, 2002).

A infertilidade é definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma

“doença caracterizada pela falha em estabelecer uma gravidez clínica após 12 meses de relações sexuais regulares e desprotegidas” (WHO, 2022). Posteriormente, o conceito foi expandido ao comprometimento da capacidade de uma pessoa se reproduzir como indivíduo ou com seu parceiro (Zegers-Hochschild *et al.*, 2017). Este é um problema de Saúde Pública que afeta cerca de 10 a 15% da população, ou seja, 1 em cada 8 casais (Direcção-Geral da Saúde, 2011). A incidência de infertilidade é superior após uma doença oncológica, com menor probabilidade de conseguir uma primeira gravidez (Anderson *et al.*, 2018).

A incidência de cancro tem vindo a aumentar na população. De acordo com o GLOBOCAN, em 2020 ocorreram cerca de 19,3 milhões de novos casos de cancro, dos quais cerca de 6,8% em idade reprodutiva, entre os 15 e os 39 anos de idade (Sung *et al.*, 2021). De acordo com dados do *National Cancer Institute*, em 2021 4,6% de todos os novos casos de cancro ocorreram nesta faixa etária, com a sobrevivência a 5 anos de 85,0% de acordo com os dados de 2011 a 2017 (National Cancer Institute, 2022). Em Portugal e segundo o Registo Oncológico Nacional (RON), verificou-se um aumento do número total de novos casos de 46.724 em 2010 para 50.151 em 2018. Em 2018, na população feminina, 11% dos casos de cancro foram diagnosticados em doentes com menos de 44 anos (Costa Miranda *et al.*, 2021; ROENO, 2016). Neste contexto são particularmente relevantes os resultados terapêuticos dos cancros pediátricos, em que mais de 80% das crianças e adolescentes estão livres da doença 5 anos após o diagnóstico, mas dois terços enfrentarão efeitos adversos tardios que podem afetar drasticamente a sua qualidade de vida a longo prazo (Demeestere, 2022).

Os avanços recentes no diagnóstico e no tratamento do cancro, aumentaram significativamente a esperança de vida dos doentes oncológicos. Assim, o aumento da sobrevivência tem sido conseguido graças a terapêuticas agressivas, que são frequentemente gonadotóxicas, acelerando a depleção folicular e condicionando insuficiência ovárica prematura (IOP) e infertilidade (Anazodo *et al.*, 2018; Gardino & Emanuel, 2010; Ronn & Holzer, 2013; Waimey *et al.*, 2013).

A par da incidência crescente de doenças oncológicas nos jovens e da melhoria dos resultados terapêuticos, verifica-se um adiamento da maternidade para a quarta década

de vida. De acordo com os dados nacionais, a idade materna ao nascimento do primeiro filho aumentou, passando de 29,7 anos em 2013 para 30,7 anos em 2020 (PORDATA, n.d.). A mesma tendência é observada na Europa onde em 2013 a idade média ao nascimento do primeiro filho foi de 28,8 anos e em 2020 foi 29,5 anos (*Fertility Statistics*, 2022). Esta situação deve-se a vários motivos. Desde logo, uma tendência da sociedade, pela expansão da educação diferenciada, condições laborais exigentes e insegurança económica, aliadas à dificuldade em estabelecer relações estáveis, ao uso de métodos contraceptivos eficazes e à baixa literacia (Martin, 2021; Nazaré *et al.*, 2021).

Tais factos, levam a que um número crescente de mulheres seja surpreendido por um diagnóstico oncológico antes de iniciar ou de terminar o seu projeto reprodutivo (Gardino & Emanuel, 2010; Silva & Almeida-Santos, 2015). Uma meta-análise recente em mulheres sobreviventes de cancro evidencia que a fertilidade não está alterada nas doentes com antecedentes de linfoma não-Hodgkin, melanoma e cancro da tiroide. No entanto, a probabilidade de ter um filho vivo está reduzida nas mulheres com antecedentes de cancro ósseo, da mama, do sistema nervoso central e do rim (Busnelli *et al.*, 2020).

Assim, a oncofertilidade surge como uma disciplina emergente que liga as especialidades da oncologia e da medicina da reprodução com o objetivo de maximizar o potencial reprodutivo de sobreviventes de cancro. O termo, cunhado em 2006 por Teresa Woodruff, marca o início de uma nova ofensiva na luta contra o cancro. A oncofertilidade é uma área interdisciplinar, sustentada numa rede integrada de recursos clínicos focados no desenvolvimento de métodos que visam preservar ou restaurar a função reprodutiva em doentes com cancro. O objetivo é atender a uma necessidade emergente dos doentes jovens, com o intuito de adicionar aos tratamentos oncológicos as opções de preservação da fertilidade (Woodruff, 2007). Além de envolver a discussão dos riscos para a fertilidade e das opções para a sua preservação, inclui ainda o apoio psicológico e a abordagem das complicações relacionadas, como atraso pubertário, irregularidades menstruais e disfunção sexual (Anazodo *et al.*, 2018). A preservação da fertilidade compreende diversas intervenções, procedimentos e técnicas para preservar a capacidade reprodutiva (Zegers-Hochschild *et al.*, 2017).

O risco de infertilidade após uma doença oncológica é difícil de definir, pois depende de múltiplos fatores, nomeadamente fatores relacionados com o doente, com a doença e com o tratamento.

No que diz respeito à mulher e aos fatores relacionados com a doente, a idade é uma condição determinante, à qual acresce a fertilidade inicial (Silva & Almeida-Santos, 2015). O seu potencial reprodutivo, ou seja, a sua fertilidade, pode ser avaliado através da reserva ovárica. A reserva ovárica é um termo geralmente usado para indicar o número e/ou qualidade dos ovócitos, refletindo a capacidade de reprodução (Zegers-Hochschild *et al.*, 2017). Esta pode ser avaliada através do número de folículos antrais por ecografia e dos níveis plasmáticos de hormona anti-Mülleriana, FSH e estradiol. Adicionalmente a reserva ovárica também pode ser aferida pela resposta ao teste de provocação com citrato de clomifeno e à estimulação com gonadotrofinas, bem como pela avaliação de ovócitos e/ou embriões durante um procedimento de Procriação Medicamente Assistida (PMA). A este respeito, não podemos deixar de referir que a amenorreia, corresponde à ausência de menstruação, mas não traduz infertilidade e só deteta o declínio da reserva ovárica numa fase terminal. Em contrapartida, a existência de ciclos menstruais regulares não exclui danos infraclínicos no ovário (Fritz & Speroff, 2010).

O impacto do tipo e do estadiamento da doença oncológica na fertilidade futura não é consensual. Os estudos nesta área são escassos e os resultados que comparam a resposta ovárica aos protocolos de estimulação para preservação da fertilidade são contraditórios (Alvarez & Ramanathan, 2018; R. S. Hussein *et al.*, 2021; Johnson *et al.*, 2013; Volodarsky-Perel *et al.*, 2019). Num estudo retrospectivo com 531 doentes verificou-se que nos casos de neoplasias ginecológicas foi obtido um menor número de ovócitos maduros em comparação com as doentes com neoplasia hematológica e de mama (Alvarez & Ramanathan, 2018). Outro estudo retrospectivo com 147 doentes revelou que quanto maior o estágio da doença, menor o número de ovócitos maduros obtidos e de embriões criopreservados (Volodarsky-Perel *et al.*, 2019). Mais recentemente, um estudo de *coorte* também retrospectivo com 96 doentes não mostrou diferenças nos resultados da estimulação ovárica com base no diagnóstico oncológico (R. S. Hussein *et al.*, 2021). As doentes referenciadas para preservação da fertilidade

apresentaram reserva ovárica, resposta à estimulação e número de ovócitos e embriões semelhantes a outras mulheres com características semelhantes, avaliadas no âmbito de tratamentos de PMA ou para doação de ovócitos. As doentes que receberam letrozol necessitaram de doses mais altas de gonadotrofinas e produziram ovócitos mais imaturos, sugerindo que a resposta à estimulação ovárica pode ser prejudicada na presença de tumores hormonodependentes sob letrozol (Johnson *et al.*, 2013).

No que diz respeito aos tratamentos, há múltiplos fatores que afetam a fertilidade, nomeadamente o tipo, a dose e a duração do tratamento, o local e a dose da radioterapia e o tipo de cirurgia (Silva & Almeida-Santos, 2015). A Sociedade Europeia de Medicina da Reprodução Humana e Embriologia (ESHRE, do inglês, *European Society of Human Reproduction and Embryology*) sistematiza num quadro o risco de amenorreia induzida pelo tratamento. Na Tabela 1 estão descritas as situações associadas a risco alto, intermédio e baixo de amenorreia. Os restantes tratamentos são considerados de muito baixo risco ou de risco desconhecido (Anderson *et al.*, 2020).

Tabela 1. Risco de amenorreia induzida pelo tratamento oncológico (adaptado de (Anderson *et al.*, 2020))

Risco	Percentagem de amenorreia	Tipo de tratamento
Alto	>80%	Regimes com ciclofosfamida usados em doentes com cancro da mama com mais de 40 anos
		Regimes com ciclofosfamida ou a irradiação corporal total em doentes com neoplasias hematológicas previamente ao transplante de medula óssea
		Radioterapia abdominal e pélvica
Intermédio	40 a 60%	Regimes com ciclofosfamida usados em doentes com cancro da mama com 30 a 39 anos
		Regimes à base de agentes alquilantes usados nos doentes com linfoma, como por exemplo BEACOPP (bleomicina, etoposido, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, procarbazina e prednisona) e CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina e cloridrato de prednisolona)
Baixo	< 20%	Regimes com ciclofosfamida usados em doentes com cancro da mama com 30 anos ou menos
		Regimes com agentes não alquilantes em doentes com linfoma e idade superior ou igual a 32 anos, como por exemplo o ABVD (adriamicina, bleomicina, vimblastina, dacarbazina)
		Esquemas BEP/EP (bleomicina, etoposido e cisplatina) nos carcinomas não epiteliais do ovário
		Iodo radioativo para os carcinomas da tiroide
		Esquemas terapêuticos utilizados no cancro colorretal e na doença do trofoblasto gestacional

I.1. Indicações para preservação da fertilidade

A preservação da fertilidade emergiu como oportunidade de assegurar o futuro reprodutivo dos doentes oncológicos. Posteriormente, esta possibilidade foi alargada a doenças benignas, aos indivíduos com disforia de género e a indicações não-médicas, relacionadas com o adiamento da maternidade e a perda da fertilidade associada à idade, muitas vezes referida como indicação “social” (Anderson *et al.*, 2020; Grynberg, 2022).

No que respeita às doenças oncológicas, a preservação da fertilidade deve ser discutida com todos os doentes pré-púberes ou em idade reprodutiva que sejam surpreendidos com o diagnóstico de uma doença oncológica. Nestes casos, as indicações mais frequentes para preservação da fertilidade são o cancro da mama e as neoplasias hematológicas. A quimioterapia, nomeadamente a utilização de agentes alquilantes, é gonadotóxica, condicionando risco de amenorreia e IOP. A radioterapia, nomeadamente a irradiação corporal total ou a exposição pélvica a doses de 5-10 Gy, também está associada a alto risco de amenorreia (Dolmans & Donnez, 2021). É considerada contra-indicação para gravidez, a exposição a uma dose de radiação superior a 25Gy na infância ou 45 Gy na idade adulta (Dolmans *et al.*, 2021). Nas neoplasias ginecológicas, a cirurgia também tem impacto na fertilidade futura. A probabilidade de IOP após os tratamentos oncológicos, está relacionada com a reserva ovárica, que tem uma enorme variabilidade interindividual, razão pela qual o aconselhamento preciso do risco de infertilidade é muito difícil (Dolmans & Donnez, 2021).

Relativamente às doenças benignas com indicação para preservação da fertilidade inclui-se uma grande diversidade de patologias e de condições. É indiscutível que são candidatas a preservação da fertilidade as doentes propostas para ooforectomia uni ou bilateral por tumores benignos do ovário, nomeadamente se bilaterais ou com risco de torsão; ou portadoras de endometriose severa ou recorrente. Um outro grupo, são as mulheres com risco de IOP, nomeadamente com história familiar de IOP, síndrome de Turner e doenças autoimunes que requeiram quimioterapia (lúpus eritematoso sistémico, artrite reumatoide, doença de Behçet e doença de Wegener). Por último, as

doentes com patologias nas quais se prevê a necessidade de transplante de medula óssea, como doenças hematológicas benignas, nomeadamente anemia falciforme, talassemia major e anemia aplástica; bem como doenças autoimunes que não respondem à terapia imunossupressora são também indicação para preservação da fertilidade (Dolmans & Donnez, 2021; Donnez et al., 2006).

Aos indivíduos com disforia de género ou transgénero, em processo de transição médica e cirúrgica, também deve ser oferecida a possibilidade de preservação da fertilidade (Cooper *et al.*, 2022; Warton & McDougall, 2022). Trata-se de uma área complexa, que suscita questões éticas, particularmente em idade pediátrica (Warton & McDougall, 2022).

Por último, as indicações não médicas ou sociais estão relacionadas com o adiamento da maternidade por diversos motivos pessoais, nomeadamente por ausência de um parceiro estável, pela exigência do percurso profissional ou por dificuldades financeiras (Nazaré *et al.*, 2021). Esta opção garante autonomia reprodutiva à mulher, mas suscita controvérsias por motivos éticos e médicos, relacionados com o adiamento da maternidade e os riscos da gravidez em idade avançada (Gil-Arribas *et al.*, 2022).

I.2. Técnicas de preservação da fertilidade

As opções disponíveis para preservação da fertilidade feminina são a criopreservação de ovócitos, a criopreservação de embriões e a criopreservação de tecido ovárico. Outras práticas que podem ser ponderadas são a maturação ovocitária *in vitro*, o uso de agonistas da hormona libertadora das gonadotrofinas (GnRh) e a transposição ovárica (Anderson *et al.*, 2020; Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2019; Silva & Almeida-Santos, 2015).

A ESHRE sistematizou as diferentes técnicas de preservação da fertilidade disponíveis em cada país da Europa. Em Portugal, é possível a criopreservação de ovócitos e tecido ovárico nas indicações oncológicas. Nas doenças benignas, a criopreservação de

ovócitos continua a ser uma opção, sendo a criopreservação de tecido ovárico reservada para situações excepcionais. Nos indivíduos transgênero FtoM (*female to male*), é realizada a criopreservação de ovócitos. Esta técnica também pode ser realizada nas situações de perda da fertilidade associada à idade (Anderson *et al.*, 2020).

A criopreservação de ovócitos corresponde à congelação ou vitrificação dos ovócitos para uso futuro (Zegers-Hochschild *et al.*, 2017). Desde o desenvolvimento da vitrificação e com a melhoria da sobrevivência dos ovócitos e das taxas de gravidez, que este é o método de escolha para a maioria das mulheres (Gil-Arribas *et al.*, 2022). Desde 2012, que este método deixou de ser considerado experimental pela Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (ASRM, do inglês, *American Society for Reproductive Medicine*), sendo considerada a técnica de primeira linha para preservação da fertilidade feminina (Cobo *et al.*, 2021; Henry *et al.*, 2022; The Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and the Society for Assisted Reproductive Technology, 2013).

A criopreservação de embriões é uma técnica efetiva para preservação da fertilidade feminina, que tem sido abandonada, uma vez que requer um parceiro masculino, não garante a autonomia reprodutiva e está associada a problemas éticos e legais no caso do casal de separar ou se um dos elementos falecer (Dolmans & Donnez, 2021; Henry *et al.*, 2022).

A criopreservação de tecido ovárico é o processo de congelação lenta ou vitrificação do tecido ovárico, obtido por excisão cirúrgica, com a intenção de preservar a capacidade reprodutiva (Zegers-Hochschild *et al.*, 2017). Em 2019, a ASRM deixou de considerar esta técnica experimental mas, no entanto, está reservada para doentes pré-púberes e para aquelas em que é urgente iniciar o tratamento (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2019).

A maturação ovocitária *in vitro* (IVM, do inglês, *in vitro maturation*) é uma técnica que, desde fevereiro de 2021, já não é considerada experimental pela ASRM. No âmbito da preservação da fertilidade, ainda não é uma técnica de rotina e pode ser considerada uma opção para as doentes nas quais é emergente iniciar tratamentos potencialmente

gonadotóxicos. Porém, ainda são necessários estudos clínicos de maiores dimensões que comparem a fertilização *in vitro* (FIV) e a IVM, bem como estudos que acompanhem a longo prazo a saúde neonatal e o desenvolvimento da descendência (American Society for Reproductive Medicine, 2021; Henry *et al.*, 2022).

Existem outras opções que visam a proteção do ovário dos efeitos nefastos do tratamento, nomeadamente através do uso de agonistas de GnRH e da transposição ovárica.

A utilização de agonistas da GnRH para preservação da fertilidade é controversa, apesar dos vários estudos clínicos randomizados e meta-análises já realizadas. Assim, eles podem ser utilizados “*off label*”, não devendo substituir outras técnicas para preservação da fertilidade (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2019).

A transposição ovárica ou ooforopexia é uma opção para as doentes que vão ser submetidas a radioterapia pélvica. Nesta técnica, os ovários são cirurgicamente removidos da região a irradiar e fixados noutra localização, minimizando assim a exposição à radioterapia (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2019).

Por fim, a cirurgia poupadora da fertilidade é uma opção que deve ser ponderada em doentes com neoplasias cervicais e ováricas. Nas doentes portadoras de neoplasias endometriais em idade reprodutiva também deve ser ponderada uma atitude conservadora, com tratamento médico (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2019).

I.3. Criopreservação de tecido ovárico

A criopreservação de tecido ovárico é uma técnica promissora que com o ulterior transplante permite repor a fertilidade e, simultaneamente, restituir a função endócrina, diminuindo as consequências da IOP (Donnez *et al.*, 2013).

A investigação nesta área iniciou-se no final do século XIX, com estudos em modelo animal (Donnez *et al.*, 2006; Gosden *et al.*, 1994; Moomjy & Rosenwaks, 1998). Em 2004, Donnez *et al.*, publicaram o primeiro nascimento após transplante de tecido ovárico (Donnez *et al.*, 2005). Desde então, o número de casos tem aumentado, com um total de 130 nascimentos em 2017 e 200 em 2020 (Dolmans & Donnez, 2021). A taxa de nascimentos é de 26%, sendo 30% por gravidez espontânea (Dolmans *et al.*, 2021; Donnez & Dolmans, 2021). A taxa de recuperação da função endócrina é elevada, atingindo 93%, num estudo com 60 casos (Donnez *et al.*, 2013), e 88,7%, num estudo com 285 casos de transplante de tecido ovárico (Dolmans *et al.*, 2021). O tempo médio entre o transplante e a primeira menstruação é de $4,5 \pm 2,2$ meses (Dolmans *et al.*, 2021). A duração média do transplante é 4 a 5 anos, com uma sobrevivência do enxerto de 55% após 5 anos (Dolmans *et al.*, 2021; Donnez *et al.*, 2013). Contudo, estes dados são muito variáveis entre estudos, devido a fatores como a reserva ovárica, os tratamentos realizados antes da criopreservação, o tamanho e o método de preparação dos fragmentos, a distribuição folicular nos fragmentos e o potencial angiogénico do enxerto (Donnez *et al.*, 2013).

O momento ideal para a realização da criopreservação de tecido ovárico é antes de iniciar o tratamento potencialmente gonadotóxico. A leucemia é uma exceção, pois a técnica pode ser ponderada após a primeira remissão e antes do transplante de medula óssea, no sentido de diminuir o risco de recidiva (American Society for Reproductive Medicine, 2014). Adicionalmente, nas suas últimas recomendações, a ESHRE refere que a criopreservação de tecido ovárico é uma opção a oferecer a doentes que já tenham realizado quimioterapia (Anderson *et al.*, 2020). Num estudo com 285 casos de transplante de tecido ovário, que englobou dados de cinco Centros Europeus, foi demonstrado que a quimioterapia antes da criopreservação de tecido ovárico não altera os resultados do transplante, reforçando que esta não deve ser considerada uma contraindicação à congelação (Dolmans *et al.*, 2021).

Do ponto de vista prático, esta técnica implica pelo menos 2 intervenções cirúrgicas: a colheita e o transplante do tecido ovárico.

A colheita do tecido ovárico é realizada por laparoscopia ou mini-laparotomia, e pode

ser realizada biópsia da cortical ovárica ou ooforectomia. A quantidade de tecido a remover deve ser ponderada tendo em conta o risco de IOP e o volume ovárico. Assim, a remoção completa do ovário é preferencial na população pré-púbere e tem como vantagem a maior quantidade de tecido disponível, o que possibilita a realização de um segundo transplante, caso o primeiro seja ineficaz ou cesse atividade endócrina (American Society for Reproductive Medicine, 2014).

São candidatas para o transplante de tecido ovárico, as mulheres com sintomas clínicos de IOP ou com sinais biológicos de baixa reserva ovárica, traduzida por uma FSH elevada e uma hormona anti-Mülleriana e contagem de folículos antrais muito reduzida.

O transplante de tecido ovárico pode ser ortotópico ou heterotópico. O transplante ortotópico corresponde à reimplantação do tecido ovárico sobre o ovário restante ou no peritoneu a nível da fosseta ovárica. Esta opção tem como vantagens: a sua eficácia demonstrada num maior número de gravidezes e nascimentos; permitir a ocorrência de gravidez espontânea, caso as trompas estejam permeáveis; e ter um ambiente mais favorável ao desenvolvimento folicular. Contudo, é uma opção mais invasiva. Em contrapartida, o transplante heterotópico está descrito a nível subcutâneo no antebraço, na parede abdominal e na parede torácica. Estas localizações configuram procedimentos mais simples, ficando o enxerto mais acessível para monitorização e punção folicular. Porém, o escasso número de casos de sucesso reportados, aliado à necessidade de FIV e à existência de temperaturas subótimas e stresse mecânico, que comprometem a qualidade ovocitária, tornam estas opções menos favoráveis (American Society for Reproductive Medicine, 2014; Donnez *et al.*, 2006, 2013; Nakano *et al.*, 2020; Oktay, 2006; Tammiste *et al.*, 2019).

O procedimento aprovado pela ASRM pressupõe a utilização de fragmentos de córtex de tecido ovárico, com menos de 1 a 1,5 mm de espessura, para criopreservação e transplante (American Society for Reproductive Medicine, 2014; Donnez *et al.*, 2013). É no córtex ovárico que se localizam a maioria dos ovócitos e a existência de vários fragmentos permite a possibilidade de repetição do transplante. Contudo, trata-se de um transplante avascular, no qual os fragmentos de tecido ovárico são colocados

habitualmente no peritoneu ou no ovário restante, sem qualquer tipo de anastomose vascular, pelo que é necessária a ocorrência de neovascularização. Até ao estabelecimento desta, há isquemia e perda de folículos, que comprometem o sucesso e a longevidade do transplante (Donnez *et al.*, 2013; L. Wang *et al.*, 2013). Por este motivo, têm sido estudadas alternativas, nomeadamente a realização do transplante de ovário como um todo, como nos restantes transplantes de órgãos sólidos, que tem como vantagem a revascularização imediata após a anastomose vascular. Em contrapartida, esta opção tem inúmeras desvantagens, em que a principal é a ausência de casos de sucesso descritos com a utilização de ovário humano pós-criopreservação, bem como o tempo mais prolongado da intervenção cirúrgica, relacionada com o reduzido calibre e comprimento da artéria ovárica, o maior risco de recidiva e a impossibilidade de repetir o transplante (American Society for Reproductive Medicine, 2014; Bedaiwy & Falcone, 2010; Hossay *et al.*, 2020).

O transporte do tecido ovárico, após a colheita, deve ser realizado a -4°C e por um período máximo de quatro a cinco horas (Donnez *et al.*, 2013). No laboratório, o tecido é preparado, com a remoção da medula e os fragmentos de córtex de tecido ovárico são congelados. O processo de congelação pode ser realizado por congelação lenta ou vitrificação. A criopreservação lenta é um procedimento no qual a temperatura é reduzida em etapas, normalmente usando um ritmo controlado por computador, desde a temperatura fisiológica ou ambiente até uma temperatura extremamente baixa, cerca de -140°C (Rosendahl *et al.*, 2011; Zegers-Hochschild *et al.*, 2017). Esta técnica foi utilizada na grande maioria das crianças nascidas após transplante de tecido ovárico (Donnez *et al.*, 2013; Terren *et al.*, 2019). A vitrificação é uma técnica mais recente com bons resultados em ovócitos e em embriões, na qual é realizada a criopreservação rápida, com melhor sobrevivência das células da granulosa e do estroma. Contudo, esta técnica requer a utilização de quantidades elevadas de crioprotetor, com risco de toxicidade celular e de trauma osmótico (American Society for Reproductive Medicine, 2014; Donnez *et al.*, 2013).

I.4. Limitações da criopreservação de tecido ovárico

Como referido previamente, a criopreservação de tecido ovárico é uma técnica estabelecida para preservação da fertilidade feminina. É uma técnica com indicações específicas, uma vez que tem algumas limitações, nomeadamente o risco de recidiva e o compromisso da longevidade com o transplante do tecido ovárico criopreservado.

O risco de reimplantação de células neoplásicas existentes no tecido transplantado é um risco teórico que pode colocar em causa a segurança do transplante. As neoplasias são estratificadas de acordo com o risco de metastização para o ovário, em que se consideram de alto risco (> 11%) a leucemia, o neuroblastoma e o linfoma de Burkitt. As neoplasias de risco moderado (0,2 a 1%) são o cancro da mama de subtipo lobular e estágio IV, o cancro do cólon, o adenocarcinoma cervical, o linfoma não-Hodgkin e o sarcoma de Ewing. Por fim, as neoplasias de baixo risco (< 0,2%) são o cancro da mama de subtipo ductal e estágio I-II, o carcinoma espinhocelular do colo, o linfoma de Hodgkin, o carcinoma osteogénico, o rabdomiossarcoma não genital e o tumor de Wilms (Dolmans *et al.*, 2013).

Para minimizar este risco têm sido desenvolvidas técnicas de diagnóstico no tecido a transplantar, como a análise histológica de uma amostra de tecido antes do transplante, a amplificação por PCR (do inglês, polymerase chain reaction) ou a deteção por citometria de fluxo de marcadores específicos do tumor ou mesmo a realização de xenotransplante. O estudo histopatológico é realizado na maioria dos Centros, enquanto as outras técnicas são mais utilizadas no contexto de investigação (American Society for Reproductive Medicine, 2014; Donnez & Dolmans, 2013).

Por outro lado, têm sido desenvolvidas alternativas à transplantação de tecido ovárico, como a IVM e o ovário artificial (American Society for Reproductive Medicine, 2014; Donnez & Dolmans, 2013). A IVM é uma técnica que permite a maturação em meio de cultura, dos complexos cumulus-ovócito imaturos da prófase I até à metáfase II (American Society for Reproductive Medicine, 2021). Deste modo, os ovócitos imaturos são obtidos intraoperatoriamente, submetidos a maturação *in vitro* e posterior criopreservação dos ovócitos já maduros ou fecundados com criopreservação

de embriões (American Society for Reproductive Medicine, 2014). O ovário artificial é uma técnica alternativa e experimental na qual os folículos primordiais são isolados e transferidos para um scaffold com uma matriz biodegradável como, por exemplo, o alginato ou a fibrina (Donnez & Dolmans, 2017, 2013).

Na maior série de casos de transplante de tecido ovárico publicada, a taxa de recidiva foi de 4,2%. O autores salientam que a recidiva foi dependente da doença primária e não relacionada com o transplante, uma vez que em todos os casos foi distante do local de transplantação e mais próximo do local do tumor primário (Dolmans *et al.*, 2021).

A longevidade do transplante está dependente de múltiplos fatores, alguns deles já referidos, nomeadamente a idade da mulher à data da criopreservação, a densidade folicular e a qualidade do tecido. Além disso, a duração da função endócrina é comprometida pela perda de mais de 50% dos folículos primordiais, devido à isquemia que se verifica até ser estabelecida a revascularização do enxerto e à ativação folicular que dela decorre (Dolmans & Donnez, 2021; Donnez *et al.*, 2013, 2022; L. Wang *et al.*, 2013).

A isquemia é o principal mecanismo relacionado com a perda folicular. O início da reperfusão do enxerto ocorre nos primeiros 5 dias após o transplante (Donnez *et al.*, 2013; L. Wang *et al.*, 2013). Ao contrário do transplante de grandes órgãos, onde a reperfusão é obtida imediatamente após a anastomose, no transplante de tecido ovárico está dependente do crescimento de novos vasos, ou seja, da neoangiogênese (Wu *et al.*, 2010).

A ativação folicular ocorre devido a um crescimento folicular acelerado e não fisiológico, uma vez que foram detetadas discrepâncias na maturação das células da granulosa e do ovócito. O processo de congelação e descongelação parece ter impacto neste mecanismo, ao afetar a morfologia do tecido (Donnez *et al.*, 2013). Verificam-se alterações na espessura da camada de células da teca, que por sua vez, estão implicadas no desenvolvimento folicular, pois fornecem suporte estrutural para os folículos. Donnez e colaboradores sugeriram que o conceito de preparação do leito vascular antes do enxerto deve ser mais explorado para diminuir significativamente a perda folicular

(Donnez *et al.*, 2013). Este conceito é complexo e pressupõe que as características do local de transplantação no hospedeiro têm um papel na revascularização do enxerto (Van Eyck *et al.*, 2010). Um estudo em macacos verificou que o transplante sob o ovário descorticado, no mesmo tempo cirúrgico, é melhor do que sob a superfície cicatrizada (Dolmans *et al.*, 2015).

Este recrutamento anormal dos folículos primordiais pode ser sustentado pela ativação precoce da via de sinalização de fosfoinositol-3-quinase (PI3K, do inglês, phosphoinositide 3-kinase)/proteína quinase B (Akt), pela disrupção da via Hippo devido à fragmentação do córtex ovárico e/ou pelo *burnout* folicular devido à diminuição da concentração da hormona anti-Mülleriana, nos primeiros meses após o transplante (Cacciottola *et al.*, 2021).

CAPÍTULO II. Angiogénesis

A angiogénese corresponde ao processo de desenvolvimento de novos vasos a partir de outros preexistentes. Este é um processo dinâmico e extremamente complexo, que envolve diversas vias e tipos celulares, e que é regulado por múltiplos fatores e componentes da matriz extracelular (Logsdon *et al.*, 2014; Yoo & Kwon, 2013).

Alguns autores descrevem diferentes mecanismos de crescimento vascular, como o *sprouting*, a intussusceção, a cooptação de vasos, o mimetismo vascular e a vasculogénese, representados esquematicamente na Figura 1 (Carmeliet & Jain, 2011; De Spiegelaere *et al.*, 2012; Secord & Siamakpour-Reihani, 2017).

Os primeiros dois mecanismos ocorrem principalmente no indivíduo saudável, com o crescimento fisiológico dos tecidos. Os restantes são observados e descritos na angiogénese patológica, nomeadamente tumoral (De Spiegelaere *et al.*, 2012).

A angiogénese através do *sprouting* é o modelo mais estudado de neovascularização (Secord & Siamakpour-Reihani, 2017). Este processo permite a formação de uma rede vascular dentro de tecidos previamente avasculares, como as zonas hipertróficas da cartilagem na placa de crescimento de ossos endocondrais, ou em situações de crescimento tumoral (De Spiegelaere *et al.*, 2012). Na intussusceção, os novos vasos são formados através da divisão de vasos preexistentes (De Spiegelaere *et al.*, 2012; Logsdon *et al.*, 2014). A cooptação de vasos representa um mecanismo totalmente diferente, no qual as células tumorais sequestram vasos maduros preexistentes do órgão hospedeiro, sem a necessidade de gerar novos vasos (Haas *et al.*, 2021). O mimetismo vascular descreve a capacidade das células tumorais formarem por si só estruturas semelhantes aos vasos, independentemente das células endoteliais (Haas *et al.*, 2021). A vasculogénese ocorre durante a embriogénese com a formação de novos vasos através de precursores de células endoteliais (Papetti & Herman, 2002).

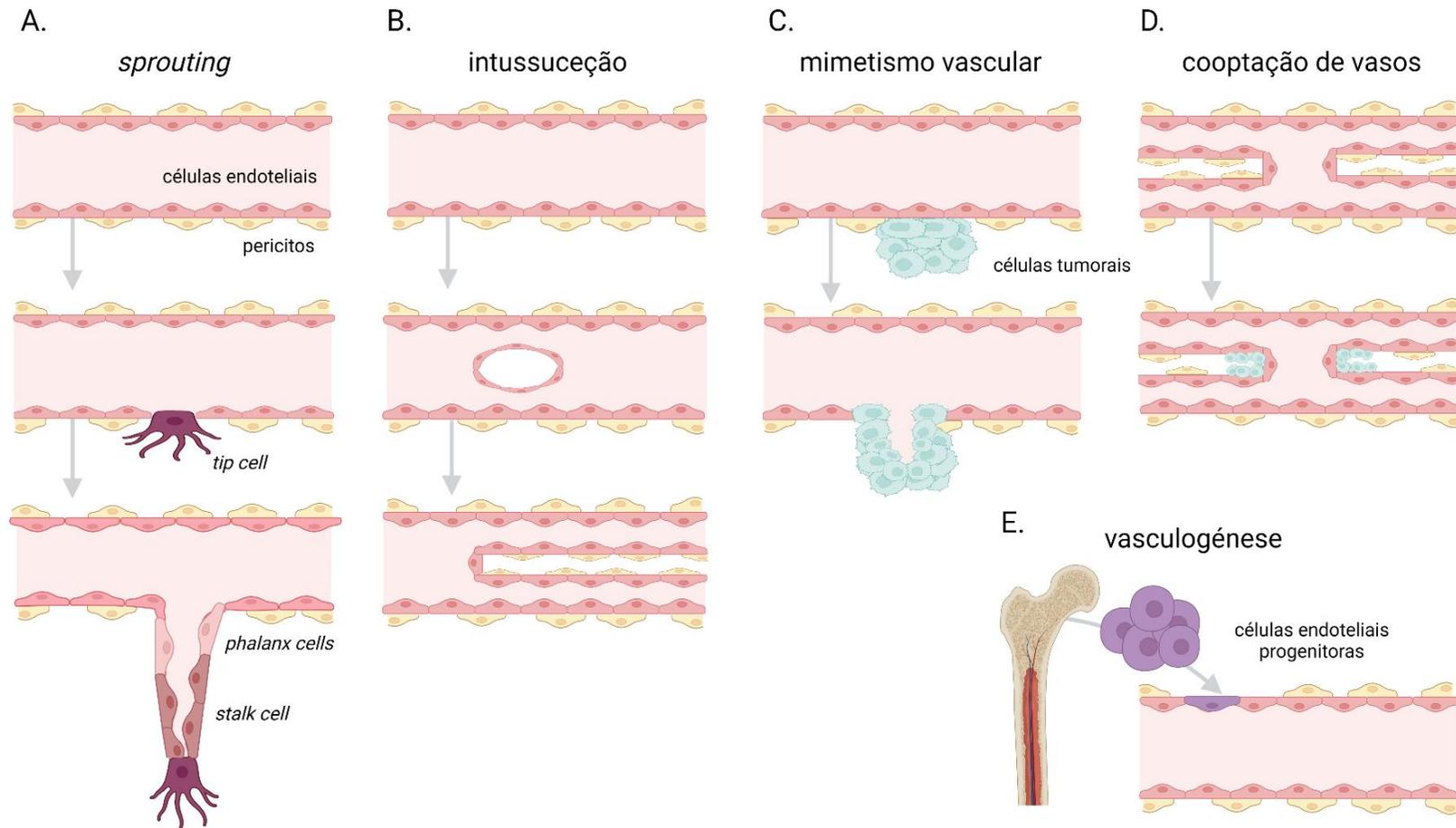


Figura 1. Mecanismos de crescimento vascular. O *sprouting* (A) permite a formação de uma rede vascular após a mobilização dos pericitos, que possibilita a migração inicial da *tip cell* a partir do vaso preexistente e que é seguida por uma sequência de *stalk cells*, que posteriormente se transformam em *phalanx cells*. A intussusceção (B) corresponde ao processo de formação de vasos através da divisão de vasos preexistentes. No mimetismo vascular (C), as células tumorais formam por si só estruturas semelhantes aos vasos. Na cooptação de vasos, as células tumorais sequestram vasos maduros preexistentes do órgão hospedeiro, sem gerar novos vasos. O último mecanismo é a vasculogênese que compreende a formação de novos vasos através de precursores de células endoteliais. *Created with BioRender.com*

II.1. O processo de angiogênese

Os vasos são compostos pelas células endoteliais, que formam a camada interna, e pelos pericitos ou células perivasculares, que interagem com as células endoteliais e envolvem a superfície externa do vaso. Os pericitos são células mesenquimatosas especializadas encontradas ao longo de capilares e vénulas pós-capilares. Estas células têm um papel crítico na angiogênese e estão associados à regulação do diâmetro e da permeabilidade dos vasos sanguíneos, bem como da proliferação das células endoteliais (Secord & Siamakpour-Reihani, 2017).

As células endoteliais são ativadas por uma variedade de citocinas pró-angiogénicas. Em simultâneo ocorre a remodelação das junções celulares e da matriz extracelular, com a mobilização dos pericitos. Neste processo existem múltiplas vias envolvidas, sendo a principal a via de sinalização do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês, *vascular endothelial growth factor*). Outras vias envolvidas são a via do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF, do inglês, *platelet-derived growth factor*) e do fator de crescimento de fibroblastos (FGF, do inglês, *fibroblast growth factor*). A via do VEGF é acompanhada por outros moduladores-chave da angiogênese, como a via do ligando *Delta-like 4* (Dll4)-Notch e a via angiopoietina-Tie, bem como várias vias secundárias. As vias de sinalização do PDGF- β e seu recetor (PDGFR- β), angiopoietina-Tie e fator de crescimento transformador- β (TGF- β , do inglês, *transforming growth factor beta*) são as mais importantes para o recrutamento de pericitos (Secord & Siamakpour-Reihani, 2017).

De forma sistematizada, o processo de angiogênese ocorre através de uma série de etapas sequenciais que se iniciam pelo estímulo angiogénico, com a consequente formação do novo vaso, e que termina com a estabilização ou a regressão (Bentley & Chakravartula, 2017; Logsdon *et al.*, 2014). Na formação do novo vaso é descrito o mecanismo de *sprouting*, que foi o primeiro a ser descrito e é o mais estudado, e a intussusceção, que é outro mecanismo de angiogênese fisiológica.

Bentley e Chakravartula descreveram a angiogênese do ponto de vista cronológico, mas concluíram que ainda há uma série de fatores e mecanismos celulares inexplorados.

Neste processo está implícita uma sequência de eventos, na qual a célula recebe o estímulo e posteriormente “move-se enquanto decide” ou “decide e depois move-se”. O “movimento” é o *sprouting* das *tip cells*, que é muito rápido, na ordem dos minutos, uma vez que é mediado por estímulos locais que não implicam uma resposta nuclear, com alteração da expressão genética. A “decisão” corresponde à inibição lateral das células endoteliais, que lhes confere o fenótipo de *stalk cells*, e requer múltiplos ciclos de regulação genética, que alteram a síntese proteica, cada um durando cerca de 4 a 6 horas. Além disso, os autores propõem que ao longo do vaso podem existir outras células 'ativas' (*tip cells*), intercaladas com as *stalk cells*. A alteração da posição das células endoteliais, durante o *sprouting*, ocorre em média a cada 3,7 horas, e permite a ramificação dos novos vasos (Bentley & Chakravartula, 2017).

II.2. Estímulo angiogénico

O estímulo angiogénico inicia-se fora do lúmen vascular e da corrente sanguínea. Há um sinal de stresse, que resulta de um estímulo hipóxico, metabólico ou mecânico e que é percebido em primeiro lugar pelas células endoteliais (Logsdon *et al.*, 2014). Os estímulos podem surgir por oclusão vascular, aumento do metabolismo ou crescimento tecidual normal ou patológico. A consequente diminuição do fluxo sanguíneo resulta na diminuição da pressão parcial de oxigénio, com hipoxia e isquemia (Bentley & Chakravartula, 2017; Logsdon *et al.*, 2014).

A hipoxia estimula a angiogénese através de múltiplas vias, incluindo a via do óxido nítrico e através de fatores de transcrição induzíveis por hipoxia (HIFs, do inglês, *hypoxia-inducible factors*). Deste modo, a hipoxia induz a produção de fatores de crescimento pró-angiogénicos pelas células parenquimatosas e/ou do estroma. Adicionalmente, verifica-se o recrutamento de células derivadas da medula óssea, incluindo macrófagos, monócitos e células progenitoras, que também produzem fatores de crescimento como, por exemplo, o VEGF (Logsdon *et al.*, 2014).

O oxigénio é necessário para a síntese de óxido nítrico, a partir das suas sintetases

como a eNOS (do inglês, *endothelial nitric oxide synthase*), a nNOS (do inglês, *neuronal nitric oxide synthase*), e a iNOS (do inglês, *inducible nitric oxide synthase*), pelo que existe uma interdependência entre o consumo de oxigénio e a regulação do óxido nítrico. Esta produção pode ser regulada pelo efeito Fåhræus-Lindqvist, descrito pela primeira vez em 1929, e no qual se verificou que quando o sangue flui de um vaso de grande diâmetro para um capilar, o hematócrito médio diminui (Barbee & Cokelet, 1971). Este efeito é mais significativo em vasos sanguíneos de menor calibre, nomeadamente com menos de 30 μm de diâmetro, nos quais ocorre o *sprouting* (Logsdon *et al.*, 2014).

A hipoxia promove ainda a estabilização dos HIFs, que atuam como fatores de transcrição para o VEGF e seus recetores (VEGFRs). O HIF1 é o fator mais estudado desta família e contém duas subunidades, uma subunidade sensível ao oxigénio, a HIF1 α , e uma subunidade constitutivamente ativa, a HIF1 β /ARNT (do inglês, *HIF1 beta/aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*). Na presença de oxigénio, o HIF1 α é degradado; enquanto em situações de hipoxia, o HIF1 α permanece estável, desloca-se para o núcleo e liga-se ao HIF1 β . No núcleo, o HIF1 regula a expressão dos genes como o *VEGF*, *VEGFR*, *angiopoietina-1*, *angiopoietina-2*, *Tie2*, *PDGF*, *FGF* e *MCPI* (do inglês, *monocyte chemoattractant protein-1*) (Logsdon *et al.*, 2014; Rizov *et al.*, 2017).

Independentemente do estímulo inicial, a primeira fase do crescimento capilar é mediada pela produção de VEGF pelas células parenquimatosas. Nesta etapa, o VEGF aumenta a sobrevivência, proliferação e migração das células endoteliais. Esta família de citocinas pró-angiogénicas é constituída por sete fatores de crescimento, os VEGF-A a E e os PGF-1 e 2 (do inglês, *placental growth factor*), que se ligam a cinco recetores principais, os VEGFR-1 a -3 e os corretores neuropilinas 1 e 2 (Logsdon *et al.*, 2014; Secord & Siamakpour-Reihani, 2017). O VEGF induz a produção de óxido nítrico e aumenta a permeabilidade do vaso preexistente, causando vasodilatação. Adicionalmente, também estimula a motilidade e a proliferação de células endoteliais, iniciando assim o processo de *sprouting* (Rizov *et al.*, 2017). O PGF ativa os macrófagos polarizados M2, que libertam fatores pró-angiogénicos (Secord & Siamakpour-Reihani, 2017).

Como previamente referido, o sinal de stresse é percecionado em primeiro lugar pelas

células endoteliais, uma vez que estas são sensíveis às alterações das concentrações de oxigénio e aos HIFs, permitindo que os vasos reajustem a sua forma para otimizar o fluxo sanguíneo. Os pericitos embainham as células endoteliais, suprimindo a sua proliferação, e libertam sinais de sobrevivência celular, como o VEGF e a angiopoietina-1. As células endoteliais e os pericitos em repouso contribuem para a formação de uma membrana basal comum (Carmeliet & Jain, 2011).

II.3. Formação do novo vaso

II.3.1. *Sprouting*

O *sprouting* corresponde à migração inicial a partir do vaso preexistente, pelo que implica a presença de uma *tip cell*, que é seguida por uma sequência de *stalk cells* (Logsdon *et al.*, 2014; Secord & Siamakpour-Reihani, 2017).

Após o estímulo inicial que desencadeia a cascata da angiogénese, há múltiplos sinais pró e antiangiogénicos no tecido que orientam a germinação das células endoteliais, culminando no desenvolvimento do vaso sanguíneo até ao seu destino final. Neste processo há uma interação complexa entre as células endoteliais, a membrana basal vascular e a matriz extracelular circundante. Os pericitos desprendem-se da parede do vaso e as células endoteliais selecionadas migram do vaso sanguíneo na direção do gradiente pro-angiogénico (Carmeliet & Jain, 2011; Logsdon *et al.*, 2014; Secord & Siamakpour-Reihani, 2017).

A mobilização dos pericitos ocorre devido à sinalização pela angiopoietina-2. A via de sinalização angiopoietina-Tie é parte integrante da angiogénese. O Tie2 é um recetor de tirosina quinase que é constitutivamente expresso e ativado na vasculatura saudável e quiescente. A função do Tie2 varia com base na ativação do ligando. A expressão de angiopoietina-1, um ligando e agonista do Tie2, condiciona um aumento da maturidade vascular e da densidade microvascular induzida por VEGF. A expressão de

angiopoietina-1 pelos pericitos estabiliza as células endoteliais. Em contraste, a angiopoietina-2, que é principalmente um antagonista de Tie2, bloqueia a estabilidade vascular induzida pela angiopoietina-1, facilita a angiogênese mediada por VEGF e sensibiliza as células endoteliais a sinais pró-angiogênicos (Papetti & Herman, 2002; Secord & Siamakpour-Reihani, 2017).

Para a migração das células endoteliais são essenciais as proteases que permitem degradar a matriz extracelular e remover as barreiras físicas. As metaloproteínases da matriz (MMP) são as proteases mais estudadas no contexto da angiogênese. Foram identificadas mais de 25 MMPs, com diferentes localizações e capacidade de clivagem das proteínas da matriz extracelular. Os inibidores das MMPs, incluem os inibidores teciduais de MMPs (TIMPs, do inglês, *tissue inhibitors of metalloproteinases*), dos quais o TIMP-1 e o TIMP-2 são expressos por células endoteliais (Logsdon *et al.*, 2014). As proteases também libertam moléculas angiogênicas armazenadas na matriz extracelular, designadamente o VEGF e o FGF. O VEGF aumenta a permeabilidade da camada de células endoteliais, permitindo o extravasamento das proteínas plasmáticas para que estas estabeleçam uma matriz extracelular provisória (Carmeliet & Jain, 2011).

Para evitar que as todas as células endoteliais se movam na direção do sinal angiogênico é selecionada uma célula endotelial conhecida como *tip cell* (Carmeliet & Jain, 2011). Estas *tip cells* apresentam projeções citoplasmáticas, uma característica das células migratórias (Secord & Siamakpour-Reihani, 2017). A identidade e seleção da *tip cell* é baseada na expressão de VEGFR-2 e na sinalização através da via Dll4-Notch1. Em suma, a ligação do VEGF ao VEGFR-2 induz a expressão do Dll4 pela célula endotelial, que se liga ao Notch1 expresso pelas células endoteliais adjacentes. A ligação e ativação do recetor Notch1 inibe o fenótipo da *tip cell* nessas células adjacentes (Carmeliet & Jain, 2011; Logsdon *et al.*, 2014; Page *et al.*, 2019). Esta inibição ocorre pela diminuição da expressão de VEGFR-2 e -3 e indução da expressão de VEGFR-1 pelas *stalk cells*. Assim, as *tip cells* não respondem à via de sinalização do Notch, mantendo altos níveis de expressão de VEGFR-2, bem como do VEGFR3 e PDGF-B (Bentley & Chakravartula, 2017; Secord & Siamakpour-Reihani, 2017).

Por conseguinte, a direção do *sprouting* e a migração vascular está dependente do gradiente local do VEGF e da sinalização ao recetor. As MMPs têm a capacidade de clivar as isoformas de VEGF ligadas à matriz (particularmente o VEGF165), o que altera a sua capacidade de ligação ao recetor e a sua distribuição. O recetor VEGFR-1 e o seu gene *sFLT-1* (do inglês, *soluble fms-like tyrosine kinase-1*) também são essenciais para a orientação do vaso. A expressão genética de *sFLT-1* pelas *tip cells* endoteliais permite que estas sequestram o VEGF, alterando o gradiente local do VEGF e, consequentemente, a sinalização ao recetor (Logsdon *et al.*, 2014).

Após o *sprouting*, as células endoteliais começam a migrar no sentido do estímulo angiogénico, formando a estrutura vascular, num processo de alongamento e ramificação, seguido da tubulogénese, que corresponde à formação do lúmen e de anastomose (Logsdon *et al.*, 2014).

Nesta fase, a *tip cell* torna-se uma *stalk cell* e, mais tarde, numa célula quiescente num vaso estável. O fenótipo das células endoteliais parece modificar-se através da via sinalização Dll4-Notch da junção célula-célula. As *stalk cell* proliferam e dividem-se para alongar o pedículo, sendo estimuladas por diversas proteínas [Notch, proteína de repetição de anquirina regulada por Notch (NARP, do inglês *Notch-regulated ankyrin-repeat protein*), Wnt (do inglês, *Wingless/Integrated*), PGF e FGF] (Carmeliet & Jain, 2011; Secord & Siamakpour-Reihani, 2017). Na fase de alongamento e ramificação, o FGF é um dos estímulos mais estudados, depois do VEGF. Contudo, há outros fatores implicados neste processo, como outras quimiocinas, nomeadamente a caderina do endotélio vascular (caderina-VE ou -5), e fatores relacionados com a matriz extracelular, como por exemplo, a alteração da densidade e da orientação das fibras da matriz extracelular (Logsdon *et al.*, 2014).

Durante a tubulogénese, o capilar que se originou deve estabelecer uma conexão com outro vaso e desenvolver um lúmen para adquirir competência funcional e transportar sangue. Esta etapa-chave no processo de angiogénese é a menos compreendida. Sabe-se, no entanto, que na fase de formação do lúmen ocorre a coalescência de vacúolos e o rearranjo de proteínas de junção celular, para além de ser definida a polaridade celular e se verificar a invaginação da membrana e a formação de lúmen extracelular.

Neste processo estão envolvidas várias moléculas da fase inicial da angiogénese, como a caderina-VE, o CD34, as sialomucinas, o VEGF e o Hedgehog, não existindo um modelo molecular consensualmente aceite (Carmeliet & Jain, 2011; Logsdon *et al.*, 2014).

A anastomose é a conexão entre dois capilares recém-formados ou um capilar recém-formado e um vaso preexistente (Logsdon *et al.*, 2014). O mecanismo de formação de um novo vaso através do sprouting está esquematizado na Figura 2.

II.3.1. Intussusceção

Alguns autores, descrevem outro mecanismo normal de formação de novos vasos na angiogénese, que é a intussusceção. Este mecanismo não implica o *sprouting*, nem a existência de *tip cells*, sendo os novos vasos formados através da divisão de vasos preexistentes (De Spiegelaere *et al.*, 2012; Logsdon *et al.*, 2014).

A intussusceção foi descrita pela primeira vez em 1940 por Clark e Clark e nomeada por Burri e Tarek em 1990 (Burri & Tarek, 1990; Clark & Clark, 1940; Logsdon *et al.*, 2014). Contudo, a investigação nesta área é escassa, sendo necessários estudos que comparem os dois mecanismos no que diz respeito às vias moleculares (De Spiegelaere *et al.*, 2012; Logsdon *et al.*, 2014).

À luz do conhecimento atual identificam-se algumas diferenças entre os dois processos. Em primeiro lugar, o processo de intussusceção é mais rápido que o *sprouting* (De Spiegelaere *et al.*, 2012; Logsdon *et al.*, 2014). Como não se formam terminações vasculares cegas, a intussusceção pode ocorrer sem interferir nas condições fisiológicas locais. A membrana basal permanece intacta durante a intussusceção, evitando que os vasos sanguíneos se tornem permeáveis. Além disso, a intussusceção tem um consumo metabólico menor que o *sprouting*, pois a migração e a proliferação endotelial são mínimas, uma vez que estas células podem apenas aumentar de tamanho e achatarem-se. Por último, o plexo vascular parece ser melhor organizado através deste mecanismo (De Spiegelaere *et al.*, 2012; Eelen *et al.*, 2020).

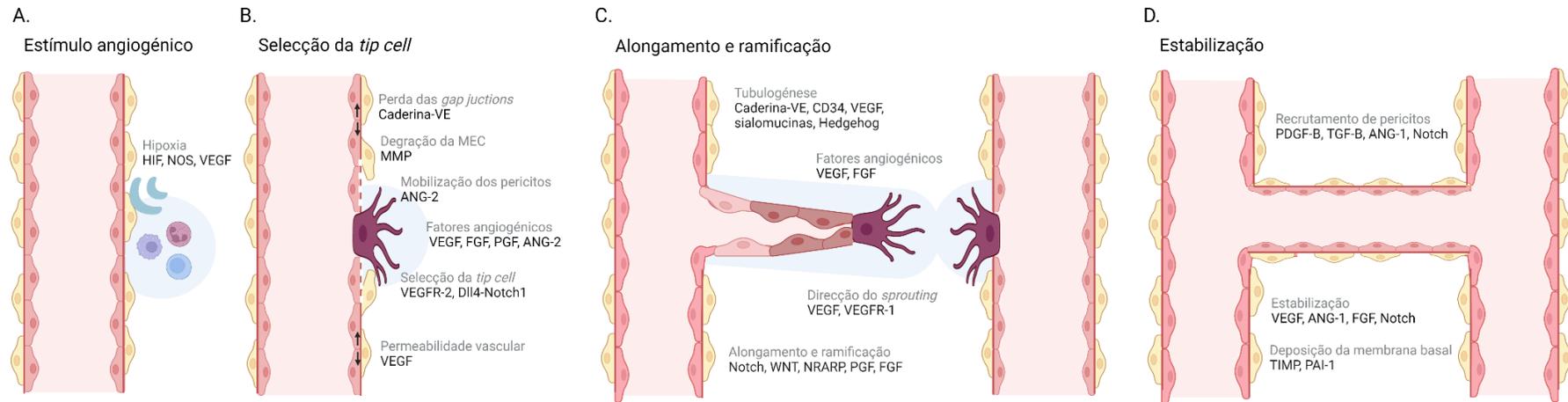


Figura 2. Mecanismos moleculares da formação do novo vaso através do processo de sprouting. O estímulo angiogénico (A) pode surgir por oclusão vascular, aumento do metabolismo ou crescimento tecidual, que condicionam hipoxia. Esta por sua vez estimula a angiogénese através de múltiplas vias, incluindo a via do óxido nítrico (NOS) e através de HIFs (do inglês, hypoxia-inducible factors), com consequente produção de fatores de crescimento como o VEGF, pelas células parenquimatosas, do estroma e/ou células derivadas da medula óssea. Posteriormente aumenta a permeabilidade vascular e ocorre a selecção da *tip cell* (B), que implica a perda de *gap junctions*, a degradação da matriz extracelular (MEC) e a mobilização dos pericitos. As células endoteliais migram no sentido do estímulo angiogénico, formando a estrutura vascular, num processo de alongamento e ramificação (C). Simultaneamente ocorre a tubulogénese, que corresponde à formação do lúmen e de anastomose. A estabilização (D) é a fase final, na qual os vasos recém-formados, se tornam funcionais, permitindo o fluxo sanguíneo. *Created with BioRender.com*

Esta forma de angiogénese parece desempenhar um papel importante no crescimento e na remodelação da maioria dos leitos vasculares, incluindo o tecido ósseo, a retina, o músculo, o rim, o ovário e a glândula mamária, bem como em tumores (De Spiegelaere *et al.*, 2012). Tem também sido descrita como a forma dominante em algumas situações como, por exemplo, em modelos animais com terapêuticas que condicionam a sobreexpressão de VEGF (Logsdon *et al.*, 2014).

A intussusceção pode ser explorada no âmbito da terapêutica pró-angiogénica para estabelecer um plexo vascular funcional em tecidos isquémicos. Os tratamentos atuais visam principalmente induzir o *sprouting*, condicionando um edema transitório nos tecidos, resultado do aumento da permeabilidade dos capilares recém-formados. A indução específica da intussusceção poderia melhorar o resultado terapêutico. Mas, para tal, seria necessário compreender e distinguir as vias moleculares destes dois mecanismos de angiogénese, o que ainda não foi plenamente estabelecido (De Spiegelaere *et al.*, 2012).

As forças hemodinâmicas têm um papel importante na angiogénese por intussusceção, contudo ainda não está claro se tal ocorre por alterações da pressão hidrostática, do calibre do vaso, da tensão de cisalhamento ou por uma combinação de fatores. Adicionalmente, e à semelhança do *sprouting*, foram identificados fatores moleculares que regulam o processo de intussusceção, nomeadamente o VEGF, as angiopoietinas, o FGF, o PDGF-B e os HIFs (De Spiegelaere *et al.*, 2012).

Estão descritas três formas de intussusceção: o crescimento microvascular, a arborização e a ramificação, representadas na Figura 3. O crescimento microvascular intussuscetivo leva à rápida expansão de uma rede vascular preexistente, que resulta numa rede simples de capilares com tamanho semelhante, adquirindo uma arquitetura específica do órgão. A arborização intussuscetiva contribui para a remodelação de uma rede capilar, de não hierárquica para hierárquica, na qual podem ser discernidas as principais arteríolas, vénulas e capilares. A ramificação intussuscetiva pode ser definida como o mecanismo que otimiza o número de vasos que nutre um tecido, através da alteração do padrão de ramificação ou da eliminação da rede vascular de vasos supérfluos (De Spiegelaere *et al.*, 2012).



Figura 3. Formas de intussusceção: crescimento microvascular intussusceptivo (A), arborização intussusceptiva (B) e ramificação intussusceptiva (C). (adaptado de (De Spiegelaere *et al.*, 2012))

II.3.2. Estabilização ou regressão

A estabilização ou regressão é a fase final da angiogênese, na qual os vasos recém-formados, se tornam funcionais, permitindo o fluxo sanguíneo.

Nesta fase, as *stalk cells* transformam-se em *phalanx cells*, que são células endoteliais em monocamada, e que têm um ritmo de proliferação mais lento, com características semelhantes às células endoteliais quiescentes, mas que formam a membrana basal e intensificam as junções celulares (De Spiegelaere *et al.*, 2012).

Para que um vaso se torne funcional, ele deve tornar-se maduro e estável, suportado pelos pericitos. O seu papel na função capilar e na angiogênese inclui a regulação da proliferação e da migração de células endoteliais, bem como a formação da membrana basal capilar, em associação com as células endoteliais. É importante notar que, assim como o pericito é crítico para a estabilidade capilar no final da angiogênese, a dissociação do pericito também é necessária para permitir o *sprouting* capilar. O recrutamento dos pericitos é mediado pelo PDGF-B produzido pelas células endoteliais e a sua diferenciação, a partir de células intersticiais, é estimulada pelo contato com as *tip cells* (De Spiegelaere *et al.*, 2012; Logsdon *et al.*, 2014). Estão ainda descritos outros fatores que contribuem para o revestimento das células endoteliais pelos pericitos, nomeadamente a angiopoietina-1, o TGF- β , a efrina-B2 e a Notch (Carmeliet & Jain, 2011).

Durante a fase de estabilização ou regressão e em estudos em modelos tumorais, os pericitos e outras células intersticiais expressam angiopoietina-1 e -2, que se ligam ao recetor Tie2 das células endoteliais. A angiopoietina-1 promove estabilização vascular,

enquanto a angiopoietina-2 tem a função oposta (Logsdon *et al.*, 2014).

Os inibidores de protease conhecidos como os TIMPs e o inibidor do ativador de plasminogênio-1 (PAI-1, do inglês, *plasminogen activator inhibitor 1*) promovem a deposição da membrana basal e as junções são restabelecidas para garantir a distribuição ideal do fluxo. Consequentemente, a angiogênese resulta no aumento do fluxo sanguíneo e da oxigenação do tecido (Carmeliet & Jain, 2011).

II.4. A angiogênese e fisiopatologia do desenvolvimento

A angiogênese é um processo complexo, com muitas etapas e intervenientes. Para manter a homeostase é necessário um equilíbrio de fatores pró-angiogênicos (designadamente, o VEGF, o FGF e a angiopoietina-1) e fatores antiangiogênicos (nomeadamente, a trombospondina-1 e a endostatina) (Logsdon *et al.*, 2014).

No início do desenvolvimento embrionário, o plexo vascular inicial é formado por vasculogênese. A vasculogênese corresponde ao desenvolvimento de vasos de novo através de precursores de células endoteliais, denominados angioblastos. Os angioblastos proliferam e coalescem formando o plexo capilar primário (Papetti & Herman, 2002). Este processo é provavelmente induzido pelo FGF (Felmeden *et al.*, 2003).

Posteriormente ocorre a angiogênese essencial ao crescimento e ao desenvolvimento vascular durante a organogênese (Logsdon *et al.*, 2014; Papetti & Herman, 2002). Pensa-se que o primeiro passo da angiogênese embrionária seja a ativação das células endoteliais do plexo capilar primário. O *sprouting* é iniciado pelos níveis aumentados dos fatores pró-angiogênicos locais (Felmeden *et al.*, 2003). Assim, o crescimento angiogênico adicional implica uma coordenação estreita entre a proliferação celular, a diferenciação, a migração, a adesão à matriz e os processos de sinalização celular (Eelen *et al.*, 2020).

O processo de angiogênese é também importante no indivíduo adulto, na remodelação

da rede vascular (Logsdon *et al.*, 2014; Papetti & Herman, 2002). As células endoteliais habitualmente são quiescentes, e têm uma taxa de renovação reduzida no adulto. Contudo, há processos fisiológicos e patológicos que são exceções e nos quais a angiogénese é essencial (Felmeden *et al.*, 2003).

A angiogénese normal é um processo altamente ordenado e sob forte regulação, pois requer a estimulação das células endoteliais quiescentes em monocamada, para que se dividam e espalhem numa rede vascular, apenas com a extensão exigida pelas necessidades dos tecidos em crescimento (Papetti & Herman, 2002). Esta regulação garante que os tecidos em desenvolvimento ou em cicatrização recebam um suprimento adequado de nutrientes (Papetti & Herman, 2002). Assim, a angiogénese está envolvida em diversos processos fisiológicos, como a reprodução, a adaptação ao exercício físico e a cicatrização de feridas (Bentley & Chakravartula, 2017; Carmeliet & Jain, 2011; Logsdon *et al.*, 2014; Papetti & Herman, 2002).

A angiogénese patológica corresponde ao desenvolvimento aberrante de novos vasos, que podem assumir morfologias tortuosas, bulbosas e pouco ramificadas. Esta é característica de muitas doenças, sendo a mais conhecida o cancro, mas também a retinopatia diabética, a endometriose e doenças inflamatórias, tais como a artrite reumatoide, o lúpus eritematoso sistémico e a psoríase (Bentley & Chakravartula, 2017; Carmeliet & Jain, 2011; Felmeden *et al.*, 2003; Logsdon *et al.*, 2014).

A angiogénese patológica, nomeadamente a tumoral, é um processo muito semelhante à angiogénese normal. As células tumorais são células que perderam a capacidade de regular o seu crescimento e que, portanto, proliferam de forma aberrante. Estas células, altamente ativas do ponto de vista metabólico, necessitam de níveis adequados de oxigénio, pelo que induzem a sua própria perfusão através do desenvolvimento de novos vasos. Além dos mecanismos previamente descritos, para este tipo de angiogénese contribuem os precursores endoteliais existentes em circulação, que são células idênticas ao angioblastos derivadas de medula óssea. Na angiogénese tumoral há menor quantidade de pericitos e os vasos formados são mais finos e tortuosos (Papetti & Herman, 2002).

Por fim, a angiogênese é um processo essencial de recuperação que ocorre em resposta a condições patológicas, nomeadamente as úlceras gastrointestinais, o enfarte agudo do miocárdio, o acidente vascular isquémico e a hipertrofia ventricular esquerda (Felmeden *et al.*, 2003).

Tendo em conta o envolvimento da angiogênese em múltiplos processos patológicos, têm sido investigadas estratégias para modular este processo no tratamento das doenças. A inibição da angiogênese é importante no tratamento antitumoral e anti-inflamatório das doenças autoimunes. Por contraponto, a estimulação da angiogênese pode melhorar algumas condições, como a pré-eclampsia, a doença vascular isquémica, a doença de Crohn e a osteoporose (Felmeden *et al.*, 2003; Logsdon *et al.*, 2014).

II.5. A angiogênese no aparelho reprodutor feminino

Na mulher, a angiogênese é particularmente importante no sistema reprodutor, nomeadamente no desenvolvimento folicular, na formação do corpo amarelo e nas alterações endometriais durante o ciclo menstrual (Felmeden *et al.*, 2003; Rizov *et al.*, 2017; Tahergorabi & Khazaei, 2012).

O ovário é um órgão particular no qual ocorrem alterações contínuas de forma cíclica (Robinson *et al.*, 2009). Apresenta um sistema vascular próprio, no qual são gerados e degenerados vasos, em resposta a modificações fisiológicas. A angiogênese é essencial para o normal processo da foliculogénese, bem como para a esteroidogénese e a maturação ovocitária. Os folículos primordiais e primários não possuem vascularização própria, pelo que são nutridos pelo estroma circundante. A partir dos folículos secundários é já necessário a existência de uma rede capilar, que fornece um suporte vascular próprio (Rizov *et al.*, 2017; Robinson *et al.*, 2009).

O primeiro passo da foliculogénese é o recrutamento dos folículos primordiais mais próximos da medula do ovário. A proximidade com a zona de maior vascularização, com conseqüente maior exposição a nutrientes e a moléculas reguladoras, parece ser

crucial no recrutamento. Posteriormente, verifica-se o crescimento folicular, com a alteração e a divisão das células da granulosa, seguida da diferenciação das células do estroma e o desenvolvimento da teca. O desenvolvimento da teca implica a formação de novos vasos, ou seja, de angiogénese. No folículo antral existem duas redes capilares, uma imediatamente abaixo da membrana basal e outra localizada na teca externa (Rizov *et al.*, 2017; Robinson *et al.*, 2009). A neovascularização é essencial para a seleção e para o crescimento do folículo antral, bem como para o desenvolvimento do folículo pré-ovulatório. Paralelamente com a extensão da rede vascular ocorre o suporte hormonal do folículo. A utilização de substâncias antiangiogénicas reduz a vascularização da teca e, conseqüentemente, compromete gravemente o desenvolvimento folicular (Rizov *et al.*, 2017).

Apesar da informação sobre as vias e as moléculas envolvidas na angiogénese durante a foliculogénese ser escassa, sabe-se que este processo é mediado essencialmente pela expressão de VEGF, nomeadamente do VEGF-A, bem como por outros fatores, como as angiopoietinas, o FGF-2 e o PDGF. O VEGF promove simultaneamente a esteroidogénese (Rizov *et al.*, 2017; Robinson *et al.*, 2009). Um estudo em primatas, mostrou que, além do VEGF-A, o PGF também é necessário para a ovulação, luteinização e para a angiogénese folicular (Bender *et al.*, 2018). A via de sinalização do Notch também está envolvida nestes processos, tendo sido identificada a expressão de Notch-1, Nocth-4 e Jagged-1 (Xie *et al.*, 2017).

A angiogénese também é fundamental na ovulação e no desenvolvimento e função do corpo amarelo. O aumento do fluxo sanguíneo e a vasodilatação são eventos característicos do folículo periovulatório. Os níveis elevados de VEGF-A nas células da granulosa não estimulam a atividade das proteases, mas sim a migração das células endoteliais. Tal facto parece ser explicado pela diferente composição das membranas basais folicular e vascular. A transição do folículo pré-ovulatório para corpo amarelo é um processo dinâmico que envolve uma série de alterações bioquímicas e morfológicas desencadeadas após o pico da hormona luteinizante (LH, do inglês, *luteinizing hormone*). Este pico aumenta a atividade proteolítica, com degradação da membrana basal e libertação de fatores angiogénicos. Nesta fase, há um aumento na expressão do FGF-2, no contexto de níveis já elevados de VEGF-A, que permitem que ocorra

vascularização, de forma intensa, após a ovulação. Foi demonstrada uma regulação positiva do HIF1 α , através da sua estimulação pelo aumento da LH e da gonadotrofina coriônica humana (hCG, do inglês, *human chorionic gonadotropin*) (Rizov *et al.*, 2017; Robinson *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2017).

A angiogênese na fase lútea tem algumas diferenças em relação à angiogênese na fase folicular. Em primeiro lugar, a rotura da membrana basal após a ovulação, ativa a MMP e permite que as células endoteliais e os pericitos migrem e vascularizem as células luteinizadas da granulosa. Além disso, o processo é mais rápido e mais intenso, sendo a maioria das células proliferativas de origem vascular (Robinson *et al.*, 2009). A angiogênese no ovário durante a foliculogênese, a esteroidogênese e na fase lútea está representada na Figura 4.

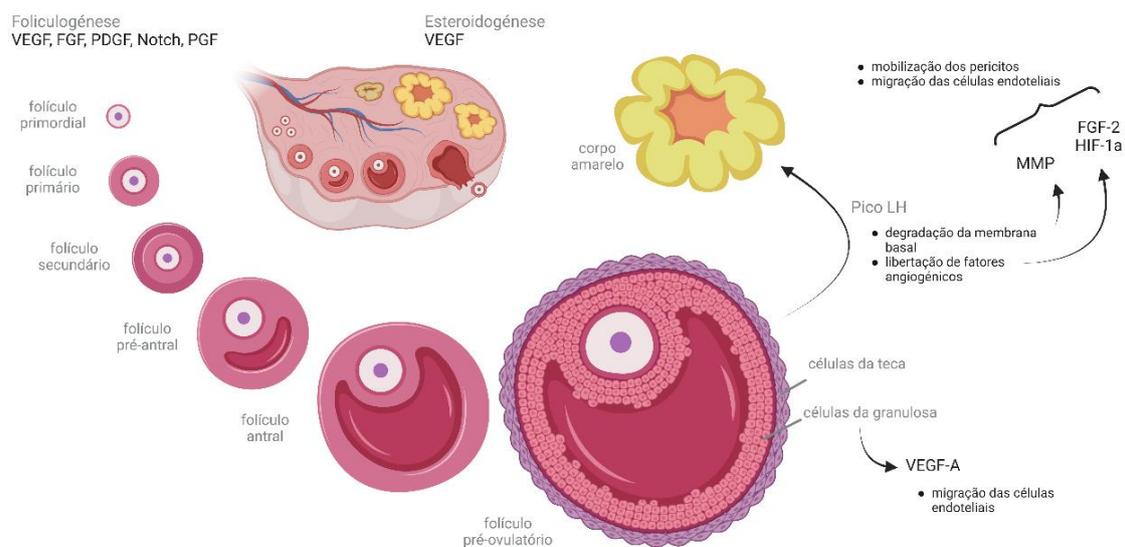


Figura 4. A angiogênese durante a foliculogênese, esteroidogênese e na fase lútea. *Created with BioRender.com*

Durante o ciclo menstrual ocorrem alterações endometriais, nas quais a angiogênese tem um papel fundamental. Na fase secretora tardia, após a ovulação, as células do estroma endometrial modificam-se, adquirindo propriedades bioquímicas e celulares únicas que lhes permitem suportar a implantação do embrião. Este processo designa-

se por decidualização e nele ocorre diferenciação e remodelação tecidual. A decidualização é acompanhada pela criação de uma extensa rede de vasos no leito estromal que suporta o crescimento do embrião e do trofoblasto. A conexina (Cx) 43 é uma proteína das *gap junctions* que aumenta em resposta ao estrogênio pelas células do estroma endometrial que circundam o embrião implantado na fase inicial da gravidez. A expressão de Cx43 afeta a expressão genética das células estromais recetoras, alterando sua capacidade de produzir VEGF, angiopoietina-1, angiopoietina-2 e, possivelmente, outros fatores angiogênicos parácrinos. O VEGF influencia a proliferação e a função das células endoteliais uterinas (Rizov *et al.*, 2017).

A hCG além de ser uma hormona fundamental na primeira fase da gravidez, tem um papel importante na angiogênese. As células endoteliais vasculares uterinas expressam recetores para a hCG, podendo esta ter efeito direto induzindo o *sprouting*. Esta hormona atua ainda nas células epiteliais endometriais e/ou diretamente no trofoblasto, induzindo a expressão de VEGF (Rizov *et al.*, 2017).

Por último, a síndrome de hiperestimulação ovárica é uma condição associada a um largo espectro de manifestações clínicas, cuja gravidade se correlaciona com os níveis de VEGF e do seu recetor. As mulheres grávidas com síndrome de hiperestimulação ovárica devem ser monitorizadas de forma mais rigorosa, devido ao risco aumentado de deterioração da sua condição clínica devido ao rápido aumento das concentrações séricas de hCG (Rizov *et al.*, 2017).

O conhecimento dos mecanismos subjacentes aos processos fisiológicos do ciclo menstrual, da fertilidade e da reprodução humana, permite delinear estratégias terapêuticas para doenças relacionadas com o sistema reprodutor feminino ou com a infertilidade. Nesta perspetiva, têm sido realizados estudos sobre a associação de polimorfismos no gene do *VEGF* com a endometriose, as falhas recorrentes de implantação e o aborto espontâneo após reprodução assistida (Rizov *et al.*, 2017). Na síndrome do ovário poliquístico, há uma maior densidade vascular das células da teca e do estroma, devido aos níveis mais elevados de múltiplos fatores pró-angiogênicos (VEGF, PDGF, FGF, PGF, TGF- β). Assim, o seu tratamento cirúrgico, através da punção do ovário com LASER (do inglês, *light amplification by stimulated emission of*

radiation) ou energia diatérmica (*drilling*), causa a rotura desta vascularização, levando a atresia folicular e subsequente melhoria da função ovárica. (Xie *et al.*, 2017).

II.6. Tratamentos pró-angiogénicos

A abordagem terapêutica com intervenção na angiogénese tem sido estudada principalmente no sentido da sua inibição, nomeadamente na vertente da patologia oncológica e na degenerescência macular associada à idade (Gabhann *et al.*, 2010). Em contraste com as terapêuticas antiangiogénicas, as abordagens para promover a angiogénese estão numa fase inicial da sua investigação. Contudo, o tratamento pró-angiogénico pode ser efetuado com a intervenção de diversos fatores, como o VEGF, o PDGF, o FGF, o TGF, o HIF, entre outros (Tabela 2) (Logsdon *et al.*, 2014). As diferenças inter-individuais, decorrentes de polimorfismos genéticos, doenças concomitantes, exposição ambiental ou dieta, tornam muito complexo o desenvolvimento de estratégias terapêuticas universais (Gabhann *et al.*, 2010).

Tabela 2. Ativadores do processo de angiogénese (adaptado de (Kopec & Abramczyk, 2022) e (Rust *et al.*, 2019))

Função	Moléculas
Aumento da permeabilidade vascular	VEGF
Degradação da matriz extracelular	VEGF, uPA, tPA, MMPs
Proliferação e migração das células endoteliais	VEGF, FGF, HGF, IGF, PDGF
Formação do tubo	VEGF, angiopoietinas, TGF- α , EGF, angiogenina

VEGF, fator de crescimento endotelial vascular; uPA, ativador do plasminogénio do tipo uroquinase (do inglês, *urokinase-type plasminogen activator*); tPA, ativador do plasminogénio tecidual (do inglês, *tissue plasminogen activator*); MMP, metaloproteinases da matriz; FGF, fator de crescimento de fibroblastos; HGF, fator de crescimento de hepatócitos; IGF, fator de crescimento semelhante à insulina; PDGF, fator de crescimento derivado de plaquetas; TGF, fator de crescimento transformador; EGF, fator de crescimento epidérmico.

As opções terapêuticas já estudadas para a angiogénese são diversas e podem envolver múltiplos elementos, designadamente os fatores de crescimento e seus recetores, os

microRNAs (miRNAs), a terapia celular, entre outros (Rust *et al.*, 2019).

A maioria dos ensaios clínicos terapêuticos focam-se na inibição ou na estimulação de componentes isolados, sendo o VEGF o mais estudado. Os anticorpos anti-VEGF são amplamente usados em tratamentos oncológicos e na retinopatia diabética. O primeiro fármaco foi estudado em 1997 e aprovado em 2004, é um anticorpo monoclonal humanizado anti-VEGF, o bevacizumab, com aplicação no cancro do cólon (Rust *et al.*, 2019). O efeito neuroprotetor e pró-angiogénico do VEGF torna-o um candidato ideal para o tratamento do acidente vascular cerebral (Chen *et al.*, 2021). Os estudos em modelo animal com a administração de fatores pró-angiogénicos no sistema nervoso central mostraram uma diminuição dos défices neurológicos e um aumento da densidade vascular. Porém, a sua eficácia foi comprometida pelo facto de aumentarem a permeabilidade vascular e da barreira hematoencefálica com consequente edema cerebral (Chen *et al.*, 2021; Rust *et al.*, 2019). Os ensaios clínicos com utilização de VEGF na doença arterial coronária e na doença arterial periférica ainda não produziram um medicamento que possa ser aprovado. Nestes estudos foi realizada a administração local (intramuscular ou intracoronária) ou sistémica (endovenosa) de isoformas de VEGF-A (Gabhann *et al.*, 2010).

O principal obstáculo ao sucesso terapêutico do VEGF, administrado sob a forma de proteína recombinante, é o seu perfil farmacocinético desfavorável, devido à semi-vida curta, necessitando de múltiplas administrações para obter estímulo pró-angiogénico suficiente no tecido alvo. Assim, têm sido desenhadas estratégias para promover a libertação do VEGF com recurso a vetores ou mesmo a matrizes, bem como o desenvolvimento de peptídeos bioidênticos ou até a modificação genética (De Rosa *et al.*, 2018; Idrisova *et al.*, 2022).

Outras estratégias com intervenção em múltiplos fatores, como FGF, protéases, integrinas, PGF, recetores do VEGF e na via de sinalização da Dll4-Notch também têm sido estudadas com resultados semelhantes (Gabhann *et al.*, 2010).

Os HIFs têm um papel bem definido na estimulação da angiogénese, pelo que têm sido propostos inúmeros métodos para intervir na sua regulação. A regulação positiva do

HIF, com consequente aumento da produção de VEGF, tem sido investigada com a modulação de cofatores de hidroxilação, bem como com vetores de transporte (Gabhann *et al.*, 2010).

O insucesso da terapêutica com moléculas isoladas pode ser explicado pela complexidade da angiogénese, um mecanismo fisiológico multicelular, com múltiplas famílias de citocinas envolvidas. Neste sentido, parece ser necessária uma abordagem mais diferenciada e multifatorial.

Os miRNAs relacionados com a angiogénese podem ser divididos em pró e antiangiogénicos. Como estratégia terapêutica, os miRNAs têm um enorme potencial, quer com recurso a administração exógena, quer através de modulação da expressão endógena (Rust *et al.*, 2019).

A terapêutica genética também tem sido amplamente estudada. A administração de cDNA de fator de crescimento de hepatócitos (HGF, do inglês, *hepatocyte growth factor*) e de VEGF165 humanos é um método seguro e eficaz de tratamento de doentes com isquemia crítica dos membros inferiores e diabetes mellitus (Barc *et al.*, 2021).

A terapia celular é uma abordagem emergente e alternativa para regular a angiogénese, através da substituição de células ou da melhoria dos sistemas de reparação celular. O transplante de células pode fornecer suporte trófico ou substituir a função de células vasculares ausentes na área danificada. A substituição das células tem o potencial de mitigar as consequências da doença e de facilitar a regeneração e função dos órgãos, mesmo em estádios avançado da doença. As células progenitoras endoteliais são a estratégia mais promissora para a produção de neovascularização em locais de isquemia. Existem vários ensaios clínicos em curso com a utilização da terapia celular com transplante de células em situações de isquemia, nomeadamente miocárdica e cerebral (Rust *et al.*, 2019).

O plasma enriquecido em plaquetas (PRP, do inglês, *platelet-rich plasma*) tem propriedades pró-angiogénicas e facilita a regeneração dos tecidos. Este consiste numa fração autóloga do sangue total que possui uma grande concentração de uma variedade de fatores de crescimento, nomeadamente de VEGF, de FGF, de TGF- β , de PDGF, de

HGF, de fator de crescimento epidérmico (EGF, do inglês, *epidermal growth factor*) e de fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1, do inglês, *insulin-like growth factor 1*). Na última década, o PRP tem sido aplicado em terapias plásticas, cirurgia periodontal e na correção de defeitos intra-ósseos. O seu perfil de segurança tem também sido estudado em doentes com angina grave e isquemia dos membros inferiores. No entanto, o PRP é um produto biológico muito complexo com uma variedade de biomoléculas ativas, cujas funções ainda não foram totalmente esclarecidas (Goshchynsky *et al.*, 2020; Imam *et al.*, 2022).

A administração local não de células, mas sim do seu secretoma também está a ser estudada, nomeadamente com a utilização de vesículas extracelulares. Os componentes das vesículas extracelulares não estão totalmente caracterizados, mas sabe-se que transportam proteínas, ácidos nucleicos e lípidos. As vesículas derivadas de células progenitoras endoteliais melhoram o comportamento angiogénico das células endoteliais, alterando a expressão de moduladores de angiogénese como o FGF-1, o VEGFR-2, a angiopoietina-1 e o eNOS. Os estudos em modelos animais e pré-clínicos têm-se revelado promissores na isquemia miocárdica e está em curso um ensaio clínico em doentes com acidente vascular cerebral isquémico agudo (Eelen *et al.*, 2020).

Têm sido desenvolvidas outras estratégias como a inibição de fatores antiangiogénicos. Por exemplo, a inibição de uma isoforma antiangiogénica específica do VEGF-A no músculo isquémico promove a recuperação da perfusão na doença arterial periférica (Ganta & Annex, 2021).

Em suma, as terapêuticas pró-angiogénicas têm sido propostas pela sua potencial eficácia na abordagem de diversas condições, nomeadamente na doença arterial coronária ou periférica, associada à vascularização insuficiente e isquemia, podendo condicionar a falência do órgão e/ou tecido. Em doenças neurológicas degenerativas, como a esclerose lateral amiotrófica, a doença de Alzheimer, a doença de Huntington, a doença de Parkinson e a epilepsia, a terapêutica pró-angiogénica tem um efeito neuroprotetor e neuroregenerativo. Por fim, estas estratégias também têm sido aplicadas na cicatrização de feridas em medicina regenerativa e em engenharia de tecidos (De Rosa *et al.*, 2018; Idrisova *et al.*, 2022).

CAPÍTULO III. Estimulação da angiogénese no tecido
ovário

A criopreservação de tecido ovárico, enquanto técnica de preservação da fertilidade, implica o autotransplante do tecido. Ao contrário do transplante de grandes órgãos, onde a reperfusão é obtida imediatamente pela anastomose vascular, o transplante de tecido ovárico é dependente do crescimento de novos vasos, ou seja, da neoangiogênese. Durante este período, verifica-se isquemia e perda de folículos que compromete o sucesso e a longevidade do transplante (Donnez *et al.*, 2013; L. Wang *et al.*, 2013). Assim, têm sido estudadas diversas estratégias para melhorar a angiogênese, diminuindo o período de isquemia-reperfusão.

Após o transplante do tecido criopreservado, há um período de hipoxia devido à revascularização progressiva e reposição gradual de oxigênio, que dura em média sete dias (Cacciottola *et al.*, 2021; S. Lee, Ozkavukcu, *et al.*, 2021; L. Wang *et al.*, 2013). Os estudos em modelos animais mostraram que a perfusão inicial do enxerto de tecido ovárico se verifica no terceiro dia após transplante (L. Wang *et al.*, 2013). No início do período pós-transplante, os tecidos dependem predominantemente do metabolismo anaeróbico; a transição para o metabolismo aeróbico ocorre quando a oxigenação é possível pela neovascularização (S. Lee, Ozkavukcu, *et al.*, 2021). A resposta pró-angiogénica à hipoxia é mediada maioritariamente pelo VEGF (Cacciottola *et al.*, 2021). Este fator também está implicado na transição dos folículos primordiais para secundários, como demonstrado num estudo *in vitro* com tecido ovárico de bovino mantido em cultura durante 10 dias (M. Y. Yang & Fortune, 2007).

A estimulação da angiogénese no tecido ovárico tem sido estudada com a utilização do VEGF, de outros fatores de crescimento, de hormonas e de agentes antioxidantes. Estas estratégias têm sido propostas para o tratamento dos fragmentos de córtex de tecido ovárico antes da realização do transplante, através da sua administração em cultura ou inclusão num *scaffold*, ou mesmo após o transplante, com administração sistémica.

III.1. Fatores de crescimento

O VEGF tem um efeito demonstrado no recrutamento de vasos sanguíneos funcionais

(M. M. Fransolet *et al.*, 2015; Henry *et al.*, 2015; Labied *et al.*, 2013; Shikanov *et al.*, 2011; Souza *et al.*, 2021).

O efeito do VEGF-168 foi avaliado no transplante de tecido ovárico encapsulado em hidrogel de fibrina modificado com peptídeo de ligação à heparina. O grupo submetido ao tratamento apresentou maior sobrevivência dos folículos primordiais e um aumento no número de vasos (Shikanov *et al.*, 2011).

As isoformas VEGF-111 e VEGF-165 também aumentaram a densidade vascular do enxerto de tecido ovárico. O efeito destes fatores foi estudado com a sua administração numa matriz de colagénio em conjunto com tecido de ovário de ovelha previamente submetido a criopreservação lenta e descongelação. Posteriormente, foi realizado o transplante ortotópico em murganho do ovário englobado na matriz (M. M. Fransolet *et al.*, 2015; Labied *et al.*, 2013).

Apenas um estudo não mostrou benefício do tratamento com este fator de crescimento. Neste caso, VEGF de roedor foi adicionado em cultura durante 24 horas e posteriormente foi realizado o transplante heterotópico de tecido ovárico de bovino no retroperitoneu de murganho. A densidade vascular foi semelhante entre grupos tendo-se verificado uma diminuição significativa em relação ao tecido antes do transplante. Tal facto, pode ser explicado pela reduzida concentração de VEGF utilizada (5 ng/mL) (Langbeen *et al.*, 2016).

Como alternativa, o VEGF pode ser incluído no meio de descongelação com efeitos benéficos na melhoria da densidade vascular do enxerto (Souza *et al.*, 2021).

O bFGF (FGF básico ou FGF-2) em alta concentração é outra estratégia que pode ser utilizada para melhorar o desenvolvimento folicular e a revascularização do tecido ovárico (J.-M. Gao *et al.*, 2013; Tanaka *et al.*, 2018). Este resultado foi constatado com a administração de várias concentrações de bFGF num hidrogel de fibrina no qual foi encapsulado o tecido ovárico de murganho fresco e posteriormente autotransplantado durante 7 dias (J.-M. Gao *et al.*, 2013). O mesmo foi conseguido com a administração num hidrogel de gelatina ácida biodegradável e posterior transplante heterotópico a nível subcutâneo em murganho durante 6 semanas (Tanaka *et al.*, 2018).

A associação do FGF com o VEGF mostrou ser mais interessante, pois melhora a sobrevivência dos folículos primordiais e a angiogênese e diminui a apoptose dos folículos e das células do estroma, face ao tratamento com cada fator isoladamente (J. Gao *et al.*, 2015; L. Wang *et al.*, 2013; C.-H. Zhang *et al.*, 2016).

Esta associação foi estudada com a administração numa matriz de colagénio com tecido ovárico de murganho fresco alotransplantado em localização subcutânea. Além da melhoria da angiogênese, verificou-se que o grupo tratado com a associação teve um número significativamente superior de folículos primordiais e secundários, menos células em apoptose e uma restituição mais precoce da função endócrina, comparativamente com o controlo e com a utilização dos fatores isoladamente (J. Gao *et al.*, 2015).

O tratamento com FGF-2 e VEGF também foi estudado por adição ao meio de cultura 15 minutos antes do autotransplante heterotópico de tecido ovário de murganho, previamente vitrificado. Além do aumento no número de vasos, também se verificou uma maior sobrevivência dos enxertos e maior número de folículos. Do ponto de vista reprodutivo, constatou-se melhor qualidade ovocitária e maior proporção de desenvolvimento até ao estágio de blastocisto, no grupo tratado com a associação em comparação com o controlo. Contudo, não houve diferenças na expressão de proteínas relacionadas com a angiogênese nem na taxa de fertilização (S. H. Li *et al.*, 2016).

A administração de bFGF, isoladamente ou em combinação com VEGF, melhorou a qualidade do enxerto de tecido ovárico humano, embora o VEGF, independentemente das diferentes concentrações, não tenha influenciado o efeito do bFGF. O tecido ovárico humano, previamente vitrificado e descongelado, foi cultivado durante 48 horas com VEGF e bFGF, isoladamente ou em associação. Posteriormente foi realizado o xenotransplante heterotópico em murganho e este foi recuperado após 7 dias. A análise do tecido mostrou um aumento da densidade vascular em todos os grupos de tratamento (bFGF isolado ou em associação com VEGF em diferentes concentrações) comparativamente com o controlo. Adicionalmente, verificou-se um aumento na proliferação e no número de folículos e uma diminuição na apoptose (Kang *et al.*, 2016).

Em oposição, um estudo reportou ausência de benefício na associação de VEGF com bFGF. Neste estudo foram comparados três grupos: tecido ovárico transplantado sem tratamento e tecido ovárico tratado com ácido hialurônico com e sem VEGF e bFGF. No desenho experimental foi utilizado o modelo de rato com o tratamento aplicado numa matriz com hidrogel de ácido hialurônico seguido de autotransplante heterotópico do tecido fresco, com subsequente análise do tecido após um ciclo *estrus* (Tavana *et al.*, 2016). A ausência de diferenças entre grupos neste estudo pode ser justificada pela menor concentração dos fatores de crescimento, menor duração do transplante e pela utilização da matriz de ácido hialurônico.

O tratamento após o transplante com VEGF e FGF, isoladamente ou em associação, demonstrou induzir aumento da densidade vascular em todos os grupos de tratamento, com menores níveis de apoptose e de fibrose no grupo sujeito à associação dos dois fatores de crescimento. Neste estudo, o xenotransplante do tecido ovárico humano fresco foi realizado no músculo de coelhos e o tratamento foi realizado através de administrações subcutâneas de bFGF e de VEGF isoladamente ou em associação (L. Wang *et al.*, 2013).

A administração subcutânea de angiopoietina-2, isoladamente ou em associação com o VEGF, após o transplante, também melhorou a vascularização do enxerto (Kong *et al.*, 2017; Youm *et al.*, 2016). A administração isolada de angiopoietina-2, no dia anterior ao autotransplante heterotópico de tecido ovárico de murganho previamente vitrificado, condicionou um aumento no número de vasos e na proporção de folículos intactos (Youm *et al.*, 2016). A associação de angiopoietina-2 com VEGF-164 através da injeção intraperitoneal, no dia anterior ao transplante heterotópico em murganho de tecido de bovino previamente vitrificado, mostrou um aumento da densidade vascular, o que resultou na manutenção da integridade e da densidade foliculares, e na redução da apoptose folicular e da fibrose do tecido (Kong *et al.*, 2017).

A Tabela 3 resume os estudos descritos com a utilização de fatores de crescimento para promover a angiogênese do tecido ovárico.

Tabela 3. Utilização de fatores de crescimento para estimular a angiogênese do tecido ovárico.

	Fator	Espécie dadora	Espécie recetora	Local do transplante	Tecido ovárico	Via de administração	Time-points	Efeito	Efeito na angiogênese	Referência
Pré-transplante	VEGF-168 (74 µg/mL)	Murganho	Murganho (autotx)	Ortotópico	TOC VT	Hidrogel de fibrina modificado	2 ciclos estrus	↑	Aumento no número de vasos (CD31+, IHQ).	(Shikanov <i>et al.</i> , 2011)
	VEGF-111 (500 µg /L)	Ovino	Murganho	Ortotópico	TOC CPL	Matriz de colagénio	3 e 21 dias	↑	Aumento da rede vascular funcional (αSMA+, IHQ) (dia 3); Aumento da densidade vascular (CD31+, IHQ) (dia 21).	(Labied <i>et al.</i> , 2013)
	VEGF-111 (100 nmol/L)	Ovino	Murganho	Ortotópico	TOC CPL	Matriz de colagénio	3 e 21 dias	↑	Aumento da densidade vascular (FITC-dextrano, IHQ).	(M. M. Fransolet <i>et al.</i> , 2015)
	VEGF-165 (50 nmol/L)	Ovino	Murganho	Ortotópico	TOC CPL	Matriz de colagénio tipo I	3 e 21 dias	↑	Aumento da rede vascular funcional (αSMA+, IHQ) (dia 3); Aumento da densidade vascular (CD31+, IHQ) (dia 21).	(Henry <i>et al.</i> , 2015)
	VEGF de roedor (5 ng/mL)	Bovino	Murganho	Heterotópico (retroperitoneu)	TOF	Meio de cultura (24 horas)	14 e 28 dias	=	Sem diferenças na densidade vascular (vWF+, IHQ).	(Langbeen <i>et al.</i> , 2016)
	VEGF (50 ng/mL)	Equino	Murganho	Heterotópico (peritoneu parietal)	TOC CPL	Meio de descongelção	7 dias	↑	Aumento da densidade vascular (CD31+ e αSMA+, IHQ).	(Souza <i>et al.</i> , 2021)
	bFGF (75, 100 e 150 µg/mL)	Murganho	Murganho (autotx)	Heterotópico (subcutâneo)	TOF	Hidrogel de fibrina	7 dias	↑	Aumento no número de vasos (CD31+, IHQ).	(J.-M. Gao <i>et al.</i> , 2013)
	bFGF (1 mg/mL)	Humano	Murganho	Heterotópico (subcutâneo)	TOC CPL	Hidrogel de gelatina ácida biodegradável	6 semanas	↑	Aumento da densidade vascular (CD31+, IHQ).	(Tanaka <i>et al.</i> , 2018)
	bFGF (100 µg/mL) e VEGF (75 µg/mL)	Murganho	Murganho (alotx)	Heterotópico (subcutâneo)	TOF	Matriz de colagénio	7 e 21 dias	↑	Aumento da densidade vascular (CD31+, IHQ) (dia 21).	(J. Gao <i>et al.</i> , 2015)

ESTIMULAÇÃO DA ANGIOGÊNESE DO TECIDO OVÁRIO

	bFGF (9 µg/mL) e VEGF (2 µg/mL)	Murganho	Murganho (autotx)	Heterotópico (subcutâneo)	TOC VT	Meio de cultura (15 min)	7, 14 e 21 dias	= ↑	Nenhuma diferença na expressão proteínas relacionadas com a angiogênese (ELISA); Aumento no número de vasos (vWF+, IHQ)	(S. H. Li <i>et al.</i> , 2016)
	bFGF (150 ng/mL) e VEGF (25, 50, 75, 100 ng/mL)	Humano	Murganho	Heterotópico (subcutâneo)	TOC VT	Meio de cultura (48 horas)	7 dias	↑	Aumento da densidade vascular (CD34+, IHQ)	(Kang <i>et al.</i> , 2016)
	bFGF (2 µg/mL) e VEGF-165 (2 µg/mL)	Rato	Rato (autotx)	Heterotópico (intramuscular)	TOF	Hidrogel de ácido hialurônico	1 ciclo <i>estrus</i>	= ↓	Nenhuma diferença na expressão dos genes VEGF e CD31 (RT- PCR); Diminuição na expressão do gene CD34 (RT-PCR).	(Tavana <i>et al.</i> , 2016)
Pós-transplante	VEGF (50 ng/mL) e bFGF (100 ng/mL)	Humano	Coelho	Heterotópico (intramuscular)	TOF	Subcutânea (dia 7)	6 semanas	↑	Aumento da densidade vascular (CD31+, IHQ)	(L. Wang <i>et al.</i> , 2013)
	Angiopietina-2 (50 e 500 ng/kg)	Murganho	Murganho (autotx)	Heterotópico (cápsula renal)	TOC VT	Intraperitoneal (dia -1)	2, 7, 21 e 42 dias	↑	Aumento no número de vasos (CD31+, IHQ)	(Youm <i>et al.</i> , 2016)
	Angiopietina-2 (500 ng/kg) e VEGF-164 (200 ng/kg)	Bovino	Murganho	Heterotópico (subcutâneo)	TOC VT	Intraperitoneal (dia -1)	7 e 28 dias	↑	Aumento da densidade vascular (CD31+, IHQ) (dia 7)	(Kong <i>et al.</i> , 2017)

Alotx - alotransplante; Autotx - autotransplante; CPL - criopreservação lenta; FGF - fator de crescimento de fibroblastos; FITC - isotiocianato de fluoresceína; IHQ - imunohistoquímica; RT-PCR - real-time PCR; TOC - tecido ovário criopreservado; TOF - tecido ovário fresco; VEGF - fator de crescimento endotelial vascular; VT - vitrificação; vWF - fator de von Willebrand; αSMA - actina do músculo liso; ↑ - aumento; ↓ - diminuição; = - sem efeito.

III.2. Modulação através de hormonas

A expressão do gene do VEGF é modulada por hormonas, nomeadamente a FSH, a LH e a hCG, entre outras (Takae & Suzuki, 2019). A eficácia do tratamento com gonadotrofinas continua a ser uma questão controversa (de Macêdo *et al.*, 2018; H. Yang *et al.*, 2008; Y. Yang *et al.*, 2015; Zheng *et al.*, 2020). O efeito do tratamento hormonal na criopreservação e transplante de tecido ovário tem sido alvo de investigação e está resumido na Tabela 4.

A adição de FSH à solução de vitrificação aumentou a expressão do gene VEGF e do seu recetor VEGFR-2. Estes resultados foram obtidos num estudo em murganho com o alotransplante de tecido ovárico e a sua avaliação dois dias depois (Y. Yang *et al.*, 2015). A administração intraperitoneal de gonadotrofina sérica da égua prenhe não alterou a expressão de VEGF, nem a massa do ovário ou a proporção dos folículos (H. Yang *et al.*, 2008). Contudo, a administração intraperitoneal de gonadotrofinas coriônicas equinas, melhorou a vascularização no enxerto com aumento da superfície e densidade vascular (de Macêdo *et al.*, 2018).

A utilização de LH isoladamente promoveu a sobrevivência do tecido ovárico no processo de criopreservação e transplante. Estes resultados foram obtidos com a administração de LH em cultura uma hora antes congelação, no meio de congelação e novamente em cultura uma hora após a descongelação. Após este período, o tecido foi avaliado e procedeu-se ao transplante para avaliação da função endócrina e da fertilidade. Verificou-se que a LH aumentou a proporção de folículos viáveis, aumentou a expressão de VEGF, de Cx37 e de Cx43 em ovários vitrificados e diminuiu o tempo até à recuperação da função endócrina (Zheng *et al.*, 2020).

A menotropina, também conhecida como gonadotrofina menopáusica humana (hMG, do inglês, *human menopausal gonadotropin*), contém LH e FSH (1:1). A exposição *in vitro* do tecido ovárico de murganho à hMG, seguida do autotransplante a fresco, mostrou melhorar a angiogénese e o tempo de reperfusão, reduzindo-o para 24 horas, deste modo, melhorando a sobrevivência dos folículos (Y. Y. Wang *et al.*, 2012).

ESTIMULAÇÃO DA ANGIOGÊNESE DO TECIDO OVÁRICO

Tabela 4. Estimulação hormonal da angiogênese do tecido ovárico.

	Fator	Espécie dadora	Espécie recetora	Local do transplante	Tecido Ovárico	Via de administração	Time-points	Efeito	Efeito na angiogênese	Referência
Pré-transplante	hMG (0,15, 0,30 e 0,60 UI/mL)	Murganho	Murganho (autotx)	Heterotópico (cápsula renal)	TOF	Meio de cultura (3 horas)	1, 2 e 28 dias	↑	Aumento na expressão da proteína VEGF em cultura de tecidos antes do enxerto com 0,60 UI/mL de hMG (IHQ).	(Y. Wang <i>et al.</i> , 2012)
	FSH (0,3 UI/mL)	Murganho	Murganho (alotx)	Orto- e heterotópico (cápsula renal)	TOC VT	Solução de vitrificação	2 dias	↑	Aumento na expressão do gene VEGF e VEGFR-2 (RT-PCR).	(Y. Yang <i>et al.</i> , 2015)
Pós-transplante	PMSG (10 mUI)	Rato	Rato (autotx)	Heterotópico (subcutâneo)	TOC CPL	Intraperitoneal (a cada 2 dias)	2, 7 e 30 dias	=	Sem diferenças na expressão de VEGF (WB, RT-PCR, IHQ).	(H. Yang <i>et al.</i> , 2008)
	eCG (10 UI)	Gato	Murganho	Heterotópico (cápsula renal)	TOF	Intraperitoneal (dia 45)	47 dias	↑	Aumento da densidade vascular (HE).	(de Macêdo <i>et al.</i> , 2018)
	AMH recombinante (1,23 µg)	Humano	Murganho	Heterotópico (subcutâneo)	TOC VT	Bomba osmótica intraperitoneal (dia -7 a 7)	7 dias	=	Sem diferenças na expressão do gene VEGF (RT-PCR).	(Detti <i>et al.</i> , 2018)
	EPO (5000 UI/kg)	Rato	Rato (autotx)	Heterotópico (subcutâneo)	TOF	Local do transplante (dia 0 e 28)	8 semanas	↓	Diminuição da expressão da proteína VEGF (ELISA).	(Kolusari <i>et al.</i> , 2018)

Alotx - alotransplante; AMH - hormona anti-Mülleriana; Autotx - autotransplante; CPL - criopreservação lenta; eCG - gonadotrofinas coriônicas equinas; EPO - eritropoietina; FITC - isotiocianato de fluoresceína; FSH - hormona folículo-estimulante; HE - Hematoxilina-Eosina; hMG - menopina; IF - imunofluorescência; IHQ - imunohistoquímica; LH - hormona luteinizante; PMSG - gonadotrofina sérica da égua prenhe; RT-PCR - real-time PCR; TOC - tecido ovárico criopreservado; TOF - tecido ovárico fresco; VEGF - fator de crescimento endotelial vascular; VT - vitrificação; WB - Western-blot; ↑ - aumento; ↓ - diminuição; = - sem efeito.

A hormona anti-Mülleriana recombinante, administrada no período peri-transplante, não protegeu da depleção folicular inicial nem alterou a expressão do gene VEGF, mas reduziu a apoptose e a ativação celular. Esta estratégia foi investigada com tecido ovárico humano vitrificado e, posteriormente, descongelado e xenotransplantado em murganho (Detti *et al.*, 2018).

A eritropoietina é uma hormona glicoproteica que regula a eritropoiese. Trata-se um fator de crescimento pleiotrópico que estimula o crescimento das células endoteliais, tendo um efeito pro-angiogénico em vários tecidos e tumores (Kimáková *et al.*, 2017). O efeito da eritropoietina foi estudado no enxerto de tecido ovárico após o transplante. Neste estudo foram utilizados murganhos, submetidos a ovariectomia e posterior autotransplante heterotópico do tecido ovárico fresco, com administração intraperitoneal de eritropoietina. Verificou-se uma melhoria da sobrevivência folicular e da função do enxerto 28 dias após o transplante. Contudo, não foi realizada nenhuma avaliação da angiogénese (Mahmoodi *et al.*, 2014).

A mesma estratégia foi investigada em modelo de rato e com a administração local de uma concentração superior de eritropoietina no dia do transplante e quatro semanas depois. A avaliação do tecido, oito semanas depois do transplante mostrou uma diminuição da expressão de VEGF (Kolusari *et al.*, 2018). Em ambos os estudos, verificou-se uma melhoria da sobrevivência folicular, provavelmente pela redução da lesão isquémica, na sequência da melhor angiogénese e de efeito antioxidante (Kimáková *et al.*, 2017; Kolusari *et al.*, 2018).

III.3. Agentes antioxidantes

O papel dos agentes antioxidantes para estimular a angiogénese do tecido ovárico também tem sido investigado, com vista a diminuir o stresse oxidativo após a reperfusão tecidual (Tabela 5) (Cacciottola *et al.*, 2021).

A N-acetilcisteína é um antioxidante e precursor da glutatona, utilizado como agente

mucolítico e também como tratamento para a sobredosagem de paracetamol. Os estudos experimentais revelaram efeitos protetores da N-acetilcisteína em lesões de isquemia/reperfusão de vários órgãos, através da inibição da apoptose e da promoção da sobrevivência celular. Em enxertos de tecido ovárico foi demonstrado um efeito benéfico na sobrevivência folicular, com diminuição do stresse oxidativo e da apoptose (Cacciottola *et al.*, 2021; Daneshpoya *et al.*, 2017).

Num estudo com autotransplante heterotópico de tecido ovárico fresco de rato, a administração intraperitoneal de N-acetilcisteína condicionou um aumento da densidade vascular no tecido avaliado 28 dias após o transplante (Daneshpoya *et al.*, 2017). O oposto foi constatado por outro grupo de investigadores, com a diminuição da densidade vascular após 29 dias de transplante, porém com efeito antioxidante, anti-inflamatório e antiapoptótico. Neste último estudo, foi utilizada a mesma concentração e via de administração da N-acetilcisteína, porém foi utilizado tecido previamente criopreservado e foi realizado o xenotransplante em murganho (Olesen *et al.*, 2021).

A benfotiamina é a forma lipossolúvel da vitamina B1. Esta vitamina estimula as defesas antioxidantes por meio da ativação da transcetólase e protege as células vasculares do stresse oxidativo e da apoptose. Num estudo com autotransplante ortotópico de tecido ovárico fresco de rato, durante 21 dias, observou-se uma diminuição na expressão de VEGF com o tratamento peritransplante com N-acetilcisteína e benfotiamina. Apesar deste efeito, houve uma melhoria do enxerto, com um aumento do número de folículos primordiais e da proliferação do tecido, paralelamente com uma diminuição da apoptose, da fibrose e da necrose (Tuncer *et al.*, 2018).

A vitamina E também foi estudada neste contexto com melhoria da sobrevivência do tecido ovárico, porém sem repercussões na densidade vascular (Nugent *et al.*, 1998; Scalercio *et al.*, 2015; Takae & Suzuki, 2019).

Tabela 5. Utilização de agentes antioxidantes para estimular a angiogênese do tecido ovárico.

	Fator	Espécie dadora	Espécie recetora	Local do transplante	Tecido Ovárico	Via de administração	Time-points	Efeito	Efeito na angiogênese	Referência
Pré-transplante	Vitamina E (50 µmol/L)	Macaco	Macaco (autotx)	Heterotópico (subcutâneo)	TOF	Meio de cultura	7 dias	=	Sem diferença na densidade vascular (CD31+, IHQ).	(Scalercio <i>et al.</i> , 2015)
Pós-transplante	NAC (150 mg/kg)	Rato	Rato (autotx)	Heterotópico (intramuscular ou em tecido de granulação cicatrizante)	TOF	Intraperitoneal (dia -2 a 7)	28 dias	↑	Aumento da densidade vascular (HE) .	(Daneshpoya <i>et al.</i> , 2017)
	NAC (150 mg/kg)	Humano	Murganho	Heterotópico (subcutâneo)	TOC CPL	Intraperitoneal (dia 0 a 7)	7 e 29 dias	= ↓	Sem diferenças na expressão do gene VEGF ou Angiopoietina-4 (dia 7) (RT-PCR); Diminuição da densidade vascular (dia 29) (CD31+, IHQ).	(Olesen <i>et al.</i> , 2021)
	NAC (150 mg/kg)	Rato	Rato (autotx)	Ortotópico	TOF	Intraperitoneal (dia -1 a 21)	21 dias	↓	Diminuição da expressão de VEGF (IHQ).	(Tuncer <i>et al.</i> , 2018)
	Benfotiamina (70 mg/kg)	Rato	Rato (autotx)	Ortotópico	TOF	Oral (dia -1 a 21)	21 dias	↓	Diminuição da expressão de VEGF (IHQ).	

Alotx - alotransplante; Autotx - autotransplante; CPL - criopreservação lenta; HE - Hematoxilina-Eosina; IF - imunofluorescência; IHQ - imunohistoquímica; NAC - N-acetilcisteína; RT-PCR - real-time PCR; TOC - tecido ovárico criopreservado; TOF - tecido ovárico fresco; VEGF - fator de crescimento endotelial vascular; VT - vitrificação; ↑ - aumento; ↓ - diminuição; = - sem efeito.

III.4. Terapia celular

As células estaminais são células com potencial para se diferenciar em muitos tipos diferentes de células e têm sido estudadas pelo seu efeito no aumento da angiogênese em doenças isquêmicas. A sua aplicação em tecido ovárico mostrou uma melhoria na angiogênese do enxerto (Tabela 6) (Damous, Nakamuta, de Carvalho, *et al.*, 2015; Damous, Nakamuta, Satri de Carvalho, *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2021; Y. Zhang *et al.*, 2017).

As células estaminais mesenquimatosas (MSCs, do inglês, *mesenchymal stem cells*) têm um papel importante na regeneração tecidual, manutenção da homeostase tecidual e vascularização. Sob condições apropriadas, estas células podem ser ativadas, secretar vários fatores angiogênicos, adquirir fenótipo endotelial ou recrutar células endoteliais vasculares, diferenciar-se em pericitos ou células endoteliais e incorporar as paredes dos vasos sanguíneos. As MSCs humanas derivadas da medula óssea foram aplicadas em matrigel que encapsulou tecido ovárico humano previamente submetido a criopreservação e descongelação. Seguidamente, realizou-se o xenotransplante heterotópico em murganho e o tecido foi analisado 3, 7 e 21 dias depois. Com este tratamento verificou-se um aumento na expressão das proteínas VEGF, FGF-2 e angiogenina, na densidade vascular e na perfusão sanguínea (Xia *et al.*, 2015). Num estudo semelhante verificou-se um aumento da densidade vascular paralelamente com o aumento do número folículos primordiais e a diminuição da apoptose nestes folículos (Y. Zhang *et al.*, 2017).

Resultados semelhantes foram obtidos com a utilização de células estaminais derivadas de tecido adiposo (ASCs, do inglês, *adipose-derived stem cells*). As ASCs têm sido usadas como estímulo pró-angiogénico, uma vez que se diferenciam ou comportam como células endoteliais após a injeção no tecido isquémico. Estas células exibem uma produção basal de VEGF, que pode ser influenciada pela hipoxia. Esta estratégia foi estudada em rato e, imediatamente após a ovariectomia, foram administradas ASC no estroma do ovário, com posterior autotransplante heterotópico. Cerca de 30 a 35 dias depois, na fase *diestrus*, o tecido foi analisado e verificou-se um aumento da expressão de VEGF e do número de vasos (Damous, Nakamuta, Satri de Carvalho, *et al.*, 2015).

O mesmo grupo publicou um estudo semelhante, com níveis idênticos de proporção folicular, mas com níveis mais elevados de apoptose no grupo tratado com ASCs. No entanto, não foi avaliada a angiogênese. Neste estudo, foi também utilizado o modelo de rato com autotransplante e administração intraovárica das ASCs, porém o tecido ovárico foi criopreservado (Damous, Nakamuta, de Carvalho, *et al.*, 2015).

O papel das ASCs na estimulação da angiogênese do tecido ovárico também foi testado com a utilização de fibrina e com diferentes números de células. No primeiro estudo, com a utilização destas células, foi utilizado tecido ovárico humano pós-criopreservação. Este foi encapsulado num *scaffold* de fibrina, com ou sem ASCs em diferentes quantidades, e posteriormente foi realizado o xenotransplante heterotópico em murganho. A utilização de $1,5 \times 10^6$ ASCs apresentou níveis superiores de área endotelial, como demonstrado pela marcação imunohistoquímica com CD34 (Manavella, Cacciottola, Desmet, *et al.*, 2018). O mesmo grupo de investigadores realizou outro estudo com ASCs, no qual colocou um implante com ou sem ASC no retroperitôneo de murganho, local onde seria realizado o xenotransplante, 14 dias antes do mesmo ser realizado. Neste trabalho foram constatadas taxas de vascularização e de oxigenação mais elevadas com a utilização de ASC, bem como taxas de sobrevivência folicular superiores (Manavella, Cacciottola, Pommé, *et al.*, 2018). Posteriormente, outro ensaio com desenho experimental semelhante corroborou os resultados, demonstrando ainda que as ASC se diferenciam em vasos humanos e promovem a secreção de VEGF numa correlação positiva com a densidade vascular (Manavella *et al.*, 2019).

Ainda no âmbito da terapia celular, foi avaliado o efeito de células estromais mesenquimatosas derivadas do tecido adiposo (AdMSCs, do inglês, *adipose-mesenchymal derived stem cells*) e células endoteliais isoladas do cordão umbilical, as quais podem ser alternativa para mitigar a isquemia e modular a ativação folicular (Cha *et al.*, 2014; Man *et al.*, 2017, 2018; Shojafar *et al.*, 2018). A administração de AdMSC no local de transplantação acelerou a angiogênese, mas a localização das células endoteliais vasculares foi semelhante ao grupo controlo ao final de 28 dias. Porém, houve um aumento do volume do ovário, do número de folículos e das concentrações de progesterona e de estradiol, bem como uma diminuição da apoptose e dos

marcadores inflamatórios. Neste estudo foi utilizado tecido ovárico fresco autotransplantado no músculo de murganhos (Shojafar *et al.*, 2018). As células endoteliais foram estudadas com administração subcutânea, no local do alotransplante de tecido ovárico de murganho previamente submetido a criopreservação. A avaliação do enxerto revelou um aumento do número de vasos e melhor sobrevivência folicular comparativamente com os fragmentos transplantados em locais com injeção simulada (Cha *et al.*, 2014). Um estudo posterior avaliou o efeito das células endoteliais num cotransplante em murganho com o tecido ovárico humano previamente submetido a criopreservação. Neste trabalho foi evidenciada a melhoria do desenvolvimento folicular e a preservação dos folículos quiescentes. Contudo, não foi avaliada a angiogênese (Man *et al.*, 2018).

Tabela 6. Aplicação da terapia celular para estimular a angiogênese do tecido ovárico.

	Fator	Espécie dadora	Espécie recetora	Local do transplante	Tecido Ovárico	Via de administração	Time-points	Efeito	Efeito na angiogênese	Referência
Pré-transplante	MSC (5×10 ⁵ células)	Humano	Murganho	Heterotópico (subcutâneo)	TOC CPL	Matrigel GFR	3, 7 e 21 dias	↑ ↑ ↑	Aumento na expressão de VEGF, FGF-2 e angiogenina (WB); Aumento da densidade vascular (CD31+, IHQ); Aumenta a perfusão sanguínea.	(Xia <i>et al.</i> , 2015)
	MSC (5×10 ⁵ células)	Humano	Murganho	Heterotópico (subcutâneo)	TOC	Matrigel	7 dias	↑	Aumento da densidade vascular (CD31+, IHQ/IF).	(Y. Zhang <i>et al.</i> , 2017)
	ASC (1,5×10 ⁵ e 1,5×10 ⁶ células)	Humano	Murganho	Heterotópico (retroperitoneu)	TOC CPL	Scaffold de fibrina	3, 7 e 14 dias	↑	Aumento da área endotelial com 1,5×10 ⁶ células (CD34+, IHQ).	(Manavella, Cacciottola, Desmet, <i>et al.</i> , 2018)
	ASC (1,5×10 ⁶ células)	Humano	Murganho	Heterotópico (retroperitoneu)	TOC CPL	Implante de fibrina (dia -14)	7 dias	↑	Aumento da área endotelial (CD34+, IHQ).	(Manavella, Cacciottola, Pommé, <i>et al.</i> , 2018)
	ASC (1,5×10 ⁵ e 1,5×10 ⁶ células)	Humano	Murganho	Heterotópico (retroperitoneu)	TOC CPL	Implante de fibrina (dia -14)	7 dias	↑ ↑	Aumento da densidade vascular (CD34+, IHQ); Aumento na expressão de VEGF (RT-PCR).	(Manavella <i>et al.</i> , 2019)
	AdMSC (5×10 ⁴ /5μL solução salina)	Murganho	Murganho (autotx)	Heterotópico (intramuscular)	TOF	Local do transplante (dia 0)	1-3 e 28 dias	=	Localização semelhante das células endoteliais (CD31+, IF).	(Shojafar <i>et al.</i> , 2018)
Pós-transplante	ASC (5×10 ⁴ células/ovário)	Rato	Rato (autotx)	Heterotópico (retroperitoneu)	TOF	Intraovário (dia 0)	30 a 35 dias (na fase diestrus)	↑ ↑	Aumento da expressão de VEGF (RT-PCR); Aumento do número de vasos (vWF, IHQ/IF).	(Damous, Nakamuta, Saturi de Carvalho, <i>et al.</i> , 2015)
	EPC (5×10 ⁵ células/animal)	Murganho	Murganho (alotx)	Heterotópico (subcutâneo)	TOC CPL	Subcutânea (dia -7)	1, 2 e 4 semanas	↑	Aumento do número de vasos (CD31+, IHQ).	(Cha <i>et al.</i> , 2014)

ESTIMULAÇÃO DA ANGIOGÊNESE DO TECIDO OVÁRICO

Alotx - alotransplante; AdMSCs - células estromais mesenquimatosas derivadas do tecido adiposo; ASC - células estaminais do tecido adiposo; Autotx - autotransplante; CPL - criopreservação lenta; EPC - células endoteliais progenitoras; FGF - fator de crescimento de fibroblastos; GFR - fator de crescimento reduzido; IF - imunofluorescência; IHQ - imunohistoquímica; MSC - células estaminais mesenquimatosas; RT-PCR - real-time PCR; TOC - tecido ovárico criopreservado; TOF - tecido ovárico fresco; VEGF - fator de crescimento endotelial vascular; VT - vitrificação; vWF - fator de von Willebrand; WB - Western-blot; ↑ - aumento; ↓ - diminuição; = - sem efeito.

Tabela 7. Outras estratégias para estimular a angiogênese do tecido ovárico.

	Fator	Espécie dadora	Espécie recetora	Local do transplante	Tecido Ovário	Via de administração	Time-points	Efeito	Efeito na angiogênese	Referência
Pós-transplante	Sinvastatina (0,1 mg/kg)	Humano	Murganho	Orto- e heterotópico (intramuscular)	TOF	Intraperitoneal (dia -1 a 7)	30 dias	↑	Aumento da fração de volume sanguíneo (RM).	(Y. Cohen <i>et al.</i> , 2016)
	Sinvastatina (10 mg/L) Matriz de fibrina	Humano	Murganho	Heterotópico (intramuscular)	TOC CPL	Oral	21 dias	↑ =	Aumento da expressão de vWF (IF); Sem diferenças na expressão de CD31 (IF).	(Magen <i>et al.</i> , 2021)
	Salviae miltiorrhizae (4,5 g/kg)	Humano	Murganho	Heterotópico (cápsula renal)	TOC CPL	Intraperitoneal (diária)	2, 7 e 28 dias	↑ = ↑ =	Aumento da densidade vascular em dia 2, mas sem diferenças em dia 7 e 28 (CD34+, IHQ); Maior expressão de angiopoietina-2 (dia 28), mas sem diferenças na expressão de VEGF (RT-PCR).	(Wu <i>et al.</i> , 2010)
	Esfingosina-1-fosfato (S1P) (200 mM)	Humano	Murganho	Heterotópico (intramuscular)	TOF	Bomba mini-osmótica subcutânea (dia 0 a 4)	10 dias	↑	Aumento da densidade vascular (CD31+ ou αSMA, IHQ).	(Soleimani <i>et al.</i> , 2011)

	Setarud (IMOD™) (1 mL/kg)	Humano	Murganho	Heterotópico (subcutâneo)	TOF	Intravenoso (dia 1 a 7)	2, 7 e 30 dias	↑ ↑ ↓	Aumento da densidade vascular (dia 2 e 7, HE); Aumento da expressão de VEGF (dia 2 e 7) e angiopoietina-2 (dia 2) (RT-PCR e WB); Diminuição da expressão de angiopoietina-1 (dia 2, 7 e 30) (RT-PCR e WB).	(Hormozi <i>et al.</i> , 2015)
Pré e pós	Z-VAD-FMK (50 μM, 2 mg/kg)	Humano	Murganho	Heterotópico (intramuscular)	TOC CPL	Meio de congelamento Intraperitoneal (dia 1 a 7)	4 semanas	↑	Aumento da densidade vascular (CD31+, IHQ).	(S. Lee, Cho, <i>et al.</i> , 2021)
	VEGF-A (200 ng/mL), rLH (3 UI/d), rFSH (3 UI/d), vitamina E (óleo, 400 UI/L; forma seca, 3.200 UI/L)	Humano	Murganho	Heterotópico (intramuscular)	TOC CPL	Meio de cultura (2 horas) e via oral (dia -2 e 2)	14 dias	↑	Aumento na expressão da proteína VEGF-A (IHQ).	(Abir <i>et al.</i> , 2011)
	Melatonina (240 mg/L), cola rica em ácido hialurônico, VEGF-A (200 ng/mL) e vitamina E (óleo, 400 UI/mL)	Humano	Murganho	Heterotópico (intramuscular)	TOC CPL	Meio de cultura (2 horas) e via oral (dia -14 a 14)	14 dias	=	Sem diferenças na expressão da proteína VEGF-A (IHQ).	(Friedman <i>et al.</i> , 2012)

Alotx - alotransplante; Autotx - autotransplante; CPL - criopreservação lenta; FGF - fator de crescimento de fibroblastos; FSH - hormona foliculo-estimulante; HE - Hematoxilina-Eosina; IF - imunofluorescência; IHQ - imunohistoquímica; LH - hormona luteinizante; RM - ressonância magnética; RT-PCR - real-time PCR; TOC - tecido ovárico criopreservado; TOF - tecido ovárico fresco; VEGF - fator de crescimento endotelial vascular; VT - vitrificação; vWF - fator de von Willebrand; WB - Western-blot; αSMA - α-actina do músculo liso; ↑ - aumento; ↓ - diminuição; = - sem efeito.

III.5. Estratégias alternativas

Têm sido ainda descritas estratégias alternativas para melhorar o sucesso do transplante de tecido ovárico através da estimulação da angiogênese (Tabela 7).

A combinação de várias estratégias foi estudada para melhorar a sobrevivência do tecido ovárico humano após o transplante. Nestes estudos foi utilizado tecido ovárico humano, submetido a criopreservação lenta e descongelação, com posterior xenotransplante em murgancho durante 14 dias. O tratamento com vários fatores de crescimento, isoladamente ou em combinação, foi aplicado em cultura previamente ao transplante e associado a administração sistêmica (oral ou intraperitoneal) antes e depois do transplante. O tratamento com vitamina E, com gonadotrofinas e com VEGF-A, isoladamente ou em combinação, condicionou um aumento da expressão de VEGF comparativamente com o tecido avaliado imediatamente após descongelação sem, no entanto, haver diferenças entre os grupos pós transplante. Contudo, foi reportada menos apoptose no grupo de tratamento do hospedeiro com vitamina E e com gonadotrofinas antes e após o transplante e no grupo que combinou o tratamento do hospedeiro com a cultura do tecido suplementada com VEGF-A e com vitamina E antes do transplante (Abir *et al.*, 2011). A utilização de melatonina, cola rica em ácido hialurônico, VEGF-A e vitamina E, quer isoladamente quer em associação, não determinou diferenças na expressão da proteína VEGF-A. Contudo, a intensidade da apoptose foi menor no grupo com o tratamento combinado (Friedman *et al.*, 2012).

A esfingosina-1-fosfato (S1P, do inglês, *sphingosine-1-phosphate*) é um esfingolípido com um efeito antiapoptótico e pró-angiogênico, conseguido através da modulação da migração de células endoteliais. A utilização de S1P no transplante de tecido ovárico aumentou a densidade vascular no enxerto. Neste estudo foi realizado um xenotransplante heterotópico de tecido humano fresco em murgancho e a administração de S1P através de uma bomba osmótica subcutânea (Soleimani *et al.*, 2011).

O Z-VAD-FMK (do inglês, *carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone*) é outro fármaco com efeito antiapoptótico, pelo seu efeito inibidor

das caspases. Este foi estudado com o intuito de preservar os folículos primordiais e prevenir danos no tecido ovárico durante a criopreservação e o xenotransplante, através da sua administração no meio de congelação, isoladamente ou em associação com a injeção intraperitoneal diária. A adição de Z-VAD-FMK ao meio de congelação mostrou melhorar a densidade e a proliferação folicular avaliada imediatamente após a descongelação. Em relação ao xenotransplante heterotópico verificou-se maior densidade vascular no tecido congelado com Z-VAD-FMK, independentemente do tratamento sistémico com esta substância. Porém, na avaliação do enxerto 4 semanas após o transplante, o grupo que recebeu concomitantemente a administração intraperitoneal de Z-VAD-FMK nos primeiros 7 dias após o transplante registou um aumento da proliferação folicular (S. Lee, Cho, *et al.*, 2021).

A sinvastatina ativa a via de sinalização da Akt1, melhorando a angiogénese e o suporte vascular dos enxertos de tecido ovárico no período de hipoxia pós-transplante. O efeito deste fármaco foi estudado através da avaliação *in vivo* por ressonância magnética (RM) e também com a avaliação histológica e imunohistoquímica do tecido removido 30 dias após o transplante. Foi realizada a administração intraperitoneal de sinvastatina após o transplante de tecido ovário humano em murganhos (Y. Cohen *et al.*, 2016). Estes resultados foram corroborados posteriormente, num estudo com a administração oral de sinvastatina após o xenotransplante heterotópico de tecido ovárico humano numa matriz de fibrina (Magen *et al.*, 2021).

A *Salviae miltiorrhizae*, também conhecida como sálvia vermelha ou sálvia chinesa, é uma planta perene do género *Salvia*, utilizada na Medicina Tradicional Chinesa. É utilizada em doenças cardiovasculares, pela sua capacidade de promover a circulação e de remover a estase sanguínea (L. Wang *et al.*, 2016). Este tratamento foi aplicado ao transplante de tecido ovárico num estudo com tecido humano fetal, submetido a criopreservação lenta e descongelação, e com posterior xenotransplante na cápsula renal de murganhos machos. Após o transplante, foi realizado o tratamento com extrato de *Salviae miltiorrhizae* através de administração intraperitoneal diária. O tratamento não interferiu no número de folículos. No que diz respeito à avaliação da angiogénese, dois dias após o transplante, verificou-se um aumento da densidade vascular no enxerto tratado, comparativamente com o controlo. Porém, sete e vinte e

oito dias depois, os resultados foram semelhantes entre os grupos. Foi ainda avaliada a expressão de VEGF e de angiopoietina-2 por RT-PCR. Só se verificaram diferenças entre os grupos para a expressão de angiopoietina-2 no dia 28, com maior expressão no grupo tratado (Wu *et al.*, 2010).

O setarud (IMODTM) é uma mistura de extrato de ervas de diferentes plantas, com efeitos benéficos no sistema imunológico, no metabolismo lipídico, na função hepática e nos processos inflamatórios. Este composto contém várias substâncias, como selênio, beta-caroteno e tanino, que alguns estudos mostraram associar-se a possíveis efeitos na angiogênese. O seu papel no enxerto de tecido ovárico também foi estudado. Para tal realizou-se o xenotransplante subcutâneo de tecido humano fresco em murganhos, com a posterior administração intravenosa do setarud (IMODTM). O tecido foi recuperado dois, sete e trinta dias após o transplante. A densidade vascular estava aumentada no 2.º e no 7.º dia, bem como a expressão de VEGF. A expressão de angiopoietina-2 estava aumentada apenas no 2.º dia, mas a diminuição da expressão de angiopoietina-1 verificou-se em todos os *time-points* (Hormozi *et al.*, 2015).

Em suma, têm sido estudadas múltiplas estratégias para melhorar o sucesso do transplante de tecido ovárico, através da intervenção na angiogênese, simultaneamente com a preservação da viabilidade dos folículos e do estroma ovárico.

CAPÍTULO IV. Objetivos

Com este trabalho pretendeu-se contribuir para a otimização da função e da duração do enxerto de tecido ovário criopreservado através do desenvolvimento de estratégias para melhorar a angiogénese precoce.

A hipótese equacionada baseia-se na possibilidade de estimular a angiogénese, reduzindo o tempo de isquemia, com conseqüente melhoria da sobrevivência dos folículos ováricos e da função endócrina.

Pretendeu-se avaliar a ação de fatores com potencial efeito pró-angiogénico: o VEGF, o bFGF, o hMG e os exossomas, em diferentes associações, após o processo de criopreservação e antes do transplante.

De modo mais detalhado, os objetivos primários foram avaliar diferentes métodos para cultura de tecido ovárico, analisar o efeito da criopreservação na angiogénese do tecido ovárico e avaliar a angiogénese do tecido ovárico previamente criopreservado após cultura com fatores pró-angiogénicos e ulterior transplante.

Adicionalmente, como objetivos secundários, pretendeu-se estudar as alterações morfológicas (densidade folicular e a qualidade do estroma) do tecido ovárico criopreservado submetido a cultura com fatores angiogénicos e com posterior transplante; analisar a proliferação e a morte celular no tecido após exposição aos diferentes estímulos e avaliar o restabelecimento da função endócrina *in vivo*, após exposição do tecido ovárico aos fatores angiogénicos.

PARTE II - Trabalho Experimental

CAPÍTULO V. Modelo 3D de cultura de tecido ovárico

Os resultados apresentados ao longo desta secção foram publicados sob a forma de artigo em revista da especialidade com arbitragem científica e disponível no Anexo I:

Pais AS, Reis S, Laranjo M, Caramelo F, Silva F, Botelho MF, Almeida-Santos T. The challenge of ovarian tissue culture: 2D versus 3D culture. *J Ovarian Res.* 2021 Nov 1;14(1):147. doi: 10.1186/s13048-021-00892-z.

O ovário é um órgão complexo constituído pela túnica albugínea, córtex e medula (Junqueira & Carneiro, 2004). No córtex encontra-se a sua unidade morfofuncional, que é o folículo, composto por um ovócito circundado por células da granulosa e da teca. Assim, a foliculogénese ocorre no córtex ovárico e inclui o recrutamento de folículos primordiais, seguido do desenvolvimento de folículos pré-antrais, seleção e crescimento dos folículos antrais e atresia folicular (Gougeon, 1996). A medula é a componente inervada e vascularizada localizada no centro do ovário. O estroma ovárico é o tecido de suporte do ovário e é essencial na dinâmica deste órgão. O estroma contribui para o desenvolvimento folicular através da produção de fatores que intervêm na sinalização bidirecional, bem como através do fornecimento de células progenitoras que se diferenciam na teca, a qual é constituída por células que se dispõem concentricamente à volta da lâmina basal dos folículos (Kinneer *et al.*, 2020; Monniaux *et al.*, 2018). As células intersticiais da teca intervêm na foliculogénese e na esteroidogénese através da produção de androgénios e de fatores de crescimento que estimulam a proliferação das células da granulosa (Monniaux *et al.*, 2018).

A cultura de fragmentos de tecido ovárico permite manter a integridade e a estrutura tridimensional dos folículos sustentados pelo estroma. Neste capítulo comparam-se duas metodologias de cultura de tecido ovárico, a cultura convencional e a cultura em matriz de alginato.

V.1. Materiais e Métodos

O estudo experimental foi realizado no Instituto de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, no biotério do Instituto de Investigação Clínica e Biomédica de Coimbra da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e no Serviço de Medicina da Reprodução do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, respeitando todas as disposições legais em vigor no que se refere à experimentação animal. O protocolo experimental foi aprovado pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária do Ministério da Agricultura (DGAV) depois de

parecer favorável do Órgão Responsável pelo Bem-Estar dos Animais (ORBEA) do Instituto de Investigação Clínica e Biomédica de Coimbra da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (número de autorização da ORBEA 2-2016 e da DGAV 11060495/23-11-2016, Anexo III).

V.1.1. Desenho experimental

Para a realização deste estudo foram usados hemiovários de ratos RNU fêmea, que foram avaliados imediatamente após a descongelação e após a cultura no meio de crescimento com e sem encapsulamento numa matriz de alginato por 24, 48 e 72 horas. A cultura convencional em meio foi designada como 2D (bidimensional) e a cultura na qual o tecido foi englobado numa matriz de alginato foi designada como tridimensional (3D).

Assim, para desenvolver esta tarefa foram constituídos 7 grupos:

- 1) Grupo controlo: tecido ovárico criopreservado e descongelado, avaliado imediatamente após a descongelação;
- 2) Grupo 2D, 24 horas: tecido ovárico criopreservado e descongelado, mantido em cultura convencional durante 24 horas;
- 3) Grupo 2D, 48 horas: tecido ovárico criopreservado e descongelado, mantido em cultura convencional durante 48 horas;
- 4) Grupo 2D, 72 horas: tecido ovárico criopreservado e descongelado, mantido em cultura convencional durante 72 horas;
- 5) Grupo 3D, 24 horas: tecido ovárico criopreservado e descongelado, mantido em cultura num *scaffold* de alginato durante 24 horas;
- 6) Grupo 3D, 48 horas: tecido ovárico criopreservado e descongelado, mantido em cultura num *scaffold* de alginato durante 48 horas;
- 7) Grupo 3D, 72 horas: tecido ovárico criopreservado e descongelado, mantido em cultura num *scaffold* de alginato durante 72 horas.

V.1.2. Animais

Neste trabalho experimental foram utilizados ratos fêmea com 8 a 10 semanas de idade, da estirpe Rowett Nude (RNU, homozigóticas) e com um peso médio de 200g. Optou-se por utilizar o rato como modelo, pelas dimensões do ovário e para permitir, em tarefas subsequentes, realizar o autotransplante de tecido ovárico, mimetizando a prática clínica. A idade dos animais foi selecionada tendo em conta o desenvolvimento pubertário, a maturidade sexual e a idade do acasalamento (Maeda *et al.*, 2000; Sengupta, 2013).

Os animais foram alojados em condições de temperatura e humidade constantes, ciclos de luz e de escuro de 12 horas em alternância, em gaiolas ventiladas individualmente. Todos os animais tinham acesso à dieta padrão esterilizada e água filtrada *ad libitum*.

Para o trabalho descrito neste capítulo foram disponibilizados 18 animais pelo biotério do Instituto de Investigação Clínica e Biomédica de Coimbra da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, os quais foram distribuídos de forma aleatória pelos grupos de estudo.

V.1.3. Ovariectomia

O tecido ovárico foi obtido por ovariectomia bilateral como é possível observar no *link* disponível no Anexo II. Do ponto de vista anatómico e conforme descrito na Figura 5, o rato fêmea possui um útero bicórneo, com os cornos uterinos localizados em cada lado da cavidade abdominal, atingindo o polo inferior do rim. Os ovários localizam-se no bordo lateral do músculo psoas, no topo dos cornos uterinos e estão envolvidos pelos oviductos e por gordura. Macroscopicamente os ovários são de pequenas dimensões e redondos. A vascularização dos ovários e do útero é fornecida pela artéria ovárica, ramo da aorta, que percorre internamente os cornos uterinos (Maeda *et al.*, 2000; M. Suckow *et al.*, 2005).

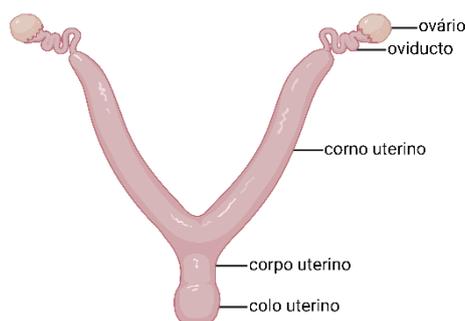


Figura 5. Representação esquemática da anatomia do trato genital feminino no rato. *Created with BioRender.com*

A anteceder o procedimento cirúrgico foi realizada anestesia inalatória com sevoflurano através do sistema de anestesia *EZ-7000 Classic Anesthesia System (EZ Systemns, Pensilvânia, EUA)* (Di Loreto *et al.*, 2009). A anestesia permite cessar de forma temporária e reversível as respostas motoras e sensoriais, sendo essencial para reduzir a dor e a ansiedade associadas ao procedimento. A anestesia inalatória é simples, tem um efeito e uma recuperação rápidos e permite controlar a profundidade da mesma pelo nível de exposição ao gás. Os ratos foram colocados numa câmara anestésica para a indução da anestesia, assegurando assim a sua contenção num ambiente controlado, no qual o animal inala o anestésico. Posteriormente, os animais foram posicionados na mesa operatória em decúbito dorsal, com a cabeça adaptada a uma máscara, equipamento cónico que permite manter a anestesia inalatória durante a ovariectomia (Lofgren *et al.*, 2020; Shibutani, 2000).

O procedimento cirúrgico, idêntico em todos os animais, consistiu na desinfecção da parede abdominal com solução de iodopovidona e na realização de laparotomia mediana longitudinal com uma incisão de dois a três cm na região inferior do abdómen. Após exposição da cavidade pélvica e identificação do corpo uterino na linha média, procurou-se o corno uterino até se identificar o ovário. O ovário foi exteriorizado da cavidade abdominal e seguidamente foram laqueados e seccionados os pedículos vasculares, tendo-se removido o ovário como representado na Figura 6 (Di Loreto *et al.*, 2009; Khajuria *et al.*, 2012). A extremidade do corno uterino foi reintroduzida na cavidade abdominal e o procedimento foi repetido para o ovário contralateral.

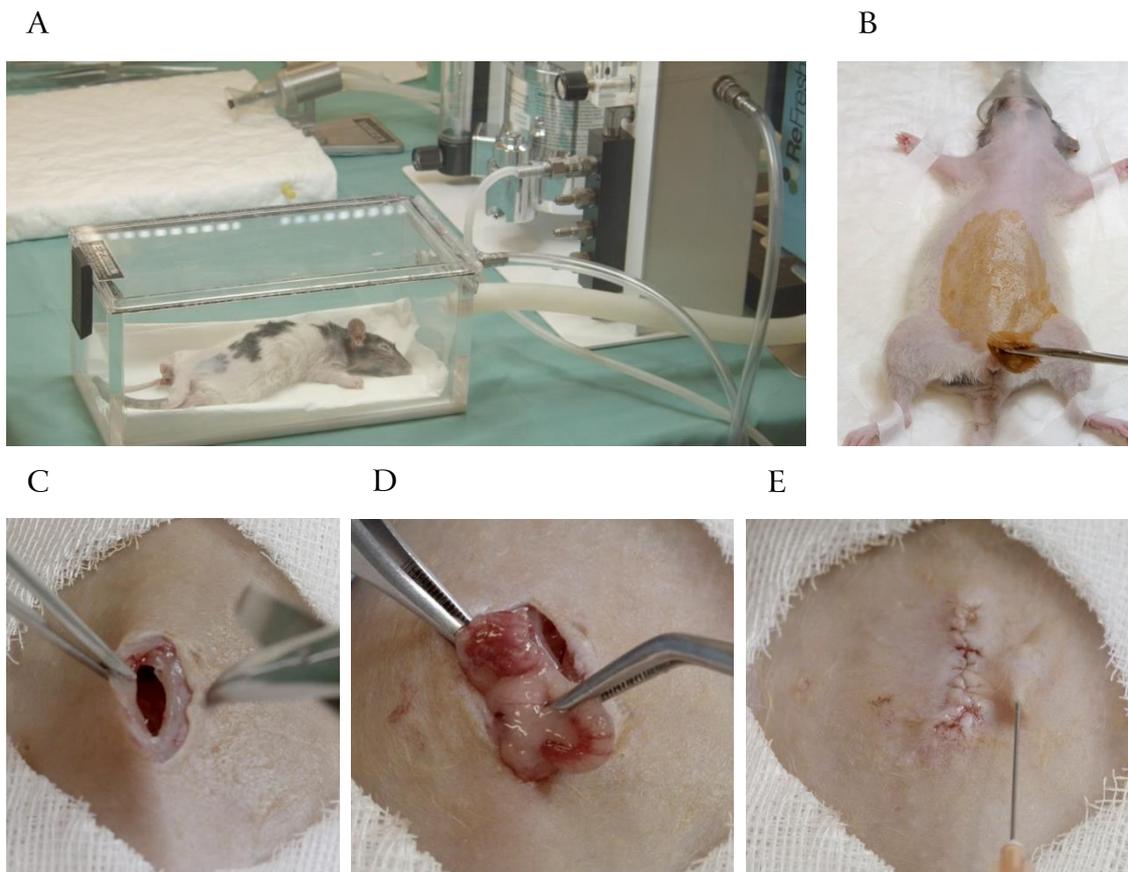


Figura 6. Fotografias representativas do procedimento cirúrgico. O rato foi submetido a anestesia inalatória com sevoflurano, encontrando-se na câmara anestésica (A). Após posicionamento em decúbito dorsal, a anestesia inalatória continuou a ser administrada através de uma máscara e foi realizada a desinfecção da parede abdominal (B). Através de uma laparotomia mediana longitudinal (C), acedeu-se à cavidade pélvica, na qual se identificaram os ovários (D) e procedeu-se à ovariectomia. Posteriormente, foi encerrada a parede abdominal por planos e administrada analgesia subcutânea com carprofeno (E).

Depois de se assegurar a adequada hemóstase, a cavidade abdominal foi fechada por planos, com um ponto de aproximação no plano muscular e sutura contínua da pele com fios reabsorvíveis. Por último, foi administrada analgesia subcutânea com carprofeno (5 mg/kg, totalizando em média 0,2 mL por animal) (Di Loreto *et al.*, 2009). Os animais foram colocados novamente em gaiolas e nas primeiras duas horas após a intervenção, durante a recuperação da anestesia, ficaram sob vigilância dos investigadores.

Após a ovariectomia, cada ovário foi cortado em dois hemiovários com uma dimensão aproximada de 3×2×1 mm. Os hemiovários foram colocados em solução tamponada

fria com DPBS (do inglês, *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline - Biological Industries*) suplementada com 10% de soro fetal bovino (*Biological Industries*), tendo-se mantido nesta solução durante cerca de 30 minutos, antes da criopreservação.

V.1.4. Protocolos de criopreservação e de descongelação

A criopreservação permite suspender a atividade biológica do tecido de forma temporalmente indefinida. Estão descritas duas técnicas de criopreservação, a criopreservação lenta e a vitrificação. O sucesso da criopreservação está relacionado com a técnica, nomeadamente o processo de arrefecimento e de posterior aquecimento, bem como com os crioprotetores utilizados. O passo mais crítico do processo de congelação é a fase de transição da água para o gelo, pelo risco de formação de cristais que destroem os componentes celulares (Barrett & Woodruff, 2010).

A criopreservação lenta é a técnica convencional, na qual se promove uma descida lenta e controlada da temperatura, associada a uma exposição prolongada a uma reduzida concentração de crioprotetores. Deste modo consegue-se uma desidratação celular progressiva, minimizando a formação de cristais de gelo intracelular e os efeitos nefastos da congelação (Barrett & Woodruff, 2010; Silber, 2012). Para minimizar este risco é realizado um período de espera (*seeding*) em altas temperaturas abaixo de zero (-5°C a -15°C), que permite a nucleação de gelo de forma mais controlada (Hunt, 2017).

A vitrificação é um procedimento de desenvolvimento mais recente e mais simples, na qual a descida da temperatura é muito rápida, de tal modo que a água solidifica sem que ocorra cristalização. Contudo, este processo requer a utilização de concentrações mais elevadas dos crioprotetores, com a inerente toxicidade celular (Barrett & Woodruff, 2010).

Os crioprotetores são compostos usados na criopreservação que aumentam a sobrevivência celular, visando preservar as estruturas celulares. No âmbito da preservação da fertilidade os crioprotetores mais utilizados são o dimetilsulfóxido

(DMSO), o etilenoglicol e o propilenoglicol, atendendo à sua solubilidade em água a baixas temperaturas, a permeabilidade celular e a relativamente baixa citotoxicidade (Barrett & Woodruff, 2010). O processo de criopreservação e os tipos de crioprotetores são descritos e discutidos mais detalhadamente no capítulo VI.

Neste estudo utilizou-se a criopreservação lenta, cujo protocolo consistiu numa congelação lenta e descongelação rápida, em utilização na prática clínica pelo Serviço de Medicina da Reprodução do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra. Este protocolo foi previamente adaptado de Rosendahl *et al.* (Rosendahl *et al.*, 2011) e de Donnez *et al.* (Donnez *et al.*, 2005).

No processo por nós realizado, os dois hemiovários foram transferidos da placa de transporte para criotubos de plástico (Nunc, *Thermo Fisher Scientific Inc.*) contendo 1,5 mL de meio de congelamento composto por DPBS com etilenoglicol na concentração de 1,5 M (*Sigma-Aldrich*), sacarose na concentração de 0,1 M (*Merck*) e albumina humana na concentração de 10 mg/mL (*Grifols*). Os criotubos foram depois colocados num agitador durante 30 minutos a 4°C, para assegurar o equilíbrio osmótico do tecido.

Para a congelação lenta, utilizou-se um aparelho com sistema de congelação automatizado, o *Planer Kryo 360-1.7* (Planer PLC), com o sistema *Freeze Control CL-8800* (*CryoLogic*), acoplado ao software *CryoGenesis™ V5*. No protocolo utilizado, a temperatura inicial foi de 0°C, onde os criotubos se mantiveram por 15 minutos, e posteriormente a temperatura foi sendo reduzida 2°C por minuto até aos -9°C. Após um tempo de espera de 10 minutos a -9°C, foi realizado o *seeding* manual, através da inversão repetida por três vezes de cada um criotubos. Posteriormente a temperatura foi reduzida 0,3°C por minutos até -40°C e por fim 10°C por minuto até -140°C. Após a conclusão do programa de congelação, os criotubos foram transferidos para o contentor de azoto líquido a -196°C, onde se mantiveram armazenados durante uma semana até à descongelação.

No dia da realização da experiência, o tecido ovárico foi descongelado, tendo os criotubos sido retirados do azoto líquido, aquecidos à temperatura ambiente por 30

segundos e posteriormente imersos em banho-maria a 37°C durante 5 minutos. A descongelação e reidratação do tecido ovárico requerem a sua passagem sucessiva por três meios. Após a preparação, os meios foram homogeneizados por agitação, filtrados e mantidos 30 minutos à temperatura ambiente. O primeiro meio, o meio I, é uma solução de etilenoglicol na concentração de 0,75 M, sacarose na concentração de 0,25 M e albumina humana na concentração de 10 mg/mL em DPBS. O segundo meio, o meio II, é constituído por sacarose na concentração de 0,25 M e albumina humana na concentração de 10 mg/mL em DPBS. Por fim, o último meio de descongelação, o meio III, corresponde a DPBS com albumina humana na concentração de 10 mg/mL. O processo de descongelação está representado na Figura 7.

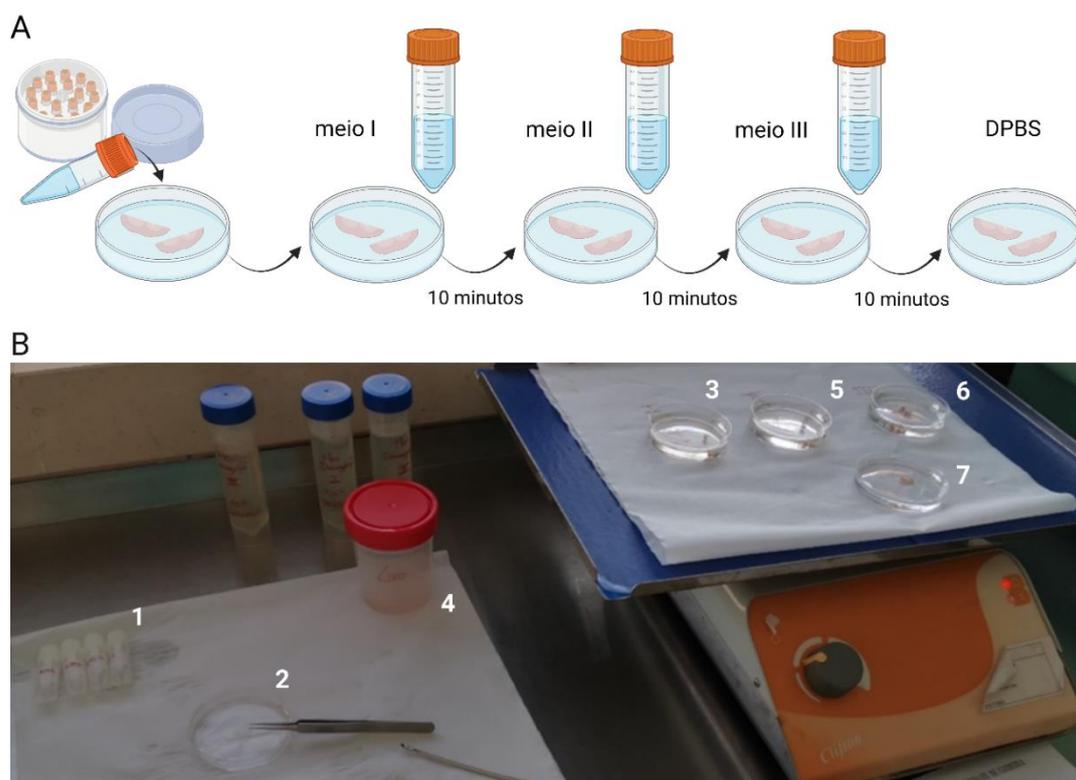


Figura 7. Procedimento de descongelação. (A) representa esquematicamente o procedimento de descongelação. Na fotografia (B) é possível identificar os criotubos (1). De forma individual e após o aquecimento, o conteúdo dos criotubos é vertido para a placa de Petri (2). Os fragmentos de tecido ovárico transitam para a placa de Petri com o meio de descongelação I (3) e o meio de congelação é desperdiçado (4). Após séries de 10 minutos em agitação, os fragmentos transitam da placa de Petri com o meio II (5), para a que contem o meio III (6) e por fim para DPBS (7). *Created with BioRender.com*

O conteúdo dos criotubos foi transferido para uma placa de Petri e desta os fragmentos de tecido ovárico foram transferidos para outra placa com cerca de 5 mL do meio I, utilizando pinças estéreis. Os fragmentos ficaram imersos neste meio durante 10 minutos, sob agitação para homogeneizar o meio. Após este período, os fragmentos foram transferidos consecutivamente para os meios de descongelação II e III, onde foi executado o mesmo procedimento, com imersão durante 10 minutos em cada um. Por fim, o tecido descongelado foi transferido para DPBS antes da cultura. Todos os meios de descongelação e o DPBS foram usados à temperatura ambiente.

V.1.5. Cultura de tecido ovárico

O meio de cultura foi constituído por α -MEM (22561-021, *Thermo Fisher Scientific Inc.*), soro fetal bovino na concentração de 10% (v/v) (*Biological Industries*) e penicilina/estreptomicina na concentração de 0,1% (v/v) (15140-122, *Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc.*).

A matriz 3D foi construída com alginato, sendo a opção para a sua utilização abordada na discussão. A solução de alginato de sódio a 1,5% (p/v) (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, Missouri, EUA) foi preparada em DPBS estéril, posteriormente dissolvido no vórtex e submetido a aquecimento a 37°C. Para obter a solidificação desta solução foi preparada outra solução de *cross-link* contendo cloreto de cálcio (CaCl_2) na concentração de 50 mM e cloreto de sódio (NaCl) na concentração de 140 mM.

Para encapsular os fragmentos de tecido ovárico foi utilizado o protocolo de anel de agarose (*Invitrogen*), adaptado de Henry, 2015 (Henry *et al.*, 2015). A agarose foi preparada na concentração de 1,5% em água ultrapura e foi colocada a polimerizar em placas de Petri a -4°C. No dia seguinte, foram criados poços nas placas de agarose com diâmetro de cerca de 7 mm. Os poços na agarose foram preenchidos com uma camada de matriz de alginato (cerca de 100 μL), e os fragmentos foram colocados no poço e cobertos novamente com matriz de alginato (cerca de 50 μL). A solução de *cross-link* foi adicionada (cerca de 100 μL) e, cerca de 20 minutos depois, verificou-se a

polimerização do alginato numa matriz, encapsulando o tecido ovárico, como representado na Figura 8.

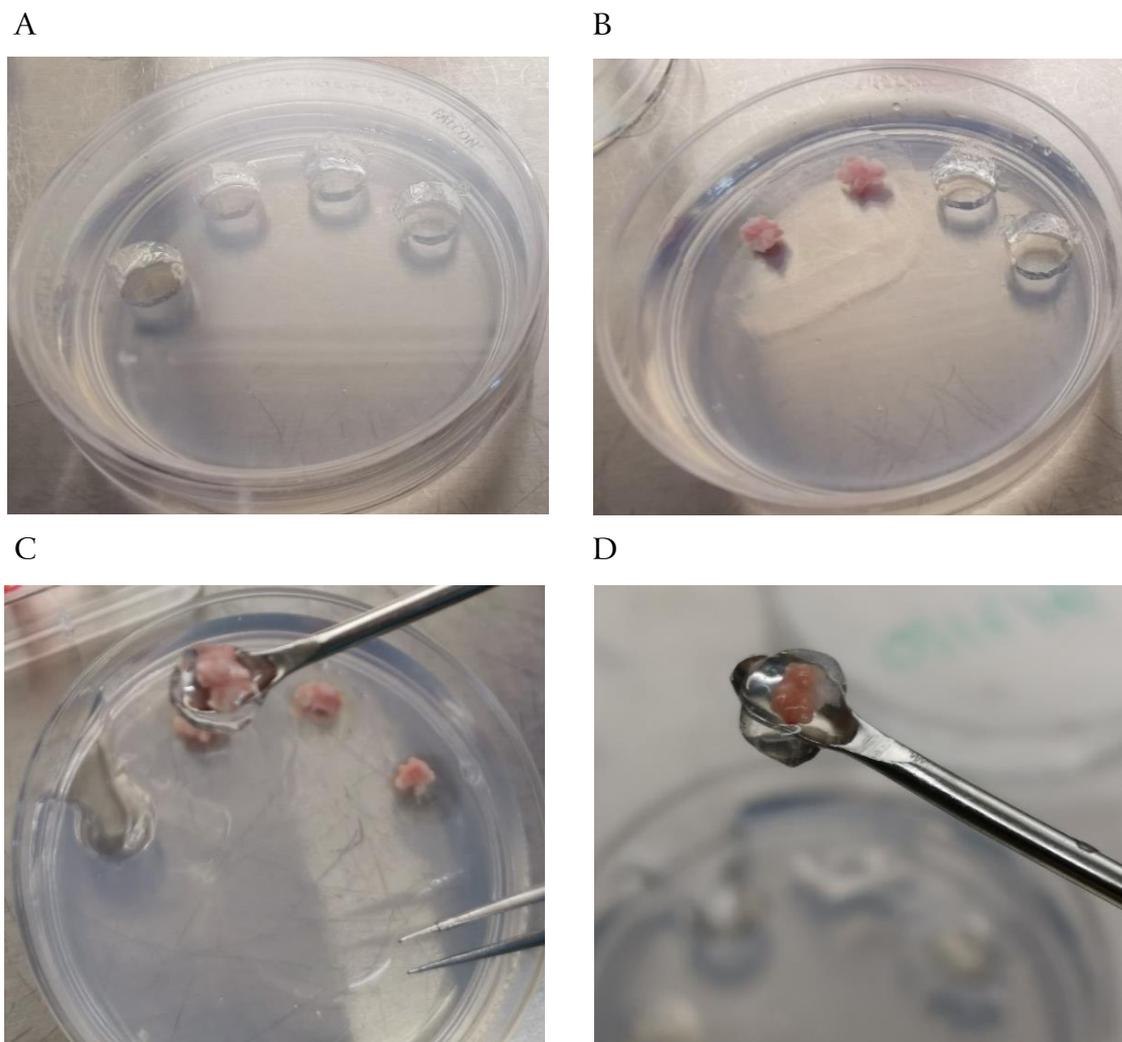


Figura 8. Fotografias representativas do scaffold de alginato. Nas placas de agarose com poços (A), foi colocado o tecido ovárico coberto por alginato e com posterior adição da solução de *cross-link* (B). Após cerca de 20 minutos, o alginato solidificou numa matriz, encapsulando o tecido ovárico (C e D).

A cultura realizou-se a 37°C em ar com 5% de CO₂, durante 24, 48 e 72 horas. No final de cada período de cultura foram removidos os hemiovários para estudo histológico e imunohistoquímico e foi guardado o meio de cultura para a avaliação da citotoxicidade.

V.1.6. Avaliação histológica

Após fixação em formaldeído a 4% (*Panreac Quimica Sau*, Barcelona, Espanha), os ovários foram transportados para o Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra. As amostras de tecido foram incluídas em parafina, cortadas num micrótomo de forma seriada a cada 5 μm de espessura e montadas em lâminas. A análise histológica foi realizada com recurso à coloração Hematoxilina-Eosina (HE) cujo protocolo de coloração inclui a reidratação, a coloração e a desidratação das amostras, como descrito na Tabela 8. Esta técnica simples é utilizada na prática clínica para visualizar e distinguir os constituintes e os tipos celulares, permitindo também avaliar o estado funcional das células. A hematoxilina é oxidada e convertida em hemateína, que é um corante catiónico que cora as estruturas ácidas, como os ácidos nucleicos, conferindo assim a coloração azulada aos núcleos. A eosina é um corante aniónico, que cora estruturas básicas, concedendo uma coloração rosada ao citoplasma e matriz extracelular (Chan, 2014; Gamble, 2008).

Tabela 8. Descrição do protocolo para a coloração hematoxilina-eosina realizado no Serviço de Anatomia Patológica do CHUC

Etapa	Composto	Número de passagens	Tempo
Reidratação	Xilol (VWR)	3	2 min.
	Etanol absoluto (Proclínica)	2	2 min.
	Etanol 95% (v/v) (Proclínica)	1	2 min.
	Água corrente	1	2 min.
Coloração	Hematoxilina Gill 1 (<i>Leica</i>)	1	5 min.
	Lavagem com água corrente	1	5 min.
	Eosina 1% solução aquosa (Bio-optica)	1	40 seg.
Desidratação	Etanol 95% (v/v)	1	30 seg.
	Etanol absoluto	2	30 seg.
	Xilol	3	30 seg.

Por cada hemiovário foram coradas três secções para análise morfológica. As fotografias das lâminas foram adquiridas no AxioScan.Z1 da *Carl Zeiss* (Figura 9), com lente Plan-Apochromat 10 \times /0,8, e fotografadas com o programa *ZEN 2 blue edition* (*Carl Zeiss*

Microscopy GmbH, 2011). A análise histológica foi realizada de forma oculta por dois observadores, utilizando o *software Image J*.



Figura 9. Fotografia representativa do AxioScan.Z1 (Zeiss).

V.1.7. Avaliação da morfologia e da viabilidade do tecido

A metodologia para avaliação da viabilidade do tecido ovárico foi adaptada de critérios previamente descritos para lesão do tecido ovárico após experiências *in vivo* de isquemia/reperfusão (Asfour *et al.*, 2015; Eser *et al.*, 2015; Guven *et al.*, 2010; Yildirim *et al.*, 2015). O exame histopatológico da viabilidade do tecido incluiu a avaliação de três parâmetros morfológicos: a percentagem de tecido em necrose, a degeneração dos folículos e o edema intersticial. Todos os parâmetros foram quantificados para a totalidade da secção de tecido ovárico corada na lâmina, de modo a aumentar a representatividade da análise.

A necrose do tecido foi avaliada visualmente e quantificada pela percentagem de área em necrose (Asfour *et al.*, 2015). As células necróticas geralmente apresentam citoplasma hipereosinofílico, edema celular, vacúolos e perda de microvilosidades (Brown *et al.*, 2021). Os folículos foram classificados como degenerados quando incluíam células com núcleo picnótico, ooplasma retraído e células da granulosa desorganizadas. O *score* de degeneração folicular foi calculado pela quantidade relativa de folículos degenerados em relação ao número total de folículos (Yildirim *et al.*, 2015).

O edema foi avaliado pela quantidade de líquido intercelular (Eser *et al.*, 2015; Yildirim *et al.*, 2015).

Cada parâmetro foi pontuado usando uma escala de 0 a 3, em que 0 corresponde a ausência de alterações, 1 traduz alterações leves ou em menos de 1/3, 2 alterações moderadas ou em 1/3 a 2/3, e 3 alterações graves ou em mais de 2/3 (Eser *et al.*, 2015; Guven *et al.*, 2010; Yildirim *et al.*, 2015). A pontuação total foi calculada de acordo com esses parâmetros (Guven *et al.*, 2010).

V.1.8. Avaliação folicular

Os folículos ováricos desenvolvem-se a partir da reserva de folículos primordiais quiescentes, estabelecidas no início da vida. Este processo, denominado por foliculogênese, inclui o recrutamento de folículos primordiais seguido do desenvolvimento de folículos pré-antrais, seleção e crescimento dos folículos antrais e termina com a ovulação ou a morte folicular por atresia.

Neste estudo, apenas os folículos que apresentaram morfologia normal foram quantificados pelos dois observadores independentes. Tendo em conta a estrutura tridimensional dos folículos e para evitar dupla contagem, foram considerados apenas os folículos com núcleo visível (Herraiz *et al.*, 2014).

A classificação folicular foi realizada de acordo com a maturidade, conforme descrito por Gougeon (Gougeon, 1996). Segundo este autor, os folículos primordiais são constituídos por uma única camada de células da granulosa, que apresentam morfologia achatada. Nos folículos primários, de igual modo, existe apenas uma única camada de células da granulosa, mas com morfologia cuboide. Quando se observou um folículo com características intermédias entre primordial e primário, com apenas uma célula da granulosa cuboide, este foi considerado como primário. Os folículos secundários são compostos por duas ou mais camadas de células da granulosa, ao redor do ovócito. Nos folículos pré-antrais, o ovócito está rodeado por mais do que duas camadas de células da granulosa, com espaços emergentes, mas sem antro definido, ao

contrário dos folículos antrais, onde já existe um antro totalmente definido. Para efeitos dos objetivos deste estudo, os folículos pré-antrais e antrais foram agrupados com os folículos secundários.

A atresia folicular foi avaliada por critérios morfológicos que incluíram o formato irregular, a picnose das células da granulosa, a contração citoplasmática, a presença de vacúolos e a eosinofilia do ooplasma (Gougeon, 1996).

A densidade folicular foi calculada através do número de folículos por unidade de área (número/mm²) (M. Fransolet *et al.*, 2014).

V.1.9. Avaliação da proliferação e da apoptose no tecido por imunohistoquímica

A imunohistoquímica é uma técnica que permite a deteção de um antigénio presente num tecido, através do seu reconhecimento por anticorpos. Esta técnica é muito útil pois preserva a arquitetura do tecido, permitindo não só detetar a presença de antigénios específicos, como também identificar a sua localização no tecido. (Hawes *et al.*, 2009)

O ensaio imunohistoquímico foi realizado com o anticorpo policlonal de coelho contra o Ki67 (diluído 1:300; PA5-19462, *Thermo Fisher Scientific Inc.*), biomarcador de proliferação celular, e o anticorpo policlonal de coelho contra a caspase 3 (diluído 1:100; AHP2286, *Bio-Rad Laboratories*), biomarcador da apoptose celular.

A atividade proliferativa do tecido foi avaliada, por imunohistoquímica, através da incubação com o anticorpo primário anti-Ki67. O Ki67 é uma proteína nuclear que está presente no ciclo celular, nas fases de atividade celular (numa fase tardia de G1, na fase S, G2 e M) e ausente em células em quiescência, em G0 (Gerdes *et al.*, 1984; Schluter *et al.*, 1993).

A marcação anti-caspase 3 permite a identificação de células apoptóticas nos tecidos.

A caspase 3 é uma caspase executora que é sintetizada na forma de proenzima inativa. Nas células em apoptose é ativada, iniciando a via executora a qual é irreversível (Elmore, 2007).

A marcação foi realizada no dispositivo de marcação automática *BenchMark* ultra IHC/ISH (*Ventana Medical Systems*) usando o kit de deteção *OptiView DAB IHC v5* (v1.00.0117, *Ventana Medical Systems*). Este kit é um método indireto de deteção de anticorpos primários de rato ou de coelho. O antigénio do tecido liga-se especificamente a um anticorpo primário, em secções de tecido em parafina. Este anticorpo primário é identificado por um *cocktail* de anticorpos secundários do kit (*HQ linker*). Por sua vez, os anticorpos secundários são reconhecidos por anticorpos terciários associados a uma enzima, neste caso a peroxidase (HRP, do inglês, *horseradish peroxidase multimer*). Este complexo é observado pela oxidação dos substratos (o peróxido de hidrogénio e o 3,3'-diaminobenzidina, ou DAB) pela HRP, traduzindo-se num produto insolúvel de cor castanha (Ventana, 2011). O protocolo está descrito de forma resumida na Tabela 9.

Tabela 9. Resumo do protocolo de imunohistoquímica para Ki67 e caspase 3 do Serviço de Anatomia Patológica do CHUC.

Etapa	Descrição
1 Desparafinação	Através do aquecimento até aos 72°C (4 minutos) e com o auxílio da solução EZprep que emulsiona a parafina.
2 Recuperação do antigénio	Induzida pelo calor e por incubação com uma solução tampão CCI a 100°C (40 minutos).
3 Inibição da peroxidase endógena	Inibidor pré-primário – Inibição com peróxido de hidrogénio (4 minutos).
4 Marcação imunohistoquímica	Incubação com o anticorpo primário a 36°C: – Ki67 – 40 minutos; – Caspase 3 – 44 minutos.
5 Deteção da reação antigénio-anticorpo (OptiView DAB IHC)	Incubação com cocktail de anticorpos secundários, HQ Universal linker (8 minutos); Incubação com os anticorpos terciários com a enzima peroxidase HRP <i>Multimer</i> (8 minutos).
6 Revelação cromogénea	Aplicação de uma gota de peróxido de hidrogénio simultaneamente com uma gota de DAB e incubação (8 minutos); Adição de uma gota de solução de cobre e incubação (4 minutos).
7 Contraste dos núcleos para observação da arquitetura nuclear	Adição de uma gota de hematoxilina e incubação (8 minutos); Incubação com uma gota de pós-contraste, <i>bluing reagent</i> (4 minutos).

A recuperação do antigénio foi realizada com tampão à base de *cell conditioner 1* (CCI, *Ventana Medical Systems*), seguido de incubação com anticorpo primário de acordo com as instruções do fabricante e as diluições mencionadas anteriormente. A detecção da imunocoloração foi realizada com o OptiView DAB IHC Detection Kit (*Ventana Medical Systems*) de acordo com as recomendações do fabricante, pela deteção do substrato cromogénico DAB precipitado.

Após o protocolo de imunohistoquímica, as imagens foram adquiridas no microscópio Axioscan Z1 (*Carl Zeiss*), com lente Plan-Apochromat 10x/0,8 e fotografadas com o auxílio do programa ZEN 2 *blue edition* (*Carl Zeiss Microscopy GmbH*, 2011). A análise dos resultados foi realizada por dois investigadores, de forma cega relativamente às condições de estudo.

Os folículos foram classificados como “positivos” ou “negativos” para Ki67 e caspase 3. Para isso, considerou-se um folículo “positivo” quando se observou coloração no ovócito e/ou em pelo menos uma célula da granulosa (Dolmans *et al.*, 2015; Luyckx *et al.*, 2013). Posteriormente quantificou-se a proliferação (Equação 1) e a apoptose (Equação 2) nos folículos mediante a percentagem de folículos positivos considerando o número total de folículos.

Equação 1. Fórmula de cálculo dos folículos em proliferação

$$\text{Folículos em proliferação (\%)} = \frac{\text{n.º de folículos positivos para Ki67}}{\text{n.º total de folículos}} \times 100$$

Equação 2. Fórmula de cálculo dos folículos em apoptose

$$\text{Folículos em apoptose (\%)} = \frac{\text{n.º de folículos positivos para caspase 3}}{\text{n.º total de folículos}} \times 100$$

Em relação ao estroma, a quantificação da área marcada com cada anticorpo foi realizada por meio do programa *Image J* (Fiji versão, 1.8.0). Foram seleccionadas

aleatoriamente cinco zonas de cada amostra por meio da aplicação de uma grelha retangular. Os resultados foram apresentados como uma média de todas as secções.

V.1.10. Avaliação da citotoxicidade

A lactato desidrogenase (LDH) é libertada no meio de cultura pelas células danificadas. Procedeu-se à sua medição usando o ensaio de citotoxicidade CytoTox96® (*Promega* G1780) (De Michele *et al.*, 2017; Keshaw *et al.*, 2005; Korzeniewski & Callewaert, 1983). O ensaio foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante. Resumidamente, após 24, 48 e 72 horas de cultura, o sobrenadante de cada condição foi coletado e armazenado a -20°C. No dia do ensaio, o reagente CytoTox96® foi preparado misturando o tampão com a mistura de substrato. Para testar os efeitos da cultura, 50 µL de meio de cultura foram transferidos para uma placa de 96 poços, misturados com 50 µL de reagente CytoTox96® e incubados por 30 minutos, protegidos da luz. Depois disso, 50 µL de “solução de STOP” foram adicionados a cada poço e a densidade ótica (OD, do inglês, *optical density*) foi medida no comprimento de onda de 490 nm usando um leitor de microplacas EnSpire™ *Multimode Plate Reader* (*PerkinElmer*). O ensaio foi realizado em triplicado para cada condição. Os valores de absorvância foram normalizados para valores médios de absorvância calculados a partir de amostras de controlo.

V.1.11. Análise estatística

Foi utilizado o software *G*Power* versão 3.1.9.4 para estimar o número de fragmentos de tecido ovárico a utilizar nesta tarefa. Foi considerada a comparação dos resultados entre os sete grupos descritos, com erro tipo I de 0,05 e poder estatístico de 0,90, para um tamanho de efeito de 0,60. Dessa forma, estimou-se um tamanho da amostra total de 66 fragmentos (9,4 por grupo), com poder efetivo de 0,901. Consequentemente, foram utilizados 10 hemiovários por grupo.

Utilizou-se o programa SPSS versão 22.0 (IBM) para a análise estatística. Para comparar os grupos 2D e 3D, foi realizada uma regressão linear simples ao longo do tempo usando uma estratégia de *bootstrapping* (1000 amostras). Foi reportado o coeficiente de regressão (B), que representa a inclinação. Um valor B positivo significa um aumento ao longo do tempo, enquanto um valor negativo significa uma diminuição. Por exemplo: $p < 0,001$; $B = 0,033$; $R^2_{adj} = 0,663$, significa que, por hora, há um aumento significativo de 0,033 (B) na variável analisada e o modelo linear explica 66% (R^2_{adj}) da variação ao longo do tempo.

A distribuição normal foi avaliada para comparar os dois grupos de estudo, que visualmente mostraram ter diferença. As variáveis com distribuição normal foram comparadas por meio do teste t de *Student* e aquelas cuja distribuição não era normal foram avaliadas por meio do teste de *Mann-Whitney*. Foi considerado estatisticamente significativo um valor de p inferior a 0,05. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (SEM).

V.2. Resultados

V.2.1. Morfologia e viabilidade do tecido

Durante as 72 horas de cultura, observou-se degeneração da morfologia tecidual, avaliada pelas características morfológicas do tecido corado com hematoxilina-eosina.

No exame histopatológico do tecido foi desenvolvido um *score* de avaliação da viabilidade do tecido, que incluiu três parâmetros morfológicos: edema intersticial, degeneração dos folículos e percentagem de tecido em necrose. Cada parâmetro foi pontuado usando uma escala de 0 a 3 conforme representado na Figura 10.

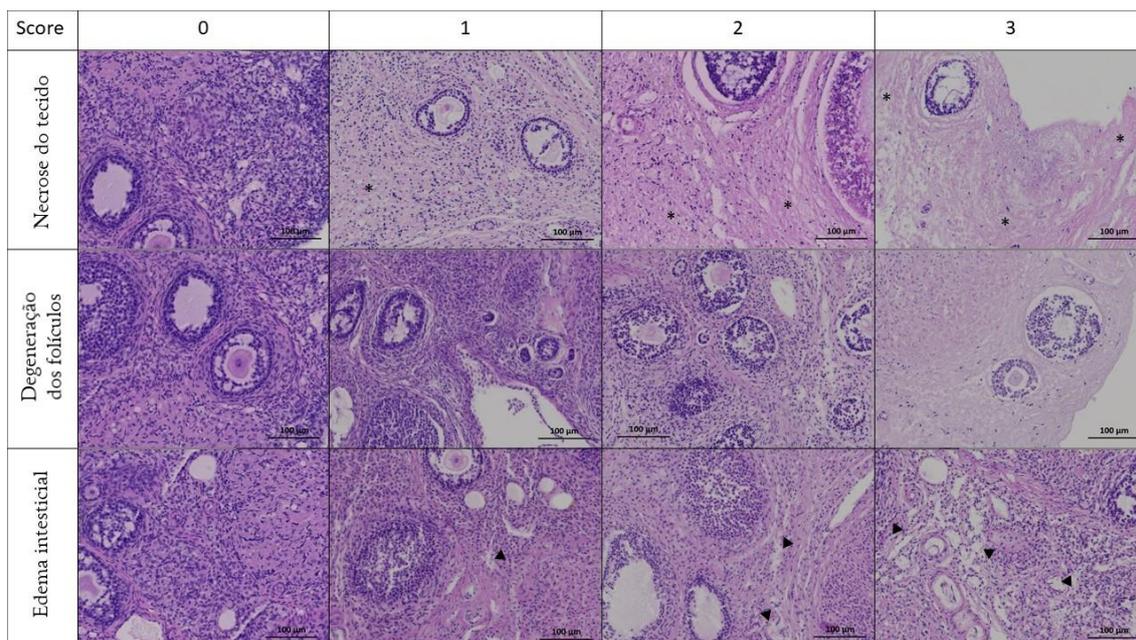


Figura 10. *Score* histopatológico representado em secções de tecido ovário corado com hematoxilina-eosina. As imagens mostram áreas de necrose tecidual (*), degeneração folicular e edema intersticial (►). Foi aplicado um sistema de pontuação, com a seguinte correspondência: nenhum = 0, leve = 1, moderado = 2 e grave = 3. A ampliação é de 100× e a barra de escala é de 100 μm .

Ao longo do tempo, verificou-se um aumento significativo no *score* de todos os parâmetros, como apresentado na Figura 11.

O aumento da necrose, representado na Figura 11.A, foi maior na cultura 3D ($p < 0,001$; $B = 0,033$; $R^2 \text{adj} = 0,663$) do que na 2D ($p < 0,001$; $B = 0,023$; $R^2 \text{adj} = 0,381$). Após 72 horas de cultura, o tecido mantido em cultura no *scaffold* de alginato (3D) apresentou maior percentagem de necrose (2D = $1,700 \pm 0,291$ vs. 3D = $2,550 \pm 0,138$, $p = 0,017$).

A quantidade de folículos degenerados também aumentou ao longo do tempo de cultura e foi muito semelhante nos dois modelos, como está representado na Figura 11.B (2D, $p < 0,001$; $B = 0,028$; $R^2 \text{adj} = 0,617$; 3D, $p < 0,001$; $B = 0,031$; $R^2 \text{adj} = 0,696$).

Quando analisada a presença de edema intersticial, observou-se maior aumento na cultura 3D (2D, $p = 0,001$; $B = 0,018$; $R^2 \text{adj} = 0,253$; 3D, $p < 0,001$; $B = 0,024$; $R^2 \text{adj} = 0,428$). Ao fim de 72 horas de cultura, o edema intersticial foi mais evidente no grupo 3D em comparação ao 2D (2D = $2,000 \pm 0,224$ versus 3D = $2,650 \pm 0,130$;

$p=0,035$). Estes resultados são reportados graficamente na Figura 11.C.

O *score* histopatológico é o somatório dos três parâmetros de lesão tecidual. Em concordância com os resultados isolados, a avaliação total de todos os parâmetros também evidenciou um aumento do *score* histopatológico ao longo do tempo em ambos os grupos. Através da análise da Figura 11.D, verifica-se que o aumento foi mais acentuado na cultura 3D ($p<0,001$; $B=0,088$; $R^2_{adj}=0,657$) do que na 2D ($p<0,001$; $B=0,069$; $R^2_{adj}=0,477$). Além disso, após 72 horas de cultura, a pontuação total também foi significativamente maior na cultura 3D do que na cultura 2D (2D= $6,200\pm 0,569$ versus 3D= $8,050\pm 0,302$; $p=0,01$).

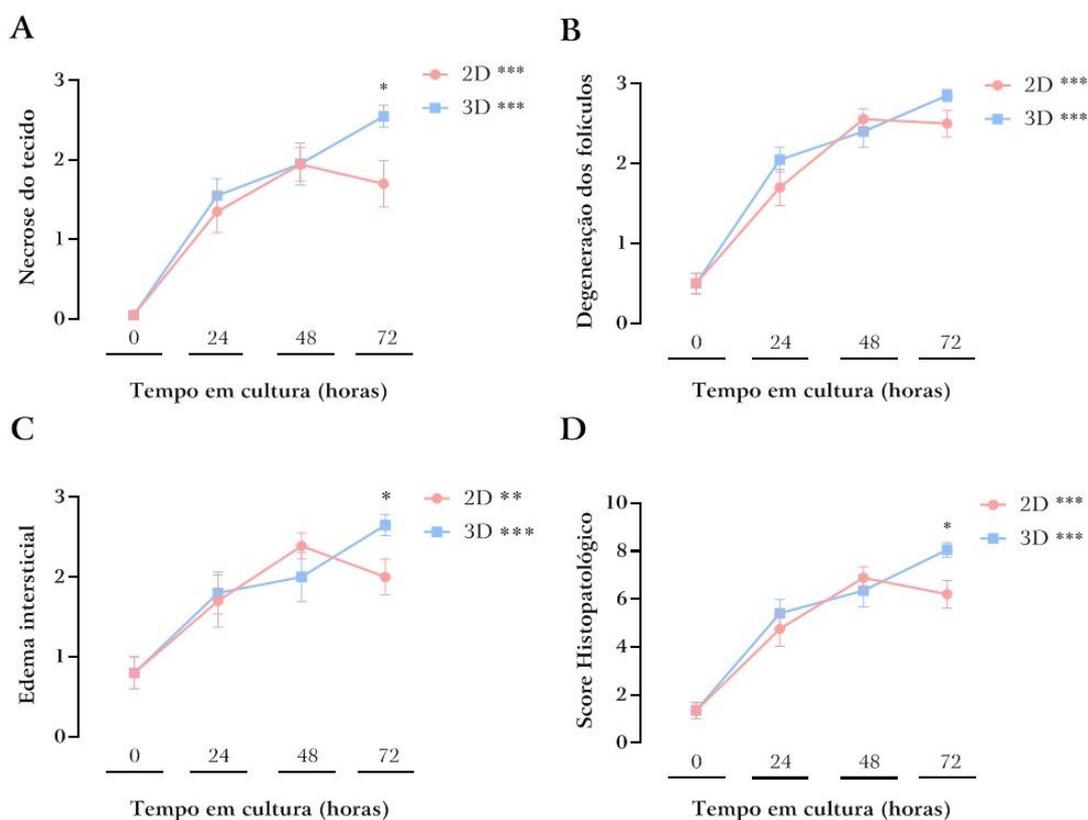


Figura 11. Resultados do *score* histopatológico quanto a necrose do tecido (A), degeneração folicular (B), edema intersticial (C) e *score* histopatológico total (D). Foi realizada uma regressão linear para os grupos 2D e 3D e as inclinações correspondentemente mostram um aumento ao longo do tempo. Além disso, foi realizada uma comparação às 72 horas através da aplicação do teste t, que mostra diferenças estatísticas. Os resultados apresentados na forma de média \pm SEM. A significância estatística está representada com * para $p<0,05$, ** para $p<0,01$ e com *** para $p<0,001$. Os asteriscos (*) ao logo da curva representa diferenças significativas entre o 2D e o 3D para aquele tempo de cultura, enquanto os asteriscos (*) junto à legenda representam diferenças significativas na regressão linear para cada grupo.

A citotoxicidade foi avaliada pela quantidade de LDH no meio de cultura. Durante o período de estudo e conforme representado na Figura 12, não houve alterações na quantidade de LDH. Após 24 horas de cultura, a quantidade de LDH libertada foi menor na cultura com a matriz de alginato do que na cultura convencional ($1,165 \pm 0,102$ versus $1,665 \pm 0,107$; $p=0,006$). No entanto, não foram encontradas diferenças entre 48 e 72 horas de cultura.

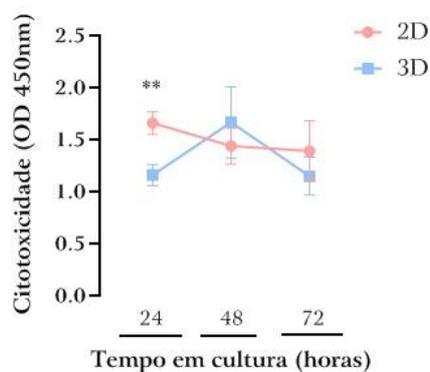


Figura 12. Citotoxicidade no tecido analisada através da libertação de LDH para o meio de cultura. Os resultados são apresentados na forma de média de densidade ótica (OD) \pm SEM. Às 24 horas de cultura foi realizada uma comparação usando o teste t, que mostra diferenças estatísticas. A significância estatística está representada com ** para $p < 0,01$. Os asteriscos (*) ao longo da curva representa diferenças significativas entre o 2D e o 3D para aquele tempo de cultura.

V.2.2. Efeito nos folículos

As secções de tecido ovárico corado com hematoxilina-eosina foram submetidas a avaliação folicular segundo a classificação de Gougeon, como representando na Figura 13.

Observou-se que a densidade de folículos morfologicamente normais se manteve inalterada durante as 72 horas de cultura. Estes resultados estão representados na Figura 14.A. No entanto, a densidade de folículos atresícos aumentou significativamente em ambos os grupos, sem diferenças relativamente ao tipo de cultura (2D, $p=0,027$; $B=0,007$; $R^2_{adj}=0,102$; 3D, $p < 0,001$; $B=0,009$; $R^2_{adj}=0,412$, Figura 14.B).

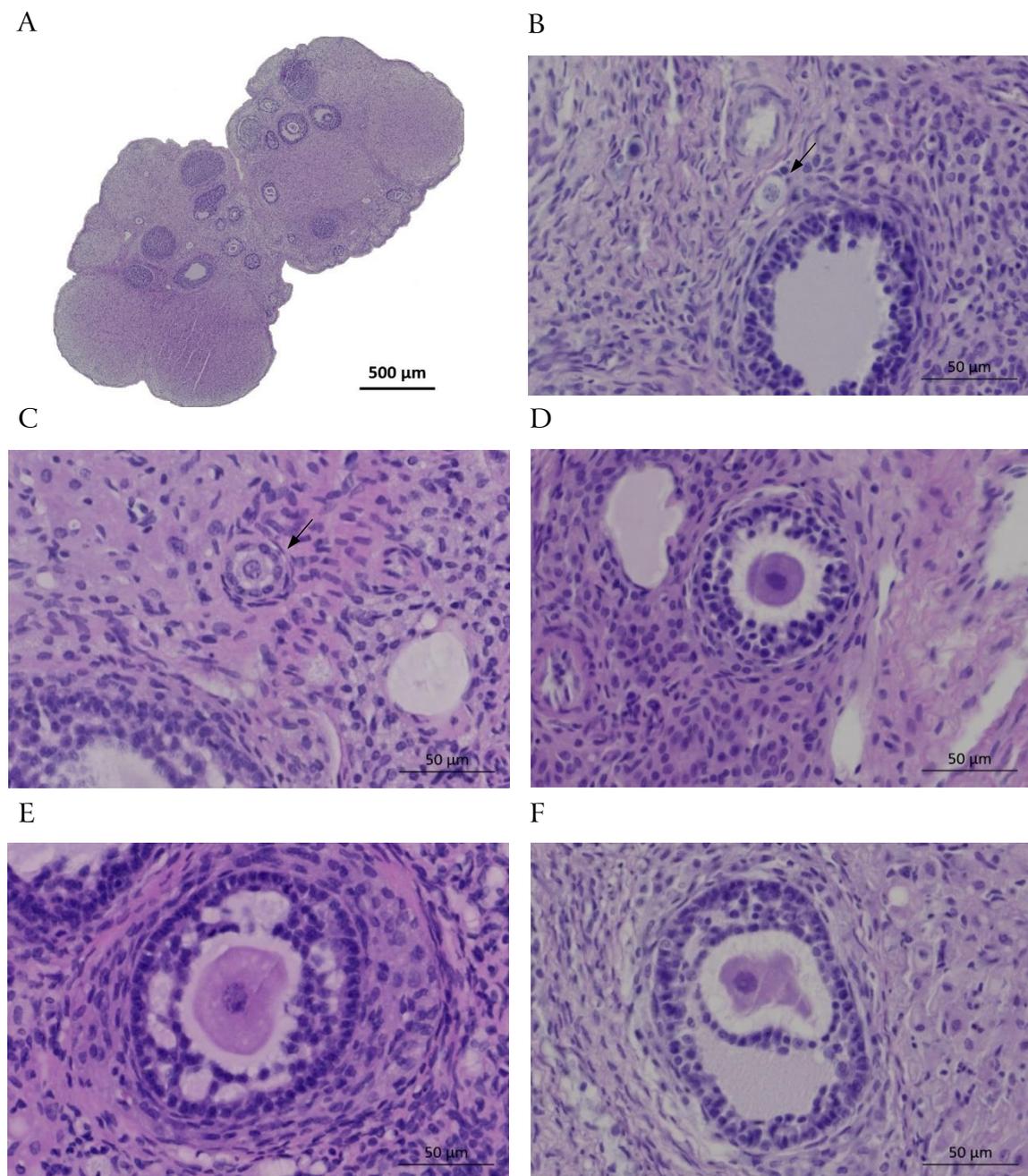


Figura 13. Imagens representativas dos folículos coradas com hematoxilina-eosina. É possível identificar numa secção de tecido ovárico (A) vários folículos em diferentes estádios de desenvolvimento: folículo primordial (B, seta), folículo primário (C, seta), folículo secundário (D), folículo pré-antral (E) e folículo antral (F). A ampliação da figura A é de 10× com barra de escala de 500 μm e das restantes é de 200× com a barra de escala de 50 μm.

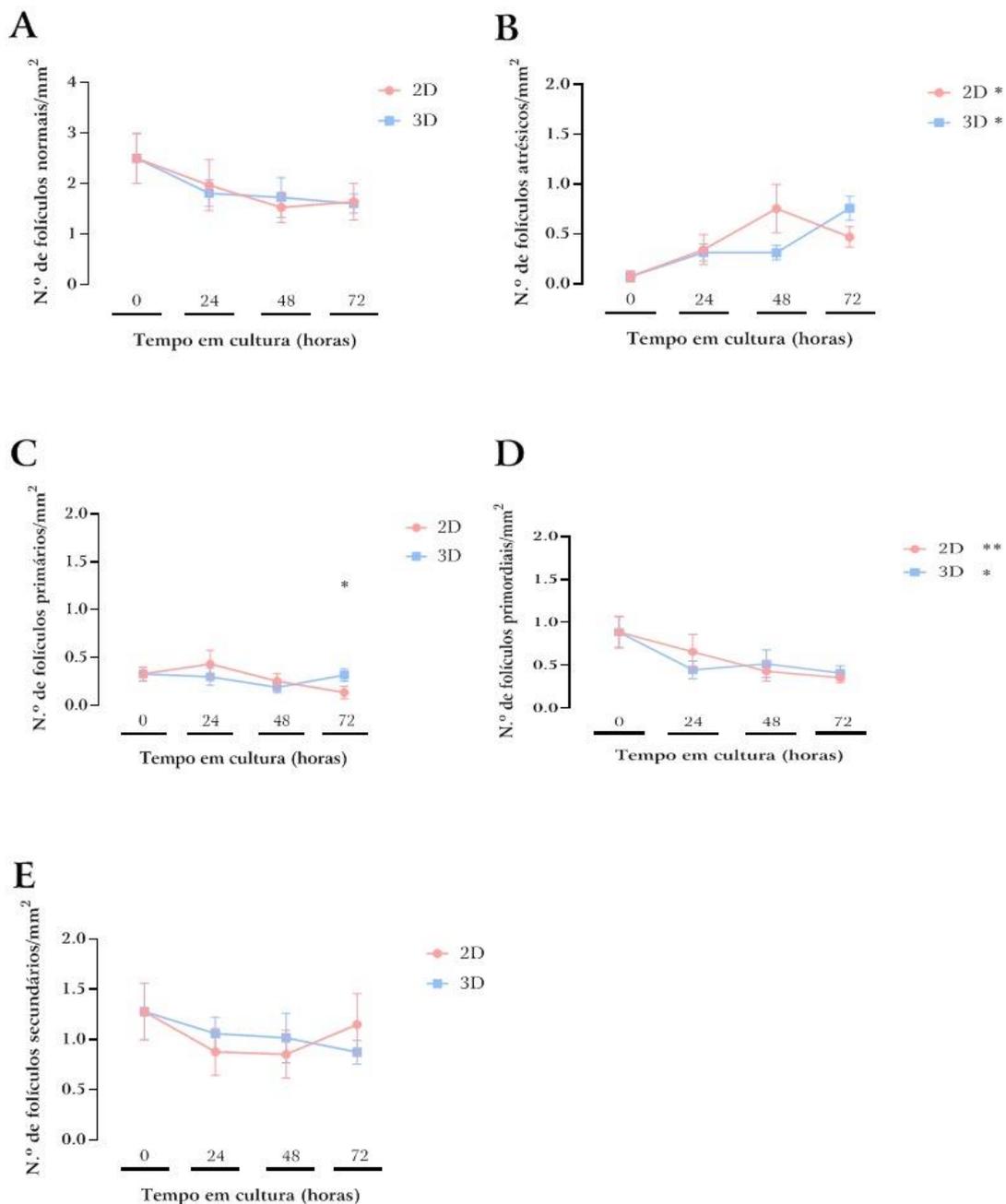


Figura 14. Análise folicular do tecido ovário mantido em cultura convencional comparativamente com a cultura na matriz de alginato. Densidade dos folículos classificados como normais (A) e atrésicos (B) de acordo com a morfologia do ovócito e das células da granulosa. Densidade dos folículos primordiais (C), primários (D) e secundários (E). Uma regressão linear foi realizada para os grupos 2D e 3D e suas inclinações correspondentes mostram um aumento ao longo do tempo nos folículos atrésicos e uma diminuição nos folículos primordiais. Adicionalmente, foi feita uma comparação entre 2D e 3D às 48 e 72 horas através do teste t, que mostra diferenças estatísticas para a densidade de folículos primários às 72 horas. Os resultados são apresentados na forma de média \pm SEM. A significância estatística está representada com * para $p < 0,05$ e ** para $p < 0,01$. Os asteriscos (*) ao longo da curva representa diferenças significativas entre o 2D e o 3D para aquele tempo de cultura, enquanto os asteriscos (*) junto à legenda representam diferenças significativas na regressão linear para cada grupo.

Em relação à classificação folicular, verificou-se diminuição significativa de folículos primordiais em ambos os tipos de cultura (2D, $p=0,009$; $B=-0,008$; $R^2_{adj}=0,169$; 3D, $p=0,036$; $B=-0,006$; $R^2_{adj}=0,11$; Figura 14.C). A densidade de folículos primários e secundários permaneceu a mesma durante as 72 horas de cultura e está representada nas Figura 14.D e E, respetivamente. Após 72 horas de cultura, a densidade de folículos primários foi significativamente maior nas amostras do grupo de cultura 3D ($2D=0,138\pm0,064$ versus $3D=0,318\pm0,063$ folículos/ mm^2 ; $p=0,035$; Figura 14.D).

V.2.3. Proliferação e apoptose no tecido ovárico

A marcação anti-Ki67 e anti-caspase 3 por imunohistoquímica permitiu avaliar a proliferação e a apoptose, respetivamente. Na Figura 15 está representada a marcação no estroma e na Figura 16 a marcação folicular.

A percentagem de folículos proliferativos manteve-se idêntica durante o período de estudo em ambos os grupos, como apresentado na Figura 17.A. No entanto, a proliferação das células do estroma diminuiu significativamente na cultura 3D ($p=0,001$; $B=-0,003$; $R^2_{adj}=0,220$; Figura 17.B). A percentagem de apoptose permaneceu sem diferenças significativas, como pode ser constatado na Figura 18.

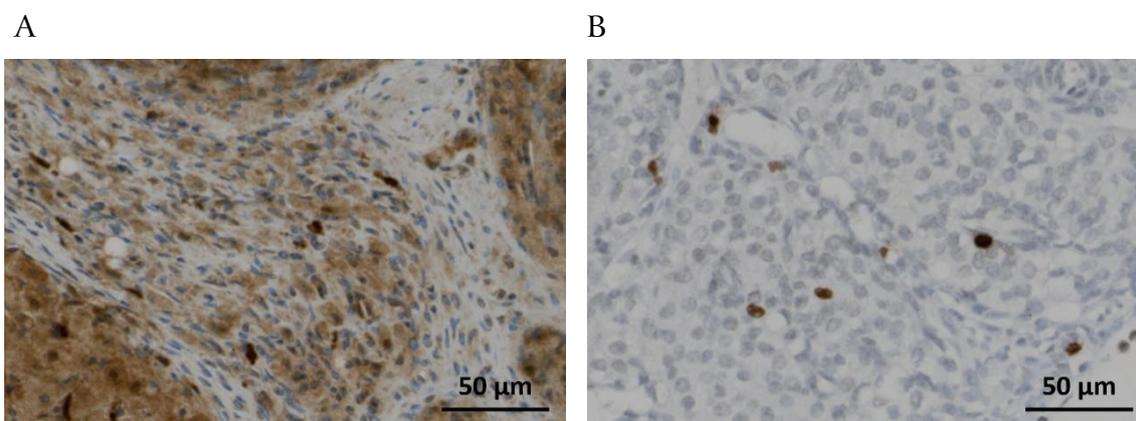


Figura 15. Marcação imunohistoquímica do estroma do tecido ovárico para Ki67 (A) e caspase 3 (B). A ampliação é de 200× e a barra de escala é de 50 µm.

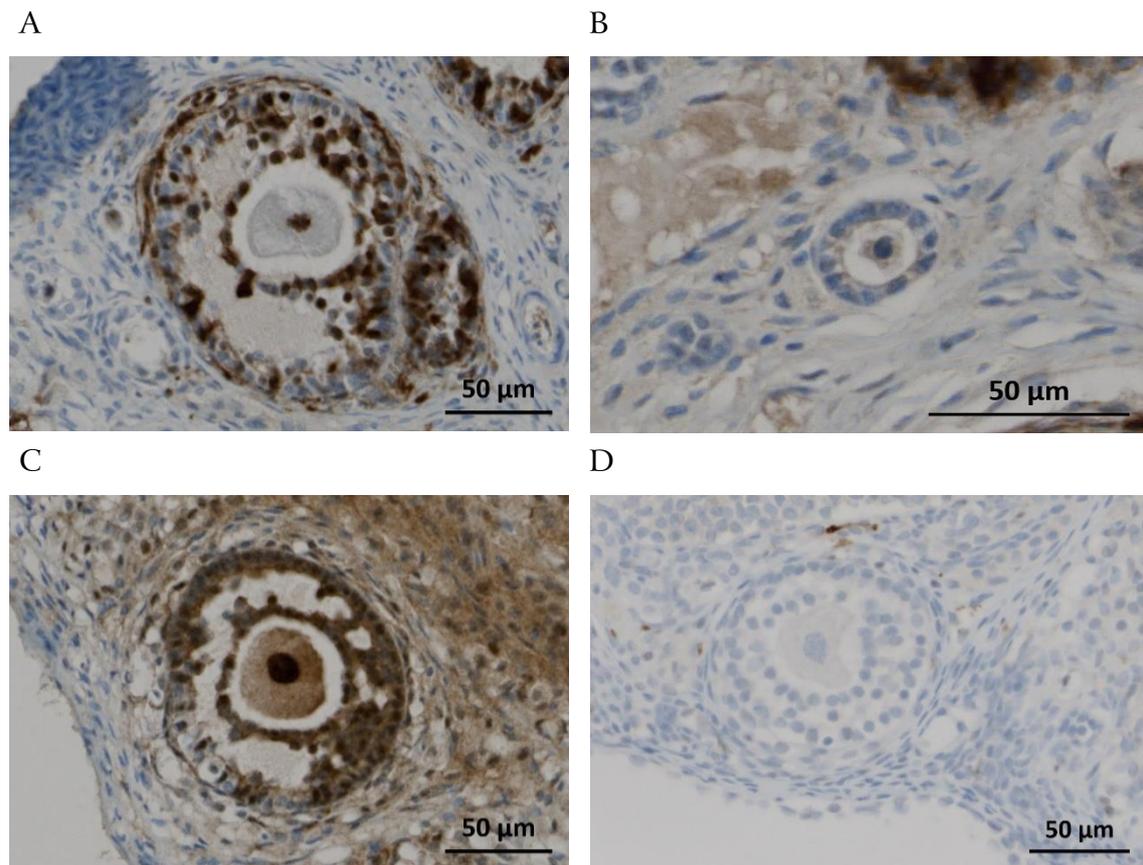


Figura 16. Marcação imunohistoquímica dos folículos. Estão representados os folículos positivos e negativos para Ki67 (A e B) e caspase 3 (C e D). A ampliação é de 200× (A, C, D) e 400× (B), com a barra de escala de 50 µm.

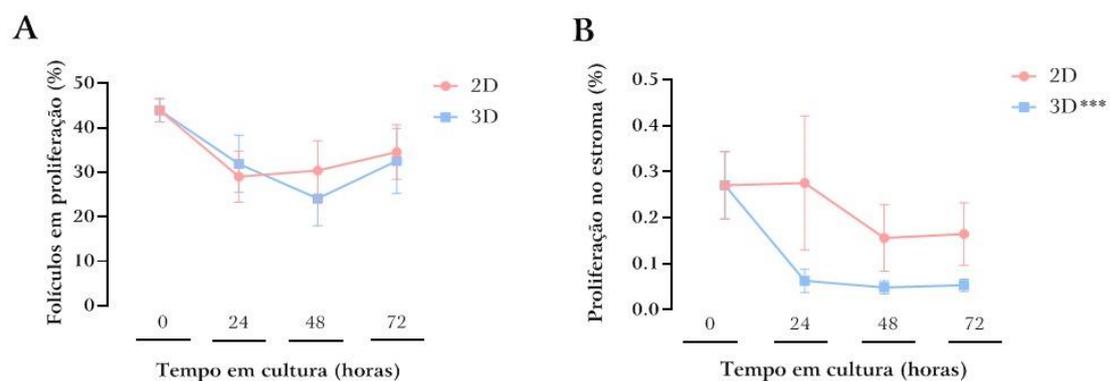


Figura 17. Proliferação no tecido ovárico avaliada pela coloração de Ki67 nos folículos (A) e células do estroma (B). Foi realizada uma regressão linear para os grupos 2D e 3D e suas inclinações correspondentes mostram uma diminuição ao longo do tempo na proliferação das células do estroma para o grupo 3D. Os resultados são apresentados na forma de média \pm SEM. A significância estatística está representada com *** para $p < 0,001$. Os asteriscos (*) junto à legenda representam diferenças significativas na regressão linear para cada grupo.

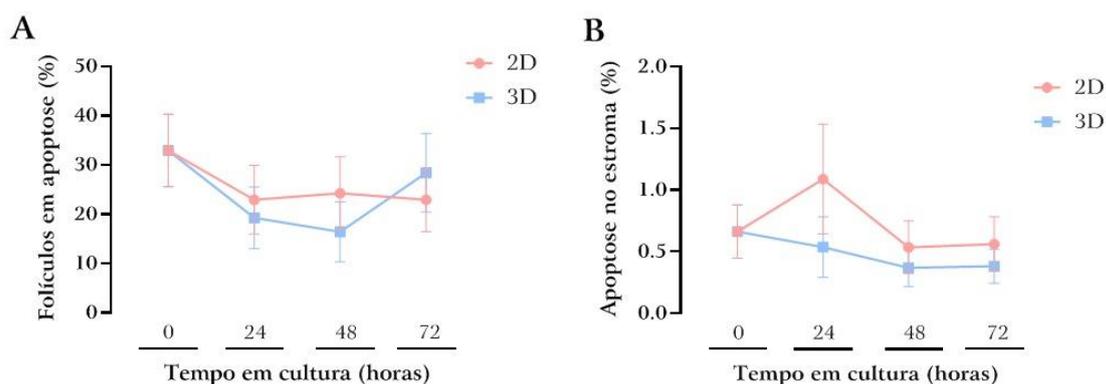


Figura 18. Apoptose do tecido ovárico avaliada pela coloração da caspase 3 em folículos (A) e células do estroma (B). Os resultados são apresentados na forma de média \pm SEM.

V.3. Discussão

Nesta tarefa foram avaliadas duas metodologias de cultura de tecido ovárico. Os resultados revelaram que a cultura de fragmentos de tecido ovárico mantém a integridade e a estrutura tridimensional dos folículos sustentados pelo estroma. A possibilidade de atingir o desenvolvimento completo do ovócito *in vitro* tem impulsionado a investigação nesta área. O córtex ovárico é o principal reservatório de folículos primordiais, que determina o tempo de vida fértil da mulher (Wagner *et al.*, 2020; Yin *et al.*, 2016).

A unidade morfofuncional do ovário são os folículos. Estes são compostos por um ovócito circundado por células da granulosa e da teca. A foliculogênese é um processo complexo, que ocorre no córtex ovárico e envolve um diálogo permanente entre o ovócito e as células vizinhas, que implica uma sinalização bidirecional autócrina e parácrina, envolvendo diversos fatores, nomeadamente a hormona anti-Mülleriana, a proteína morfogenética óssea (BMP, do inglês, *bone morphogenetic protein*), o fator de crescimento e diferenciação celular (GDF, do inglês, *growth differentiation factor*), TGF- β , a inibina, a activina e a folistatina (Baerwald *et al.*, 2012; Belli *et al.*, 2012; Monniaux *et al.*, 2018).

A manutenção da natureza tridimensional do folículo durante todo o processo de crescimento é crucial para manter estas interações. Assim, a investigação em cultura de folículos tem mudado de 2D para o uso de estruturas 3D (Belli *et al.*, 2012). Ao preservar a arquitetura 3D do folículo, através do uso de uma matriz, são mimetizadas as condições *in vivo*, com acesso variável a oxigénio e a nutrientes (Belli *et al.*, 2012; Kapalczyńska *et al.*, 2018). Este modelo de cultura contribui para preencher a lacuna entre a cultura convencional de células e os modelos animais (Jensen & Teng, 2020).

Com o objetivo de manter a estrutura tridimensional do tecido, e assim promover melhores condições de desenvolvimento folicular, foi desenvolvida uma matriz de alginato para cultura de tecido ovárico e desenhado um *score* de avaliação histopatológica que permite avaliar a viabilidade do tecido em cultura.

Durante muitos anos, a investigação na área do ovário esteve focada na foliculogénese. Recentemente o estroma ovárico tornou-se um novo foco de investigação, crítico para a compreensão da dinâmica complexa da fisiologia do ovário. (Kinnear *et al.*, 2020). O estroma divide-se pela medula e pelo córtex do ovário. No córtex ovárico, o estroma desempenha um papel importante na ativação dos folículos primordiais, através de vias de sinalização que atingem o folículo através da microvascularização (Monniaux *et al.*, 2018). Além disso, o estroma também influencia o crescimento dos folículos. A teca vascularizada diferencia-se pelo recrutamento de células progenitoras presentes no córtex ovárico, imediatamente adjacentes ao folículo (Monniaux *et al.*, 2018; Scott *et al.*, 2004).

A cultura de fragmentos de um órgão permite aumentar o número de experiências com um único animal, através da criação de várias culturas a partir de um único órgão (King *et al.*, 2011). Apesar de terem sido desenvolvidas muitas abordagens de cultura para diferentes modelos animais, o modelo ideal ainda não foi alcançado (Desai *et al.*, 2010; Smitz *et al.*, 2010). A cultura de tecido ovárico *in vivo-like* foi descrita como uma metodologia inovadora e promissora para o crescimento de folículos *in vitro*, com a utilização de matrigel para criar a estrutura 3D. A metodologia da cultura é simples e permite reconstituir o microambiente ovárico ou manipular algumas condições para induzir o crescimento folicular (Fathi *et al.*, 2017; Higuchi *et al.*, 2015). A cultura deste

tipo de tecidos em hidrogéis de alginato fornece suporte mecânico para manter a arquitetura tridimensional do tecido, enquanto o próprio gel não interage com as células (King *et al.*, 2011).

No nosso modelo, o tecido ovárico foi mantido em cultura numa matriz de alginato. Este material tem sido amplamente utilizado para a cultura *in vitro* de folículos isolados em murganhos (Pangas *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2006) e ratos (Heise *et al.*, 2005). A matriz de alginato oferece várias vantagens sobre outros tipos de matrizes. É uma matriz natural biocompatível e bioativa que flutua em meio de cultura de células e fornece suporte mecânico para tecidos em crescimento (Jackson *et al.*, 2009; King *et al.*, 2011). As suas propriedades bioquímicas, físicas e biológicas tornam-na uma boa candidata para modelos 3D. A dissolução desta matriz é fácil de controlar, permitindo a recuperação de células e/ou tecidos. Por último é uma matriz transparente, o que permite a avaliação microscópica (King *et al.*, 2011). As características físicas da rede de poros da matriz de alginato permitem a difusão bidireccional de nutrientes e substâncias de excreção que são essenciais para a sobrevivência dos tecidos e também para o desenvolvimento folicular (Amorim *et al.*, 2009; Andersen *et al.*, 2015).

A biocompatibilidade do alginato foi intensamente investigada usando modelos *in vitro* e *in vivo*, tendo sido descrita como não induzindo uma resposta imune (Orive *et al.*, 2002), primeiro devido à ausência de recetores celulares que reconheçam o alginato e segundo devido à elevada pureza do alginato utilizado. A purificação em várias etapas garante um elevado nível de pureza, diminuindo a presença de metais pesados, de endotoxinas, de proteínas e de compostos polifenólicos (K. Y. Lee & Mooney, 2012). Apesar da segurança deste composto, o seu uso generalizado tem sido limitado por algumas contradições dos resultados dos vários estudos, relacionadas com diferentes modelos de cultura ou modelos animais, diferentes locais de implantação, bem como outras características relacionadas com o próprio composto como o tamanho molecular, a carga e a viscosidade (Orive *et al.*, 2002).

No nosso trabalho, a cultura do tecido ovárico condicionou uma deterioração global da viabilidade tecidual, aferida através da avaliação histopatológica (Figura 11). Esta deterioração é dependente do tempo e é comum a ambos os modelos. Em concordância

com outros trabalhos publicados (Gurski *et al.*, 2009), nas primeiras 48 horas não se verificaram diferenças entre a cultura no modelo 2D e 3D (Gurski *et al.*, 2009). No entanto, após 72 horas verificou-se uma diminuição significativa na viabilidade, no modelo 3D. Este resultado já foi descrito anteriormente, uma vez que no modelo 3D, o tecido apresenta três camadas, a camada externa com alta taxa de proliferação, a camada intermediária com células senescentes e o volume central hipóxico. Esta organização afeta o fornecimento de oxigénio e de nutrientes, retendo os produtos de excreção produzidos (Edmondson *et al.*, 2014; Hoarau-Véchet *et al.*, 2018). Assim, uma possível explicação para a perda da viabilidade tecidual após 72 horas de cultura no modelo 3D é a retenção dos produtos de excreção produzidos, que poderá induzir um défice no fornecimento de oxigénio e de nutrientes (Hoarau-Véchet *et al.*, 2018).

Para estabelecer uma avaliação histopatológica detalhada, desenvolveu-se um *score* baseado na avaliação de três parâmetros histológicos: a necrose do tecido, a degeneração dos folículos e o edema intersticial (Asfour *et al.*, 2015; Eser *et al.*, 2015; Guven *et al.*, 2010).

A necrose do tecido e o edema intersticial são parâmetros intimamente relacionados. A necrose é um processo de morte celular não programada, que se inicia com o edema da célula e resulta na rotura da membrana celular com consequente libertação do conteúdo citoplasmático da célula para o espaço extracelular. Este fenómeno cria um movimento extracelular de fluídos (S. Y. Lee *et al.*, 2018), que se relaciona com o edema, uma vez que corresponde ao líquido intercelular. Os nossos resultados mostram um aumento da necrose do tecido e do edema intersticial ao longo do tempo em ambos os modelos. Decorridas 72 horas de cultura, o aumento do edema e da necrose foi maior na cultura 3D. No interior da estrutura 3D, a biodisponibilidade de oxigénio e nutrientes pode ser limitada, o que afeta a sobrevivência celular ao longo do tempo e condiciona maior necrose e libertação do conteúdo intracelular (Hoarau-Véchet *et al.*, 2018).

No que diz respeito à avaliação folicular, detetou-se um nível acentuado de degeneração (Figura 11.B), sem diferenças entre os modelos. Uma análise detalhada da densidade e da classificação folicular, revelou um aumento da atresia folicular

(Figura 14.B) associado à diminuição dos folículos primordiais (Figura 14.C). Estes resultados estão de acordo com trabalhos anteriores, que mostraram um aumento, dependente do tempo, de atresia folicular em cultura (Otala *et al.*, 2002).

Para quantificar a citotoxicidade, realizou-se o ensaio de LDH a partir do meio de cultura. Este ensaio é baseado na capacidade da LDH de converter piruvato em lactato enquanto consome NADH (Khattak *et al.*, 2006). Na Figura 12 demonstra-se a detecção e quantificação da LDH no meio em ambos os modelos. Nas primeiras 24 horas, o modelo 3D apresenta baixa citotoxicidade quando comparado com a cultura convencional. Com a continuidade da cultura os níveis de citotoxicidade tornaram-se semelhantes em ambos os modelos. Este efeito pode ocorrer devido à retenção de LDH na matriz de alginato condicionada pelo seu elevado peso molecular (140 kDa) (Javed *et al.*, 1997). A resistência à difusão da matriz de alginato foi descrita pela primeira vez, em 2006, numa linha celular de células de carcinoma hepático (HepG2) encapsuladas em esferas de alginato (Khattak *et al.*, 2006). Embora a matriz de alginato tenha uma elevada porosidade, permitindo a difusão de pequenos substratos (peso molecular < 20 kDa) com a mesma velocidade da água (Brito *et al.*, 2014), algumas proteínas com maior peso molecular, como a albumina (69 kDa), têm uma difusão mais baixa. Assim, a LDH pode ser retida por mais tempo na estrutura esferoide.

A expressão de Ki67 está relacionada com a atividade mitótica e com a proliferação. A diferença na proliferação entre os modelos 2D e 3D foi descrita anteriormente. As culturas celulares em sistema 3D mostraram uma proliferação reduzida quando comparadas com o modelo 2D, onde proliferaram com velocidade anormalmente rápida (Jensen & Teng, 2020). Estes efeitos são dependentes do modelo 3D e mais especificamente da matriz, e também dependentes das propriedades específicas das células (Edmondson *et al.*, 2014; Jensen & Teng, 2020). No âmbito da preservação da fertilidade, este efeito também foi descrito na cultura de folículos *in vitro*. Alguns autores descreveram que as propriedades físicas das matrizes de alginato podem limitar o crescimento e o desenvolvimento de folículos secundários (Higuchi *et al.*, 2015; King *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2006). Através da análise imunohistoquímica, verificou-se uma percentagem de proliferação diferente quando são comparados os modelos 2D e 3D

de cultura de tecido ovárico. A rigidez da matriz de alginato pode ser uma possível explicação para a diminuição da proliferação (Fathi *et al.*, 2017). Foram propostas matrizes mais macias com menores concentrações de alginato (Xu *et al.*, 2006) ou a combinação de diferentes elementos na matriz para permitir mais espaço e a difusão de macromoléculas essenciais à sobrevivência e crescimento do tecido (Higuchi *et al.*, 2015).

A morte celular foi avaliada pela marcação com um anticorpo anti-caspase 3. A caspase 3 é uma protéase bem caracterizada, que desempenha um papel efetivo na apoptose (G. M. Cohen, 1997; M. R. Hussein, 2005). A apoptose é um processo central na função e desenvolvimento do ovário, que ocorre desde a vida fetal até a vida adulta. No feto, a apoptose é detetada apenas no ovócito, mas mais tarde, na mulher adulta, atinge também as células da granulosa de folículos em crescimento (M. R. Hussein, 2005; Milenkovic *et al.*, 2012). A expressão da caspase 3 já foi estudada em células da granulosa (Izawa *et al.*, 1998) e da teca (Krajewska *et al.*, 1997) e também em ovócitos (Otala *et al.*, 2002). Neste trabalho, a apoptose foi avaliada em células do estroma e nos folículos. O nível de apoptose no tecido manteve-se sem alterações significativas durante o tempo da experiência sem diferença entre as condições (modelo 2D vs. 3D), conforme os resultados apresentados na Figura 18.

Em síntese, a cultura de tecido ovárico na matriz de alginato foi semelhante à cultura convencional, no que diz respeito à densidade folicular, proliferação de células foliculares e apoptose celular em folículos e estroma. No entanto, após 72 horas, na cultura 3D foram observados níveis mais acentuados de lesão do tecido e edema, bem como menor proliferação de células do estroma.

Assim, para culturas de curta duração (até 48 horas), os dois modelos são semelhantes. A cultura 3D de tecido ovárico tem como desvantagem ser mais demorada, difícil de realizar e menos reprodutível. Contudo, este modelo pode ser equacionado quando se pretende avaliar o efeito de um determinado estímulo terapêutico *in vitro*, uma vez que com a sua administração na matriz poderá ser possível um maior contacto das moléculas com as células ou o tecido.

Para estudos *in vivo*, nomeadamente no âmbito do transplante de tecido ovárico, também têm sido utilizadas matrizes que permitem realizar o cotransplante do tecido com moléculas (M. M. Fransolet *et al.*, 2015; J.-M. Gao *et al.*, 2013; J. Gao *et al.*, 2015; Henry *et al.*, 2015; Labied *et al.*, 2013; Shikanov *et al.*, 2011; Tanaka *et al.*, 2018) ou células (Manavella, Cacciottola, Desmet, *et al.*, 2018; Xia *et al.*, 2015; Y. Zhang *et al.*, 2017), com o intuito de diminuir a isquemia ou a ativação folicular. A matriz de alginato desenvolvida nesta tarefa pode ser uma alternativa a outras matrizes descritas na literatura, com a vantagem de ser biocompatível e com resultados equivalentes ao modelo de cultura convencional *in vitro*.

CAPÍTULO VI. Criopreservação de tecido ovárico

Parte dos resultados apresentados ao longo desta secção foram realizados em conjunto com a aluna Maria Carolina Pereira Reis, no âmbito da sua Dissertação de Mestrado em Bioquímica.

A criopreservação permite manter os tecidos ou as células quiescentes, através da conservação a temperaturas muito baixas. Este estado de suspensão da atividade biológica pode manter o material preservado indefinidamente. Em concordância com esta premissa, a lesão nas células ou nos tecidos não é causada pelo tempo de armazenamento, mas sim pelo processo de congelação e descongelação. A formação de cristais de gelo é a principal fonte de lesão e de morte celular (Barrett & Woodruff, 2010; Campos *et al.*, 2011; Pegg, 2007). As técnicas disponíveis para criopreservação são a congelação lenta e a vitrificação. A congelação lenta é uma técnica mais morosa e que necessita de equipamento dispendioso, contudo utiliza menor concentração de crioprotetores. A vitrificação tem sido proposta como uma alternativa, mais rápida, mais barata e mais fácil, porém requer concentrações mais elevadas de crioprotetores (El Cury-Silva *et al.*, 2021; Herraiz *et al.*, 2020).

Em medicina da reprodução, o desenvolvimento das técnicas de criopreservação permitiu otimizar os resultados dos protocolos de estimulação ovárica, com a estratégia de criopreservação de embriões, evitando assim a necessidade de descartar o excesso de gâmetas ou de embriões. No âmbito da preservação da fertilidade e, em paralelo, com o aumento da sobrevivência dos doentes, tem havido a necessidade de aperfeiçoar os métodos de criopreservação, de modo a garantir o melhor sucesso das técnicas (Barrett & Woodruff, 2010). A criopreservação de embriões para preservação da fertilidade não é recomendada, pois não garante a autonomia reprodutiva e suscita questões éticas (Dolmans & Donnez, 2021; Henry *et al.*, 2022). Assim, para preservação da fertilidade feminina, as técnicas disponíveis atualmente são a criopreservação de ovócitos e de tecido ovárico.

Para criopreservação de ovócitos, a vitrificação é desde há alguns anos, o procedimento convencional utilizado, pois além da rapidez de execução permite taxas de sobrevivência celular superiores a 80%. A técnica de congelação associa-se a piores resultados devido à lesão dos ovócitos, já que o grande volume citoplasmático aumenta a probabilidade de formação de cristais de gelo intracelulares (Barrett & Woodruff, 2010; Iussig *et al.*, 2019).

A criopreservação de tecido ovárico é mais complexa que a criopreservação de ovócitos,

devido à heterogeneidade do tecido e consequente dificuldade de penetração dos crioprotetores. A técnica mais utilizada é a criopreservação lenta, a qual está associada a efeitos negativos na integridade das células da granulosa e da teca, bem como no estroma ovárico (Herraiz *et al.*, 2020).

Neste capítulo pretendeu-se avaliar o efeito do protocolo de criopreservação utilizado na prática clínica no Serviço de Medicina da Reprodução do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, no tecido ovárico de rato.

VI.1. Materiais e Métodos

O estudo experimental foi realizado no Instituto de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, no biotério do Instituto de Investigação Clínica e Biomédica de Coimbra da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, no Serviço de Medicina da Reprodução do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra e no Laboratório de Oncologia e Hematologia e Clínica Universitária de Hematologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, respeitando todas as disposições legais em vigor no que se refere à experimentação animal. O protocolo experimental foi aprovado pela DGAV depois de parecer favorável do ORBEA do Instituto de Investigação Clínica e Biomédica de Coimbra da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (Anexo III).

VI.1.1. Desenho experimental

Para cumprir o objetivo deste capítulo o tecido ovárico dos ratos foi avaliado a fresco e após criopreservação lenta, imediatamente após a ovariectomia ou após descongelação (0 horas) e após a cultura durante um período de 4 horas, como representado na Figura 19. Assim, foram constituídos 4 grupos, em que o Grupo 1 correspondeu a tecido ovárico fresco (TOF) imediatamente após a descongelação (0

horas), o Grupo 2 correspondeu a TOF após 4 horas em cultura, o Grupo 3 correspondeu a tecido ovárico pós-criopreservação (TOPC) imediatamente após a descongelação e o Grupo 4 correspondeu a TOPC após 4 horas em cultura. De facto, no Grupo 1, o tecido foi avaliado imediatamente após a ovariectomia, no Grupo 2, o tecido foi submetido a cultura e avaliado 4 horas após, no Grupo 3, o tecido foi submetido a congelação e descongelação e avaliado imediatamente após a descongelação e, finalmente, no Grupo 4, o TOPC foi submetido a cultura e avaliado 4 horas após.

Seis hemiovários de cada grupo foram fixados em formaldeído a 4% (*Panreac Quimica Sau*), para avaliação histológica e imunohistoquímica, e os seis restantes foram macerados numa caixa de Petri com o auxílio de agulha e bisturi e transferidos para um tubo com 1 mL de NZYol® (*Nzytech*), para extração de RNA e de DNA e posterior realização do *array*. Todos os procedimentos foram realizados sob condições estéreis.

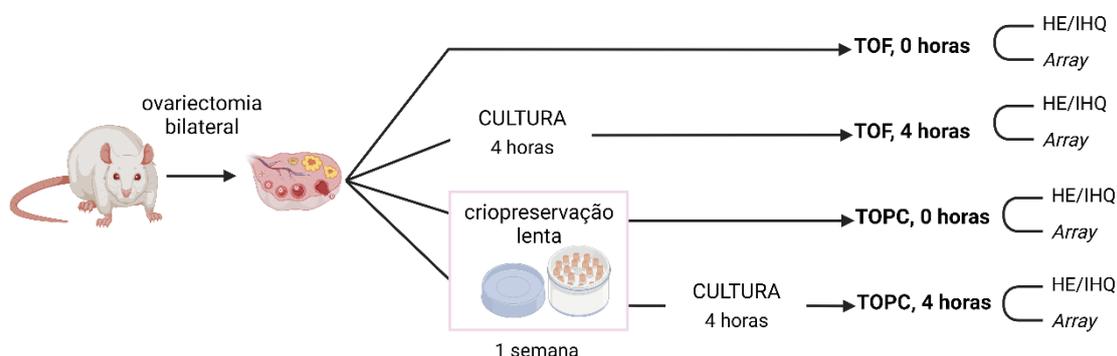


Figura 19. Representação esquemática do desenho experimental. *Created with BioRender.com*. TOF, tecido ovárico fresco; TOPC, tecido ovárico pós-criopreservação; HE, hematoxilina-eosina; IHQ, imunohistoquímica.

VI.1.2. Animais

Nesta experiência foram utilizados 12 ratos fêmea com 8 a 10 semanas de idade da estirpe Rowett Nude (RNU, homozigóticas), como descrito no capítulo V. Os hemiovários foram distribuídos de forma aleatória entre os grupos de estudo.

VI.1.3. Ovariectomia e preparação dos hemiovários

A ovariectomia foi realizada conforme descrito no capítulo V. Os animais foram submetidos a anestesia inalatória com sevoflurano (5%) e posteriormente os ovários foram removidos por laparotomia. No final do procedimento, os animais foram occisados. Cada ovário foi cortado em dois hemiovários. Seis hemiovários foram fixados em formaldeído a 4%, seis foram macerados e colocados em NZYol® (*Nzytech*), 12 foram submetidos a cultura e os restantes foram colocados em solução tamponada fria com DPBS (*Biological Industries*) suplementada com 10% de soro bovino fetal (*Biological Industries*) para criopreservação.

VI.1.4. Protocolos de criopreservação e de descongelação

Foi realizado o protocolo de criopreservação lenta e de descongelação descrito no capítulo V. Imediatamente após a descongelação, seis hemiovários foram fixados em formaldeído a 4% e os outros seis foram macerados e colocados em NZYol®, tendo 12 sido colocados em cultura.

VI.1.5. Cultura de tecido ovárico

Metade dos fragmentos de tecido ovárico de rato utilizados nesta experiência foram submetidos a cultura convencional durante 4 horas, e mantidos à temperatura de 37 °C em ar com 5% de CO₂. O meio de cultura foi constituído por α -MEM (22561-021, *Thermo Fisher Scientific Inc.*) e albumina humana na concentração de 10% (v/v) (*Grifols*).

VI.1.6. Avaliação histológica

Os tecidos fixados em formaldeído foram transportados para o Serviço de Anatomia

Patológica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, onde foram incluídos em parafina e seccionados sequecialmente a cada 5 μm . A análise histológica foi realizada após coloração hematoxilina-eosina (como descrito no capítulo V), por dois investigadores, desconhecedores das condições em estudo, com recurso ao software *Image J*. As lâminas foram observadas no microscópio ótico, Axio Imager.Z2 (*Zeiss*), apresentado na Figura 20, com uma ampliação total de 200 \times e de 400 \times . As imagens do tecido foram adquiridas com a câmara digital AxioCam HRc (*Zeiss*) e processadas com o software *ZEN 2 blue edition* (*Carl Zeiss Microscopy GmbH*, 2011).



Figura 20. Microscópio Axio Imager.Z2 (*Zeiss*).

VI.1.7. Avaliação folicular

Os folículos foram quantificados, considerando-se apenas aqueles em que era possível identificar o ovócito. A classificação e a avaliação da atresia folicular foram realizadas

como descrito no capítulo V, tendo-se agrupado os folículos pré-antrais e antrais com os folículos secundários.

A densidade folicular foi calculada pelo número de folículos por unidade de área em mm² (M. Fransolet *et al.*, 2014). A percentagem folicular foi obtida pelo quociente entre o número de folículos de cada classe e o número de folículos considerados como normais. A percentagem de folículos primários, primordiais e secundários foi calculada como apresentado na Equação 3. A percentagem dos folículos atrésicos foi apresentada sobre a forma de percentagem de folículos atrésicos, pela quantidade total de folículos, conforme representado pela Equação 4.

Equação 3. Fórmula de cálculo da percentagem de folículos primordiais, primários e secundários

$$\text{Percentagem de folículos de cada classe} = \frac{\text{n.º de folículos de cada classe}}{\text{n.º total de folículos normais}} \times 100$$

Equação 4. Fórmula de cálculo da percentagem de folículos atrésicos

$$\text{Percentagem de folículos atrésicos} = \frac{\text{n.º de folículos atrésicos}}{(\text{n.º de folículos normais} + \text{n.º de folículos atrésicos})} \times 100$$

VI.1.8. Avaliação por imunohistoquímica

A imunohistoquímica permitiu avaliar a proliferação, a apoptose e a densidade vascular.

A atividade proliferativa do tecido foi evidenciada através da incubação com o anticorpo primário anti-Ki67 numa diluição de 1:300 (anticorpo policlonal de coelho; PA5-19462, *ThermoFisher*). A apoptose foi avaliada pela marcação anti-caspase 3 com recuso a um anticorpo policlonal de coelho na diluição de 1:100 (AHP2286, *Bio-Rad Laboratories*).

A densidade vascular foi determinada através da identificação das células endoteliais dos vasos sanguíneos, com recurso a marcação do fator de von Willebrand ou ao antígeno relacionado com o Fator VIII (FVIII, anticorpo policlonal de coelho, 760-2642, *Cell Marque*). Este antígeno é uma glicoproteína produzida unicamente pelas células endoteliais e megacariócitos, sendo por isso usado para a identificação de vasos (Peyvandi *et al.*, 2011).

A marcação do FVIII também foi realizada no dispositivo de marcação automática BenchMark ultra IHC/ISH (*Ventana Medical Systems*) usando o kit de deteção OptiView DAB IHC v5 (v1.00.0117, *Ventana Medical Systems*). O protocolo está descrito de forma resumida na Tabela 10.

Tabela 10. Resumo do protocolo de imunohistoquímica para fator VIII do Serviço de Anatomia Patológica do CHUC.

Etapa	Descrição
1 Desparafinação	Através do aquecimento até aos 72°C durante 4 minutos e com o auxílio da solução EZprep que emulsiona a parafina.
2 Recuperação do antígeno	Induzida pelo calor e por incubação com uma solução tampão CCI durante 24 minutos a 95°C.
3 Marcação imunohistoquímica	Incubação com o anticorpo primário durante 20 minutos a 36°C.
4 Inibição da peroxidase endógena	Inibidor pré-primário – Inibição com peróxido de hidrogénio (4 minutos).
5 Deteção da reação antígeno-anticorpo (OptiView DAB IHC)	Incubação com cocktail de anticorpos secundários, <i>HQ Universal linker</i> , durante 8 minutos; Incubação com os anticorpos terciários com a enzima peroxidase HRP <i>Multimer</i> durante 8 minutos.
6 Revelação cromogénica	Aplicação de uma gota de peróxido de hidrogénio simultaneamente com uma gota de DAB e incubação (8 minutos); Adição de uma gota de solução de cobre e incubação (4 minutos).
7 Contraste dos núcleos, para observação da arquitetura nuclear	Adição de uma gota de hematoxilina e incubação durante 8 minutos; Incubação com uma gota de pós-contraste, <i>bluing reagent</i> , durante 4 minutos.

Em cada ciclo de marcação foi utilizado um controlo negativo e um controlo positivo. No controlo negativo foi aplicado apenas o anticorpo secundário, ou seja, o anticorpo primário foi omitido. Como controlos positivos utilizaram-se tecidos de rato RNU, nomeadamente o apêndice para confirmação da marcação de Ki67, o baço para a caspase 3 e o rim para o fator VIII (Figura 21).

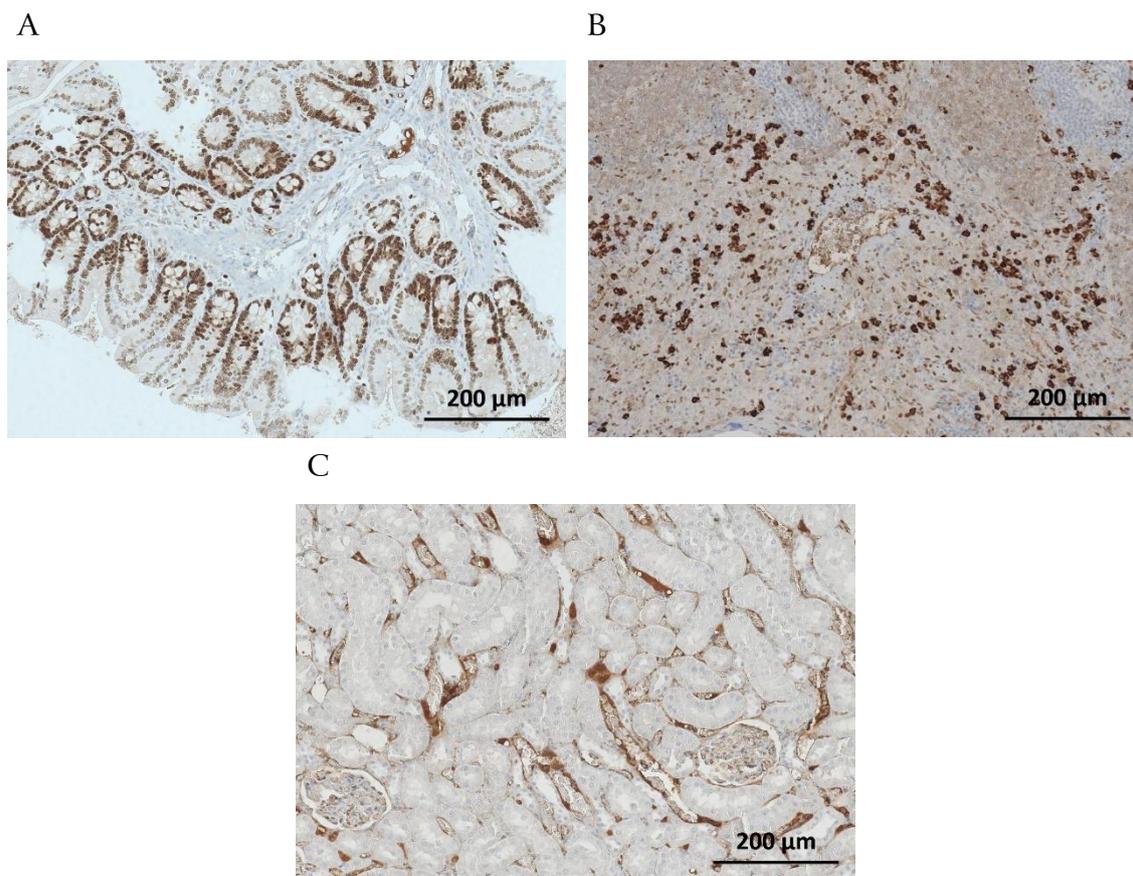


Figura 21. Controlos positivos da imunohistoquímica. Para os anticorpos Ki67 (A), caspase 3 (B) e FVIII (C) foi realizada a confirmação da marcação em cortes de apêndice, baço e rim, respetivamente. As imagens foram obtidas com uma ampliação 200× e a barra de escala é 200 µm.

Depois da preparação para avaliação imunohistoquímica, as lâminas foram observadas no microscópio ótico, Axio Imager.Z2 (Zeiss) com uma ampliação total de 200× e de 400×. As imagens dos tecidos foram adquiridas na forma de *tile* com a câmara digital Axiocam HRc (Zeiss) com o auxílio do software ZEN 2 *blue edition* (Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2011), em condições constantes de brilho e gama dinâmica (0,45). A análise dos resultados foi realizada por dois investigadores independentes de forma cega.

Os folículos foram classificados como “positivos” ou “negativos” para o Ki67 e para a caspase 3. Considerou-se um folículo “positivo” para o Ki67, ou seja, em proliferação, mediante a coloração positiva no ovócito e/ou em pelo menos uma célula da granulosa (Dolmans *et al.*, 2015; Luyckx *et al.*, 2013). Os folículos foram considerados “positivos” para a caspase 3, ou seja, apoptóticos, quando apresentavam o ovócito marcado com

caspase 3 ou mais de 50% das células da granulosa também marcadas (Kang *et al.*, 2016).

Em relação ao estroma, a quantificação da área marcada com cada anticorpo foi realizada por meio do programa *Image J* (Fiji versão, 1.8.0). Foram selecionadas aleatoriamente três zonas de dimensões idênticas de cada amostra. Os resultados foram apresentados como uma média de todas as secções.

Para a quantificação da marcação das células endoteliais com FVIII foram selecionadas aleatoriamente cinco regiões de cada fragmento para cálculo da densidade e de área vascular. A densidade vascular foi calculada pelo número de vasos sanguíneos por unidade de área (em mm²). De acordo com a literatura, consideraram-se como vasos individuais aglomerados de células endoteliais marcados com fator VIII, com ou sem lúmen nítido (Wu *et al.*, 2010). A área vascular corresponde à percentagem de área marcada com fator VIII quantificada com o auxílio do programa *Image J* (Herraiz *et al.*, 2020).

VI.1.9. Análise da expressão génica dos tecidos

Foi realizado *array* de PCR com o intuito de identificar genes integrantes da via da angiogénese, bem como avaliar eventuais diferenças na expressão génica entre os grupos. Com este objetivo foi desenhado um *array*, *TaqMan® Array Fast (Applied Biosystems)*, que permitiu verificar a expressão de 48 genes, que são descritos na Tabela 11. Para esta análise foram utilizados reagentes comercializados pela *Applied Biosystems*, exceto aqueles que se indica especificamente outra marca.

Foi realizada a extração e a quantificação dos ácidos nucleicos, seguida da transcrição reversa do RNA em cDNA e da avaliação do perfil de transcrição através de um *array* de nucleótidos. Estes procedimentos são descritos pormenorizadamente nos subcapítulos seguintes.

Tabela 11. Genes avaliados no *array* desenhado para estudo da angiogênese.

Nome do gene	Símbolo	Referência
<i>18S ribossomal N5</i>	<i>18s rRNA</i>	Hs99999901_s1
<i>actin, beta</i>	<i>Actb</i>	Rn00667869_m1
<i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>	<i>Hprt1</i>	Rn01527840_m1
<i>lactate dehydrogenase A</i>	<i>Ldha</i>	Rn00820751_g1
<i>ribosomal protein, large, P1</i>	<i>Rplp1</i>	Rn03467157_gH
<i>angiopoietin 1</i>	<i>Angpt1</i>	Rn01504818_m1
<i>angiopoietin 2</i>	<i>Angpt2</i>	Rn01756774_m1
<i>alanyl (membrane) aminopeptidase</i>	<i>Anpep</i>	Rn00578763_m1
<i>cadherin 5</i>	<i>Cdh5</i>	Rn01536708_m1
<i>collagen, type XVIII, alpha 1</i>	<i>Col18a1</i>	Rn01428995_m1
<i>collagen, type IV, alpha 3</i>	<i>Col4a3</i>	Rn01400991_m1
<i>connective tissue growth factor</i>	<i>Ctgf</i>	Rn01537279_g1
<i>epidermal growth factor</i>	<i>Egf</i>	Rn00563336_m1
<i>Endoglin</i>	<i>Eng</i>	Rn01438763_m1
<i>endothelial PAS domain protein 1</i>	<i>Epas1</i>	Rn00576515_m1
<i>v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene 2</i>	<i>ErbB2</i>	Rn00566561_m1
<i>fibroblast growth factor 1 (acidic)</i>	<i>Fgf1</i>	Rn00689153_m1
<i>fibroblast growth factor 2</i>	<i>Fgf2</i>	Rn00570809_m1
<i>fibroblast growth factor 6</i>	<i>Fgf6</i>	Rn00590927_m1
<i>fibroblast growth factor receptor 3</i>	<i>Fgfr3</i>	Rn00584799_m1
<i>c-fos induced growth factor</i>	<i>Figf</i>	Rn00582193_m1
<i>FMS-related tyrosine kinase 1</i>	<i>Flt1</i>	Rn01409533_m1
<i>fibronectin 1</i>	<i fn1<="" i=""></i>	Rn00569575_m1
<i>hepatocyte growth factor</i>	<i>Hgf</i>	Rn00566673_m1
<i>hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit</i>	<i>Hif1α</i>	Rn01472831_m1
<i>integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)</i>	<i>Itga5</i>	Rn01761831_m1
<i>integrin, alpha V</i>	<i>Itgav</i>	Rn01485633_m1
<i>integrin, beta 3</i>	<i>Itgb3</i>	Rn00596601_m1
<i>matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)</i>	<i>Mmp14</i>	Rn00579172_m1
<i>matrix metalloproteinase 19</i>	<i>Mmp19</i>	Rn01756324_m1
<i>matrix metalloproteinase 2</i>	<i>Mmp2</i>	Rn01538170_m1
<i>matrix metalloproteinase 3</i>	<i>Mmp3</i>	Rn00591740_m1
<i>matrix metalloproteinase 8</i>	<i>mmp8</i>	Rn00573646_m1
<i>matrix metalloproteinase 9</i>	<i>Mmp9</i>	Rn00579162_m1
<i>nitric oxide synthase 3, endothelial cell</i>	<i>Nos3</i>	Rn02132634_s1
<i>platelet-derived growth factor alpha polypeptide</i>	<i>Pdgfa</i>	Rn00709363_m1
<i>platelet-derived growth factor beta polypeptide</i>	<i>Pdgfb</i>	Rn01502596_m1
<i>platelet/endothelial cell adhesion molecule 1</i>	<i>Pecam1</i>	Rn01467262_m1
<i>placental growth factor</i>	<i>Pgf</i>	Rn00677739_m1
<i>TEK tyrosine kinase, endothelial</i>	<i>Tek</i>	Rn01433346_m1
<i>transforming growth factor alpha</i>	<i>Tgfa</i>	Rn00446234_m1
<i>tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1</i>	<i>Tie1</i>	Rn01417182_m1
<i>TIMP metalloproteinase inhibitor 1</i>	<i>Timp1</i>	Rn01430873_g1
<i>TIMP metalloproteinase inhibitor 2</i>	<i>Timp2</i>	Rn00573232_m1
<i>TIMP metalloproteinase inhibitor 3</i>	<i>Timp3</i>	Rn00441826_m1
<i>vascular endothelial growth factor A</i>	<i>Vegfa</i>	Rn01511602_m1
<i>vascular endothelial growth factor B</i>	<i>Vegfb</i>	Rn01454585_g1
<i>vascular endothelial growth factor C</i>	<i>Vegfc</i>	Rn01488076_m1

VI.1.10. Extração de ácidos nucleicos do tecido

O tecido colocado em NZYol® (*Nzytech*) foi armazenado a -86°C . No dia da extração de RNA foi descongelado e realizado o protocolo descrito na Tabela 12.

Tabela 12. Protocolo de extração de RNA, adaptado do catálogo do produto NZYol®.

Etapa	Descrição
Homogeneização	1 Colocar o tecido num tubo Eppendorf com cerca de 6 esferas de vidro e 1 mL de NZYol.
	2 Utilizar o vórtex até o tecido estar completamente macerado.
Separação de fases	3 Incubar as amostras durante 5 minutos à temperatura ambiente.
	4 Adicionar 200 μL de clorofórmio.
	5 Agitar os tubos durante 15 segundos.
	6 Incubar as amostras durante 2-3 minutos à temperatura ambiente.
	7 Centrifugar a 12000g durante 15 minutos a 4°C . A amostra separa-se por fases: a fase transparente e aquosa que fica no cimo aquela que contem o RNA.
Precipitação do RNA	8 Transferir a fase aquosa com cuidado para um novo tubo Eppendorf.
	9 Adicionar 500 μL de isopropanol a 4°C .
	10 Incubar as amostras durante 10 minutos à temperatura ambiente.
Lavagem do RNA	11 Centrifugar as amostras a 12000g durante 10 minutos a 4°C .
	12 Remover o sobrenadante.
	13 Adicionar 1 mL de etanol a 75% (v/v).
	14 Agitar as amostras no vórtex.
Re-dissolução do RNA	15 Centrifugar a 75000g durante 5 minutos a 4°C .
	16 Deixar secar o <i>pellet</i> .
	17 Dissolver em água DNase/RNase <i>free</i> .

VI.1.11. Quantificação dos ácidos nucleicos

A quantificação dos ácidos nucleicos foi realizada com o espectrofotómetro NanoDrop® 2000 (*Thermo Fisher Scientific Inc.*). No programa foi selecionada a opção *Acid Nucleic*. O branco foi estabelecido com água DNase/RNase *free* (2 μL), com análise dupla e rigorosa garantindo uma variação inferior a 0,4 Abs. Posteriormente utilizaram-se 2 μL de cada amostra para quantificar os ácidos nucleicos (em ng), registando os rácios 260/280 e 260/230. Entre as medições e no final do procedimento foram realizadas lavagens com água DNase/RNase *free*. Foram selecionadas as amostras com rácios de 260/280 entre 1,8 e 2,0 e rácios de 260/230 superiores a 2.

VI.1.12. Transcrição reversa do RNA em cDNA

A partir do RNA total extraído de cada amostra foi sintetizado o cDNA por transcrição reversa utilizando o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription*, de acordo com as instruções do fabricante e como descrito na Tabela 13. Para evitar qualquer contaminação, todo o procedimento foi realizado com material e reagentes livres de RNases. O cDNA obtido foi armazenado a 4°C, até à sua utilização.

Tabela 13. Protocolo de transcrição reversa do RNA em cDNA como kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription*.

Etapa	Descrição
Preparação da <i>mix</i>	1 <ul style="list-style-type: none"> – <i>Buffer</i> de transcrição reversa, – <i>Mix</i> de dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfatados), – <i>Primers</i> aleatórios para iniciar a síntese de cDNA, – Transcriptase reversa <i>multiscribe™</i>, – Inibidor de RNase, – Água livre de nucleases.
Preparação da reação	2 Pipetar 10 µL da <i>mix</i> de transcrição reversa preparada para cada tubo.
	3 Pipetar 10 µL da amostra de RNA para cada tubo e homogeneizar.
	4 Centrifugar os tubos.
Reação de transcrição reversa	5 Manter os tubos em gelo até à sua colocação no termociclador.
	6 Programar o termociclador T100 (<i>Bio-Rad</i>) segundo as condições seguintes: <ul style="list-style-type: none"> – Passo 1 – 25°C durante 10 minutos; – Passo 2 – 37°C durante 120 minutos; – Passo 3 – 85°C durante 5 minutos; – Passo 4 – 4°C.

VI.1.13. Perfil de transcrição através de *array* de nucleótidos

Foi utilizada uma placa *TaqMan® Array Fast, 96-well Plate & Format 48* (Catalog: 4413257; Design ID: RPGZE6Y) para a análise da expressão génica das condições de estudo. Nesta placa estavam dispostos os *primers* dos genes descritos na Tabela 11. Para a reação de amplificação por PCR utilizaram-se 5 µL de cDNA, amplificados pela DNA polimerase da *TaqMan® Fast Advanced Master Mix*. Foi utilizado o sistema de PCR em tempo real *QuantStudio™ 3*, de acordo com as condições descritas na Tabela 14.

Tabela 14. Condições para a reação de amplificação por PCR

Etapa	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	50°C	2 minutos
Ativação da polimerase	95°C	20 segundos
PCR (40 ciclos)	Desnaturação	95°C
	Emparelhamento/extensão	60°C

A quantificação foi realizada no sistema de Real-Time PCR QuantStudio™ 3 (*Thermo Fisher Scientific Inc.*). O *cycle threshold* (Ct) é o valor do ciclo onde a fluorescência ultrapassa o valor da fluorescência de *background*. Este valor foi calculado no software QuantStudio™ *Design and Analysis* (*Thermo Fisher Scientific Inc.*) e analisado com recurso ao software *Applied Biosystems Analysis* (*Thermo Fisher Scientific Inc.*) com a aplicação *relative quantification*.

A expressão dos genes em estudo (alvo) foi normalizada apenas para a β -actina (referência). Os restantes genes de referência testados foram excluídos por apresentarem variabilidade entre as amostras. O gene *Fgf-2* foi excluído por não ter condições de admissibilidade. A quantidade relativa dos genes em estudo foi calculada através dos Δ Ct, conforme apresentado na Equação 5. Para a análise da expressão génica calculou-se o *fold-change* entre a amostra (TOPC) e o grupo controlo (TOF), de acordo com a Equação 6. Este *fold-change* reflete o número de vezes que um gene específico foi expresso comparativamente com o controlo. Considerou-se que o gene estava sobreexpresso para valores superiores a dois e subexpresso para valores inferiores a -2.

Equação 5. Fórmulas de cálculo dos Δ Ct e $\Delta\Delta$ Ct

$$\Delta\text{Ct}_{\text{amostra}} = \text{Ct}_{\text{alvo}} - \text{Ct}_{\text{referência}}$$

$$\Delta\text{Ct}_{\text{controlo}} = \text{Ct}_{\text{alvo}} - \text{Ct}_{\text{referência}}$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{amostra}} - \Delta\text{Ct}_{\text{controlo}}$$

Equação 6. Fórmula de cálculo do *fold-change*

$$\text{Fold-change} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

VI.1.14. Análise estatística

Utilizou-se o programa SPSS versão 22.0 (IBM) para a análise estatística. Avaliou-se a distribuição normal para comparar os grupos de estudo. Atendendo a que as variáveis apresentavam uma distribuição normal, foram comparadas por meio do teste t de *Student*. Para a comparação entre os grupos em que se avaliou a expressão génica por *array*, aplicou-se o teste de *Benjamini-Hochberg*. Um valor de p inferior a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. Os resultados são expressos como média±SEM. A potência estatística atingida foi calculada com recurso ao software *G.Power*.

VI.2. Resultados

VI.2.1. Avaliação folicular

A avaliação histológica do tecido permitiu quantificar a densidade folicular. Na avaliação imediatamente após a ovariectomia e a descongelamento não houve diferenças entre grupos. Após a cultura, o grupo de tecido submetido a criopreservação apresentava maior densidade folicular que o tecido fresco ($2,123 \pm 0,293$ versus $1,2909 \pm 0,114$ folículos/mm²; p=0,03). Com a cultura, a quantidade de folículos morfológicamente normais por área de superfície manteve-se idêntica no tecido fresco e criopreservado, como representado na Figura 22.

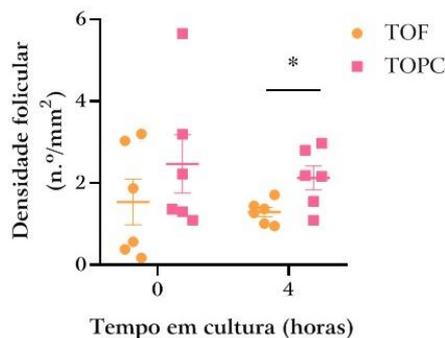


Figura 22. Densidade de folículos morfologicamente normais no tecido antes e após criopreservação. Os resultados são apresentados na forma de média \pm SEM. A significância estatística está representada com * para $p < 0,05$. TOF: tecido ovárico fresco; TOPC: tecido ovárico pós-criopreservação.

Posteriormente procedeu-se à avaliação dos folículos por estágio de desenvolvimento. A densidade e percentagem folicular foi semelhante no tecido avaliado imediatamente após a ovariectomia e após a criopreservação. Após a cultura, o tecido criopreservado apresentava menor percentagem de folículos primordiais (TOPC, 4h = $23,129 \pm 5,429$ *versus* TOF, 4h = $45,191 \pm 6,062$ folículos/mm²; $p = 0,041$; Figura 23.B) e maior densidade de folículos secundários (TOPC, 4h = $0,999 \pm 0,179$ *versus* TOF, 4h = $0,348 \pm 0,122$ folículos/mm²; $p = 0,013$; Figura 23.E). A cultura no tecido ovárico criopreservado condicionou uma diminuição da percentagem de folículos primordiais ($51,208 \pm 7,063$ *versus* $23,129 \pm 5,429$ folículos/mm²; $p = 0,009$; Figura 23.B) e um aumento da percentagem de folículos secundários ($30,792 \pm 5,098$ *versus* $46,924 \pm 4,619$ folículos/mm²; $p = 0,041$; Figura 23.F). Não se verificaram diferenças na análise do folículos primários (Figura 23.C e D).

No que diz respeito à avaliação da proliferação folicular, não se verificaram diferenças entre o tecido ovárico fresco e criopreservado relativamente à totalidade dos folículos (Figura 24.A), nem na análise por estádios de desenvolvimento (Figura 24.B, C e D), com ou sem cultura. Imediatamente após a ovariectomia e a descongelação a maioria dos folículos encontrava-se em proliferação. Com a cultura observou-se uma diminuição da percentagem de folículos em proliferação no grupo de tecido ovárico criopreservado ($95,320 \pm 2,510$ *versus* $31,288 \pm 19,813\%$; $p = 0,041$; Figura 24.A). Quando realizada a avaliação dos folículos por estágio de desenvolvimento, todos os

folículos secundários estavam em proliferação e após a cultura apenas 1/3 ($32,410 \pm 20,509$, $p=0,015$, Figura 24.D).

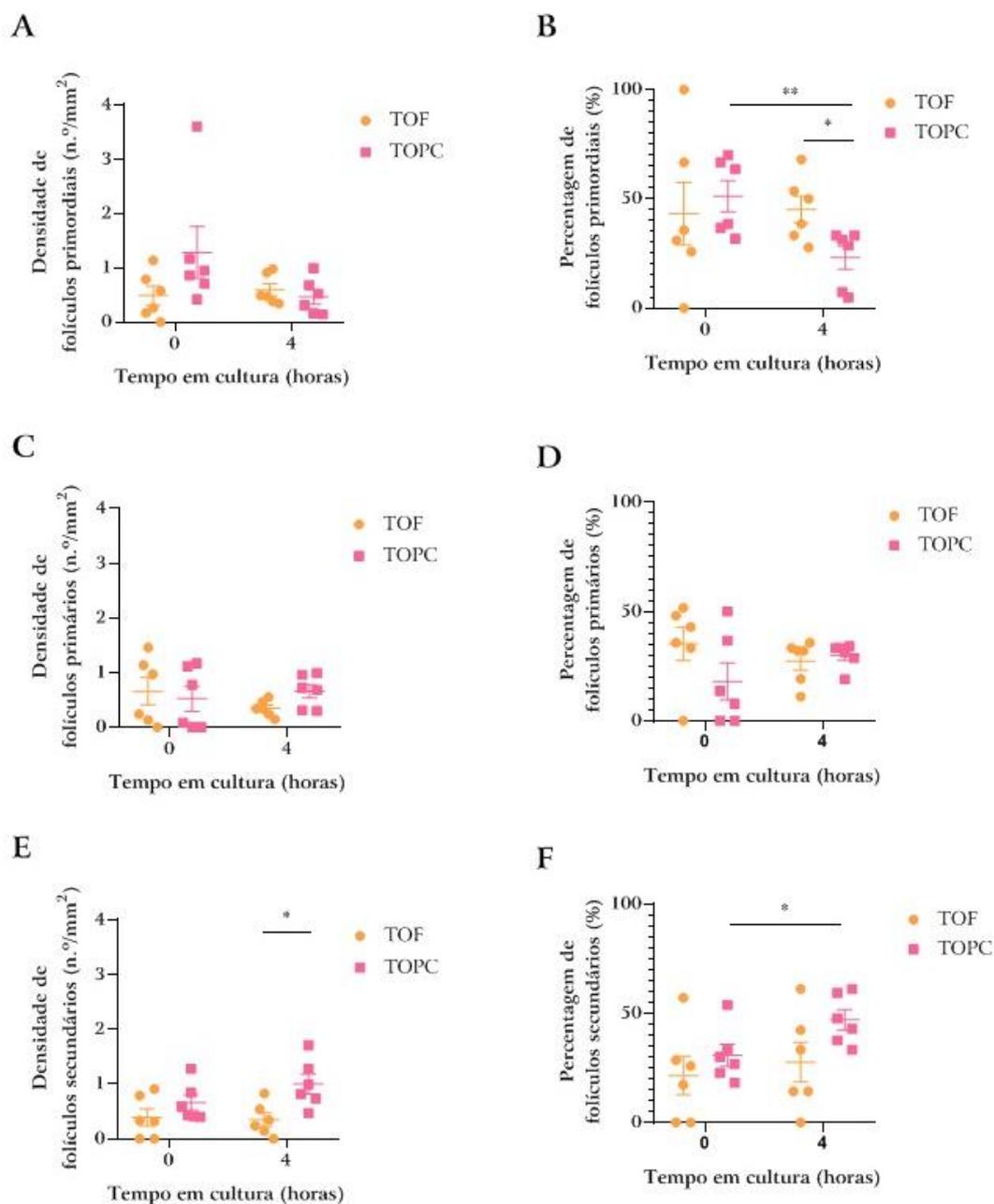


Figura 23. Quantificação dos folículos por estádios de desenvolvimento no tecido a fresco e após criopreservação. São representados os resultados da densidade folicular, expressa em número de folículos por mm^2 (A, C, E) e da percentagem folicular, expressa na percentagem de folículos no total de folículos morfológicamente normais (B, D, F), para os folículos primordiais (A, B), primários (C, D) e secundários (E, F). Os resultados são apresentados na forma de média \pm SEM. A significância estatística está representada com * para $p < 0,05$ e ** para $p < 0,01$. TOF: tecido ovário fresco; TOPC: tecido ovário pós-criopreservação.

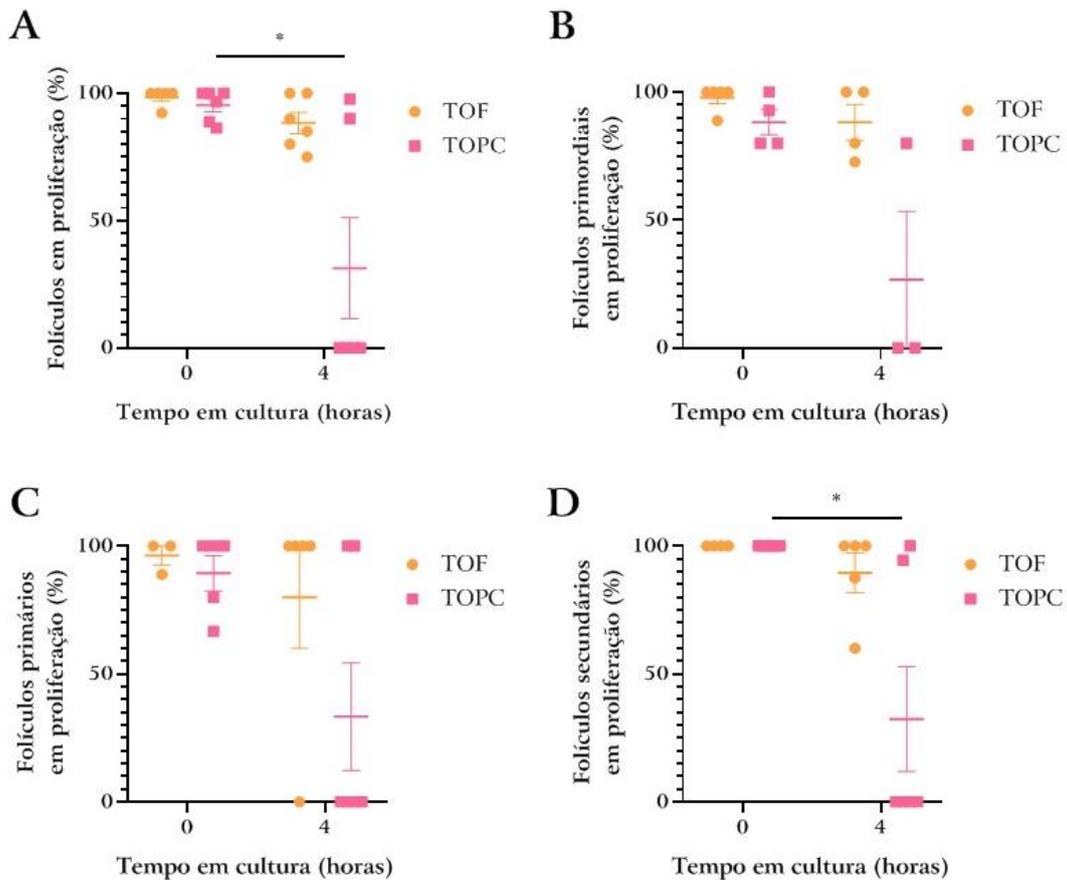


Figura 24. Proliferação nos folículos no tecido a fresco e após criopreservação. A proliferação foi quantificada tendo em conta o número de folículos com marcação positiva para Ki67 no número total de folículos (A) e no número de folículos por estádios de desenvolvimento [primordiais (B), primários (C) e secundários (D)]. Os resultados são apresentados na forma de média \pm SEM. A significância estatística está representada com * para $p < 0,05$. TOF: tecido ovárico fresco; TOPC: tecido ovárico pós-criopreservação.

A avaliação da extensão da apoptose nos folículos revelou níveis idênticos antes e após a criopreservação do tecido, como representado na Figura 25. Não foi encontrado nenhum ovócito marcado com caspase 3 em nenhuma das amostras analisadas, pelo que apenas se verificou marcação das células da granulosa. Na avaliação dos folículos por estádios de desenvolvimento, constatou-se que a apoptose foi residual nos folículos primordiais (Figura 25.B) e preponderante nos folículos secundários (Figura 25.D).

Os folículos que apresentaram formato irregular, picnose das células da granulosa, contração citoplasmática, presença de vacúolos e eosinofilia do ooplasma foram considerados atresícos (Gougeon, 1996). Na ausência de cultura, verificou-se que o

tecido ovárico criopreservado apresentava maior densidade de folículos atrésicos que o tecido fresco ($0,57 \pm 0,11$ versus $0,19 \pm 0,055$ folículos/ mm^2 ; $p=0,012$, Figura 26.A), porém sem diferenças na percentagem dos mesmos (Figura 26.B). Após a cultura, a atresia folicular foi semelhante entre grupos.

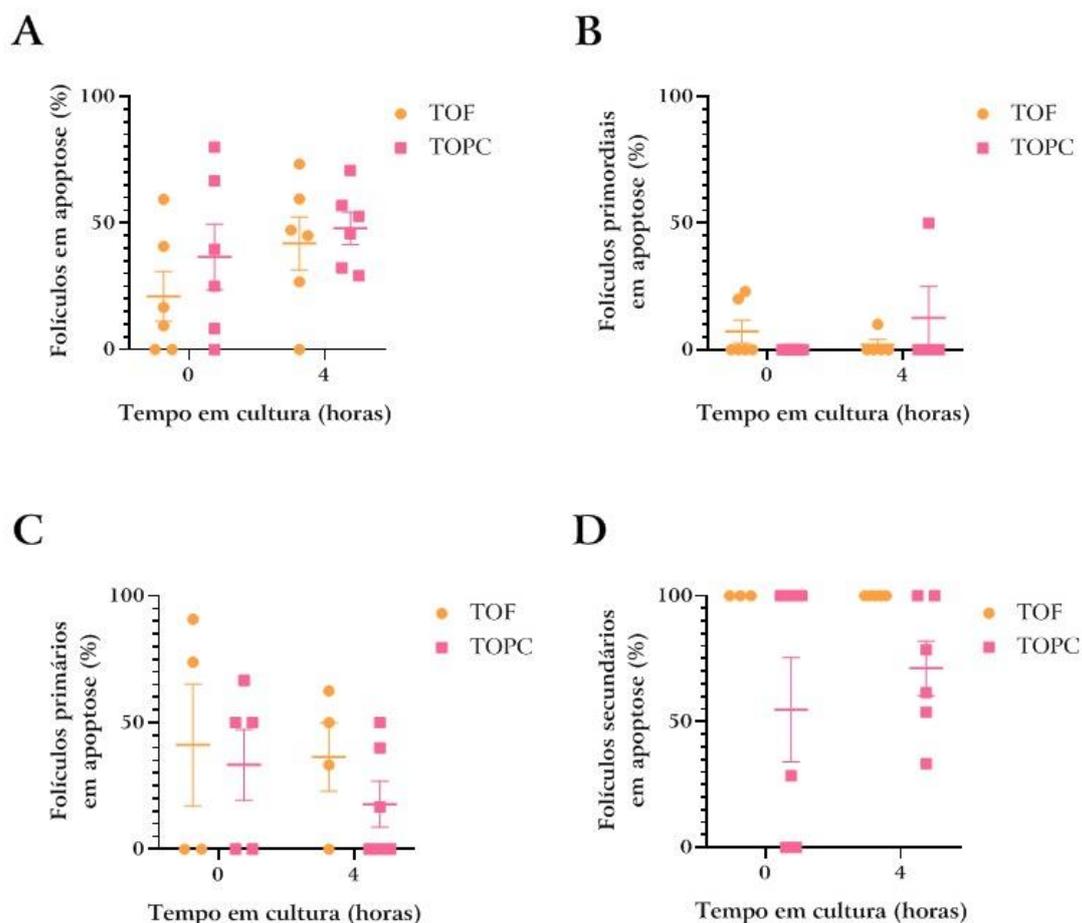


Figura 25. Apoptose nos folículos no tecido a fresco e após criopreservação. A apoptose foi quantificada tendo em conta o número de folículos com marcação positiva para caspase 3 número total de folículos (A) e no número de folículos por estádios de desenvolvimento [primordiais (B), primários (C) e secundários (D)]. Os resultados são apresentados na forma de média \pm SEM. TOF: tecido ovárico fresco; TOPC: tecido ovárico pós-criopreservação.

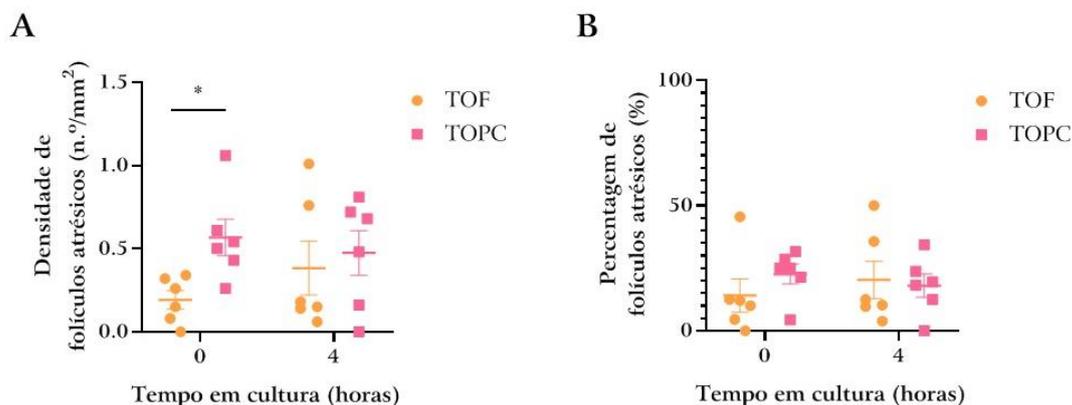


Figura 26. Quantificação dos folículos atresícos no tecido antes e após criopreservação. Os resultados da densidade folicular (A), expressa em número de folículos por mm², e da percentagem folicular (B), expressa na percentagem de folículos por classe no total de folículos morfologicamente normais, são apresentados na forma de média ± SEM. A significância estatística está representada com * para p < 0,05. TOF: tecido ovárico fresco; TOPC: tecido ovárico pós-criopreservação.

VI.2.2. Avaliação do estroma

Na avaliação histológica qualitativa do estroma não foram evidenciadas diferenças após a criopreservação do tecido.

No que diz respeito à proliferação das células do estroma, não se verificaram diferenças com a criopreservação, aferida através da comparação do tecido criopreservado com o tecido fresco. Porém, a cultura condicionou uma diminuição significativa da proliferação no tecido criopreservado ($3,910 \pm 0,889$ versus $0,265 \pm 0,146\%$; $p=0,009$) e no tecido fresco ($3,107 \pm 0,465$ versus $0,869 \pm 0,262\%$; $p=0,002$), como se pode observar na Figura 27.A

A avaliação dos níveis de apoptose no estroma está representada na Figura 27.B. Nesta análise também não se verificaram diferenças no tecido avaliado imediatamente após a criopreservação e após a ovariectomia. Porém, salienta-se que a percentagem de apoptose no tecido criopreservado foi menor que no tecido fresco ($3,18 \pm 0,68$ versus $9,69 \pm 2,84\%$; $p=0,07$), com diferença significativa após cultura ($0,530 \pm 0,132$ versus $3,280 \pm 0,698\%$; $p=0,003$). Em paralelo com a diminuição da proliferação com a cultura, também se constatou a diminuição da apoptose no tecido criopreservado ($3,190 \pm 0,682$ versus $0,530 \pm 0,132$; $p=0,003$).

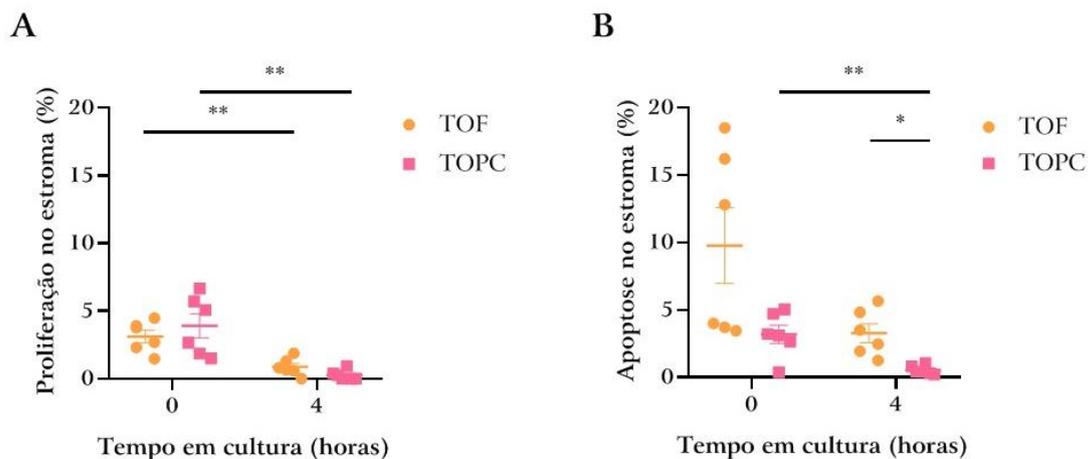


Figura 27. Avaliação da proliferação e apoptose no estroma do tecido ovárico antes e após a criopreservação. Os resultados de acordo com a percentagem de área marcada para Ki67 (A) e caspase 3 (B) nas células do estroma são apresentados na forma de média±SEM. * A significância estatística está representada com * para $p<0,05$ e ** para $p<0,01$. TOF: tecido ovárico fresco; TOPC: tecido ovárico pós-criopreservação.

VI.2.3. Avaliação vascular

A avaliação da marcação de células endoteliais vasculares teve como objetivo investigar se a criopreservação teria algum impacto nestas células. A marcação das células endoteliais com FVIII pode ser observada na Figura 28.

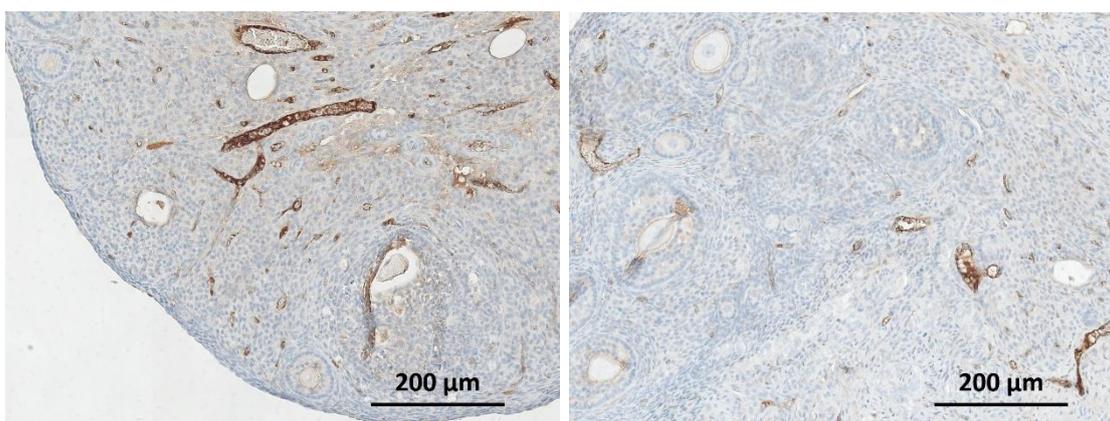


Figura 28. Imagens representativas da marcação imunohistoquímica do fator VIII. A ampliação é de 200x e a barra de escala é de 200 µm.

Independentemente da metodologia utilizada, foi consistente a diminuição da vascularização no tecido fresco submetido a cultura ($p < 0,001$), bem como a maior quantidade de vasos após cultura do tecido criopreservado comparativamente com o fresco ($p < 0,01$). Na avaliação da densidade vascular, ou seja, o número de vasos por unidade de superfície de tecido, foi menor imediatamente após a criopreservação comparativamente com o tecido após ovariectomia ($15,305 \pm 1,767$ versus $24,490 \pm 1,455$ vasos/ mm^2 ; $p = 0,002$). Contudo, com a cultura, verificou-se um aumento da densidade vascular no tecido criopreservado ($15,31 \pm 1,77$ versus $27,740 \pm 1,871$ vasos/ mm^2 ; $p = 0,001$; potência $(1-\beta) = 100\%$), para níveis idênticos aos do tecido avaliado imediatamente após ovariectomia. Estes resultados estão representados na Figura 29.

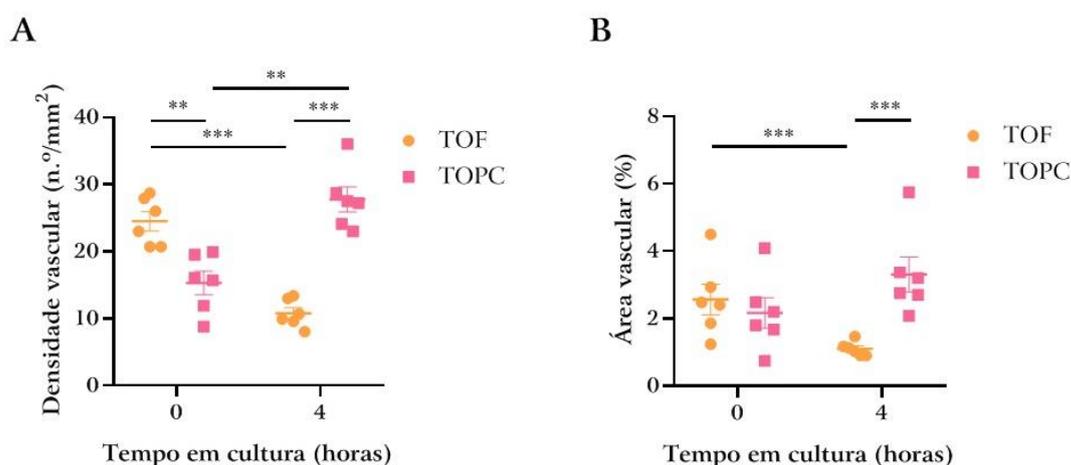


Figura 29. Avaliação vascular do tecido ovárico antes e após a criopreservação. Os resultados da densidade vascular (A), expressa em número de vasos por mm^2 , e da área vascular (B), expressa na porcentagem de área marcada para FVIII, são apresentados na forma de média \pm SEM. A significância estatística está representada com ** para $p < 0,01$ e com *** para $p < 0,001$. TOF: tecido ovárico fresco; TOPC: tecido ovárico pós-criopreservação.

Os resultados da expressão gênica de marcadores de angiogênese são apresentados no *plot* da Figura 30 com a quantificação dos *scores* de dispersão (Kalocsai & Shams, 1999). Os genes com valores de expressão idêntica nas diferentes condições alinham com a linha de identidade ou linha diagonal. Quanto maior for a distância a esta linha, ou seja, quanto mais diferente de 1 for o *score*, maior é a diferença na expressão gênica

entre condições. A expressão génica de marcadores de angiogénese foi semelhante no tecido avaliado imediatamente após criopreservação comparativamente com o tecido avaliado imediatamente após ovariectomia com um *score* de 0,928. Com a cultura no tecido criopreservado o *score* foi de 0,486. Na avaliação mais detalhada da expressão génica e através da análise dos gráficos Volcano apresentados na Figura 31, verificou-se que após cultura houve aumento da expressão de *Col4a3* ($p=0,010$), *Egf* ($p=0,016$), *Epas1* ($p=0,027$) e *Tie1* ($p=0,042$).

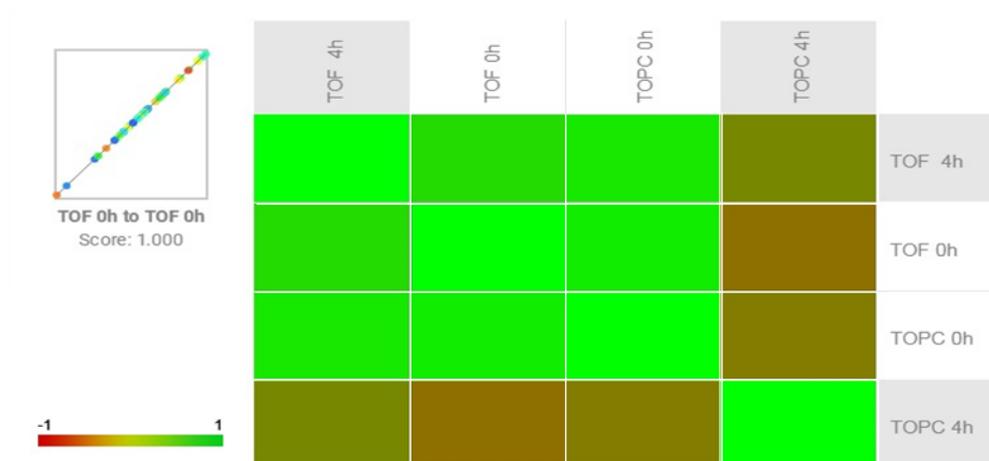


Figura 30. Representação gráfica da comparação entre o painel de expressão no tecido ovárico fresco (TOF) e pós-criopreservação (TOPC).

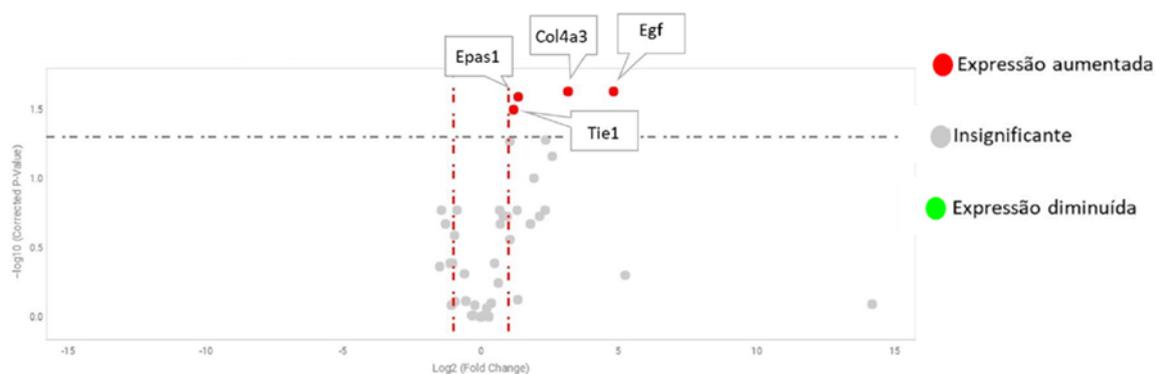


Figura 31. Gráficos Volcano da comparação do tecido avaliado imediatamente após descongelação com o tecido mantido em cultura. Os resultados são apresentados em $\log_2(\text{fold-change})$ versus $-\log_{10}(\text{valor } p \text{ corrigido})$. A linha tracejada vermelha representa o *fold change* e a linha tracejada cinzenta delimita a significância estatística ($p=0,05$). A vermelho estão representados os genes com expressão aumentada, a verde com expressão diminuída e a cinzento aqueles que não apresentam diferenças.

VI.3. Discussão

A investigação que avalia as técnicas de criopreservação de tecido ovárico pretende otimizar os diferentes protocolos para melhorar os resultados do transplante. Assim, têm sido realizados vários estudos que comparam a congelação lenta com a vitrificação. A importância da investigação nesta área justifica-se pela complexidade do tecido ovárico, associada à tendência para a transição da congelação lenta para a vitrificação na criopreservação de gâmetas e embriões.

A primeira revisão sistemática e meta-análise realizada neste âmbito inclui seis estudos e verificou que as duas técnicas produzem resultados equivalentes relativamente ao número de folículos primordiais intactos (Zhou *et al.*, 2016). No ano seguinte, outra revisão sistemática e meta-análise, que incluiu 14 estudos, sugeriu que a vitrificação seria mais eficaz, com menor lesão do DNA dos folículos primordiais e melhor preservação das células do estroma (Shi *et al.*, 2017). Estudos posteriores com avaliação dos resultados após o transplante de tecido ovárico, mostraram melhores resultados com a congelação lenta relativamente à vitrificação, com melhor sobrevivência e crescimento foliculares após xenotransplante (S. Lee *et al.*, 2019) e maior probabilidade de gravidez após o autotransplante (Terren *et al.*, 2019). Apesar dos vários estudos, na prática clínica apenas foi reportado o nascimento de duas crianças após vitrificação do tecido ovárico em mais de 130 casos de sucesso com a criopreservação e transplante de tecido ovárico (Rivas Leonel *et al.*, 2019).

Neste trabalho experimental utilizámos o protocolo de criopreservação lenta adaptado de Donnez *et al.* (Donnez *et al.*, 2005) e Rosendahl *et al.* (Rosendahl *et al.*, 2011). O nascimento do primeiro bebé após criopreservação e transplante de tecido ovárico ocorreu em 2004. O tecido ovárico havia sido criopreservado pelo método de criopreservação lenta utilizando DMSO como crioprotetor (Donnez *et al.*, 2005). O grupo de C. Y. Andersen publicou os resultados de 10 anos da técnica de criopreservação de tecido ovárico em 2011, com o nascimento de 3 crianças após o transplante. Em 2018 já foram reportados 17 nascimentos no mesmo grupo, sendo este o que tinha realizado o maior número de transplantes de tecido ovárico, 113 cirurgias num total de 360 (Gellert *et al.*, 2018). A metodologia de criopreservação

utilizada por este grupo foi descrita pela primeira vez em 2004, também com criopreservação lenta, mas recorrendo ao etilenoglicol como crioprotetor (Tryde Schmidt *et al.*, 2004).

O crioprotetor é uma substância com a capacidade de proteger as células e os tecidos da desidratação e dos danos causados pelas mudanças extremas de temperatura. Normalmente é utilizada a combinação de um crioprotetor permeável e outro não permeável. Os crioprotetores com elevada permeabilidade celular mais utilizados são o DMSO, o etilenoglicol e o propilenoglicol. Estes têm baixo peso molecular, são solúveis em água a baixas temperaturas e associam-se a baixa toxicidade. Os agentes não permeáveis mantêm-se na solução extracelular e promovem uma desidratação celular controlada. Como exemplos destes agentes encontram-se os açúcares, como a sacarose, e macromoléculas, como o ficoll. A exposição prolongada ou em quantidade excessiva aos crioprotetores pode causar citotoxicidade e prejudicar a viabilidade do tecido (El Cury-Silva *et al.*, 2021; Rivas Leonel *et al.*, 2019; Whaley *et al.*, 2021). Uma revisão sistemática comparou os vários crioprotetores na vitrificação de tecido ovárico, mas não concluiu qual a melhor combinação de crioprotetores. A combinação de etilenoglicol com outros crioprotetores está associada a taxas de recuperação folicular elevadas. O DMSO também pareceu ser seguro, sendo os melhores resultados obtidos com a utilização de concentrações menores (El Cury-Silva *et al.*, 2021). Para a criopreservação lenta são utilizados crioprotetores em baixa concentração, cerca de 1,5 M do agente permeável e 0,1 M do agente não permeável. Os crioprotetores mais utilizados são o DMSO e a sacarose, com curvas de arrefecimento semelhantes (Rivas Leonel *et al.*, 2019). A nossa opção pela associação do etilenoglicol e da sacarose, como descrito pelo grupo de C. Y. Andersen (Tryde Schmidt *et al.*, 2004), baseou-se na melhor preservação folicular (Newton *et al.*, 1996).

Além do crioprotetor, o tipo de tecido também influencia o sucesso da técnica de criopreservação (Barrett & Woodruff, 2010). No que diz respeito ao tecido, o ovário de rato é diferente do humano. Um dos passos importantes na preparação do tecido ovárico para criopreservação é a descorticação. Esta etapa corresponde à remoção da medula para melhorar a penetração do agente crioprotetor no córtex ovárico (Herraiz *et al.*, 2020). Do ponto de vista anatómico, o ovário de rato não tem um córtex de

consistência cartilaginosa como o ovário humano. Além disso, o ciclo hormonal do rato dura apenas 4 a 5 dias e são ovulados cerca de 7 a 15 ovócitos por ciclo. Estas características também tornam os ratos num excelente modelo para estudos na área da medicina da reprodução, nomeadamente os relacionados com a foliculogénese e o transplante de tecido ovárico, permitindo a realização de autotransplante *in vivo* (M. Suckow et al., 2005). Tendo em conta as diferenças do tecido ovárico entre espécies, o protocolo de criopreservação utilizado na clínica humana poderia ter de ser adaptado ao modelo animal. Assim, esta tarefa visou validar a aplicação do protocolo de criopreservação lenta ao tecido ovárico de rato, tendo-se comparado para o efeito o tecido com e sem criopreservação. Uma vez que a análise do tecido, imediatamente após a criopreservação, poderia não refletir o potencial de desenvolvimento folicular, foi realizada a cultura do tecido por um período de 4 horas.

O processo de descongelação é igualmente um passo importante para garantir o sucesso da criopreservação. Durante o processo de aquecimento, também se verifica o risco de formação de cristais de gelo, risco que parece ser maior no processo de aquecimento após vitrificação do que na descongelação (Rivas Leonel *et al.*, 2019). Neste trabalho utilizou-se o protocolo de descongelação do grupo de C. Y. Andersen, que inclui várias etapas com o intuito de remover a maior quantidade possível do crioprotetor (Tryde Schmidt *et al.*, 2004), o qual é removido pela exposição a concentrações cada vez menores desta substância (Pegg, 2007). Mesmo com protocolos de descongelação com várias lavagens foi demonstrado que persistem quantidades residuais de crioprotetores no tecido imediatamente antes do transplante. Estes resultados suscitam preocupações relacionadas com a segurança, uma vez que o DMSO altera o perfil de metilação do DNA e o etilenoglicol é tóxico em altas concentrações (Nakamura *et al.*, 2017).

Do ponto de vista global, confirmámos a preservação do tecido através da comparação do tecido ovárico de rato fresco e após criopreservação. O mesmo resultado foi reportado num estudo com avaliação histológica e imunohistoquímica de tecido humano submetido a criopreservação lenta com propilenoglicol e sacarose (Fabbri *et al.*, 2003).

A maioria dos estudos refere que a congelação lenta mostrou ser capaz de preservar os

folículos (Campos *et al.*, 2011; Fabbri *et al.*, 2003; Gastal *et al.*, 2017; Klocke *et al.*, 2015; Kometas *et al.*, 2021; Labrune *et al.*, 2020). Os resultados da nossa investigação são concordantes e mostraram a preservação da densidade de folículos morfológicamente normais, com níveis idênticos de apoptose e atresia folicular. Na análise dos folículos por estádios de desenvolvimento, constatámos uma diminuição dos folículos primordiais e um aumento dos folículos secundários após cultura. Este impacto negativo da criopreservação lenta na quantidade dos folículos primordiais já tinha sido verificado (Labrune *et al.*, 2020; S. Lee *et al.*, 2019; Ramos *et al.*, 2021; Sugishita *et al.*, 2021). A diminuição dos folículos primordiais em paralelo com o aumento de folículos em crescimento poderia estar associada à ativação folicular, uma das limitações já descritas da criopreservação e transplante de tecido ovárico. A ativação folicular é um dos mecanismos responsáveis pela perda folicular imediatamente após o transplante de tecido ovárico criopreservado, que limita o sucesso e a longevidade do mesmo. O *burn-out* folicular ocorre pela ativação da via PI3K/fosfatase homóloga à tensina (PTEN)/Akt (Terren & Munaut, 2021). Foi demonstrada a presença de produtos de degradação desta via entre uma a três horas após a sua ativação (Kawamura *et al.*, 2013). Contudo, a evolução de folículos primordiais para primários é um processo mais moroso (Gougeon, 1996). A ativação folicular, com conseqüente diminuição dos folículos primordiais e aumento dos folículos em crescimento, foi descrita em estudos com culturas de pelo menos 12 a 24 horas (Fortune *et al.*, 2000; Ghezelayagh *et al.*, 2022; Terren *et al.*, 2021; Terren & Munaut, 2021).

Apesar do processo de criopreservação lenta permitir a preservação dos folículos, com bons resultados na estrutura dos ovócitos, verifica-se algum impacto nas células da granulosa e da teca (Herraiz *et al.*, 2020; Hovatta *et al.*, 1996; Siebzehnrübl *et al.*, 2000), nomeadamente nos folículos secundários (Nottola *et al.*, 2008). Nesta classe de folículos verificámos elevada percentagem de apoptose, que se manteve mesmo após o processo de criopreservação. Os folículos primordiais são mais resistentes à criopreservação, provavelmente devido ao seu menor tamanho e mais lenta atividade metabólica (Morewood *et al.*, 2017). Em concordância, observámos uma quantidade residual de folículos primordiais em apoptose, também sem diferenças após o processo

de criopreservação.

A apoptose foi avaliada pela marcação com caspase 3, uma protéase que desempenha um papel na via apoptótica induzida pela criopreservação, tendo em conta o aumento da marcação no tecido submetido a criopreservação (Fauque *et al.*, 2007; Labrune *et al.*, 2020; Sugishita *et al.*, 2021). Contudo, há estudos com resultados discordantes, ou seja, sem diferenças (Fabbri *et al.*, 2003; Gastal *et al.*, 2017) ou com uma diminuição da apoptose no tecido pós-criopreservação (S. Lee *et al.*, 2019). Inclusivamente, num estudo em que o tecido ovárico também foi mantido em cultura durante 4 horas, foi comparado o tecido criopreservado através de congelação lenta e vitrificação e verificou-se que a apoptose foi menor no tecido criopreservado (Terren *et al.*, 2019). Os nossos resultados confirmaram este achado, com menos apoptose no estroma após a criopreservação.

O estroma assume particular importância no âmbito da criopreservação de tecido ovárico, uma vez que aqui são produzidos fatores de crescimento que intervêm na revascularização e na atividade metabólica dos folículos. Assim, o grande desafio é a preservação simultânea dos folículos e do estroma. No que diz respeito ao estroma, a criopreservação lenta parece limitar a sobrevivência destas células (Amorim *et al.*, 2011; Gastal *et al.*, 2017; Herraiz *et al.*, 2020). Este resultado foi confirmado com a cultura, através da diminuição da proliferação em ambos os grupos. Esta proliferação reduzida no estroma já tinha sido descrita num estudo em que o tecido ovárico também foi mantido em cultura durante 4 horas (Terren *et al.*, 2019). No que diz respeito ao tecido avaliado imediatamente após ovariectomia e criopreservação, verificámos que a proliferação das células do estroma eram semelhantes, em conformidade com o estudo de Fabbri *et al.* (Fabbri *et al.*, 2003).

Nos folículos está descrita uma diminuição de aproximadamente 30% na viabilidade (Campos *et al.*, 2011) e proliferação (S. Lee *et al.*, 2019), conforme também foi constatado nos nossos resultados.

Além da avaliação dos folículos e do estroma, investigámos se a criopreservação afetaria os microvasos presentes no tecido, através da marcação das células endoteliais com

FVIII. De facto, após o transplante de tecido ovárico, a manutenção da integridade vascular é um fator-chave para o sucesso da neo-angiogénese que, por sua vez, é indispensável para a sobrevivência dos folículos. A área vascular corresponde à área de células endoteliais no tecido, a qual é utilizada por alguns autores, para aferir a densidade microvascular (M. M. Fransolet *et al.*, 2015; Herraiz *et al.*, 2020). Através desta análise, verificámos que a percentagem de área marcada com FVIII foi semelhante antes e após criopreservação. Este resultado está em concordância com a literatura, que mostrou a preservação dos microvasos com a criopreservação lenta (Sanfilippo *et al.*, 2013). A densidade vascular, ou seja, o número de vasos sanguíneos por unidade de área de superfície, diminuiu com a criopreservação. Esta avaliação pode sobrestimar o número de vasos, uma vez que são considerados como vasos individuais aglomerados de células endoteliais, com ou sem lúmen nítido (Wu *et al.*, 2010). Apesar dos resultados não serem concordantes no tecido avaliado imediatamente após a ovariectomia e criopreservação, com a cultura verificámos um aumento da vascularização do tecido após criopreservação, com as duas metodologias de avaliação. Neste curto período de tempo é possível ocorrer a ativação da angiogénese com o *sprouting* inicial (Bentley & Chakravartula, 2017). Este resultado é relevante, uma vez que o estímulo angiogénico do tecido ovárico é essencial para a sobrevivência folicular após o transplante.

Perante estes resultados e com o intuito de entender se o processo de criopreservação teria algum impacto no estímulo angiogénico, foi avaliada a expressão de genes relacionados com a angiogénese. A comparação entre o tecido fresco e o tecido após criopreservação mostrou níveis idênticos de expressão. A expressão de *VEGF*, *angiopoietina-1* e *-2* também foi avaliada em tecido ovárico de murgancho com e sem criopreservação. Na avaliação imediatamente após descongelação o tecido apresentava menores níveis de expressão de *VEGF-A*, *angiopoietina-1* e *-2* do que o controlo (Cho *et al.*, 2018). Com a cultura verificámos alteração da expressão génica, com sobreexpressão de *Col4a3*, *Egf*, *Epas1* e *Tie1*.

Em síntese, o protocolo de criopreservação lenta com etilenoglicol e sacarose utilizado na prática clínica não parece ser deletério para o tecido ovárico de rato, preservando a densidade folicular e a morfologia do tecido, com diminuição da apoptose.

CAPÍTULO VII. Avaliação de fatores pró-angiogênicos e
de hormonas

Esta secção inclui resultados do estudo *in vitro* e *in vivo* da estimulação da angiogénese com VEGF, FGF e hMG. No estudo *in vitro*, os resultados da análise histológica, imunohistoquímica e do *array* foram realizados em conjunto com a aluna Maria Carolina Pereira Reis, no âmbito da sua Dissertação de Mestrado em Bioquímica.

A estimulação da angiogénese no tecido ovárico permite minimizar a lesão de isquemia/reperfusão do tecido e, conseqüentemente, o impacto na sobrevivência folicular, otimizando a longevidade do transplante do ponto de vista reprodutivo e endócrino (Donnez *et al.*, 2013). Com este intuito, têm sido investigadas várias estratégias, nomeadamente a utilização de VEGF, de outros fatores de crescimento, de hormonas e de agentes antioxidantes. Para além do recurso a diferentes moléculas, também foram avaliados vários níveis de intervenção, nomeadamente antes da criopreservação do tecido, antes realização do transplante, recorrendo à suplementação no meio de congelação ou em cultura, ou após o transplante, com a administração por via sistémica (Cacciottola *et al.*, 2021).

No processo de angiogénese, a primeira fase do crescimento capilar é mediada pela produção de VEGF pelas células parenquimatosas, sendo esta a principal via de sinalização ativada. No tecido ovárico, foi demonstrado um efeito positivo do VEGF no recrutamento de vasos sanguíneos funcionais (M. M. Fransolet *et al.*, 2015; Henry *et al.*, 2015; Labied *et al.*, 2013; Shikanov *et al.*, 2011; Souza *et al.*, 2021). A associação do VEGF com FGF mostrou ser mais eficaz, com maior sobrevivência dos folículos primordiais e da angiogénese e diminuição da apoptose (J. Gao *et al.*, 2015; L. Wang *et al.*, 2013; C.-H. Zhang *et al.*, 2016). A eficácia do tratamento isolado com gonadotrofinas é controversa. Contudo, a utilização de hMG mostrou um efeito benéfico sobre a angiogénese e o tempo de reperfusão, com maior sobrevivência dos folículos (Y. Y. Wang *et al.*, 2012).

Neste capítulo reportam-se os resultados da influência de VEGF, de FGF e de hMG na angiogénese do tecido ovárico após criopreservação.

VII.1. Materiais e Métodos

O estudo experimental foi realizado nas instituições referidas no capítulo VI, respeitando todas as disposições legais e éticas em vigor no que se refere à experimentação animal.

VII.1.1. Desenho experimental

Nesta tarefa pretendeu-se investigar o efeito da suplementação em cultura com hMG, com VEGF e com FGF no tecido ovárico de rato. Inicialmente foi realizado um estudo *in vitro*, cujos resultados contribuíram para definir o desenho experimental do estudo *in vivo*.

No estudo *in vitro*, os fragmentos de tecido ovárico de rato, previamente submetidos a criopreservação lenta e descongelação, foram divididos em quatro grupos, em que o Grupo 1 correspondeu a tecido ovárico pós-criopreservação sem adição de qualquer fator; o Grupo 2 a tecido ovárico mantido em cultura na presença de VEGF e de bFGF; o Grupo 3 a tecido ovárico mantido em cultura na presença de hMG; e o Grupo 4 a tecido ovárico mantido em cultura com suplementação tripla, com a associação dos três produtos (VEGF, FGF e hMG).

Neste ensaio foram estabelecidos três tempos de avaliação: imediatamente após a descongelação (0 horas) e após cultura durante 4 e 48 horas. Os grupos de tecido avaliados imediatamente após descongelação e às 4 horas de cultura sem suplementação correspondem aos descritos no capítulo VI.

Seis hemiovários de cada grupo foram fixados em formaldeído tamponado (VWR) a 4%, para a avaliação histológica e imunohistoquímica, e outros seis colocados em NZYol® (Nzytech), para a avaliação da expressão génica. O meio de cultura foi reservado para a quantificação de angiopoietina-2 por método de ELISA.

Para o estudo *in vivo*, o tecido ovárico de rato também foi submetido a criopreservação lenta e descongelação, seguido da cultura durante 4 horas, numa matriz de alginato, conforme os resultados do capítulo V. De acordo com a suplementação da cultura, o tecido ovárico foi dividido em dois grupos, em que o Grupo I correspondeu a tecido ovárico mantido em cultura na presença de hMG; e o Grupo II a tecido ovárico mantido em cultura com a suplementação tripla (VEGF, bFGF e hMG).

Após 4 horas em cultura foi realizado o autotransplante heterotópico do tecido ovárico. O enxerto foi transplantado a nível subcutâneo na parede abdominal do rato.

Ao fim de 7 e de 21 dias, os enxertos de tecido ovárico foram removidos para avaliação histológica e imunohistoquímica, para a avaliação da expressão gênica e guardados para avaliação da expressão proteica. A função endócrina foi avaliada através da citologia vaginal, que foi realizada diariamente, e do doseamento de estradiol e de FSH no sangue do rato, colhido ao 21º dia após o transplante.

O desenho experimental deste estudo está representado na Figura 32.

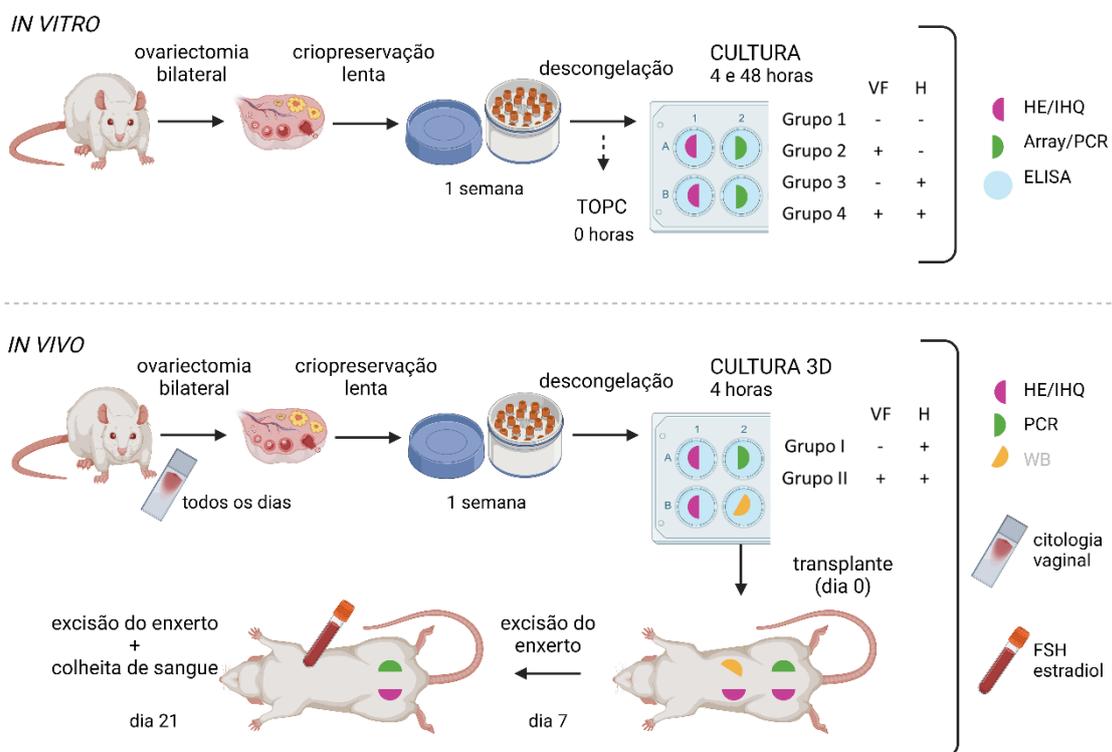


Figura 32. Representação esquemática do desenho experimental. *Created with BioRender.com.* HE, hematoxilina-eosina; IHQ, imunohistoquímica; VF, VEGF+FGF; H, hMG; TOPC, tecido ovárico pós-criopreservação; WB, *western blot*.

VII.1.2. Animais

Para o estudo *in vitro*, foram utilizados os hemiovários do grupo pós criopreservação do capítulo VI e mais 84 hemiovários, de 21 ratos fêmea com 8 e a 10 semanas de

idade da estirpe Rowett Nude (RNU, homozigóticas). Os hemiovários foram distribuídos de forma aleatória pelos grupos de estudo.

Para o estudo *in vivo*, foram utilizados 33 ratos fêmea com as mesmas características. Os animais foram distribuídos de forma aleatória pelos grupos de estudo. Optou-se por utilizar o modelo de rato da estirpe Rowett Nude (RNU, homozigóticas), pelas dimensões do ovário e para permitir realizar o autotransplante de tecido ovárico, mimetizando o que é realizado na prática clínica em humanos. O facto de estes animais serem atímicos, portadores de deficiência de células T, mantendo células B e NK, o que permite a realização de prova de conceito com tecido humano através de ensaios de xenotransplante. A idade dos animais foi selecionada tendo em conta o desenvolvimento pubertário, a maturidade sexual e a idade do acasalamento (Maeda *et al.*, 2000; Sengupta, 2013).

VII.1.3. Ovariectomia

A ovariectomia foi realizada como descrito no capítulo V, sob anestesia inalatória com sevoflurano. No final do procedimento, os animais cujos ovários se destinavam ao estudo *in vitro* foram occisados. Os animais do grupo de estudo *in vivo* foram identificados com marcações nas orelhas para posterior realização do autotransplante. Nestes animais, após a cirurgia, foi administrada analgesia subcutânea com carprofeno (5 mg/kg, totalizando 0,2 mL por animal). Por fim, foram colocados em gaiolas individuais, durante a recuperação da anestesia e ficaram em vigilância pelos investigadores nas primeiras duas horas após a intervenção.

Cada ovário foi dividido em dois hemiovários, que foram colocados em solução tamponada fria com DPBS (*Biological Industries*) suplementada com soro fetal bovino na concentração de 10% (v/v) (*Biological Industries*), onde se mantiveram durante cerca de 30 minutos, antes da criopreservação.

VII.1.4. Protocolos de criopreservação e descongelção

Foi realizado o protocolo de criopreservação lenta e descongelção descrito no capítulo V. Imediatamente após a descongelção seis hemiovários foram fixados em formaldeído a 4% (*Panreac Quimica Sau*) e outros seis foram colocados em NZYol® (*Nzytech*).

VII.1.5. Cultura de tecido ovárico

No estudo *in vitro*, os fragmentos de tecido ovárico de rato foram submetidos a cultura convencional durante 4 e 48 horas. O meio de cultura foi constituído por α -MEM (22561-021, *Thermo Fisher Scientific Inc.*) e soro fetal bovino na concentração de 10% (v/v) (*Biological Industries*). O meio foi suplementado com hMG na concentração de 0,3 UI/mL (*Menopur®*, *Ferring Pharmaceuticals*), com VEGF165 na concentração de 100 ng/mL (*Thermo Fisher Scientific Inc.*) e com bFGF na concentração de 150 ng/mL (*Sigma-Aldrich*), de acordo com os grupos de estudo.

Terminada a cultura, seis hemiovários de cada condição foram fixados em 4% formaldeído tamponado (VWR) para subsequente análise histológica e imunohistoquímica. Os restantes hemiovários foram macerados numa caixa de Petri com o auxílio de agulha e bisturi e transferidos para um tubo com 1 mL de NZYol para realizar a extração do RNA e do DNA e posterior realização do *array*. Todo o procedimento foi realizado sob condições estéreis. O meio de cultura foi conservado a -80°C.

Para o estudo *in vivo* também foi realizada a cultura 3D do tecido com recurso à matriz de alginato durante 4 horas. O meio de cultura foi constituído por α -MEM, soro fetal bovino na concentração de 10% (*Biological Industries*), penicilina/estreptomicina na concentração de 1/1000 (15140-122, *Gibco*, *Thermo Fisher Scientific Inc.*) e hMG na concentração de 0,3 UI/mL (*Menopur®*, *Ferring Pharmaceuticals*). O *scaffold* de alginato foi preparado como descrito no capítulo V. A concentração de alginato de sódio foi

reduzida para 1%, atendendo ao facto de se tratar de uma cultura de curta duração, com o intuito de reduzir a rigidez da matriz. No grupo com a suplementação tripla foi também adicionado VEGF165 na concentração de 100 ng/mL (*Thermo Fisher Scientific Inc.*) e bFGF na concentração de 150 ng/mL (*Sigma-Aldrich*), à matriz de alginato. No final da cultura, os hemiovários foram autotransplantados nos animais.

VII.1.6. Transplante de tecido ovárico

O transplante de tecido ovárico pode ser ortotópico, quando é reimplantado no ovário restante ou no peritoneu a nível da fosseta ovárica, ou heterotópico, quando realizado noutra local, designadamente a nível subcutâneo, intramuscular ou retroperitoneal. O transplante ortotópico é mais invasivo mas, na prática clínica, é o que demonstrou maior eficácia. O transplante heterotópico é mais simples, ficando o enxerto mais acessível (American Society for Reproductive Medicine, 2014). Um estudo que comparou diferentes locais de transplante, nomeadamente intramuscular, subcutâneo, intraperitoneal e na fosseta ovárica, mostrou resultados semelhantes, nomeadamente do ponto de vista folicular e considerando a duração do transplante até 21 dias (Dath *et al.*, 2010). Assim, neste trabalho experimental e após a cultura dos hemiovários foi realizado o autotransplante heterotópico de tecido ovárico a nível subcutâneo.

A cirurgia foi realizada sob anestesia inalatória e com analgesia subcutânea no final do procedimento, como descrito para a ovariectomia. Para o transplante foi realizada uma única incisão de 2 cm na parede abdominal, seguida de dissecção romba de quatro bolsas subcutâneas, cada uma com cerca de 1 cm. Os hemiovários foram inseridos subcutaneamente ao longo da fáscia muscular abdominal, como representado na Figura 32. Por fim, a pele foi encerrada com fio absorvível. O procedimento cirúrgico pode ser visualizado através do *link* disponível no Anexo II.

Ao fim de 7 dias o animal foi novamente submetido a anestesia inalatória. Dois dos enxertos de tecido ovárico foram recuperados através de uma incisão única na pele. Após o encerramento da pele com fio absorvível foi administrada analgesia subcutânea.

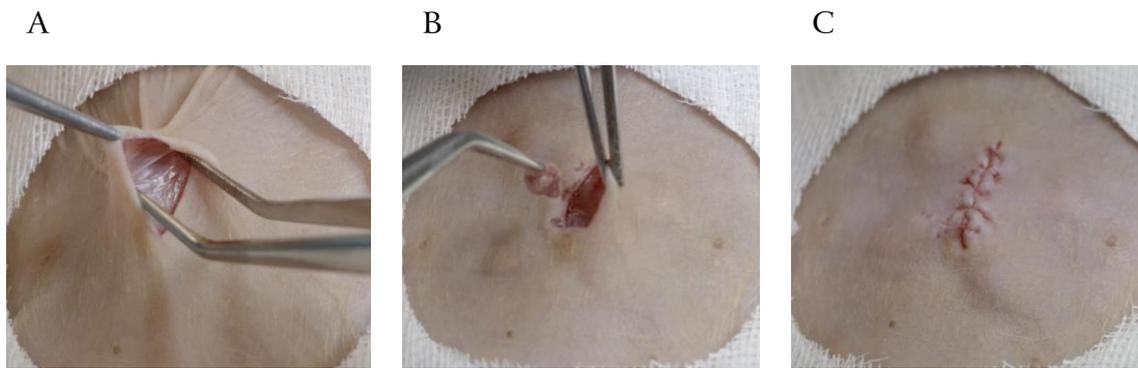


Figura 33. Fotografias representativas do transplante de tecido ovárico. Com o rato anestesiado e em decúbito dorsal, foi realizada uma incisão na parede abdominal, seguida de dissecção romba de quatro bolsas subcutâneas (A). Os hemiovários foram inseridos subcutaneamente ao longo da fáscia muscular abdominal (B). Por fim, a pele foi encerrada com fio absorvível, sendo possível identificar os enxertos transplantados subcutaneamente (C).

No 21.º dia após o transplante, foi realizado um procedimento de não recuperação em que os animais foram submetidos a anestesia profunda, seguida da remoção cirúrgica dos hemiovários restantes e da colheita de 2 mL de sangue por punção intracardíaca, sendo depois os animais occisados.

VII.1.7. Avaliação histológica e imunohistoquímica

Os tecidos fixados em formaldeído foram transportados para o Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, onde foram incluídos em parafina e seccionados seriadamente a cada 5 μm . A análise histológica e imunohistoquímica foi realizada como descrito nos capítulos V e VI. No estudo *in vivo* foi também avaliada e comparada a área do enxerto em mm^2 .

Todos os resultados foram avaliados com recurso ao software *Image J*, por dois investigadores, independentes e alheios às condições em estudo.

As lâminas do estudo *in vitro* foram observadas no microscópio ótico, Axio Imager.Z2 (*Zeiss*) com ampliação total de 200 \times e 400 \times . As imagens do tecido foram adquiridas com a câmara digital AxioCam HRc (*Zeiss*) com o auxílio do software ZEN 2 *blue edition*

(Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2011). Para o estudo *in vivo*, as lâminas foram adquiridas no AxioScan.Z1 (Carl Zeiss), com lente Plan-Apochromat 10x/0.8, e fotografadas com o programa ZEN 2 *blue edition* (Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2011).

VII.1.8. Análise da expressão génica dos tecidos

Com o intuito de identificar genes integrantes da via da angiogénese, bem como avaliar diferenças na expressão génica entre grupos, foram realizados microarrays de PCR no tecido do estudo *in vitro*. Assim, o *array* foi repetido para seis hemiovários de cada condição. Como descrito no capítulo VI foi utilizado o *TaqMan® Array Fast* (Applied Biosystems), que permitiu verificar a expressão de 46 genes.

Tendo em conta os resultados do *array* de angiogénese do estudo *in vitro* foi realizada qPCR para quantificação dos genes referidos na Tabela 15.

Tabela 15. Genes em estudo.

Nome do gene	Símbolo	Referência
<i>actin, beta</i>	Actb	Rn00667869_m1
<i>bone morphogenetic protein 15</i>	Bmp-15	Rn00572320_m1
<i>collagen, type XVIII, alpha 1</i>	Coll8a1	Rn01428995_m1
<i>collagen, type IV, alpha 3</i>	Col4a3	Rn01400991_m1
<i>epidermal growth factor</i>	Egf	Rn00563336_m1
<i>endothelial PAS domain protein 1</i>	Epas1	Rn00576515_m1
<i>fibroblast growth factor receptor 3</i>	Fgfr3	Rn00584799_m1
<i>c-fos induced growth factor</i>	Figf	Rn00582193_m1
<i>growth differentiation factor 9</i>	Gdf-9	Rn00572328_m1
<i>hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit</i>	Hif1 α	Rn01472831_m1
<i>kinase insert domain receptor</i>	KDR	Rn00564986_m1
<i>tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1</i>	Tie1	Rn01417182_m1

A qPCR foi realizada com cDNA extraído do tecido do estudo *in vitro*, para confirmação dos resultados do *array*, e com o cDNA extraído do tecido do estudo *in vivo*. A extração de RNA, a quantificação dos ácidos nucleicos e a conversão em cDNA

foi realizada como descrito no capítulo VI.

Para a qPCR foi utilizada a *TaqMan® Gene Expression Assays*. Na placa foram dispostos os *primers* dos genes descritos na Tabela 15. Para a reação de amplificação por PCR utilizou-se 1 μL de cDNA, amplificados pela DNA polimerase da *TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems)*. Foi utilizado o sistema de PCR em tempo real QuantStudio™ 3, de acordo com as condições descritas na Tabela 14 (capítulo VI.1.13). A quantificação e a análise da expressão génica foram realizadas como descrito no capítulo VI.

VII.1.9. Avaliação da angiopoietina-2 no meio de cultura

Procedeu-se à quantificação da angiopoietina-2 pela técnica de ELISA no meio de cultura do tecido ovárico do estudo *in vitro*. Para tal utilizou-se o *Mouse/Rat Angiopoietin-2 Quantikine ELISA Kit* (n.º de catálogo: MANG20, R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, EUA). O protocolo realizado está descrito de forma sumária na Tabela 16.

Tabela 16. Descrição sumária do protocolo de ELISA para angiopoietina-2.

Etapas	
1	Adicionar 50 μL do diluente em cada poço.
2	Adicionar 50 μL do standard, do controlo e das amostras em cada poço.
3	Incubar 120 minutos à temperatura ambiente num agitador de placas.
4	Aspirar e lavar 4 vezes com o tampão de lavagem.
5	Adicionar 100 μL do conjugado em cada poço.
6	Incubar 120 minutos à temperatura ambiente num agitador de placas.
7	Aspirar e lavar 4 vezes com o tampão de lavagem.
8	Adicionar 100 μL da solução de substrato em cada poço.
9	Incubar 15 minutos à temperatura ambiente e protegida da luz.
10	Adicionar 100 μL da solução STOP em cada poço.
11	Ler a placa em 30 minutos a 450 nm.

Para a determinação da concentração da angiopoietina-2 em cada amostra, foi obtida a curva de calibração e as densidades óticas (OD) foram interpoladas com o Prism 8.0, utilizando um ajuste não linear semi-logarítmico de quatro parâmetros, conforme representado na Figura 34. Os valores de melhor ajuste da OD da curva de calibração ao modelo matemático que permitiram interpolar dos resultados dados experimentais foram 38,48 da assintota superior, -0,005 da assintota inferior, 4,815 do logaritmo do ponto médio, 0,979 para o declive e 0,9946 para o R^2 .

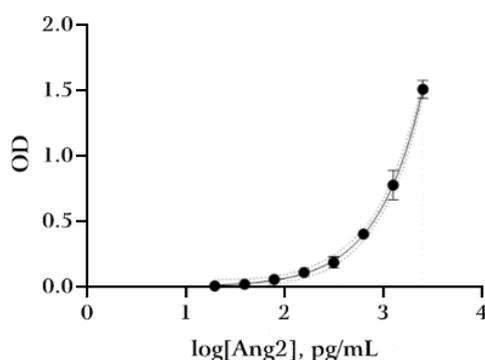


Figura 34. Curva de calibração da angiopoietina-2. OD: densidade ótica.

VII.1.10. Doseamentos hormonais

No rato, o ciclo menstrual dura 4 a 5 dias e é denominado ciclo *estrus*. A duração curta do ciclo torna estes animais num excelente modelo para avaliação do ciclo reprodutivo. Acresce ainda o facto de os ratos serem fáceis de manipular e terem frequentemente ciclos regulares, dificilmente afetados pelo stresse da manipulação. O ciclo *estrus* está dividido em quatro fases: *proestrus*, *estrus*, *metestrus* e *diestrus*. A fase *proestrus* dura cerca de 14 horas e corresponde ao dia pré-ovulatório, quando o estradiol aumenta e, conseqüentemente, ocorre o pico de gonadotrofinas (FSH e LH). O pico de LH desencadeia a ovulação e começa a fase *estrus*, na qual os níveis de progesterona estão mais elevados e os de estradiol diminuem até níveis basais ao final do dia. Esta fase dura entre 24 a 48 horas. A fase *metestrus* dura apenas 6 a 8 horas e a concentração de estradiol é baixa. Por último, a fase *diestrus* é a mais prolongada, pois dura cerca de 48

a 72 horas, e os níveis de estradiol começam a aumentar. Os níveis de FSH e LH são reduzidos na fase *estrus*, *metestrus* e *diestrus* (Caligioni, 2009; Cora *et al.*, 2015). A ovariectomia mimetiza o hipoestrogenismo típico da menopausa, com o aumento concomitante dos níveis séricos de FSH e LH (M. Suckow *et al.*, 2005).

Para avaliação da função endócrina foi quantificada a FSH e o estradiol no soro dos animais e no meio de cultura. Para esta determinação foram utilizados kits de ELISA para a FSH (*Rat FSH ELISA Kit*, n.º de catálogo: E-EL-R0391, *Elabscience*) e para o estradiol (*17 beta-Estradiol ELISA Kit*, referência: ab108667, *Abcam*).

O sangue recolhido ao 21º dia após transplante foi colocado em Microvette ® 500Z-Gel (REF 20.1344, *Laborimpex*). De imediato foi realizada uma centrifugação a 10.000×G durante 5 minutos a 2°C, o soro removido para um tubo Eppendorf e conservado a -80°C.

No dia da experiência os soros foram descongelados e foram realizados os protocolos de ELISA de acordo com as recomendações dos fabricantes, conforme resumido na Tabela 17 para o estradiol e na Tabela 18 para a FSH. Para a determinação da concentração de FSH e de estradiol em cada amostra, as OD foram interpoladas com a curva de calibração obtida no *Prism 8.0*, utilizando um ajuste não linear semi-logarítmico de quatro parâmetros, conforme representado na Figura 35 e com os valores de melhor ajuste descritos na Tabela 19.

Tabela 17. Descrição sumária do protocolo de ELISA para estradiol.

Etapas	
1	Adicionar 25 µL do standard, controlo e das amostras em cada poço.
2	Adicionar 200 µL do conjugado em cada poço.
3	Incubar 120 minutos a 37°C.
4	Remover o líquido.
5	Aspirar e lavar 3 vezes com 300 µL do tampão de lavagem.
6	Adicionar 100 µL da solução de substrato em cada poço.
7	Incubar 30 minutos à temperatura ambiente e protegida da luz.
8	Adicionar 100 µL da solução STOP em cada poço.
9	Ler a placa a 450 nm em 30 minutos.

Tabela 18. Descrição sumária do protocolo de ELISA para FSH.

Etapas	
1	Adicionar 100 μ L do standard e das amostras em cada poço.
2	Incubar 90 minutos a 37°C.
3	Remover o líquido.
4	Adicionar 100 μ L do anticorpo de detecção em cada poço.
5	Incubar 60 minutos a 37°C.
6	Aspirar e lavar 3 vezes com 350 μ L do tampão de lavagem.
7	Adicionar 100 μ L do conjugado em cada poço.
8	Incubar 30 minutos a 37°C.
9	Aspirar e lavar 5 vezes com 350 μ L do tampão de lavagem.
10	Adicionar 90 μ L da solução de substrato em cada poço.
11	Incubar 15 minutos a 37°C e protegida da luz.
12	Adicionar 50 μ L da solução STOP em cada poço.
13	Ler a placa imediatamente a 450 nm.

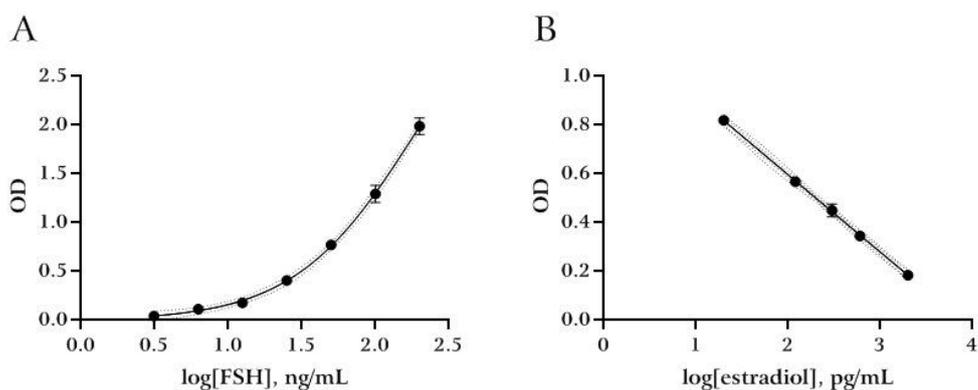


Figura 35. Curva de calibração FSH (A) e Estradiol (B). OD: densidade ótica.

Tabela 19. Valores de melhor ajuste da OD da curva de calibração ao modelo matemático que permitiu interpolar os resultados dados experimentais.

	FSH	Estradiol
Assintota superior	3,867	6,739
Assintota inferior	-0,014	-4,830
Logaritmo do ponto médio	2,279	0,871
Declive	1,050	-0,048
R ²	0,999	0,997

VII.1.11. Citologia vaginal

A citologia vaginal é o método mais preciso para avaliar o ciclo hormonal do rato, uma vez que a mucosa vaginal é influenciada pelos níveis de estrogénios e de progesterona (Byers *et al.*, 2012; Cora *et al.*, 2015). Em situações de hipoestrogenismo, o epitélio vaginal é atrófico, composto apenas pelas camadas basal e parabasal. Do ponto de vista celular são predominantes os leucócitos, nomeadamente neutrófilos, e as células epiteliais nucleares pequenas. Com o aumento dos níveis de estrogénios, surge a camada intermédia e superficial. Neste caso, as células nucleares são maiores, com o ratio núcleo/citoplasma menor e com uma forma poligonal. Existem também células epiteliais queratinizadas, que não têm núcleo visível, são de grandes dimensões e o citoplasma é granular e de forma irregular. Na avaliação citológica, as fases do ciclo *estrus* são identificadas pela ausência, presença ou proporção destas células. Na fase *proestrus* há predomínio de células epiteliais nucleadas, que podem aparecer em grupos ou individualmente. Ocasionalmente, algumas células queratinizadas podem aparecer na amostra. A fase *estrus* é caracterizada pela presença de células epiteliais escamosas queratinizadas. Na fase *metestrus* existe uma mistura dos vários tipos celulares. Por último, na fase *diestrus* há predomínio de leucócitos (Caligioni, 2009; Cora *et al.*, 2015).

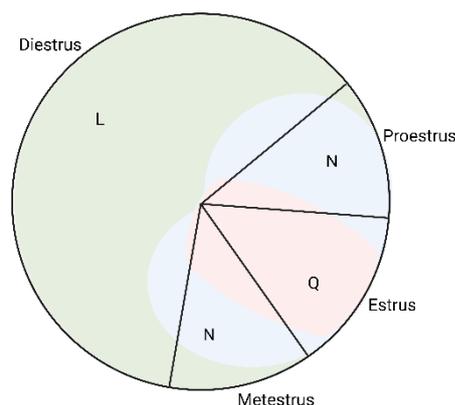


Figura 36. Representação esquemática do tipo de células e sua proporção identificáveis na citologia vaginal de acordo com a fase do ciclo *estrus*. Em *diestrus* há um predomínio de leucócitos (L), no *proestrus* de células epiteliais nucleadas (N) e no *estrus* de células epiteliais escamosas queratinizadas (Q). Na *metestrus* é possível identificar todas as populações celulares. A figura foi adaptada de Cora *et al.* (Cora *et al.*, 2015). Created with BioRender.com

As citologias vaginais foram realizadas diariamente em seis animais, desde o dia da ovariectomia (dia -7) até ao final da experiência (21º dia após o transplante). As colheitas foram realizadas sensivelmente à mesma hora, a meio do dia. Quando as citologias são realizadas muito cedo ou ao final do dia, podem não ser identificadas todas as fases do ciclo, devido à variabilidade da sua duração (entre 6 e 72 horas) e ao efeito do ritmo circadiano (Cora *et al.*, 2015). As amostras foram recolhidas por lavagem vaginal com 200 μ L de soro fisiológico. A ponta da micropipeta foi gentilmente introduzida no orifício vaginal, a uma profundidade de aproximadamente 2 a 3 mm, com cuidado para evitar a estimulação cervical. Em seguida, a solução salina foi instilada na vagina duas vezes. Após a lavagem, colocou-se a amostra uniformemente na lâmina e deixou-se secar ao ar (Cora *et al.*, 2015). O procedimento está representado na Figura 37 e pode ser visualizado através do *link* disponível no Anexo II.

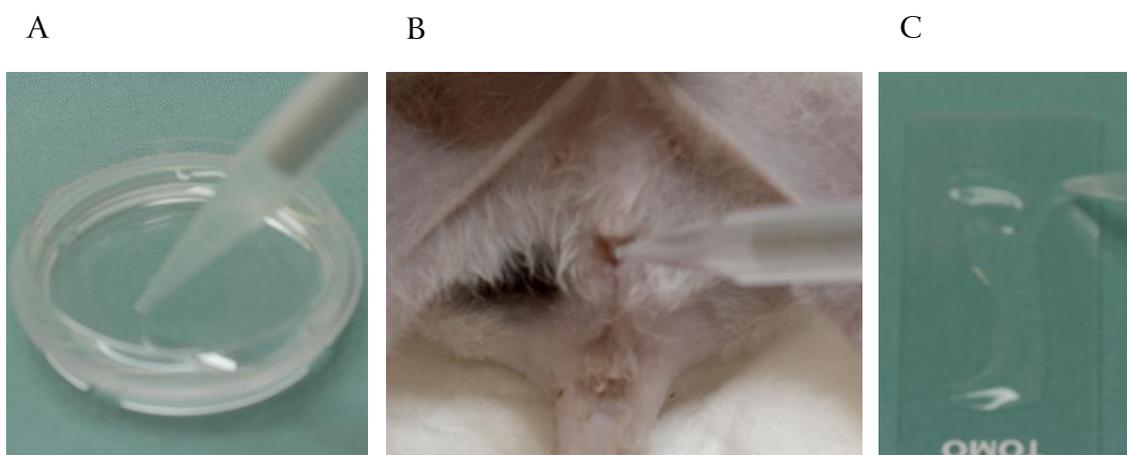


Figura 37. Fotografias representativas da técnica de realização de citologia vaginal. Com o rato anestesiado e em decúbito dorsal foi realizada a colheita de células para a citologia vaginal, através da lavagem com solução salina (A). A micropipeta foi introduzida na vagina do animal e a solução salina foi instilada e recuperada (B). Após a lavagem, a amostra foi colocada numa lâmina de forma uniforme (C), para posterior fixação e coloração de Papanicolau.

As lâminas foram fixadas e transportadas para o Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra. Foi realizada a coloração de Papanicolau, que é universalmente utilizada em citopatologia. Esta é uma técnica de

coloração multicromática que combina um corante nuclear, a hematoxilina, e dois citoplasmáticos, o *orange G* e o EA (do inglês, *Eosin Azure*). Os corantes oferecem melhor detalhe da cromatina e coram o citoplasma com tons de laranja, rosa ou azul, dependendo do grau de queratinização (Bancroft & Layton, 2019; Cora *et al.*, 2015). O protocolo realizado está descrito na Tabela 20.

Tabela 20. Protocolo de coloração de Papanicolau

Etapa	Composto	Nº de passagens	Tempo
Hidratação	Água	1	2 min
Aplicação dos corantes	Hematoxilina de Gill I (<i>Leica Biosystems</i>)	1	5 min
	Água	2	2 min
	Etanol 95% (v/v)	1	2 min
	<i>Orange II (Merck)</i>	1	3 min
	Etanol a 95° (v/v)	2	1 min
	EA50 (<i>Merck</i>)	1	3 min
Desidratação	Etanol 95% (v/v)	1	1 min
	Etanol absoluto	2	1 min
Diafanização	Xilol	2	1 min
Montagem das lâminas			

As lâminas foram observadas no microscópio ótico Nikon Eclipse E600 (Nikon Europe BV), a uma ampliação total de 200×. As imagens do tecido foram adquiridas com a câmara Moticom 5 com o auxílio do software Motic *Images Plus 3.0*. A classificação das fases do ciclo *estrus* foram realizadas por dois observadores independentes, desconhecedores da identificação das lâminas. Em situações de discordância, a lâmina foi reavaliada em conjunto.

VII.1.12. Análise estatística

O programa SPSS versão 22.0 (IBM) foi utilizado para a análise estatística. A distribuição normal foi avaliada para comparar os grupos de estudo. As variáveis com distribuição normal foram comparadas por meio do teste t de *Student* e aquelas cuja

distribuição não era normal foram avaliadas por meio do teste de *Mann-Whitney*. Para a comparação entre os grupos no *microarray*, aplicou-se o teste de Benjamini-Hochberg. Foi construído um *heatmap* dos genes estudados nos diferentes tempos/condições recorrendo ao programa da *Thermo Fisher Connect™* tendo por base a correlação de *Pearson* e com o método de *clustering average link*. Foi considerado estatisticamente significativo um valor de *p* inferior a 0,05. Os resultados são expressos como média±SEM. A potência estatística foi calculada com recurso ao software *G.Power*.

VII.2. Resultados

VII.2.1. Estudo *in vitro*

O estudo *in vitro* pressupôs a avaliação do tecido imediatamente após a descongelação e após 4 e 48 horas de cultura. A avaliação histológica do tecido ovárico, submetido a cultura por 48 horas, mostrou o tecido degradado como é possível verificar nas fotografias da Figura 38.

No estroma foi visível a presença de edema intersticial e de necrose, com células picnóticas e em baixa densidade. Nos folículos constatou-se que as células da granulosa também se encontravam picnóticas, desorganizadas e separadas do ovócito e da membrana basal do folículo, existindo sinais de degeneração do ovócito. Estas alterações foram comuns a todos os hemiovários mantidos em cultura durante 48 horas. Assim, este grupo foi excluído do estudo.

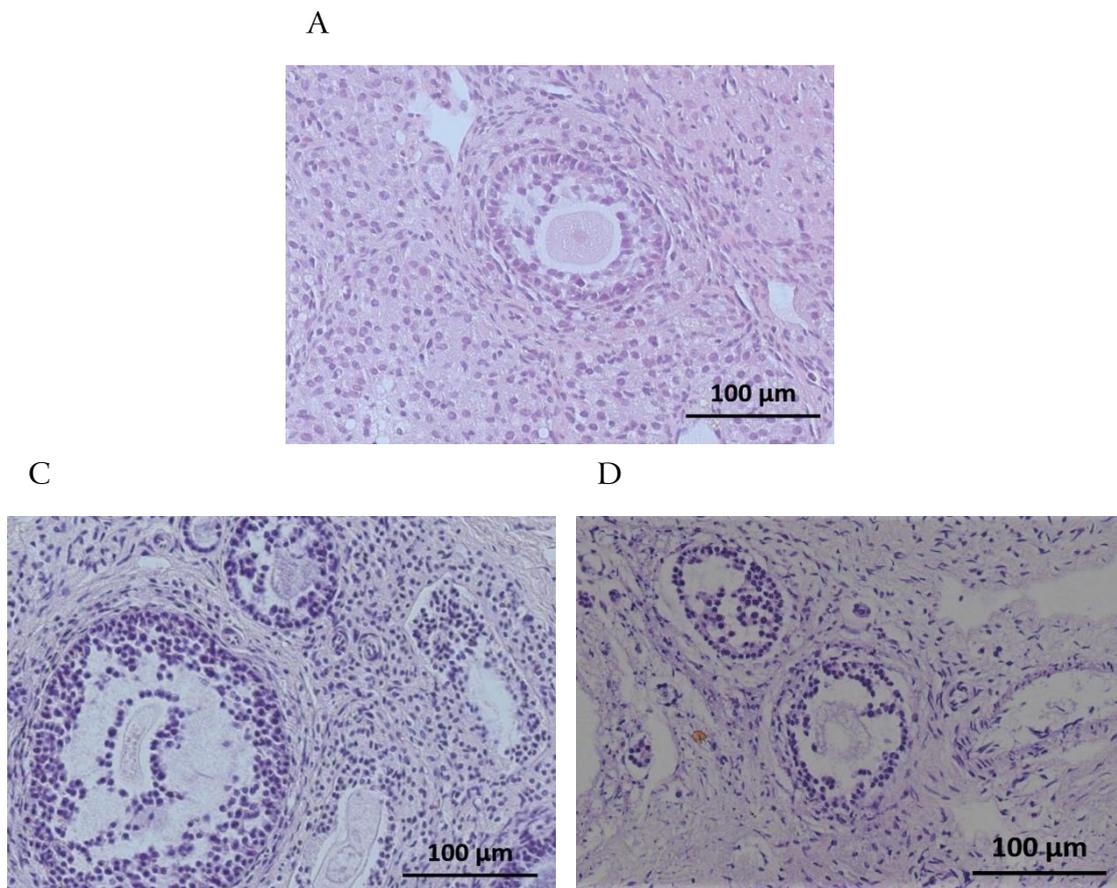


Figura 38. Fotografias representativas do tecido ovárico corado com hematoxilina-eosina. O tecido foi avaliado imediatamente após a descongelação (A) e após 4 (B) e 48 horas de cultura (C). A ampliação é de 200× e a barra de escala é de 100 µm.

VII.2.1.1. Estimulação da angiogênese com VEGF, FGF e hMG

A cultura de tecido ovárico condicionou um aumento da densidade vascular, sem diferenças entre os tipos de suplementação, como está representado no gráfico A da Figura 39. A densidade vascular imediatamente após a criopreservação foi de $15,305 \pm 1,767$ vasos/mm² e após cultura sem suplementação foi de $27,741 \pm 1,8713$ vasos/mm² ($p=0,001$). No caso da suplementação com VEGF e com FGF foi de $25,407 \pm 2,568$ vasos/mm² ($p=0,009$), com hMG isoladamente foi de $24,106 \pm 2,209$ vasos/mm² ($p=0,011$) e com a suplementação tripla foi de $28,442 \pm 2,771$ vasos/mm² ($p=0,004$). No que diz respeito à área vascular não se verificaram diferenças significativas, como apresentado na Figura 39.B.

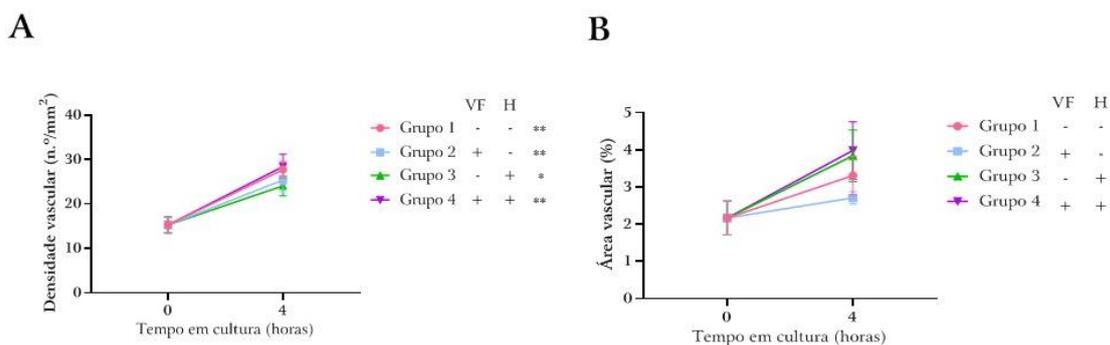


Figura 39. Densidade e área vascular do tecido ovárico após criopreservação submetido a cultura com VEGF, FGF e hMG. A avaliação vascular foi realizada por imunohistoquímica com marcação anti-FVIII. Todas as comparações foram realizadas em relação ao tecido avaliado imediatamente após criopreservação. Os resultados da densidade vascular (A) e área vascular (B) são apresentados na forma de média \pm SEM. A significância estatística está representada com * para $p < 0,05$ e ** para $p < 0,01$. Os asteriscos (*) junto à legenda representam diferenças significativas entre a cultura e o tecido avaliado imediatamente após descongelação.

A concordância interobservador para as duas metodologias de quantificação da vascularização do tecido foi avaliada e classificada de acordo com o *intraclass correlation coefficient* (ICC). A concordância foi considerada fraca para ICC no intervalo de 0,4 a 0,6; moderada para ICC no intervalo de 0,6 a 0,8; forte para ICC no intervalo de 0,8 a 0,9; e muito forte para ICC superior 0,9 mas inferior a 1. Verificou-se que a densidade vascular quantificada pelo número de vasos por unidade de superfície em mm^2 , tem uma concordância moderada ($\text{ICC}=0,648$, $p < 0,001$), com maior dispersão entre os valores mais elevados, como pode ser observado na Figura 40.A. Para a avaliação da área vascular, a concordância foi moderada a forte ($\text{ICC}=0,780$, $p < 0,001$), com menor dispersão geral. Porém, também se verificou maior desvio nos valores mais elevados, como pode ser observado na Figura 40. O método B, além de tecnicamente ser mais simples, é mais reprodutível e independente do observador. Por este motivo, no estudo *in vivo* foi apenas realizada a quantificação da área vascular (método B).

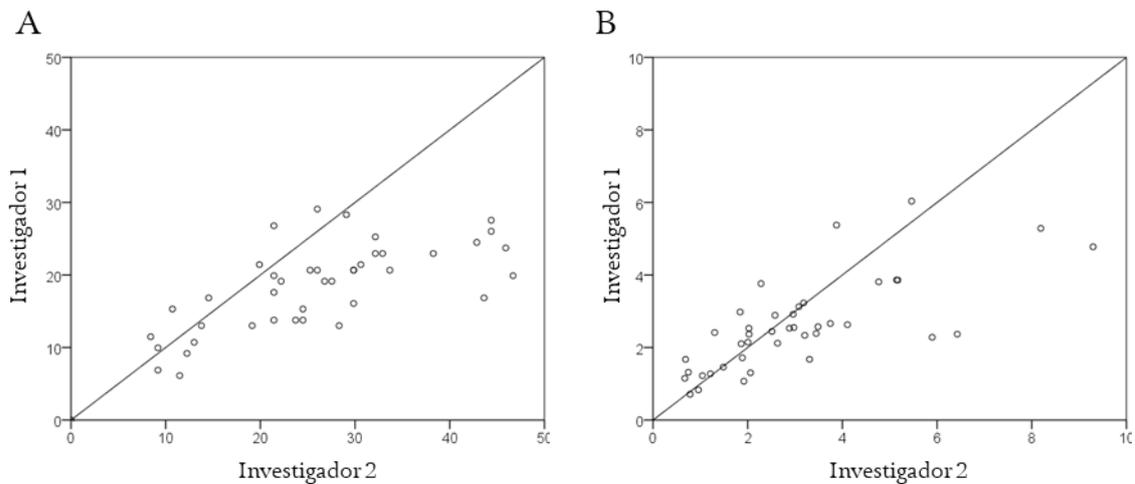


Figura 40. Dispersão da avaliação vascular entre os dois investigadores. São apresentados os resultados para a densidade vascular (A) e área vascular (B). A reta representada é a $y = x$, de forma que os pontos/marcas que ficam sobre a mesma indicam que os valores dos dois investigadores são iguais entre si.

Da avaliação da expressão gênica por *array*, não foi possível identificar diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes tipos de cultura. O *score* de dispersão foi 0,811 após a cultura com suplementação com VEGF e com FGF, 0,464 após cultura com suplementação apenas com hMG e 0,572 após cultura com a suplementação tripla. O painel de expressão gênica está representado na Figura 41.

No entanto, verificaram-se alterações nos tecidos submetidos a cultura em relação ao tecido avaliado imediatamente após a criopreservação. O painel de expressão gênica está representado na Figura 42. O *score* de dispersão foi 0,486 após a cultura sem suplementação, 0,624 com VEGF e com FGF, 0,708 com hMG isolada e 0,854 com a suplementação tripla.

O *heatmap* com a expressão de cada gene, em cada amostra, está representado na Figura 43. Observa-se que existem alguns genes (linhas iniciais, do *Figf* ao *Ctgf*) que se encontraram sobre-expressos nos tecidos avaliados imediatamente após a descongelação e que se tornaram subexpressos com a suplementação isolada com hMG e a associação de VEGF com FGF, mas menos com a suplementação tripla. Para outro conjunto de genes (linhas finais, do *Nos3* ao *Col4a3*) observou-se uma tendência inversa, isto é, inicialmente encontraram-se subexpressos tornando-se sobre-expressos

nas condições estudadas. Os restantes genes apresentaram pouca alteração na sua expressão.

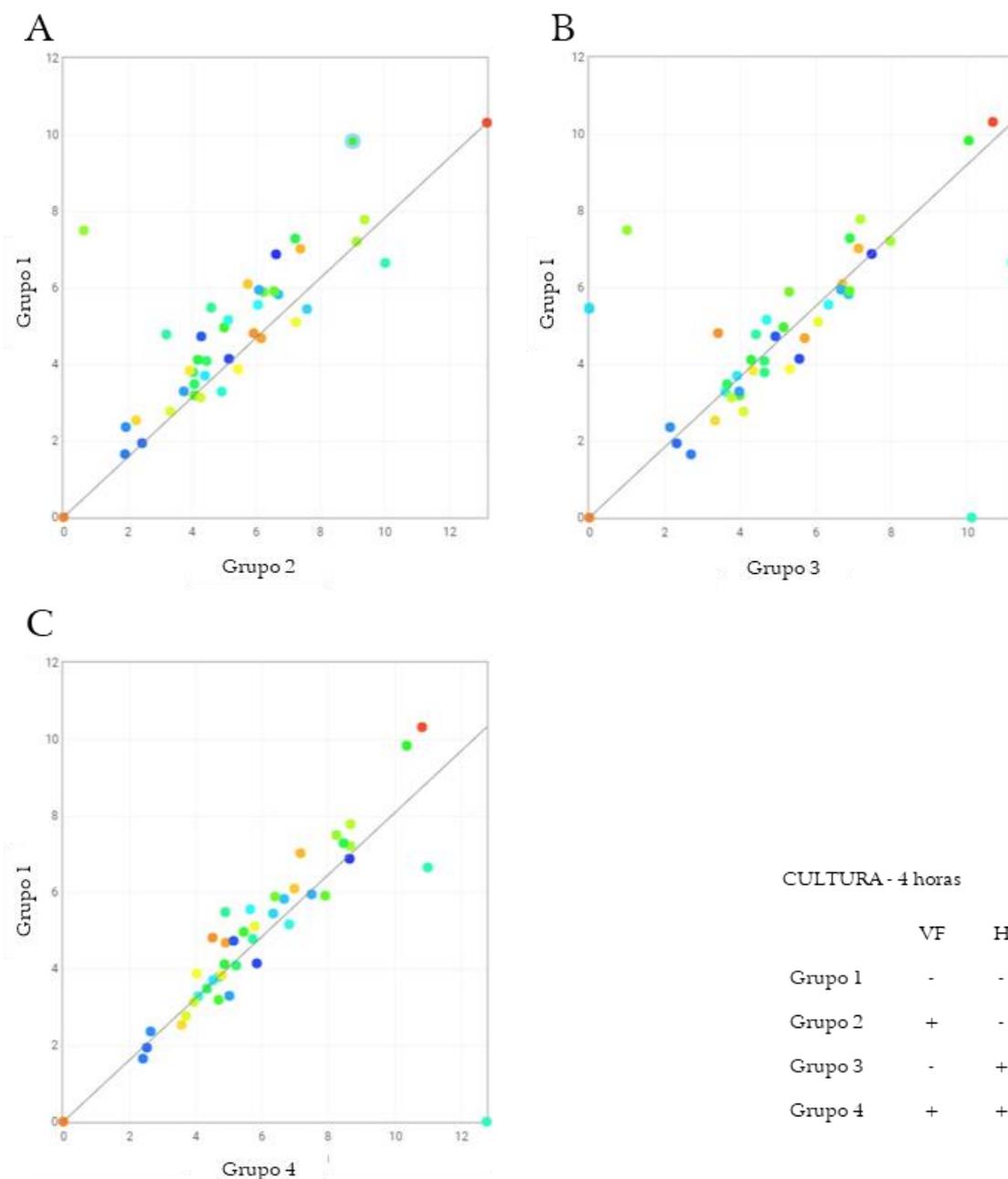


Figura 41. Comparação entre o painel de expressão génica no tecido ovárico mantido em cultura sem suplementação e com VEGF, FGF e hMG. A expressão génica do grupo de cultura sem suplementação (Grupo 1, eixos do y) foi comparada com o tecido ovárico mantido em cultura com VEGF e FGF (Grupo 2, A), hMG (Grupo 3, B) ou a suplementação tripla (Grupo 4, C) (eixos do x). Cada ponto representa um gene diferente.

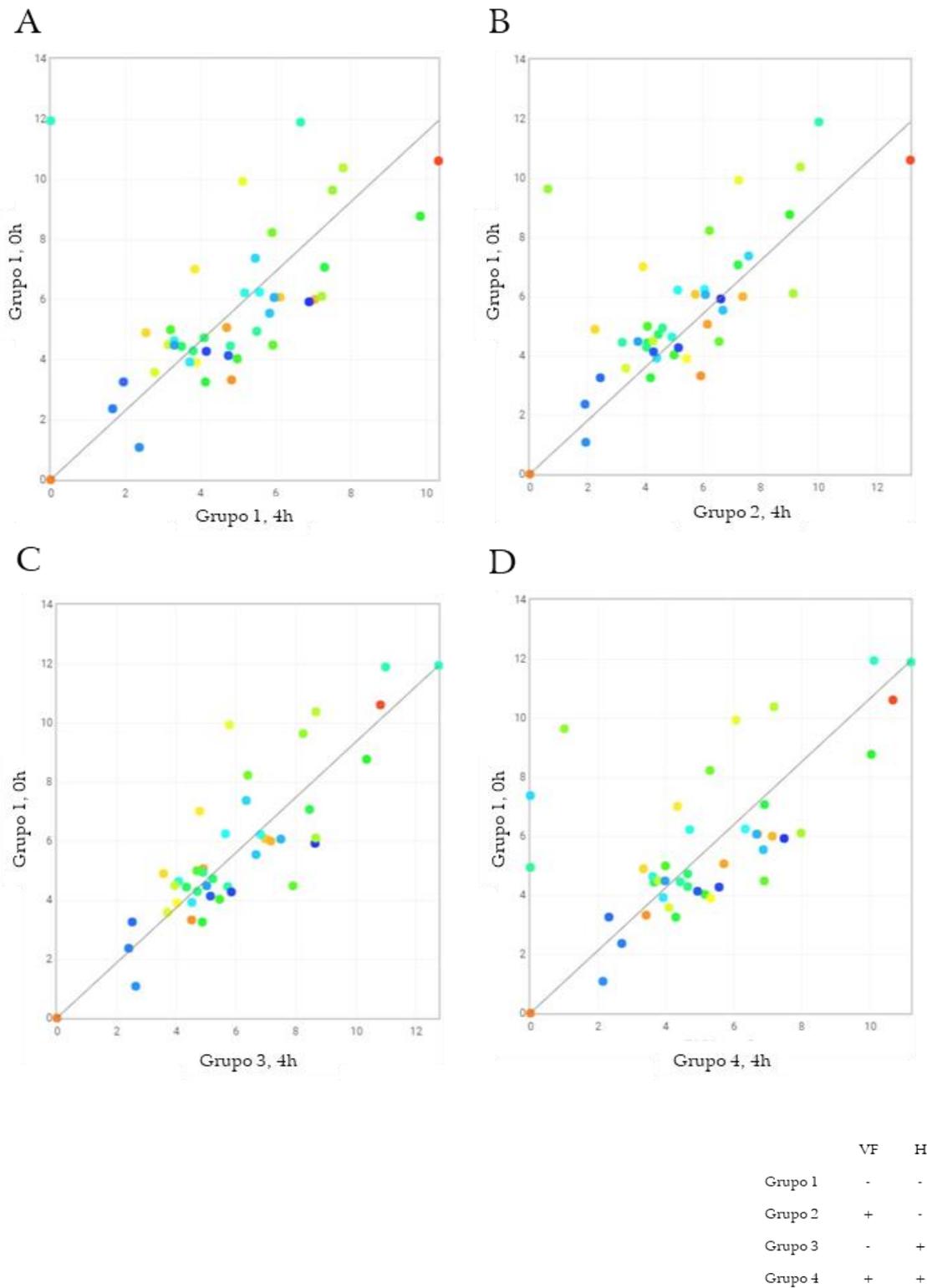


Figura 42. Comparação entre o painel de expressão génica no tecido ovárico avaliado imediatamente após criopreservação comparativamente com a cultura com e sem suplementação. A expressão génica do grupo de tecido avaliado imediatamente após criopreservação (Grupo 1, eixos dos y) foi comparada com o tecido ovárico mantido em cultura sem fatores (Grupo 1, A), com VEGF e FGF (Grupo 2, B), hMG (Grupo 3, C) ou a suplementação tripla (Grupo 4, D) (eixos dos x). Cada ponto representa um gene diferente.

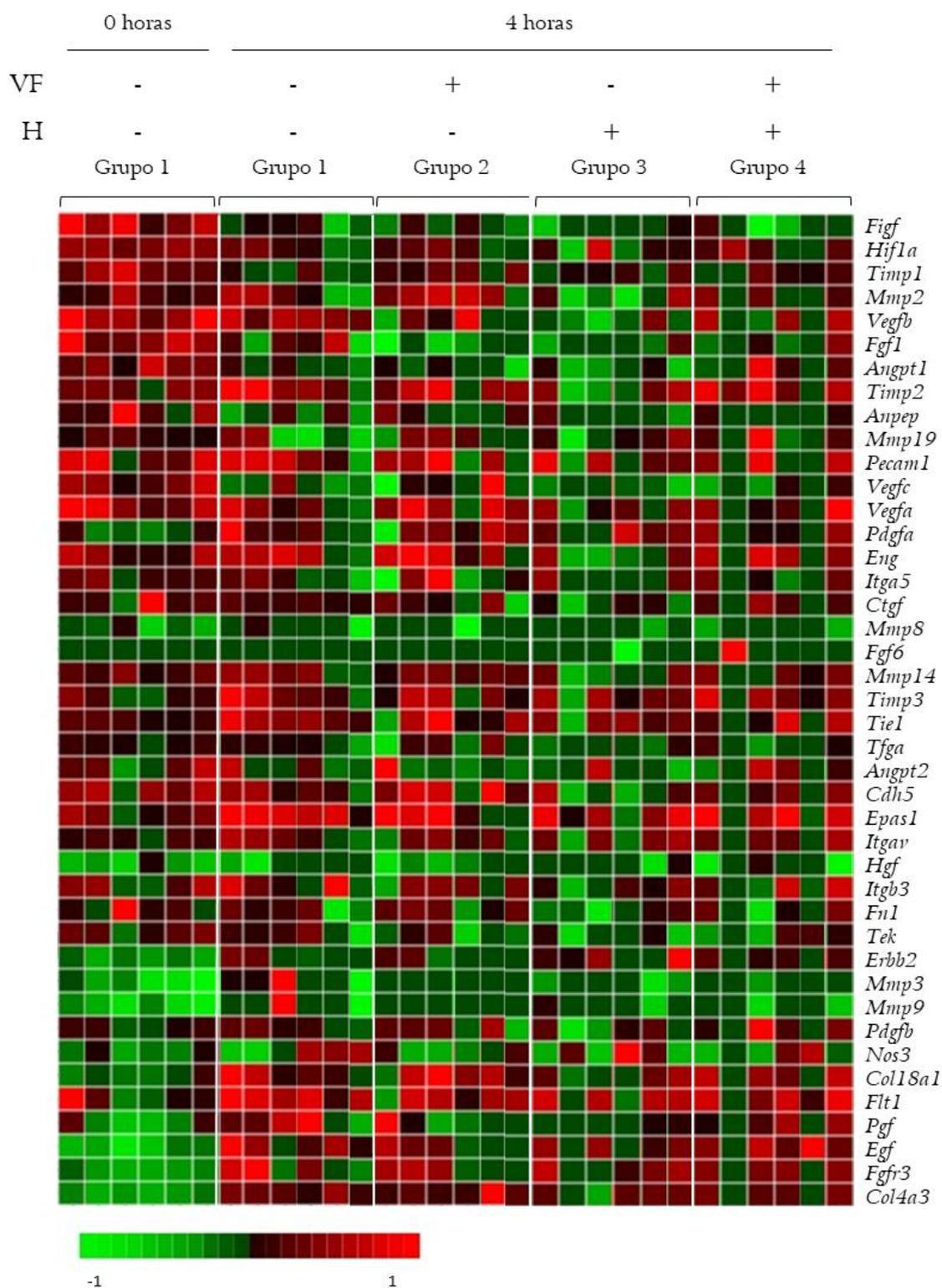


Figura 43. *Heatmap* com o padrão de expressão no tecido ovárico de genes envolvidos na angiogênese. Nas colunas encontram-se representadas as diferentes amostras de cada grupo e nas linhas os vários genes avaliados. A escala de cores representa a verde os genes sobre expressos e a vermelho os genes subexpressos.

Na avaliação mais detalhada da expressão gênica e através da análise dos gráficos Volcano apresentados na Figura 44, verificou-se que com a suplementação com VEGF e com FGF houve diminuição da expressão de *Figf* e aumento da expressão da *Col18a1* ($p=0,026$ para ambos). A administração de hMG isoladamente aumentou a expressão de *Egf* ($p=0,032$) e *Fgfr-3* ($p=0,024$). Com a suplementação tripla, o aumento da expressão de *Egf* persiste ($p=0,03$).

Tendo em conta estes resultados foram selecionados os genes referidos na Tabela 15 para avaliação quantitativa. Os resultados da qPCR estão representados na Figura 45. Verificou-se que nos tecidos submetidos a cultura sem suplementação, houve um aumento da expressão de *Col4a3* ($p<0,001$), de *Col18a1* ($p=0,04$), de *Egf* ($p=0,02$) e de *Tie1* ($p=0,02$), bem como uma tendência para aumento da expressão de *Epas1* e de *Fgfr-3* ($p=0,05$, em ambos). Os tecidos mantidos em cultura com suplementação com VEGF e com FGF apresentaram níveis mais elevados de expressão de *Col4a3* que os tecidos avaliados imediatamente após criopreservação ($p=0,02$), mas menores nos tecidos submetidos a cultura sem suplementação ($p=0,01$). No grupo de cultura com suplementação com VEGF e com FGF, verificou-se ainda uma tendência ($p=0,05$) para níveis mais elevados de expressão de *Egf* e de *Epas1* e mais reduzidos de expressão de *Figf* e de *Kdr* comparativamente com os tecidos avaliados imediatamente após criopreservação. A expressão de *Figf* nos tecidos submetidos a cultura com suplementação com VEGF e com FGF, encontrou-se diminuída não só quando comparado com os tecidos avaliados imediatamente após criopreservação como com os tecidos submetidos a cultura sem suplementação e com suplementação com hMG ($p=0,05$). Os tecidos ováricos mantidos em cultura com suplementação com hMG também mostraram maiores níveis de expressão de *Col4a3* do que os tecidos avaliados imediatamente após criopreservação ($p=0,03$). O mesmo se verificou nos tecidos submetidos a cultura com a suplementação tripla com hMG, VEGF e FGF ($p=0,03$), bem como um aumento nos níveis de expressão de *Tie1* ($p<0,001$). Neste grupo, a expressão de *Figf* diminuiu comparativamente com o grupo de cultura sem suplementação ($p=0,02$).

Por último, quando se comparam os resultados do *array* com a qPCR, apenas se confirmou a menor expressão de *Figf* no grupo de cultura com suplementação com

VEGF e com FGF e maior expressão de *Egf* com suplementação tripla, ambos em comparação com o tecido avaliado imediatamente após a criopreservação.

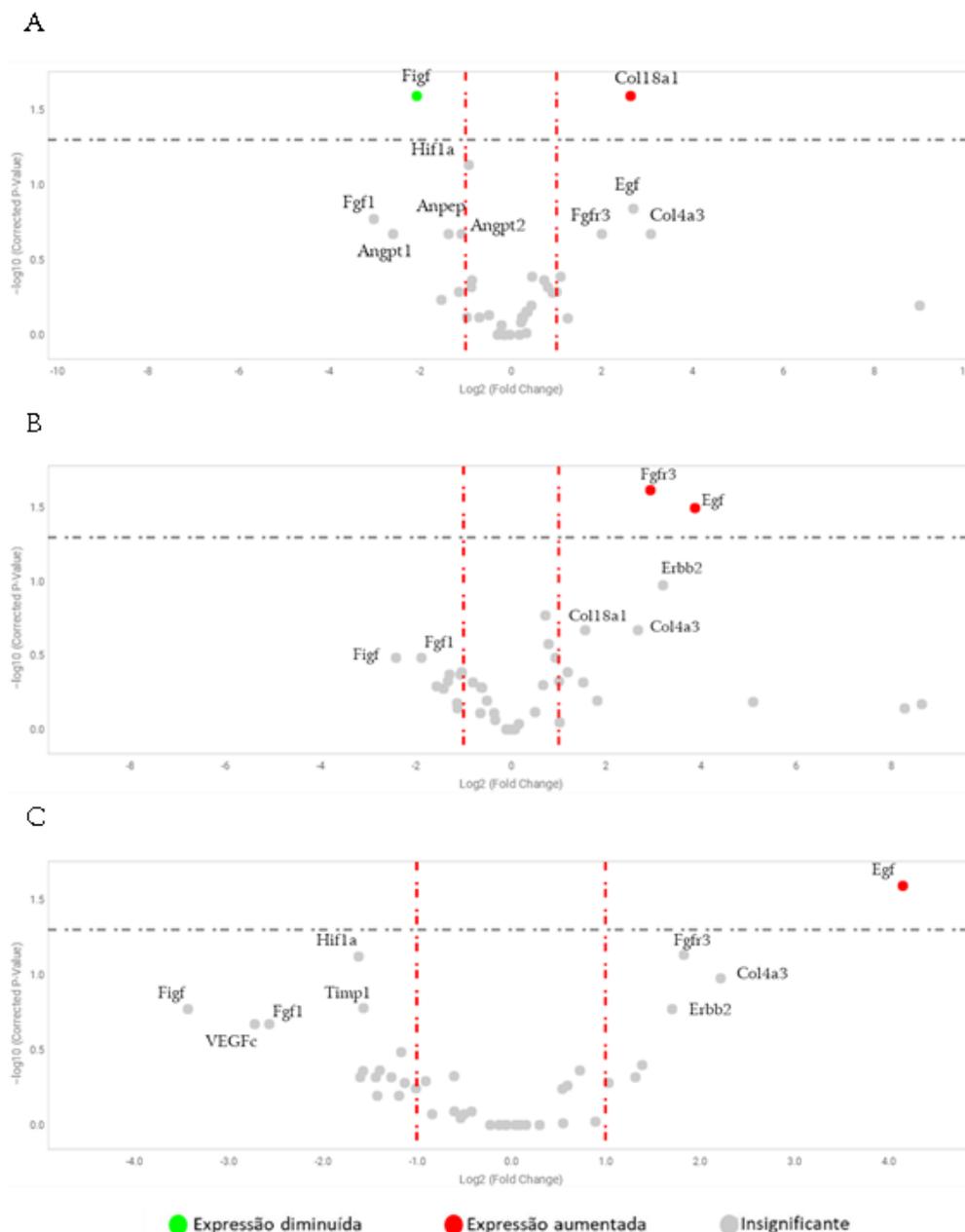


Figura 44. Gráficos Volcano da comparação do tecido avaliado imediatamente após descongelação com o tecido mantido em cultura com suplementação do meio. Os resultados são apresentados em $\log_2(\text{fold-change})$ versus $-\log_{10}(\text{valor } p \text{ corrigido})$. O gráfico A é da comparação com o tecido mantido em cultura com suplementação com VEGF e com FGF (Grupo 2), o B com hMG (Grupo 3) e o C com a suplementação tripla (Grupo 4). A linha tracejada vermelha representa a *fold change* e a linha tracejada cinzenta delimita a significância estatística ($p = 0,05$). A vermelho estão representados os genes com expressão aumentada, a verde com expressão diminuída e a cinzento aqueles que não apresentam diferenças.

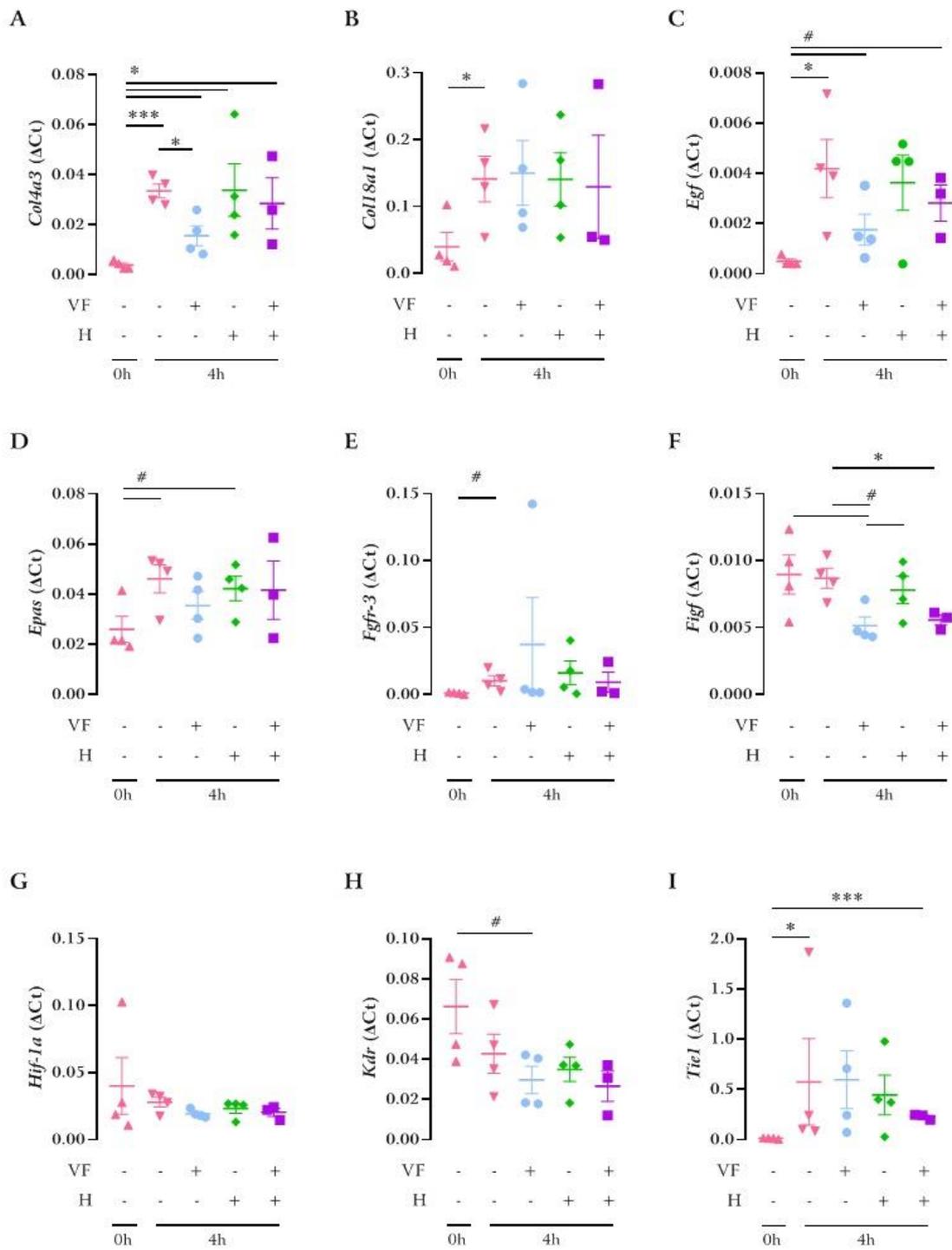


Figura 45. Expressão gênica no tecido avaliado imediatamente após a criopreservação e após cultura com e sem suplementação do meio. Os resultados dos ΔCt para cada gene *Col4a3* (A), *Col18a1* (B), *Egf* (C), *Epas1* (D), *Fgfr-3* (E), *Figf* (F), *Hif1 α* (G), *Kdr* (H), e *Tie1* (I) são apresentados na forma de média \pm SEM. A significância estatística está representada com * para $p < 0,05$, *** para $p < 0,001$ e # para $p = 0,05$.

Os níveis de angiopoietina-2 no meio de cultura foram avaliados pela técnica de ELISA. Os grupos com suplementação do meio com hMG isolada ou em associação com VEGF e FGF apresentaram menor quantidade de angiopoietina-2 comparativamente com os restantes grupos, como se pode observar na Figura 46.

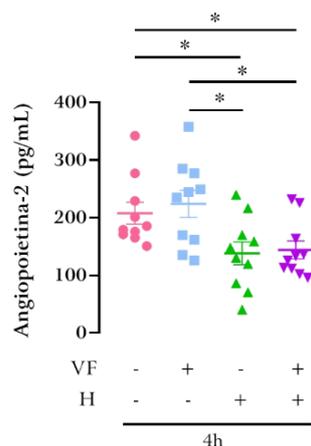


Figura 46. Angiopoietina-2 no sobrenadante do tecido mantido em cultura com ou sem suplementação. Os resultados são apresentados em pg/mL, na forma de média±SEM. A significância estatística está representada com * para $p < 0,05$.

VII.2.1.2. Efeito da suplementação com VEGF, FGF e hMG nos folículos

A densidade de folículos normais manteve-se sem alterações significativas em relação ao tecido avaliado imediatamente após criopreservação, como representado na Figura 47.A. Quando comparados os grupos após a cultura, a densidade folicular nos tecidos submetidos a cultura com a suplementação com hMG isoladamente ($1,156 \pm 0,257$ folículos/ mm^2 , $p=0,033$) ou em associação com VEGF e FGF ($1,303 \pm 0,204$ folículos/ mm^2 , $p=0,045$) foi menor que no grupo de tecido mantido em cultura sem suplementação ($2,123 \pm 0,293$ folículos/ mm^2), como se pode verificar na Figura 47.B.

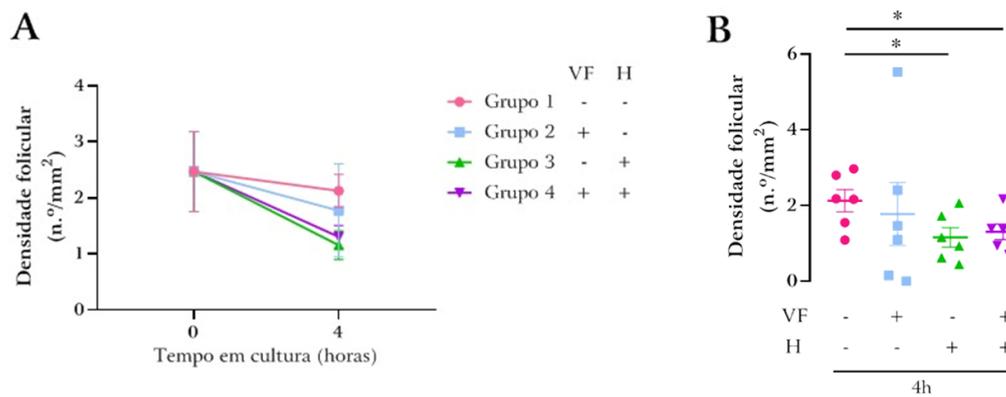


Figura 47. Densidade de folículos morfologicamente normais no tecido ovárico após criopreservação submetido a cultura com VEGF, FGF e hMG. São apresentados os resultados relativamente ao tecido avaliados imediatamente após a criopreservação (A), bem como a comparação entre grupos após cultura (B). Os resultados são apresentados na forma de média±SEM. A significância estatística está representada com * para $p < 0,05$.

O *Bmp15* e o *Gdf9* são genes envolvidos na foliculogénese, que apresentaram diminuição da expressão quando comparados os tecidos avaliados imediatamente após a descongelação com os tecidos submetidos a cultura sem suplementação (*Bmp15*, $p=0,02$, Figura 48.A; *Gdf9*, $p=0,03$, Figura 48.B) e com VEGF e com FGF (*Bmp15*, $p=0,006$, Figura 48.A; *Gdf9*, $p=0,03$, Figura 48.B). Não houve diferenças na expressão destes genes entre os restantes grupos.

Através da avaliação dos folículos por estágio de desenvolvimento, a densidade de folículos primordiais nos grupos de cultura com suplementação com hMG isoladamente ($0,329 \pm 0,106$ folículos/mm², $p=0,015$) ou em associação com o VEGF e FGF ($0,260 \pm 0,2054$ folículos/mm², $p=0,004$) foi menor que no tecido avaliado imediatamente após a criopreservação ($1,285 \pm 0,474$ folículos/mm²), como apresentado na Figura 49.A. Não houve diferenças na densidade de folículos primários e secundários (Figura 49.C e E).

Na avaliação da percentagem folicular, constatou-se uma diminuição dos folículos primordiais, em todos os grupos comparativamente com o tecido avaliado imediatamente após a criopreservação, como representado na Figura 49.B. A percentagem de folículos primordiais verificada imediatamente após a criopreservação foi de $51,208 \pm 7,062\%$ e após cultura sem suplementação foi de $23,129 \pm 5,428\%$

($p=0,009$), com suplementação com VEGF e com FGF foi de $12,875\pm 3,780\%$ ($p=0,002$), com hMG isoladamente foi de $24,872\pm 4,024\%$ ($p=0,012$) e com a associação dos três foi de $20,848\pm 3,511\%$ ($p=0,006$). Verificou-se ainda um aumento da percentagem de folículos secundários nos grupos de cultura sem suplementação ($46,924\pm 4,619\%$, $p=0,041$) e com suplementação apenas com hMG ($52,488\pm 6,180\%$, $p=0,022$) comparativamente com o tecido avaliado imediatamente após criopreservação ($30,792\pm 5,098\%$) como apresentado na Figura 49.F. Não se verificaram diferenças na percentagem de folículos primários.

Na comparação entre grupos após cultura, a diminuição da densidade folicular global verificada nos grupos com suplementação com hMG (Figura 47.B) foi devida à diminuição de folículos primários nestes grupos. Os tecidos mantidos em cultura com hMG isoladamente ($0,233\pm 0,047$ folículos/mm², $p=0,009$) e em associação com VEGF e FGF ($0,329\pm 0,033$ folículos/mm², $p=0,043$) apresentaram menor densidade de folículos primários que o grupo de cultura sem suplementação ($0,658\pm 0,123$ folículos/mm²), como apresentado na Figura 50.C. Não se verificaram diferenças na densidade de folículos primordiais (Figura 50.A) e secundários (Figura 50.E), nem na percentagem de todas as classes foliculares (Figura 50.B, D e F).

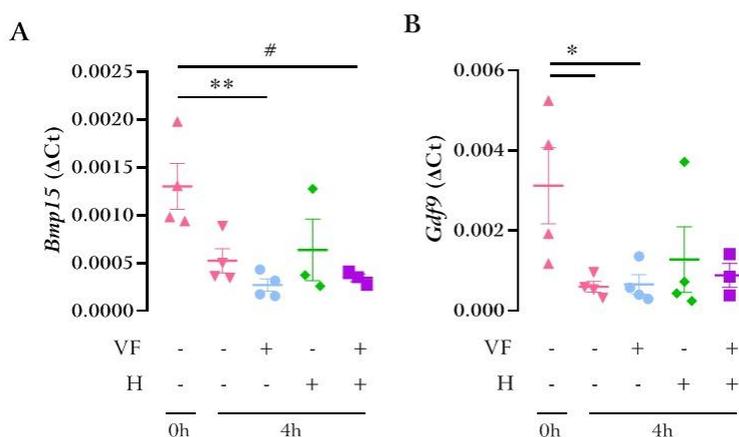


Figura 48. Expressão de *Bmp15* e *Gdf9* no tecido ovárico avaliado imediatamente após criopreservação e comparado com o tecido submetido a cultura com VEGF, FGF e hMG. São apresentados o Δ Ct do *Bmp15* (A) e do *Gdf9* (B). Os dados são apresentados na forma de média \pm SEM. A significância estatística está representada com * para $p < 0,05$, ** para $p < 0,01$ e # para $p = 0,05$. Os asteriscos (*) junto à legenda representam diferenças significativas entre a cultura e o tecido avaliado imediatamente após descongelação.

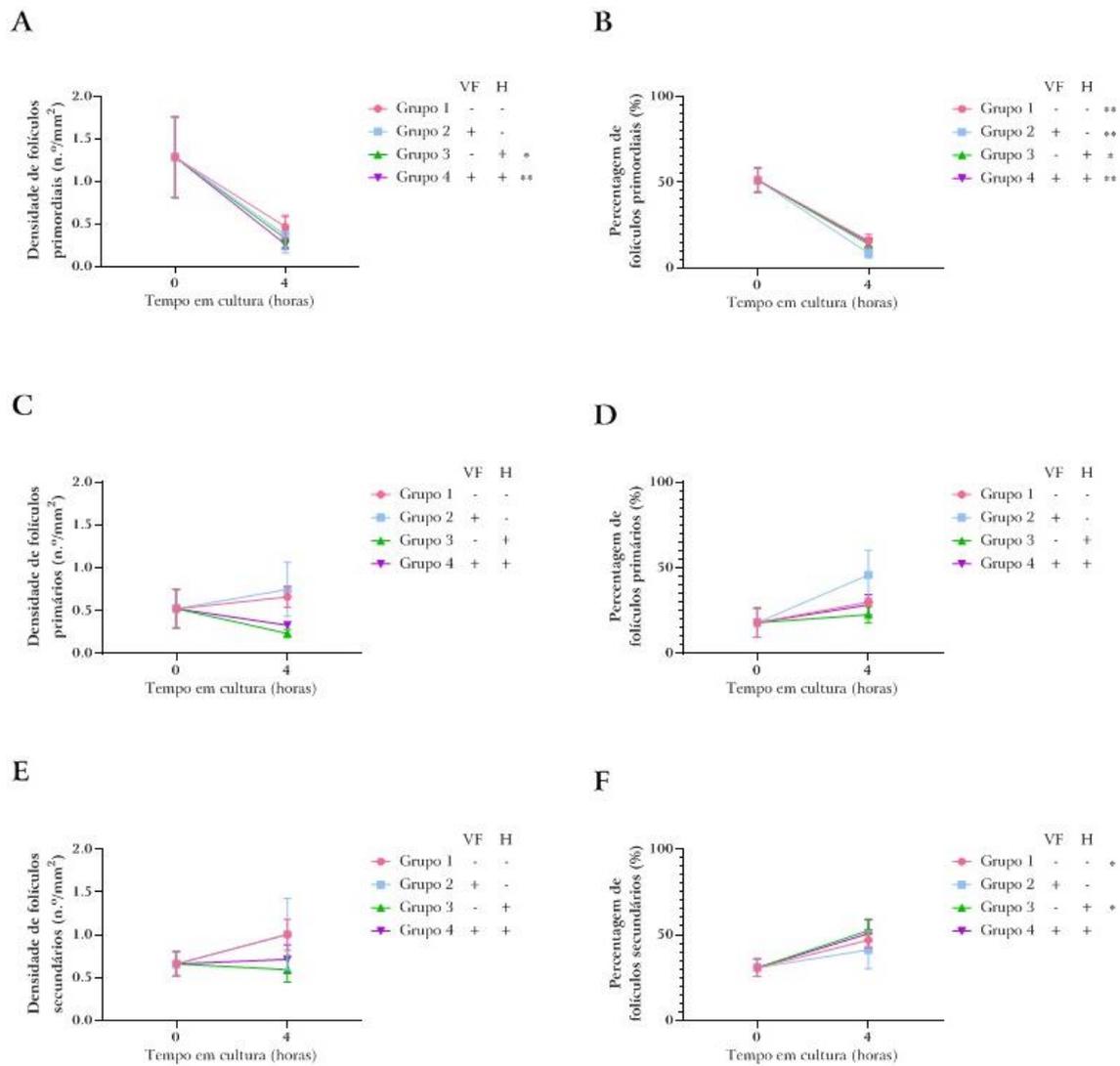


Figura 49. Folículos por estágio de desenvolvimento no tecido ovárico avaliado imediatamente após criopreservação e comparado com o tecido submetido a cultura com VEGF, FGF e hMG. São apresentados os resultados em densidade (A, C, E) e percentagem folicular (B, D, F) para os folículos primordiais (A, B), primários (C, D) e secundários (E, F). Todas as comparações foram realizadas em relação ao tecido avaliado imediatamente após criopreservação. Os dados são apresentados na forma de média \pm SEM. A significância estatística está representada com * para $p < 0,05$ e ** para $p < 0,01$. Os asteriscos (*) junto à legenda representam diferenças significativas entre a cultura e o tecido avaliado imediatamente após descongelamento.

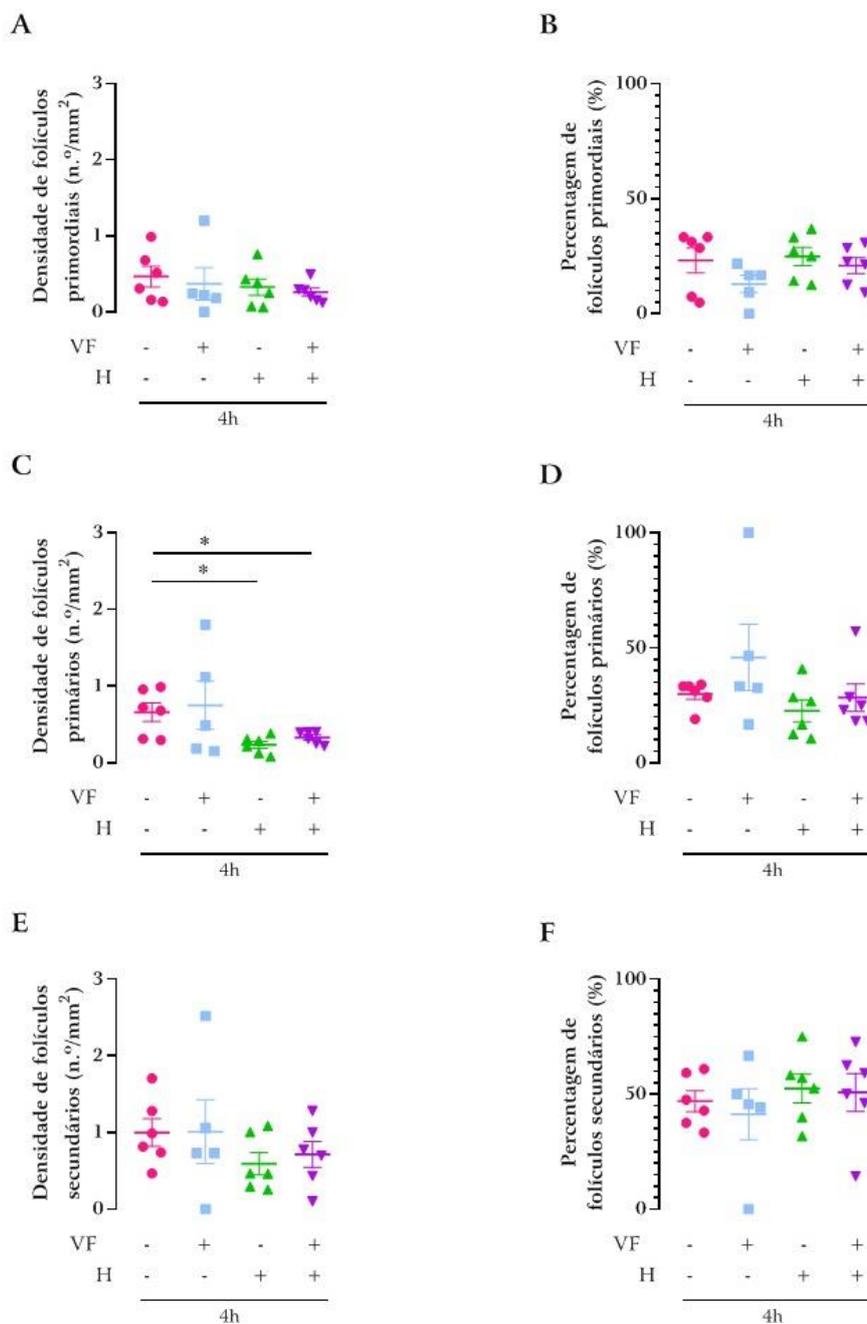


Figura 50. Folículos por estágio de desenvolvimento no tecido ovárico submetido a cultura na ausência e na presença de VEGF, FGF e hMG. São apresentados os resultados em densidade (A, C, E) e percentagem folicular (B, D, F) para os folículos primordiais (A, B), primários (C, D) e secundários (E, F). Os dados são apresentados na forma de média±SEM. A significância estatística está representada com * para $p < 0,05$ e ** para $p < 0,01$.

No que diz respeito à quantidade de folículos atresicos avaliados por área de superfície (densidade, Figura 51.A) e em percentagem (Figura 51.B), não se verificaram diferenças entre os grupos.

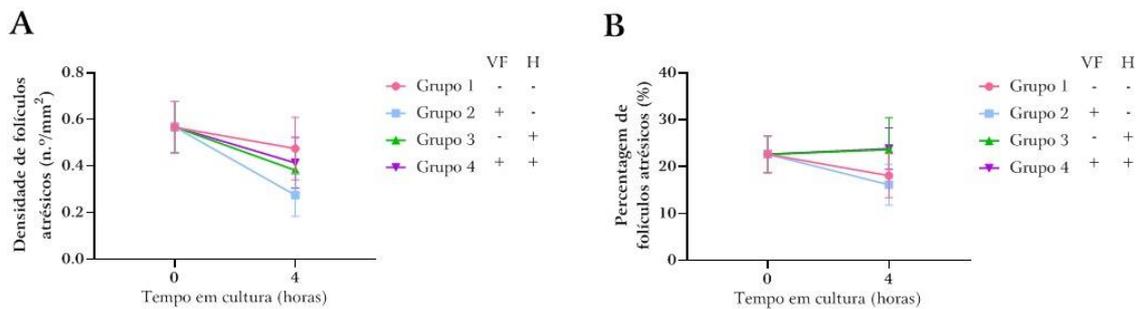


Figura 51. Foliculos atrésicos no tecido ovárico avaliado imediatamente após criopreservação e comparado com o tecido submetido a cultura com VEGF, FGF e hMG. Todas as comparações foram realizadas em relação ao tecido avaliado imediatamente após criopreservação. Os resultados em densidade (A) e percentagem folicular (B) são apresentados na forma de média \pm SEM.

A proliferação no tecido ovárico foi avaliada pela expressão de Ki67. Observou-se uma diminuição dos foliculos em proliferação no grupo mantido em cultura sem suplementação e tratado com a associação de VEGF e FGF em relação ao grupo de tecido ovárico avaliado imediatamente após criopreservação, como apresentado na Figura 52.A. A suplementação com hMG, isoladamente ou em associação com VEGF e com FGF, condicionou uma percentagem significativamente superior de foliculos em proliferação comparativamente com a suplementação apenas com VEGF e com FGF (VF=6,811 \pm 5,896% *versus* H=77,536 \pm 8,853%, p=0,004, e VF+H=80,714 \pm 4,959%, p=0,004). Estes resultados são apresentados na Figura 52.B.

Na análise da proliferação folicular, por estágio de desenvolvimento, não se verificaram diferenças na percentagem de foliculos primordiais entre os grupos de cultura. A percentagem de foliculos primários aumentou no grupo com a suplementação tripla comparativamente com o grupo com suplementação apenas com VEGF e com FGF (p=0,016). A suplementação com hMG isoladamente ou em associação tripla também aumentou a percentagem de foliculos secundários (p<0,01). Estes resultados podem ser observados na Tabela 21.

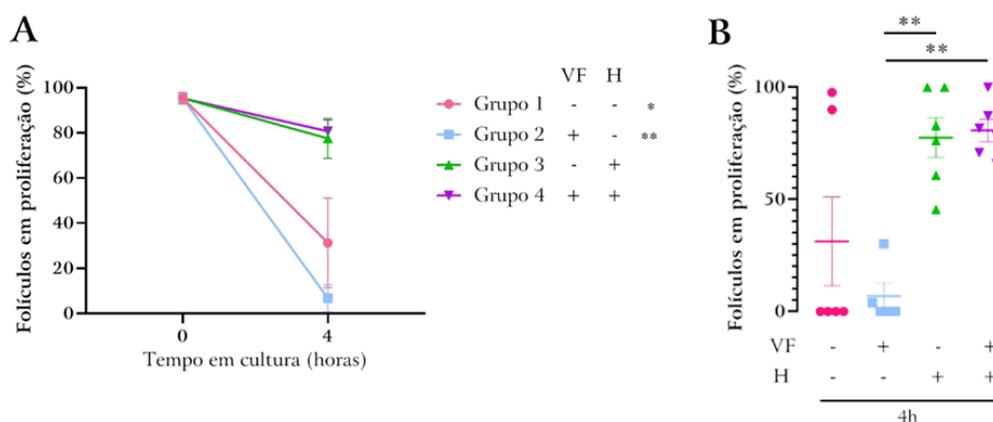


Figura 52. Proliferação nos folículos no tecido ovárico avaliado imediatamente após criopreservação e comparado com o tecido submetido a cultura com VEGF, FGF e hMG. A proliferação foi quantificada tendo em conta o número de folículos com marcação positiva para Ki67 no número total de folículos. São apresentados os resultados relativamente ao tecido avaliados imediatamente após a criopreservação (A), bem como a comparação entre grupos após cultura (B). Os dados são apresentados na forma de média±SEM. A significância estatística está representada com ** para $p < 0,01$. Os asteriscos (*) junto à legenda representam diferenças significativas entre a cultura e o tecido avaliado imediatamente após descongelamento (A), enquanto os asteriscos (*) entre grupos representam diferenças entre grupos de tratamento após cultura (B).

Tabela 21. Percentagem de folículos em proliferação por estágio de desenvolvimento. Os dados são apresentados na forma de média±SEM. A significância estatística está representada com ^a para diferenças relativamente ao grupo de tecido avaliado imediatamente após criopreservação, ^b para diferenças relativamente ao grupo de tecido submetido a cultura sem suplementação e ^c para diferenças relativamente ao grupo de cultura com suplementação com VEGF e com FGF.

	VF	H	Folículos primordiais	Folículos primários	Folículos secundários
0h	-	-	88,214 ± 4,966	86,667 ± 8,165	100
	-	-	26,667 ± 26,667	66,667 ± 33,333	64,815 ± 32,447 ^a
4h	+	-	0 ^a	9,091 ± 9,091 ^a	31,250 ± 31,250 ^a
	-	+	25 ± 25	47,619 ± 21,028 ^a	100 ^{b,c}
	+	+	35 ± 17,078 ^a	67,917 ± 16,310 ^c	100 ^{b,c}

No que diz respeito à apoptose, não se verificam diferenças a nível dos folículos, quer na avaliação global representada na Figura 53, quer na avaliação por estágio de desenvolvimento apresentada na Tabela 22.

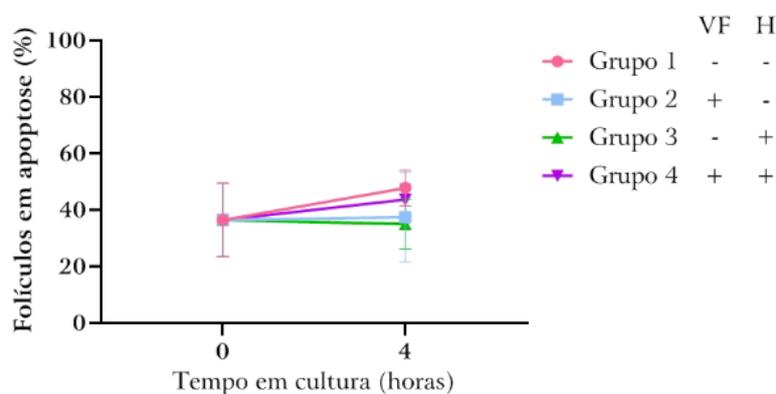


Figura 53. Apoptose nos folículos no tecido ovárico avaliado imediatamente após criopreservação e comparado com o tecido submetido a cultura com VEGF, FGF e hMG. A apoptose foi quantificada tendo em conta o número de folículos com marcação positiva para caspase 3 no número total de folículos. Todas as comparações foram realizadas em relação ao tecido avaliado imediatamente após criopreservação. Os dados são apresentados na forma de média±SEM.

Tabela 22. Percentagem de folículos em apoptose por estágio de desenvolvimento. Os dados são apresentados na forma de média±SEM.

	VF	H	Folículos primordiais	Folículos primários	Folículos secundários
0h	-	-	0	33,33 ± 13,94	45,71 ± 22,77
	-	-	12,50 ± 12,50	14,16 ± 9,46	78,85 ± 12,31
4h	+	-	0	30,56 ± 16,89	49,61 ± 27,33
	-	+	0	6,25 ± 6,25	57,22 ± 14,10
	+	+	0	0	81,68 ± 7,51

VII.2.1.3. Efeito da suplementação com VEGF, FGF e hMG no estroma ovárico

A nível do estroma, não se verificaram diferenças na proliferação celular no grupo de suplementação tripla comparativamente com o tecido avaliado imediatamente após a criopreservação. Nos restantes grupos de cultura houve uma diminuição da proliferação celular comparativamente com o tecido avaliado imediatamente após a criopreservação, conforme pode ser constatado na Figura 54.A. Na análise da cultura representada na Figura 54.B., o mesmo grupo cujo tecido foi submetido a suplementação tripla teve maior percentagem de proliferação ($1,740 \pm 0,426\%$) comparativamente ao grupo de cultura sem suplementação ($0,2645 \pm 0,146\%$,

p=0,008) e com VEGF e com FGF ($0,160\pm 0,117\%$, p=0,009).

No que diz respeito à apoptose, verificou-se uma diminuição da apoptose em todos os grupos comparativamente ao tecido avaliado imediatamente após criopreservação, como representado na Figura 55.A. Após a cultura, o grupo de suplementação tripla apresentou maior percentagem de apoptose no estroma comparativamente a suplementação isolada com hMG ($0,643\pm 0,071\%$ versus $0,258\pm 0,110\%$, p=0,015). Como apresentado na Figura 55.B, a percentagem de apoptose no tecido após cultura é residual.

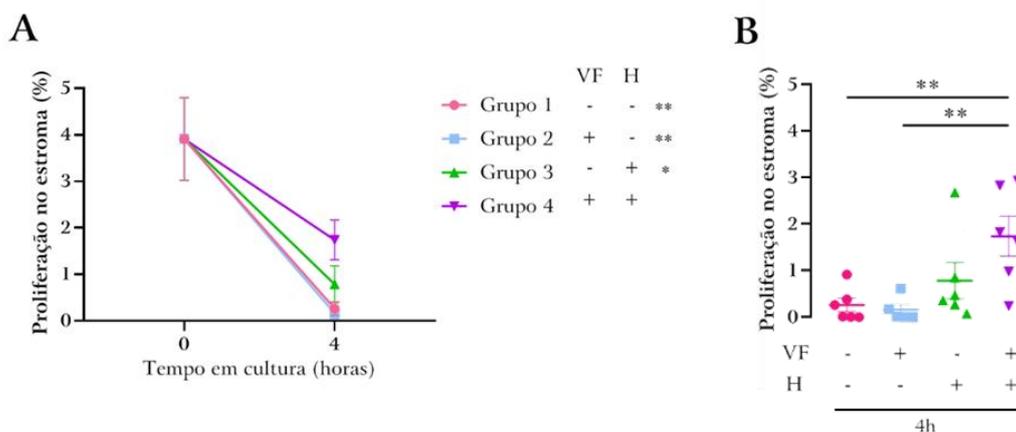


Figura 54. Proliferação no estroma ovárico avaliado imediatamente após criopreservação e comparado com o tecido submetido a cultura com VEGF, FGF e hMG. A proliferação foi quantificada tendo em conta a área de marcação positiva para Ki67. São apresentados os resultados relativamente ao tecido avaliados imediatamente após a criopreservação (A), bem como a comparação entre grupos após cultura (B). Os dados são apresentados na forma de média±SEM. A significância estatística está representada com * para p<0,05 e ** para p<0,01. Os asteriscos (*) junto à legenda representam diferenças significativas entre a cultura e o tecido avaliado imediatamente após descongelação (A), enquanto os asteriscos (*) entre grupos representam diferenças entre grupos de tratamento após cultura (B).

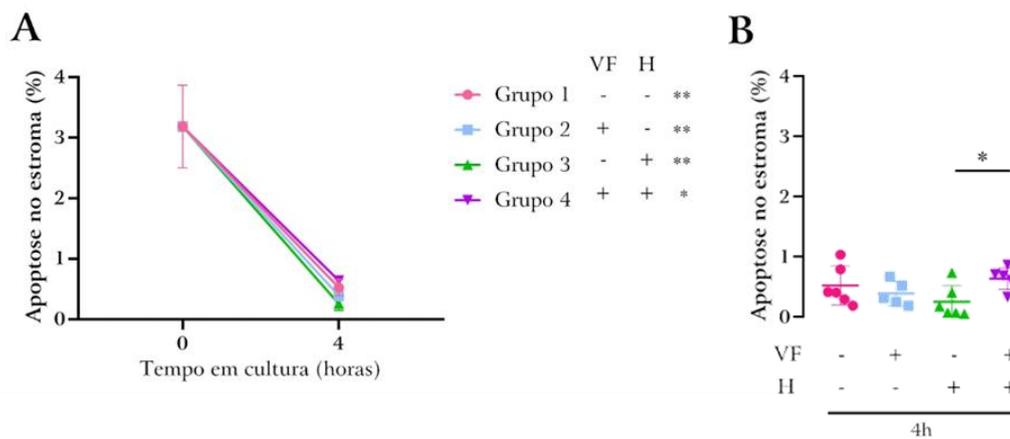


Figura 55. Apoptose no estroma ovárico avaliada imediatamente após criopreservação e comparado com o tecido submetido a cultura com VEGF, FGF e hMG. A apoptose foi quantificada tendo em conta a área com marcação positiva para caspase 3. Todas as comparações foram realizadas em relação ao tecido avaliado imediatamente após criopreservação. Os dados são apresentados na forma de média \pm SEM. A significância estatística está representada com * para $p < 0,05$ e ** para $p < 0,01$. Os asteriscos (*) junto à legenda representam diferenças significativas entre a cultura e o tecido avaliado imediatamente após descongelação (A), enquanto os asteriscos (*) entre grupos representam diferenças entre grupos de tratamento após cultura (B).

Em síntese, a suplementação em cultura do tecido ovárico após criopreservação alterou a expressão de genes relacionados com a angiogénese como o *Col4a3*, o *Coll8a1*, o *Egf*, o *Epas1*, o *FgFr-3*, o *Figf*, o *Kdr* e o *Tie1*, bem como da angiopoietina-2. A suplementação com hMG, isoladamente ou em associação a VEGF e a FGF, foi o que apresentou melhores resultados, uma vez que não condicionou a alteração da expressão dos genes relacionados com a foliculogénese (*Gdf9* e *Bmp15*) e se associou a uma maior proliferação no tecido, de forma mais aproximada ao tecido avaliado imediatamente após a criopreservação. Do ponto de vista folicular, houve uma diminuição da densidade folicular nestes grupos, à custa da diminuição dos folículos primários e com preservação dos folículos primordiais.

VII.2.2. Estudo *in vivo*

Com base nos resultados do estudo *in vitro* e da utilização de uma matriz de alginato descrita no capítulo V, realizou-se o estudo *in vivo*, no qual se investigou o transplante

de tecido ovárico após suplementação com hMG isoladamente ou em associação com o VEGF e o FGF.

VII.2.2.1. Estímulo angiogénico no enxerto com VEGF, FGF e hMG

No que diz respeito à avaliação vascular, verificou-se que após 7 dias de transplante não há diferenças entre os grupos. Contudo, com o prolongamento da permanência do transplante até 21 dias, a suplementação tripla determinou um aumento da área vascular (cerca do dobro) comparativamente à suplementação apenas com hMG ($1,293 \pm 0,133\%$ versus $0,757 \pm 0,123\%$, $p=0,007$, potência $(1-\beta)=100\%$). Além disso, no grupo de suplementação isolada com hMG, verificou-se um decréscimo para metade da área vascular dos 7 para os 21 dias após o transplante ($1,634 \pm 0,237$ versus $0,757 \pm 0,123\%$, $p=0,002$). Estes resultados são apresentados na Figura 56.

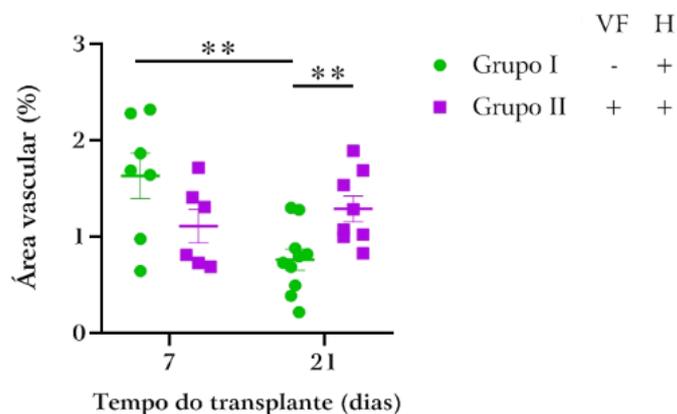


Figura 56. Área vascular no enxerto de tecido ovárico após o transplante. A avaliação vascular foi realizada por imunohistoquímica com a marcação anti-FVIII. São comparados os resultados entre o tecido suplementado apenas com hMG (Grupo I) ou em associação com VEGF e FGF (Grupo II). Os dados são apresentados na forma de média \pm SEM. A significância estatística está representada com ** para $p < 0,01$.

Do ponto de vista da expressão génica, não houve diferenças entre grupos nos dois

momentos de avaliação dos enxertos, como é possível constatar pelos gráficos da Figura 57. No grupo de suplementação isolada com hMG verificou-se um aumento da expressão de *Egf* ($p=0,01$), de *Epas1* ($p=0,02$) e de *Tie1* ($p<0,001$) do 7º para o 21º dia pós- transplante. No grupo de suplementação tripla aumentou a expressão de *Col4a3* ($p=0,03$), de *Fgfr-3* ($p=0,03$) e de *Hif1 α* ($p=0,009$) durante o período do transplante.

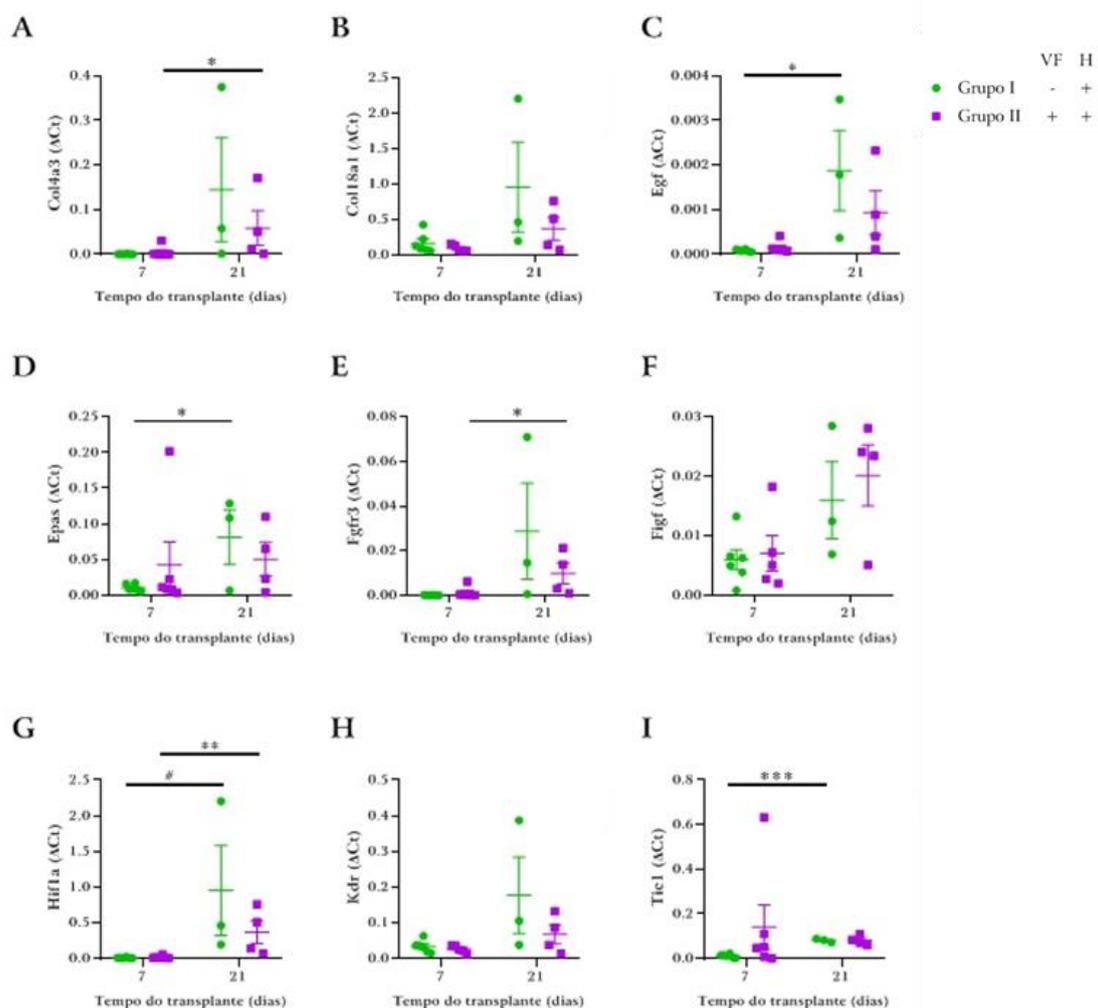


Figura 57. Expressão gênica no tecido avaliado imediatamente após a criopreservação e após cultura com e sem suplementação do meio. Os resultados são apresentados os ΔC_t para cada gene: *Col4a3* (A), *Col18a1* (B), *Egf* (C), *Epas1* (D), *Fgfr-3* (E), *Figf* (F), *Hif1 α* (G), *Kdr* (H), e *Tie1* (I). São comparados os resultados entre o tecido suplementado apenas com hMG (Grupo I) ou em associação com VEGF e FGF (Grupo II). Os dados são apresentados na forma de média \pm SEM. A significância estatística está representada com * para $p<0,05$, ** para $p<0,01$, *** para $p<0,001$ e # para $p=0,05$.

VII.2.2.2. Avaliação do enxerto de tecido ovárico

Na avaliação macroscópica dos enxertos não se verificaram diferenças entre grupos. Ao longo do período experimental verificou-se que uma percentagem semelhante de enxertos foi reabsorvida (18% no grupo de cultura com suplementação com hMG isoladamente e 20% no grupo com a suplementação tripla, $p>0,05$). Através da avaliação histológica foi quantificada a área do enxerto e não se verificaram diferenças entre os grupos, como representado na Figura 58.

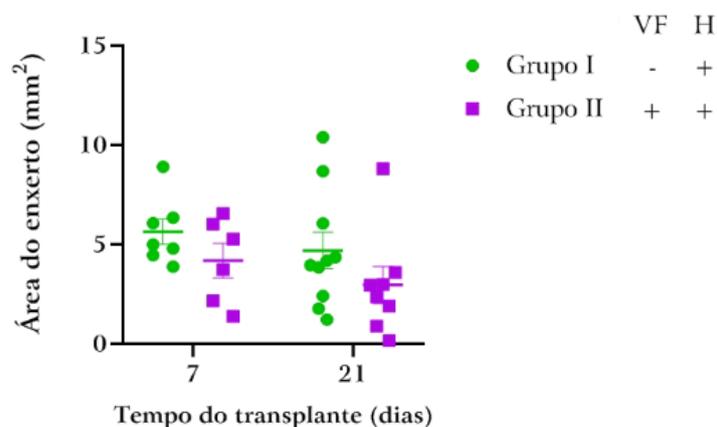


Figura 58. Área do enxerto de tecido ovárico após o transplante. São comparados os resultados entre o tecido suplementado apenas com hMG (Grupo I) ou em associação com VEGF e FGF (Grupo II). Os dados são apresentados na forma de média \pm SEM.

VII.2.2.3. Efeito do tratamento nos folículos

No que diz respeito à avaliação folicular apresentada na Figura 59, também não se verificaram diferenças entre os grupos de tratamento. Ao comparar os enxertos aos 7 e 21 dias, constatou-se que no tecido suplementado apenas com hMG houve aumento da densidade folicular ($0,295 \pm 0,082$ versus $1,100 \pm 0,433$ folículos/mm², $p=0,019$).

O aumento dos folículos no grupo com suplementação apenas com hMG ocorreu à custa de uma maior densidade de folículos primordiais e secundários após 21 dias comparativamente com os 7 dias após transplante ($0,165 \pm 0,037$ versus $0,326 \pm 0,094$).

folículos primordiais/mm², $p=0,043$; $0,009\pm 0,009$ *versus* $0,143\pm 0,043$ folículos secundários/mm², $p=0,01$). Do ponto de vista de avaliação da percentagem de folículos por estádios de desenvolvimento, apenas se verificou um aumento na percentagem de folículos secundários também no grupo de tecido mantido em cultura com hMG e pela comparação dos 7 e dos 21 dias após transplante ($3,333\pm 3,333$ *versus* $25,298\pm 7,737\%$, $p=0,022$). A análise dos folículos por estádio de desenvolvimento está representada na Figura 60.

No que diz respeito à proliferação e à presença de sinais de apoptose nos folículos, também não se verificaram diferenças entre os grupos de tratamento. Dos 7 para os 21 dias após transplante, houve um aumento da proliferação ($41,667\pm 8,333$ *versus* $92,187\pm 5,480\%$, $p=0,009$) e diminuição da apoptose nos folículos ($94,444\pm 5,556$ *versus* $71,595\pm 18,208\%$, $p=0,013$) do tecido suplementado apenas com hMG, como representado na Figura 61.A e B, respetivamente.

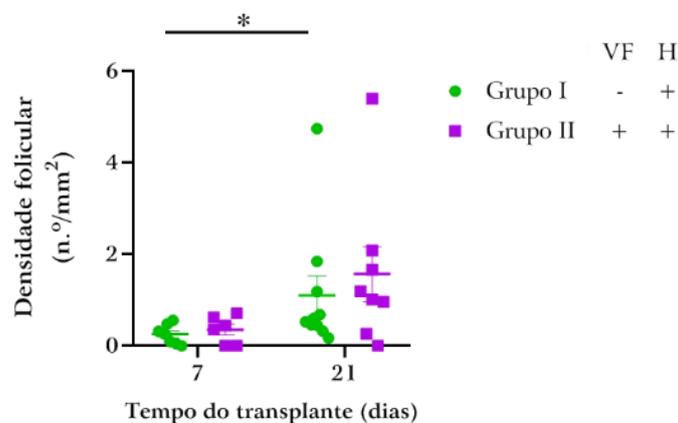


Figura 59. Densidade de folículos morfologicamente normais no enxerto de tecido ovárico. São comparados os resultados entre o tecido suplementado apenas com hMG (Grupo I) ou em associação com VEGF e FGF (Grupo II). Os dados são apresentados na forma de média \pm SEM. A significância estatística está representada com * para $p < 0,05$.

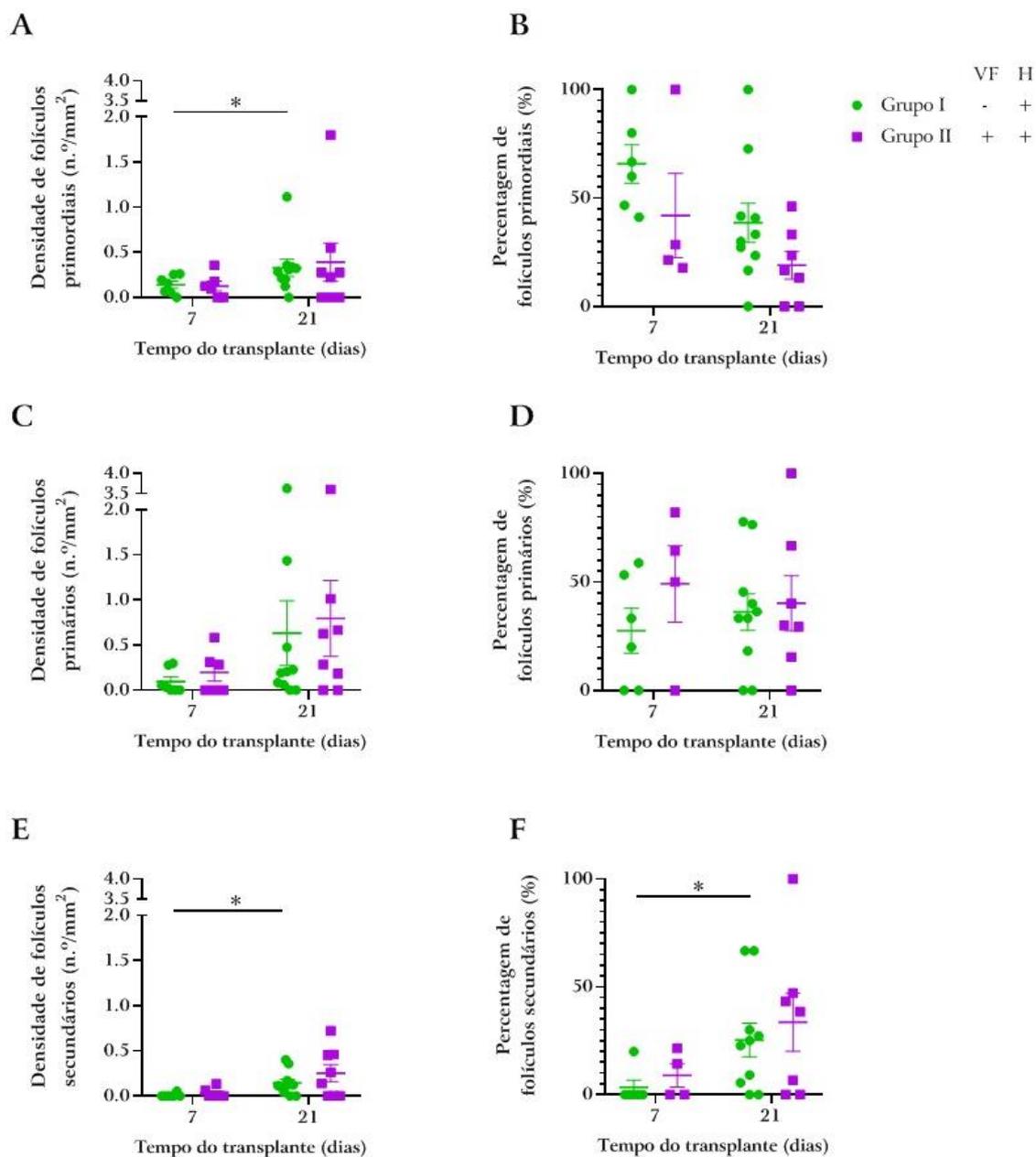


Figura 60. Folículos por estágio de desenvolvimento no enxerto de tecido ovárico. Os resultados são apresentados em densidade (A, C, E) e percentagem folicular (B, D, F) para os folículos primordiais (A, B), primários (C, D) e secundários (E, F). São comparados os resultados entre o tecido suplementado apenas com hMG (Grupo I) ou em associação com VEGF e FGF (Grupo II). Os dados são apresentados na forma de média±SEM. A significância estatística está representada com * para $p < 0,05$.

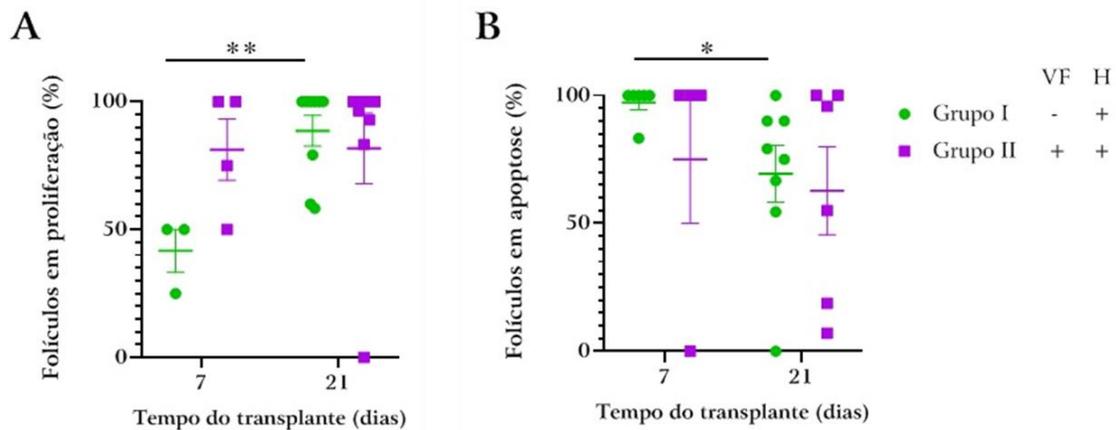


Figura 61. Proliferação e apoptose nos folículos no enxerto de tecido ovárico. A proliferação foi avaliada pela marcação com KI67 (A) e a apoptose com caspase 3 (B). A marcação foi quantificada tendo em conta o quociente em percentagem entre o número de folículos com marcação positiva pelo número total de folículos. São comparados os resultados entre o tecido suplementado apenas com hMG (Grupo I) ou em associação com VEGF e FGF (Grupo II). Os dados são apresentados na forma de média±SEM. A significância estatística está representada com * para $p<0,05$ e ** para $p<0,01$.

VII.2.2.4. Efeito no estroma dos enxertos de tecido ovárico

Após 7 dias de transplante, os enxertos submetidos à suplementação tripla apresentaram menor proliferação nas células do estroma que o grupo no qual se utilizou apenas hMG ($2,441 \pm 0,539$ versus $7,330 \pm 0,695\%$, $p<0,001$). Ao final dos 21 dias, a proliferação era semelhante nos dois grupos, tendo diminuído significativamente no grupo do tratamento apenas com hMG relativamente aos 7 dias ($7,330 \pm 0,695$ versus $1,739 \pm 0,18$ %, $p<0,001$). Estes resultados são apresentados na Figura 62.A.

A apoptose no estroma foi semelhante entre grupos, com tendência para diminuir no tecido submetido à suplementação tripla após os 21 dias de transplante ($1,550 \pm 0,232$ versus $0,934 \pm 0,160\%$, $p=0,05$), como é possível verificar na Figura 62.B.

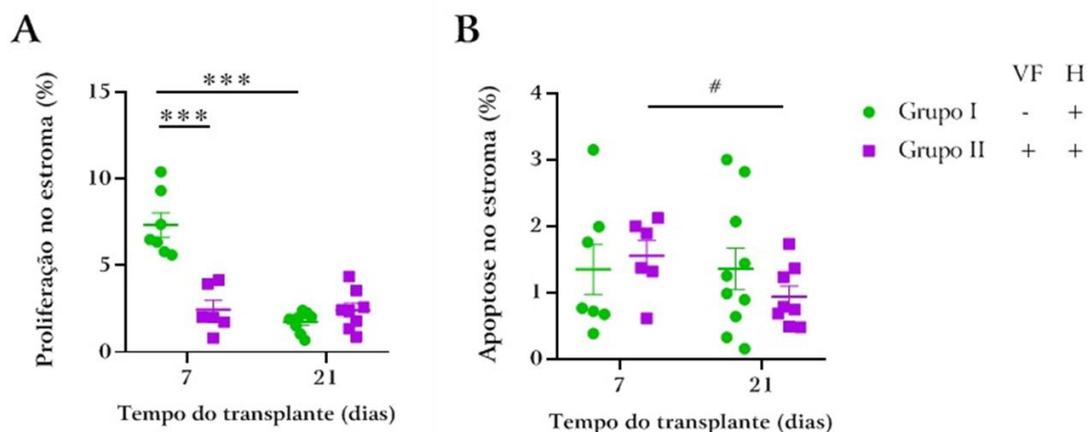


Figura 62. Proliferação e apoptose nas células do estroma do enxerto de tecido ovárico. A proliferação foi avaliada pela marcação com KI67 (A) e a apoptose com caspase 3 (B). A marcação foi quantificada tendo em conta a percentagem de área com marcação positiva. São comparados os resultados entre o tecido suplementado apenas com hMG (Grupo I) ou em associação com VEGF e FGF (Grupo II). Os dados são apresentados na forma de média±SEM. A significância estatística está representada com *** para $p < 0,001$ e # para $p = 0,05$.

VII.2.2.5. Recuperação da função endócrina com o transplante

No que diz respeito à avaliação da função endócrina após transplante, foi realizada a citologia vaginal para aferir o ciclo *estrus*. Foram identificadas as diferentes fases do ciclo *estrus* como representado na Figura 63.

É considerado que os ratos retomam ciclo quando têm uma fase *proestrus* seguida da fase *estrus*, como representado graficamente na Figura 64.A. Segundo este pressuposto, um dos ratos submetidos ao transplante de tecido ovárico previamente criopreservado e mantido em cultura com hMG não recuperou a função endócrina (Figura 64.C). O outro animal deste grupo teve um ciclo *estrus*, sendo restabelecido apenas ao 19º dia pós-transplante (Figura 64.B). Nos animais submetidos ao transplante de tecido ovárico previamente criopreservado e submetido a cultura com suplementação tripla, dois ratos não recuperaram ciclo *estrus*, como é possível verificar na Figura 64.F e H. Os outros três ratos retomaram ciclo *estrus*, após 6, 7 e 14 dias, respetivamente Figura 64.D, E e G.

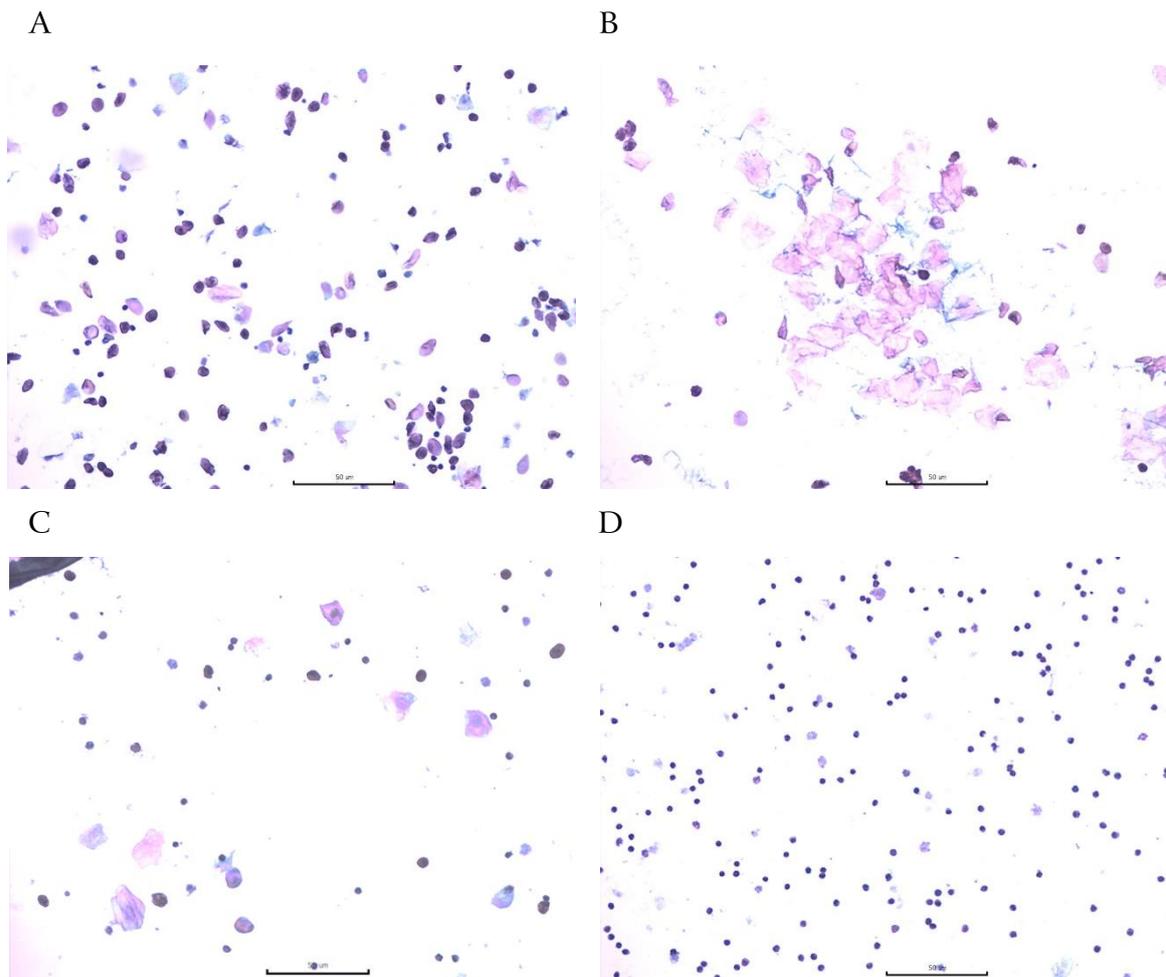


Figura 63. Imagens representativas das fases do ciclo *estrus*. É possível identificar a fase *proestrus* (A) com predomínio de células epiteliais nucleadas, a fase *estrus* (B) com uma grande proporção de células epiteliais queratinizadas, a fase *metestrus* (C) com os vários tipos de células e a fase *diestrus* (D) maioritariamente com leucócitos. A ampliação é de 100× com barra de escala de 50 μm .

Deste modo, o grupo de animais cujo tecido ovárico tinha sido submetido a cultura com suplementação tripla esteve tendencialmente menos tempo em fase *diestrus* e mais em *estrus*, como apresentado na Figura 65. Porém não se verificaram diferenças entre grupos, tendo em conta o reduzido número da amostra.

Adicionalmente, foram realizados doseamentos hormonais, que mostraram níveis idênticos de FSH e estradiol nos dois grupos, como apresentado na Figura 66.

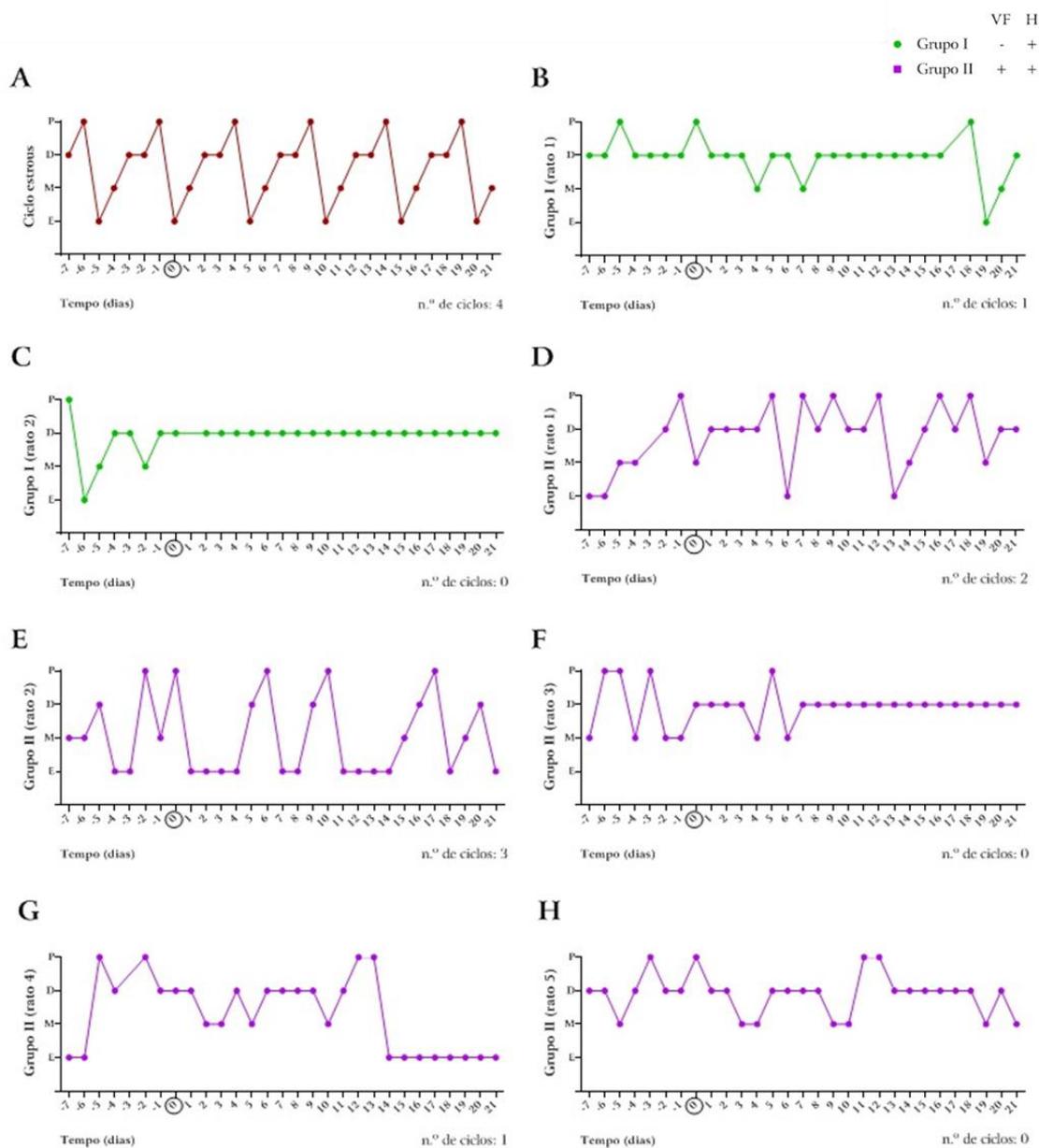


Figura 64. Representação gráfica do ciclo *estrus* no rato fêmea. O ciclo *estrus* está dividido em 4 fases: *proestrus* (P), *estrus* (E), *metestrus* (M) e *diestrus* (D). A figura A corresponde à representação gráfica do ciclo *estrus* regular. As figuras B e C traduzem o ciclo *estrus* dos animais do grupo cujo tecido foi suplementado em cultura apenas com hMG (Grupo I). Enquanto as figuras D-F são dos animais do grupo cujo tecido foi suplementado em cultura apenas com hMG em associação com VEGF e FGF (Grupo II). O dia -7 é o dia da ovariectomia, o dia 0 o dia do transplante e o dia 21 o dia em que terminou a experiência. Foi registado para cada animal o número de ciclos *estrus* tendo em conta a presença de uma fase *proestrus* seguida da fase *estrus*.

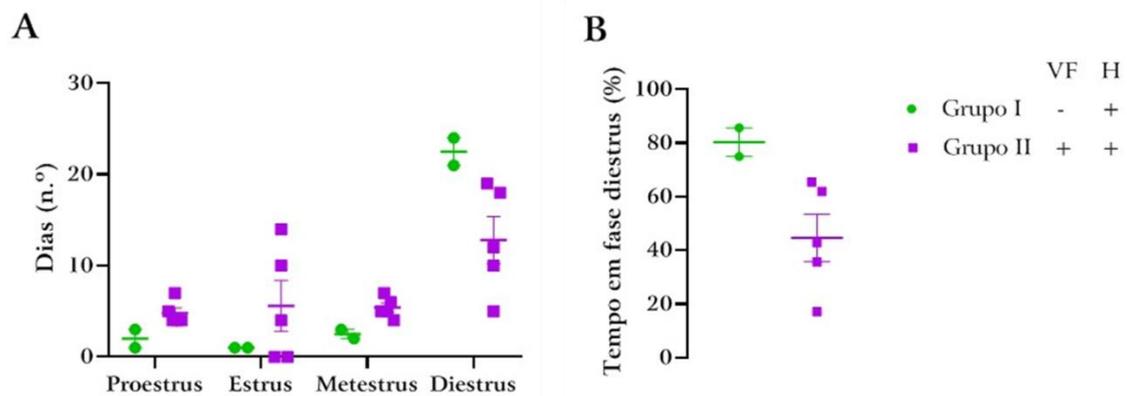


Figura 65. Duração das fases do ciclo *estrus* nos ratos submetidos a transplante de tecido ovárico. São apresentados os resultados do número de dias em cada fase do ciclo *estrus* por grupo de estudo (A), bem como a porcentagem de tempo em fase *diestrus* (B). São comparados os resultados entre o tecido suplementado apenas com hMG (Grupo I) ou em associação com VEGF e FGF (Grupo II). Os dados são apresentados na forma de média \pm SEM.

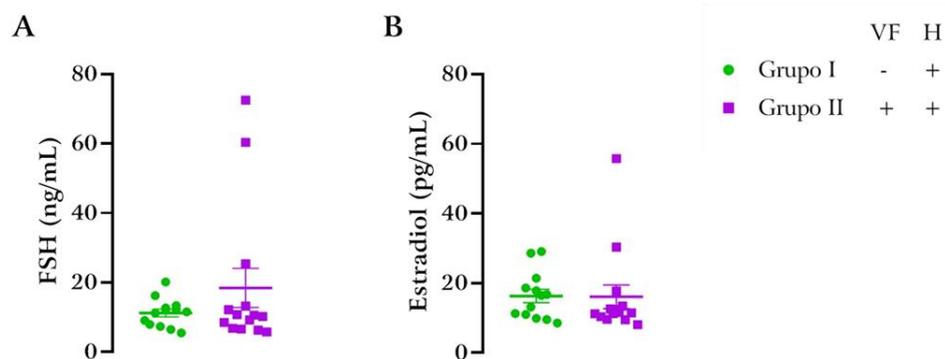


Figura 66. Doseamentos hormonais dos ratos submetidos a transplante de tecido ovárico. Foram quantificados o FSH (A) e o estradiol (B) no soro dos animais 21 dias após o transplante de tecido ovárico. São comparados os resultados entre o tecido suplementado apenas com hMG (Grupo I) ou em associação com VEGF e FGF (Grupo II). Os dados são apresentados na forma de média \pm SEM.

VII.3. Discussão

A criopreservação de tecido ovárico é uma técnica de preservação da fertilidade que permite, após o transplante de tecido ovárico, recuperar a fertilidade e a função endócrina. Porém, o transplante de tecido ovárico é avascular, pelo que existe um período de isquemia/reperfusão, até que seja restabelecida a angiogênese. Neste

período há perda folicular, o que compromete a longevidade do transplante e, conseqüentemente, os benefícios do mesmo, nomeadamente na restituição da função endócrina, que minimiza as conseqüências nefastas de uma insuficiência ovárica prematura nas mulheres jovens sobreviventes de cancro. Assim, com a estimulação da angiogênese no tecido ovárico, pretende-se diminuir a isquemia e a perda folicular.

O processo de angiogênese é dinâmico e complexo, envolvendo diversas vias de sinalização e diversos tipos celulares. Além disso, a criopreservação de tecido ovárico é uma técnica utilizada em doentes seleccionadas, frequentemente oncológicas, pré-púberes e nas quais é emergente iniciar tratamentos gonadotóxicos. Esta conjuntura torna a investigação na área da estimulação da angiogênese do tecido ovárico criopreservado um desafio complexo. Como foi abordado no capítulo III, têm sido estudadas diversas estratégias, desde a utilização do VEGF, a outros fatores de crescimento, hormonas, agentes antioxidantes, etc. Neste trabalho experimental foi avaliado o efeito do VEGF, FGF, e hMG, isoladamente ou em associação. O tratamento triplo permitiu melhorar a angiogênese do tecido ovárico após o transplante, sem comprometer a viabilidade do enxerto, nomeadamente o seu *pool* folicular.

No que diz respeito a nível de intervenção, também estão descritas diversas estratégias, desde a aplicação do estímulo em diferentes momentos do processo de criopreservação ou transplante do tecido, recorrendo à suplementação no meio de congelação, em cultura ou à administração por via sistémica. Neste nosso trabalho optou-se por aplicar o estímulo após a criopreservação e antes do transplante, com um curto período de cultura de 4 horas. Do ponto de vista translacional, este tempo de cultura possibilita que o processo de descongelação seja realizado no laboratório e que a cultura ocorra durante o transporte para o bloco operatório onde é realizado o transplante. No que diz respeito ao processo de angiogênese, este intervalo de tempo foi suficiente para que fosse regulada a expressão génica e alterada a síntese proteica, bem como para que se inicie o *sprouting* com a alteração da posição das células endoteliais (Bentley & Chakravartula, 2017). Este efeito foi corroborado pelo aumento da densidade vascular com a cultura, bem como pela alteração da expressão génica, com sobreexpressão de *Col4a3*, de *Col18a1*, de *Egf*, de *Epas1*, de *Fgfr-3* e de *Tie1*.

A cultura durante 48 horas teve como objetivo diferenciar os estímulos angiogênicos aplicados. Contudo, os resultados obtidos tornaram evidente a degradação do tecido ovárico, objetivada pela análise morfológica. Para a cultura prévia ao transplante foi adicionado ao meio de cultura antibiótico em baixa concentração (Amonn *et al.*, 1978; Liebethron *et al.*, 2013) e hMG, pelos resultados observados no estudo *in vitro*, que serão explorados adiante nesta discussão. Foi também utilizada a matriz de alginato, desenvolvida e descrita no capítulo V, pelos resultados equivalentes comparativamente com o modelo de cultura convencional *in vitro* e por ser biocompatível (Orive *et al.*, 2002). A utilização de matrizes no âmbito do transplante de tecido ovárico tem sido extensamente descrita, pois permite realizar o co-transplante do tecido com moléculas (M. M. Fransolet *et al.*, 2015; J.-M. Gao *et al.*, 2013; J. Gao *et al.*, 2015; Henry *et al.*, 2015; Labied *et al.*, 2013; Shikanov *et al.*, 2011; Tanaka *et al.*, 2018) ou com células (Manavella, Cacciottola, Desmet, *et al.*, 2018; Xia *et al.*, 2015; Y. Zhang *et al.*, 2017).

Após o transplante, o enxerto foi mantido durante 21 dias, tendo em conta a influência do local do transplante e a recuperação da função endócrina. O transplante heterotópico a nível subcutâneo, além de ser tecnicamente mais simples e mais acessível, é semelhante do ponto de vista folicular às outras localizações, considerando a duração do transplante até 21 dias (Dath *et al.*, 2010). A função endócrina mostrou ser restabelecida na segunda semana após o transplante, através da análise de citologias vaginais, o que é corroborado em estudos de autotransplante de tecido ovárico de murganho e de rato (Shikanov *et al.*, 2011; Tavana *et al.*, 2016). A reperusão do tecido ovárico ao fim de 7 dias também foi demonstrada em estudos com rato (Cacciottola *et al.*, 2021; Israely *et al.*, 2004; L. Wang *et al.*, 2013).

No que diz respeito ao estudo da angiogênese, a sua complexidade está interligada com o próprio processo que é altamente regulado e que envolve múltiplas vias e intervenientes, com o intuito de desenvolver novos vasos a partir de outros preexistentes (Logsdon *et al.*, 2014; Yoo & Kwon, 2013). As várias etapas da angiogênese podem ser avaliadas e quantificadas individualmente por um grande número de bioensaios, cada um com as suas vantagens e limitações. Assim, a metodologia mais adequada depende do tecido ou da doença sob investigação (Nowak-Sliwinska *et al.*, 2018). Para este trabalho e à semelhança dos trabalhos publicados

nesta área descritos nas tabelas do capítulo III, foi avaliada a densidade microvascular. A densidade microvascular é aferida por imunohistoquímica ou por imunofluorescência com marcação das células endoteliais, sendo os anticorpos mais frequentemente utilizados contra o CD31 (Cha *et al.*, 2014; J.-M. Gao *et al.*, 2013; J. Gao *et al.*, 2015; Henry *et al.*, 2015; Kong *et al.*, 2017; Labied *et al.*, 2013; S. Lee, Cho, *et al.*, 2021; Magen *et al.*, 2021; Olesen *et al.*, 2021; Scalercio *et al.*, 2015; Shikanov *et al.*, 2011; Shojafar *et al.*, 2018; Soleimani *et al.*, 2011; Souza *et al.*, 2021; Tanaka *et al.*, 2018; L. Wang *et al.*, 2013; Xia *et al.*, 2015; Youm *et al.*, 2016; Y. Zhang *et al.*, 2017), o CD34 (Kang *et al.*, 2016; Manavella, Cacciottola, Desmet, *et al.*, 2018; Manavella, Cacciottola, Pommé, *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2010), o α SMA (Henry *et al.*, 2015; Labied *et al.*, 2013; Soleimani *et al.*, 2011; Souza *et al.*, 2021) e o fator von Willebrand ou FVIII (Damous, Nakamuta, de Carvalho, *et al.*, 2015; Langbeen *et al.*, 2016; S. H. Li *et al.*, 2016; Magen *et al.*, 2021).

Nas diretrizes de consenso para o uso e para a interpretação de ensaios de angiogênese, a avaliação da densidade vascular está descrita como uma metodologia robusta, rápida e fácil de executar e automatizar, porém com grande variabilidade entre observadores (Nowak-Sliwinska *et al.*, 2018). Para minimizar a variabilidade, neste trabalho foi realizada a avaliação por dois observadores independentes e ocultos dos grupos de estudo, foram selecionadas aleatoriamente cinco regiões de cada fragmento e foi avaliada a diferença entre os observadores. Nos vários estudos da área de criopreservação de tecido ovárico que incluem a avaliação da angiogênese através da densidade vascular estão descritas duas formas de quantificação que foram aplicadas no estudo *in vitro*. A densidade vascular foi aferida pela quantificação do número de vasos sanguíneos por área de superfície (Wu *et al.*, 2010) e a área vascular correspondeu à percentagem de área marcada (Herraiz *et al.*, 2020). Na avaliação do número de vasos sanguíneos por área de superfície consideraram-se como vasos individuais aglomerados de células endoteliais marcados com fator VIII, com ou sem lúmen nítido. Contudo esta metodologia foi mais subjetiva e a concordância dos resultados entre os observadores foi fraca, pelo que para o estudo *in vivo* foi quantificada apenas a área vascular já que apresentou uma concordância forte.

Na cultura (estudo *in vitro*) não se verificaram diferenças na vascularização do tecido

com os diferentes estímulos. Porém, com o transplante verificou-se um aumento da área vascular com a associação de VEGF, de FGF e de hMG. O VEGF é um fator central no processo de angiogênese, que intervém na primeira fase do crescimento capilar. No tecido ovárico, o VEGF permite o recrutamento de vasos sanguíneos funcionais (M. M. Fransolet *et al.*, 2015; Henry *et al.*, 2015; Labied *et al.*, 2013; Shikanov *et al.*, 2011; Souza *et al.*, 2021). A associação de VEGF e de FGF mostrou ser mais eficaz para a estimulação da angiogênese de tecido ovárico criopreservado do que o tratamento com os fatores isoladamente, promovendo uma melhoria da sobrevivência dos folículos primordiais e da angiogênese e reduzindo a apoptose quando comparados com a utilização dos fatores isoladamente (J. Gao *et al.*, 2015; L. Wang *et al.*, 2013; C.-H. Zhang *et al.*, 2016). Neste trabalho não se verificaram diferenças entre os vários estímulos no que diz respeito à densidade e à percentagem folicular, bem como à proliferação e à presença de apoptose dos folículos, nomeadamente dos primordiais. No que diz respeito à apoptose no estroma, os níveis foram residuais, inferiores a 1% na cultura e 4% no transplante. O grupo do tratamento triplo, em cultura, apresentou maior percentagem de área em apoptose comparativamente com a utilização isolada de hMG. Contudo, com o transplante, este resultado inverteu-se com uma diminuição da apoptose no estroma, salientando o benefício da associação da hMG.

As gonadotrofinas têm um papel determinante na fisiologia do ovário, pelo que para a cultura de tecido ovárico, diversos grupos utilizam a suplementação do meio de cultura com FSH, uma vez que foi demonstrada a diminuição da atresia folicular (Fabbri *et al.*, 2009; Gastal *et al.*, 2017; Sanfilippo *et al.*, 2013; Scott *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2015; Walker *et al.*, 2019). A LH intervém na angiogênese que ocorre fisiologicamente após a ovulação, com um aumento do FGF-2 e do HIF1 α (Rizov *et al.*, 2017; Robinson *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2017). No processo de criopreservação e transplante de tecido ovárico, a LH promoveu a sobrevivência com aumento dos folículos viáveis (Zheng *et al.*, 2020). A hMG contem FSH e LH em igual proporção. A utilização de hMG, através da exposição *in vitro* do tecido ovárico de murganho, seguida do autotransplante a fresco, mostrou melhorar a sobrevivência dos folículos (Y. Y. Wang *et al.*, 2012). No nosso trabalho, a suplementação do meio de cultura com hMG

permitiu preservar os folículos primordiais no tecido ovárico pós-criopreservação, com maiores níveis de proliferação no tecido e sem diferenças nos níveis de apoptose. Além da análise histológica, foi também quantificada a expressão de fator de diferenciação de crescimento 9 (GDF-9) e a proteína morfogenética óssea 15 (BMP-15). Estes fatores são membros da família do TGF- β , que regulam a foliculogênese e a ovulação. Ambos são sintetizado pelos ovócitos, sendo o BMP-15 secretado desde o estágio de folículo primordial e o GDF-9 desde o estágio de folículo primário (Sanfins *et al.*, 2018). Os níveis de expressão dos genes que codificam estas proteínas não se modificaram nos grupos de tratamento com hMG isolada ou em associação com VEGF e FGF relativamente ao tecido avaliado imediatamente após a congelação, sugerindo o benefício da associação de hMG. Tendo em conta estes resultados, foi utilizada hMG para suplementação do meio de cultura no estudo *in vivo*.

Para a estimulação da angiogênese do tecido ovárico, a eficácia da utilização de gonadotrofinas isoladamente é controversa. Um estudo com a utilização de hMG mostrou melhorar a angiogênese, com um aumento da expressão de VEGF e diminuição do tempo de reperfusão para 24 horas (Y. Y. Wang *et al.*, 2012). No nosso estudo, a utilização de hMG não alterou a vascularização do tecido após a cultura, aferida pela imunomarcação com o FVIII. No que diz respeito à expressão génica, o *array* de angiogênese evidenciou a sobre-expressão de *Fgfr-3* e de *Egf* comparativamente com o tecido avaliado imediatamente após criopreservação. Contudo, estes resultados não foram confirmados por qPCR. A avaliação quantitativa da expressão génica apenas mostrou um aumento da expressão de *Col4a3*.

Para estudar a angiogênese, além dos ensaios que permitem identificar os novos vasos (Nowak-Sliwinska *et al.*, 2018), vários autores optam por quantificar os diferentes intervenientes do processo (Damous, Nakamuta, Satri de Carvalho, *et al.*, 2015; Detti *et al.*, 2018; Hormozi *et al.*, 2015; Kolusari *et al.*, 2018; S. H. Li *et al.*, 2016; Manavella *et al.*, 2019; Olesen *et al.*, 2021; Tavana *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2010; Xia *et al.*, 2015; H. Yang *et al.*, 2008; Y. Yang *et al.*, 2015). Contudo, são frequentemente estudados determinados genes ou proteínas isoladamente, nomeadamente o VEGF. De modo a ter uma visão geral da alteração na expressão génica após a cultura com os diferentes estímulos e tendo em conta a complexidade deste processo que envolve várias vias de

sinalização, foi construído um *array* de angiogénese. Assim, este é o primeiro estudo com uma caracterização detalhada da expressão génica do tecido ovárico submetido à estimulação pró-angiogénica.

Os resultados do *array* foram validados com a avaliação quantitativa da expressão génica por qPCR. Na cultura verificaram-se algumas diferenças entre grupos, em especial relativamente aos tecidos mantidos em cultura sem suplementação e ao tecido avaliado imediatamente após descongelação. No transplante, a expressão génica foi igual entre os dois tratamentos estudados. Contudo, em cada grupo verificaram-se diferenças nos dois momentos de avaliação. No caso da suplementação apenas com hMG verificou-se um aumento da expressão de *Egf*, de *Epas1* e de *Tie1*. No grupo de tratamento triplo verificou-se um aumento da expressão de *Col4a3*, de *Fgfr-3* e de *Hif1 α* .

O VEGF é um dos fatores mais importantes na regulação da formação de novos vasos, desde o desenvolvimento embrionário até à cicatrização de feridas e manutenção da homeostase dos vasos no adulto (Cébe-Suarez *et al.*, 2006). Existem diferentes isoformas de VEGF, sendo a mais estudada o VEGF-A, que ativa vias de sinalização através do recetor 2 do VEGF (VEGFR-2) e regula a morfogénese dos vasos através do VEGFR-1 (Cébe-Suarez *et al.*, 2006; Secord & Siamakpour-Reihani, 2017). O VEGF-B liga-se ao VEGFR-1 e o VEGF-E ao VEGFR-2. O VEGF-C liga-se ao VEGFR-3 e fracamente ao VEGFR-2, desempenhando um papel na formação das *tip cells* e na linfangiogénese. O VEGF-D também estimula a linfangiogénese através da ligação ao VEGFR-3 (Secord & Siamakpour-Reihani, 2017). A expressão de *Vegf-D* (ou *Figf*) mostrou-se reduzida na cultura com o tratamento com VEGF e FGF isoladamente ou em associação com a hMG. Nas restantes isoformas do *Vegf* não se verificaram alterações nos níveis de expressão génica. No que diz respeito aos recetores, há uma tendência para uma menor expressão do *Vegfr-2* (ou *Kdr*) na cultura com o tratamento com VEGF e FGF e não se verificaram diferenças na expressão do *Vegfr-1* (ou *Flt1*).

O FGF é um dos fatores mais estudados na angiogénese, depois do VEGF, e está envolvido na proliferação e na migração das células endoteliais. O FGF-1 e -2 são os fatores mais estudados. O FGF-1 ou ácido (aFGF) aumenta a velocidade de migração

e diminui a persistência direcional. O FGF-2 ou básico (bFGF) é um dos fatores quimiotáticos mais potentes da célula endotelial vascular e tem sido demonstrado o seu efeito sinérgico, com o VEGF, na estimulação da angiogênese. Os recetores do FGF são recetores tirosina quinase transmembranares que interferem nesta via de sinalização. Apenas se verificaram diferenças na expressão de *Fgfr-3*. Com a cultura existe uma tendência para aumentar a expressão, sem diferenças entre grupos. Com o transplante houve um aumento da expressão no grupo do tratamento triplo do 7º para o 21º dia. No ovário este recetor foi identificado nas células da granulosa, da teca e nos ovócitos, sem que se verificassem diferenças durante a foliculogênese (Drummond *et al.*, 2007). Os seus níveis foram inversamente relacionados com a viabilidade celular, no que diz respeito à proliferação e à presença de apoptose (Price, 2016). Tal relação, não se verificou no nosso estudo.

Além do VEGF e do FGF, o PDGF e o HGF também intervêm na proliferação e na migração das células endoteliais (Logsdon *et al.*, 2014). Outros fatores de crescimento envolvidos na angiogênese são o TGF, o PGF, o fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) e o EGF. No nosso estudo, apenas se verificou a alteração da expressão do *Egf*, com um aumento com a cultura relativamente ao tecido avaliado após criopreservação, sem diferenças entre grupos. Durante o transplante também se verificou o aumento da expressão de *Egf* no grupo de suplementação com hMG isoladamente. O EGF é um polipeptídeo que, mediante a ligação ao seu recetor, ativa cascatas de sinalização relacionadas com a proliferação celular, com a angiogênese e com a diminuição da apoptose (Pache, 2006).

Têm sido estudados outros genes que codificam proteínas. A endoglina (ENG) é uma glicoproteína de membrana que faz parte da via de sinalização do TGF (Carmeliet & Jain, 2011). O *ERRB2* codifica um membro da família de recetores do EGF, o recetor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2), que intervêm na angiogênese através do aumento da expressão de VEGF (Kumar & Yarmand-Bagheri, 2001). O gene que codifica a alanina aminopeptidase (*ANPEP*) também mostrou ter ação pró-angiogénica. A molécula de adesão de plaquetas e células endoteliais 1 (PECAM1) ou CD31 é encontrada na superfície de plaquetas, monócitos, neutrófilos e alguns tipos de células T, e constitui uma grande parte das junções intercelulares de células

endoteliais, pelo que também está envolvida na angiogénese, sendo frequentemente utilizada como marcador em imunohistoquímica (DeLisser *et al.*, 1997). No estudo que realizámos não se verificaram alterações na expressão de nenhum destes genes.

A angiogénese pode ser estimulada pela hipoxia que atua por múltiplas vias, incluindo a via do óxido nítrico e dos HIFs. Da via do óxido nítrico avaliámos a expressão de *Nos3* e não se verificaram diferenças. O HIF1 α é a subunidade sensível ao oxigénio, que é degradada na presença deste. Em situações de hipoxia, o HIF1 α permanece estável e desloca-se para o núcleo onde regula a expressão dos genes como o *VEGF*, o *VEGFR*, a *angiopoietina-1* e a *angiopoietina-2*, o *Tie2*, o *PDGF*, o *FGF* e o *MCPI* (Logsdon *et al.*, 2014; Rizov, Andreeva, & Dimova, 2017). A regulação positiva do HIF também condiciona um aumento da produção de VEGF (Gabhann *et al.*, 2010). Não se verificaram diferenças na expressão de *Hif1 α* na cultura, mas com o transplante houve um aumento significativo dos níveis de *Hif1 α* com o estímulo triplo com VGF, FGF e hMG. O HIF2 (ou EPAS1) funciona de maneira semelhante ao HIF1, mas as duas isoformas têm expressões diferentes nos tecidos e durante a doença (Gabhann *et al.*, 2010). No nosso estudo, constatou-se uma tendência para níveis mais elevados de *Hif2* (ou *Epas1*) com a cultura, nomeadamente no grupo sem suplementação e apenas com hMG comparativamente com o tecido avaliado imediatamente após a criopreservação. Com o transplante apenas se verificou o aumento da expressão deste gene também no grupo de tratamento com hMG isoladamente.

As MMP e os TIMP têm uma função importante na regulação da angiogénese, nomeadamente na degradação da matriz extracelular, que permitem a migração das células endoteliais. Adicionalmente, as MMP têm a capacidade de clivar as isoformas do VEGF, interferindo nesta via de sinalização. Os TIMP-1, -2 e -3 são inibidores das MMP expressos por células endoteliais, que inibem a angiogénese (Logsdon *et al.*, 2014; Sang, 1998). O nosso estudo foi o primeiro no qual foram avaliados estes genes no tecido ovárico e não se verificaram diferenças na sua expressão.

As integrinas são recetores que medeiam a adesão à matriz extracelular e que intervêm na migração das células endoteliais (Carmeliet & Jain, 2011). As caderinas são glicoproteínas transmembranares que medeiam a adesão célula-célula, com

dependência de cálcio. A caderina-5 ou VE-caderina é uma das principais caderinas das células endoteliais e está localizada preferencialmente nas junções celulares (Rahimi & Kazlauskas, 1999). Na cultura não se verificaram diferenças na expressão destes genes.

A matriz extracelular é composta por colagénio, fibronectina e outras proteínas. O colagénio tipo IV é o principal componente da membrana basal, fornecendo o suporte estrutural para as células epiteliais e endoteliais. Além disso, o colagénio tipo IV interage com outros componentes da matriz extracelular, modula o comportamento celular e a sua degradação liberta moléculas sinalizadoras bioativas que estão envolvidas em diversos processos fisiológicos. A cadeia $\alpha 3$ é libertada pela degradação mediada pela MMP9 e denomina-se tumstatina. O colagénio tipo XVIII é um proteoglicano constituído por três cadeias $\alpha 1$ e localizado nas membranas basais. A endostatina é o fragmento carboxil-terminal do colagénio tipo XVIII. Tanto a tumstatina como a endostatina têm uma ação anti-angiogénica (Reese-Petersen *et al.*, 2019). No nosso estudo, a *Col4a3* e a *Col18a1* aumentaram com a cultura do tecido ovárico, comparativamente com o tecido avaliado imediatamente após a criopreservação. Com os diferentes estímulos angiogénicos verificámos alterações apenas na *Col4a3*, com a diminuição da expressão na cultura com a utilização de VEGF e de FGF, comparativamente ao tecido mantido em cultura sem suplementação e o aumento no transplante com o tratamento triplo do 7^o para o 21^o dia.

A via de sinalização da angiopoietina-Tie intervém na estabilidade vascular, sendo a interação entre a angiopoietina 1 e 2 complexa e com funções complementares, porém contrarreguladoras. A angiopoietina-1 é agonista do Tie2, favorece a estabilidade das células endoteliais e condiciona um aumento da maturidade vascular e da densidade microvascular induzida por VEGF. Em contraste, a angiopoietina-2 é principalmente um antagonista de Tie2, bloqueia a estabilidade vascular induzida pela angiopoietina-1, facilita a angiogénese mediada por VEGF e sensibiliza as células endoteliais a sinais pró-angiogénicos (Papetti & Herman, 2002; Secord & Siamakpour-Reihani, 2017). No entanto, esta proteína também pode funcionar como um agonista parcial e estimular a ativação de Tie2 quando a expressão de angiopoietina-1 é baixa ou ausente (Secord & Siamakpour-Reihani, 2017). O Tie1 é outro recetor Tie, cujo ligando ainda

não foi identificado e que mostrou ser necessário para a integridade e sobrevivência das células endoteliais durante a angiogénese (Papetti & Herman, 2002). Desta via apenas verificámos alterações na expressão génica de *Tie1*. Na cultura, o grupo no qual não foi realizada suplementação do meio e aquele em que foi realizado o tratamento triplo apresentaram maiores níveis de expressão que o tecido avaliado imediatamente após a criopreservação. No transplante, verificou-se um aumento da expressão no grupo com suplementação do meio com hMG dos 7 para os 21 dias.

Do ponto de vista de expressão proteica, apenas foi avaliada a angiopoietina no sobrenadante do meio de cultura. Os grupos de cultura durante 4 horas com suplementação do meio com hMG isolada ou em associação com VEGF e FGF apresentaram menor quantidade de angiopoietina-2 comparativamente com os restantes grupos. A cultura durante 4 horas parece pouco tempo para se identificarem estas diferenças, contudo está descrito que durante a angiogénese em cerca de 4 a 6 horas há regulação da expressão génica que altera a síntese proteica (Bentley & Chakravartula, 2017). Assim, os nossos resultados sugerem que a síntese de angiopoietina está diminuída ou poderá ser atrasada, com a adição de gonadotrofinas, nomeadamente da hMG. De acordo com a função da angiopoietina-2 no *sprouting* seria expectável o seu incremento, tal como demonstrado em estudos prévios com avaliação da expressão génica (Hormozi *et al.*, 2015; Olesen *et al.*, 2021; L. Wang *et al.*, 2016). Nestes trabalhos as avaliações foram realizadas pelos menos 2 dias após o transplante. Assim, para perceber se a expressão de angiopoietina está diminuída, apenas quando foi terminada a cultura, temos guardados os extratos de proteína dos diferentes enxertos para posterior avaliação da expressão proteica e confirmação deste resultado.

O transplante de tecido ovárico é uma técnica promissora para preservação da fertilidade, pois permite não só restituir a fertilidade como também a função endócrina (Donnez *et al.*, 2013). Neste trabalho, foi confirmada a recuperação da função hormonal através das citologias vaginais, mas não se verificaram diferenças nos doseamentos hormonais entre grupos de estudo. A avaliação da função endócrina é raramente reportada nos estudos existentes nesta área e os resultados são discrepantes. Num estudo em que se avaliou o efeito do tratamento com angiopoietina-2 e VEGF com xenotransplante heterotópico em murgancho de tecido de bovino previamente

vitricado, não se verificaram diferenças na concentração de estradiol ao fim de 7 e de 28 dias após o transplante entre grupos (Kong *et al.*, 2017). Noutro trabalho com a avaliação do efeito do cotransplante heterotópico do tecido ovárico fresco com AdMSC constatou-se uma recuperação mais rápida do ciclo *estrus* com a avaliação diária das citologias vaginais e maior concentração de estradiol e progesterona com a avaliação sérica ao 28.º dia (Shojafar *et al.*, 2018). A concentração de estradiol também foi superior na avaliação ao 28.º dia após o autotransplante heterotópico de tecido ovárico fresco em murganho com o tratamento com NAC (Daneshpoya *et al.*, 2017). Com a cultura com hMG, previamente ao autotransplante heterotópico de tecido ovárico fresco, a recuperação do ciclo *estrus* é mais rápida do que quando é realizada cultura sem esta hormona (Y. Y. Wang *et al.*, 2012). Assim, um dos pontos fortes do nosso trabalho foi a avaliação da função endócrina após o transplante de tecido ovárico previamente criopreservado, porém como limitações temos o reduzido número de animais nos quais foi realizada a citologia e a avaliação da função endócrina em apenas um momento. Como perspectivas futuras, pretendemos aumentar o número de casos e realizar o transplante ortotópico, de modo a prolongar o transplante permitindo a avaliação da sua longevidade e da restituição da fertilidade.

Em suma, o objetivo principal do trabalho foi alcançado com o aumento da densidade vascular, associada a uma caracterização da expressão génica e avaliação da função endócrina, com a preservação do tecido no que diz respeito à morfologia, proliferação e apoptose. Do ponto de vista folicular, houve preservação dos folículos, nomeadamente dos primordiais, em todos os grupos de estudo, quer na cultura, quer com o transplante.

CAPÍTULO VIII. Estimulação da angiogénese com
exossomas

As vesículas extracelulares pequenas (SEVs, do inglês, *small extracellular vesicles*), também designados como exossomas, são vesículas celulares tipicamente com um diâmetro de 30 a 150 nm, que contêm múltiplas biomoléculas, tais como miRNAs, mRNAs, DNA, proteínas e lípidos. Estas vesículas têm um papel importante na comunicação intercelular e modulam funções biológicas como a proliferação e a migração celulares, a regeneração dos tecidos e a neovascularização (Doyle & Wang, 2019; Henriques-Antunes *et al.*, 2019). No campo da ginecologia e medicina da reprodução, os exossomas são uma ferramenta emergente para ajudar a entender os diferentes mecanismos biológicos relacionados com a foliculogênese, a ovogênese e a qualidade embrionária (Machtinger *et al.*, 2021). No entanto, são ainda escassos os estudos sobre a utilização destas vesículas. Em estudos *in vitro* e em modelos animais, os exossomas promoveram o desenvolvimento folicular e restabeleceram a fertilidade na IOP (Deng *et al.*, 2021; Liao *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2020; Thabet *et al.*, 2020; Z. Yang *et al.*, 2019; J. Zhang *et al.*, 2020; S. Zhang *et al.*, 2021). Também foram investigados como estratégias terapêuticas na síndrome do ovário poliquístico, na endometriose e na síndrome de Asherman (Liao *et al.*, 2021). Na área da preservação da fertilidade, não parece haver nenhum trabalho com a aplicação de exossomas com vista a melhorar os resultados do transplante de tecido ovárico.

Assim, o nosso trabalho avalia, pela primeira vez, o efeito *in vitro* de exossomas na cultura de tecido ovárico humano previamente criopreservado.

VIII.1. Materiais e Métodos

As experiências descritas neste capítulo foram realizadas no Serviço de Medicina da Reprodução do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, no *Biomaterials and Stem Cell-Based Therapeutics Lab* da UC-Biotech do Centro de Neurociências e Biologia Celular (CNC) da Universidade de Coimbra, e no Instituto de Biofísica do Instituto de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, respeitando todas as disposições legais em vigor. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão

de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (ref^a CE-143-2016, Anexo IV).

VIII.1.1. Desenho experimental

Neste estudo avaliámos e comparámos o efeito dos exossomas com o da associação de VEGF e FGF na estimulação da angiogénese de tecido ovárico humano após criopreservação. Assim, foram constituídos 4 grupos, em que o grupo controlo correspondeu a tecido ovárico mantido em cultura sem adição de fatores ou vesículas; o grupo VF a tecido ovárico mantido em cultura com VEGF na concentração de 100 ng/mL e bFGF na concentração de 150ng/mL; o grupo Ex1 a tecido ovárico mantido em cultura com exossomas na concentração de 1 μ g/mL; e o grupo Ex3 a tecido ovárico mantido em cultura com exossomas na concentração de 3 μ g/mL. O desenho experimental deste estudo está representado na Figura 67.

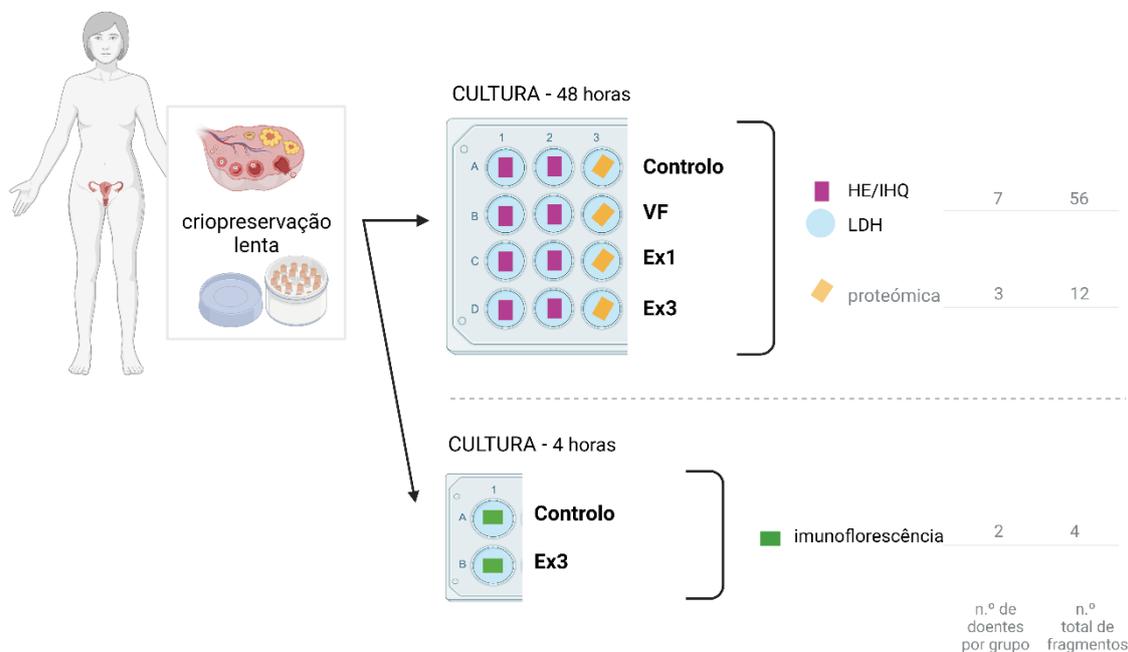


Figura 67. Representação esquemática do desenho experimental. *Created with BioRender.com.* HE, hematoxilina-eosina; IHQ, imunohistoquímica; VF, VEGF+FGF; Ex, exossomas.

Após a cultura durante 48 horas, os fragmentos de tecido ovárico foram utilizados para avaliação histológica e imunohistoquímica e guardados para posterior realização de ensaios de proteômica. Tendo em conta os resultados obtidos e com a perspectiva translacional discutida no capítulo VII, a cultura foi realizada por um período de 4 horas para o grupo controlo e Ex3 para a avaliação da internalização dos exossomas por imunofluorescência.

VIII.1.2. Tecido ovárico humano

Nesta experiência foi utilizado tecido ovárico de doentes que realizaram criopreservação de tecido ovárico no Centro de Preservação da Fertilidade do Serviço de Medicina da Reprodução do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, no âmbito da preservação da fertilidade por doença oncológica. Todas as doentes deram consentimento informado para a investigação. Foi utilizado tecido ovárico de sete mulheres cuja idade e diagnóstico oncológico são referidos na Tabela 23.

Tabela 23. Características clínicas das doentes cujo tecido ovárico foi utilizado para a experiência.

Código	Idade	Diagnóstico
A	22	Osteossarcoma
B	22	Osteossarcoma
C	32	Carcinoma do cólon
D	15	Carcinoma da nasofaringe
E	23	Osteossarcoma
F	24	Leucemia/linfoma linfoblástico-B
G	22	Carcinoma do ovário

Conforme referido, de acordo com o protocolo do Serviço de Medicina de Reprodução do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, os tecidos foram criopreservados pelo protocolo de congelação lenta, descrito no capítulo V. No dia da experiência o tecido ovárico foi descongelado segundo o protocolo descrito também no capítulo V. Os fragmentos de tecido ovárico utilizados na prática clínica têm a dimensão média de 10×5×1 mm. Para minimizar a quantidade de tecido humano utilizada, estes

fragmentos foram seccionados para um tamanho compatível com os trabalhos de investigação, nomeadamente cerca de $3 \times 2 \times 1$ mm, designados como “fragmentos de tecido ovárico”. Para cada caso foram utilizados dois fragmentos de tecido ovárico por grupo de estudo para avaliação histológica e imunohistoquímica, o que fez um total de 14 fragmentos por doente. Para avaliação da internalização foram utilizados dois fragmentos do grupo controlo e dois do grupo de tratamento com exossomas na concentração de $3 \mu\text{g/mL}$. Para o estudo de proteómica foi utilizado tecido ovárico de três doentes, tendo sido guardado um fragmento por doente e por grupo de estudo (controlo, VF, Ex 1 e Ex3).

Assim, para esta experiência foram utilizados no total 72 fragmentos de tecido ovárico, como descrito na Figura 67.

VIII.1.3.Exossomas

Os exossomas ou SEV foram fornecidos pelo *Biomaterials and Stem Cell-Based Therapeutics Lab (Centro de Neurociências e Biologia Celular)*, após isolamento a partir de células do cordão umbilical obtidas mediante consentimento informado assinado e aprovado pela Comissão de Ética do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra e em conformidade com a Legislação Portuguesa. As amostras de sangue do cordão foram armazenadas, transportadas e processadas no referido laboratório. As células mononucleares do sangue do cordão umbilical foram isoladas por separação em gradiente de densidade e, posteriormente, mantidas em cultura em condições de hipoxia (0,5% de O_2) durante 18 horas. Os exossomas foram purificados, a partir do sobrenadante, por centrifugação diferencial ($2000 \times \text{G}$ durante 20 minutos e dois passos de centrifugação a $10.000 \times \text{G}$ durante 30 minutos para remoção de detritos celulares e de eventuais corpos apoptóticos, seguidos de dois passos de centrifugação a $100.000 \times \text{G}$ durante 2 horas) (Henriques-Antunes *et al.*, 2019). O *pellet* foi ressuspenso em PBS e armazenado a -80°C . Os exossomas foram quantificados com base no seu teor de proteína, através do teste de micro BCA, tendo sido utilizadas a uma concentração de $274 \mu\text{g/mL}$.

VIII.1.4. Cultura de tecido ovárico

Para este trabalho experimental foi realizada cultura 3D com matriz de alginato durante 48 horas, a 37°C em ar com 5% de CO₂. O meio de cultura foi constituído por α -MEM, suplementado com albumina humana na concentração de 10% (*Grifols*), penicilina/estreptomicina na concentração de 1/1000 (15140-122, Gibco, *Thermo Fisher Scientific Inc.*) e hMG na concentração de 0,3 UI/mL (*Menopur®*, *Ferring Pharmaceuticals*). O *scaffold* de alginato foi preparado como descrito no capítulo V e VI. Nos grupos de tratamento, os fatores de crescimentos e os exossomas foram adicionados à matriz de alginato, com VEGF165 na concentração de 100 ng/mL (*Thermo Fisher Scientific Inc.*), bFGF na concentração de 150 ng/mL (*Sigma-Aldrich*) e exossomas na concentração de 1 e 3 μ g/mL. No final da cultura, 14 fragmentos de cada grupo foram fixados em formaldeído a 4% (*Panreac Quimica Sau*), para avaliação histológica e imunohistoquímica, e três outros de cada grupo foram congelados a -80°C, para posterior realização de ensaios de proteómica. Todos os procedimentos foram realizados sob condições estéreis. O meio de cultura foi conservado a -80°C para avaliação da citotoxicidade.

Para a avaliação da internalização dos exossomas, a cultura foi mantida durante 4 horas para os grupos controlo e Ex3, com a mesma composição do meio e condições de cultura. Após este tempo, dois fragmentos de tecido ovárico de cada grupo foram congelados a -80°C, para posterior realização de imunofluorescência.

VIII.1.5. Avaliação histológica e imunohistoquímica

Os tecidos fixados em formaldeído foram transportados para o Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, onde foram incluídos em parafina, seccionados seriadamente a cada 5 μ m e realizada coloração hematoxilina-eosina (como descrito no capítulo V). A análise histológica e imunohistoquímica foi realizada como descrito nos capítulos V e VI.

As fotografias das lâminas foram adquiridas no AxioScan.Z1 (*Carl Zeiss*), com lente Plan-Apochromat 10x/0.8, e com o auxílio do programa ZEN 2 *blue edition* (*Carl Zeiss Microscopy GmbH*, 2011). Todas as imagens foram avaliadas com recurso ao software *Image J*, por dois investigadores, alheios às condições em estudo.

VIII.1.6. Avaliação da citotoxicidade

Para avaliação da citotoxicidade foi realizado o ensaio de citotoxicidade CytoTox96® (*Promega G1780*) descrito no capítulo V. Foi avaliada a densidade ótica (OD) da LDH, que é libertada no meio de cultura pelas células danificadas.

VIII.1.7. Avaliação por imunofluorescência

A imunofluorescência é uma técnica que permite a visualização de vários componentes do tecido, através da combinação de anticorpos específicos marcados com fluoróforos (Im *et al.*, 2019). Para avaliação da internalização dos exossomas no tecido ovárico após 4 horas de cultura foi realizado um ensaio de imunofluorescência com a marcação das células endoteliais com CD31. O CD31 ou PECAM-1 é uma glicoproteína transmembranar que constitui uma grande parte das junções intercelulares de células endoteliais, pelo que é frequentemente utilizado como marcador vascular (DeLisser *et al.*, 1997).

Os exossomas foram marcados com PKH67. Após a cultura o tecido ovárico foi congelado a -80°C e transportado para o *Biomaterials and Stem Cell-Based Therapeutics Lab*. As amostras congeladas foram montadas com OCT cryomatrix (*Thermo Fisher Scientific*) e as criosecções de 30 µm foram obtidas usando um crióstato Leica CM1950 e colocadas em lâminas de vidro (*Superfrost plus*, VWR). As lâminas foram mantidas a -80°C até à marcação. Os núcleos foram corados com DAPI (2 µg/mL) e as células endoteliais com CD31 de acordo com o protocolo descrito na Tabela 24.

Tabela 24. Resumo do protocolo de imunofluorescência para CD31.

Descrição	
1	Descongelamento das lâminas em temperatura ambiente;
2	Fixação em formaldeído a 4% por 10 minutos;
3	Lavagem com DPB, três vezes por 10 minutos;
4	Bloqueio com albumina de soro bovino a 5% em DPBS;
5	Incubação durante 1 hora com anti-humano CD31 de murganho (JC/70 ^a , DAKO; 1:100 em 1% albumina de soro bovino);
6	Lavagem com DPBS, três vezes por 10 minutos;
7	Incubação durante 1 hora com anticorpo secundário Alexa-fluor 555 cabra anti-ratinho (<i>Invitrogen</i> ; 1:1000 em 1% albumina de soro bovino);
8	Lavagem com DPBS, três vezes por 10 minutos;
9	Montagem das lâminas com meio de montagem fluorescente (<i>Dako</i>).

As imagens foram adquiridas usando um sistema de imagem celular de alta sensibilidade e alto rendimento, do inglês *super-fast and sensitive wide-field cell imaging system* (IN Cell 2200, *GE Healthcare*).

VIII.1.8. Análise estatística

Os resultados de cada indivíduo foram padronizados ao seu controlo, usando as fórmulas apresentadas na Equação 7, tendo em conta a variabilidade interindividual. Devido a esta padronização, o resultado do grupo controlo corresponde a um e os valores superiores traduzem um aumento na variável analisada e inferiores uma redução.

Equação 7. Padronização dos resultados ao controlo por indivíduo.

$$\text{resultado do grupo VF padronizado} = \frac{\text{resultado do grupo VF}}{\text{resultado do grupo controlo}}$$

$$\text{resultado do grupo Ex1 padronizado} = \frac{\text{resultado do grupo Ex1}}{\text{resultado do grupo controlo}}$$

$$\text{resultado do grupo Ex3 padronizado} = \frac{\text{resultado do grupo Ex3}}{\text{resultado do grupo controlo}}$$

Para a análise estatística foi utilizado o programa SPSS versão 22.0 (IBM). A normalidade da distribuição foi avaliada para comparar os grupos de estudo. As variáveis com distribuição normal foram comparadas por meio do teste t de *Student* e aquelas cuja distribuição não era normal foram avaliadas por meio do teste de *Mann-Whitney*. Foi considerado estatisticamente significativo um valor de p inferior a 0,05. Os resultados são expressos como média±SEM. A potência estatística atingida foi calculada com recurso ao *software G.Power*.

VIII.2. Resultados

VIII.2.1. Estímulo angiogénico

A estimulação da angiogénese no tecido, que se traduz pela marcação das células endoteliais com FVIII, pode ser observada nas fotografias da Figura 68.

No que diz respeito à avaliação vascular, representada na Figura 69, verificou-se que com a suplementação com exossomas na concentração mais elevada houve um aumento da área vascular para cerca do dobro comparativamente com o grupo de tratamento com a associação com VEGF e FGF ($1,700 \pm 0,262$ versus $0,848 \pm 0,1667$; $p=0,02$; potência $(1-\beta)=71,2\%$) e com o grupo controlo ($p=0,037$; potência $(1-\beta)=60,8\%$).

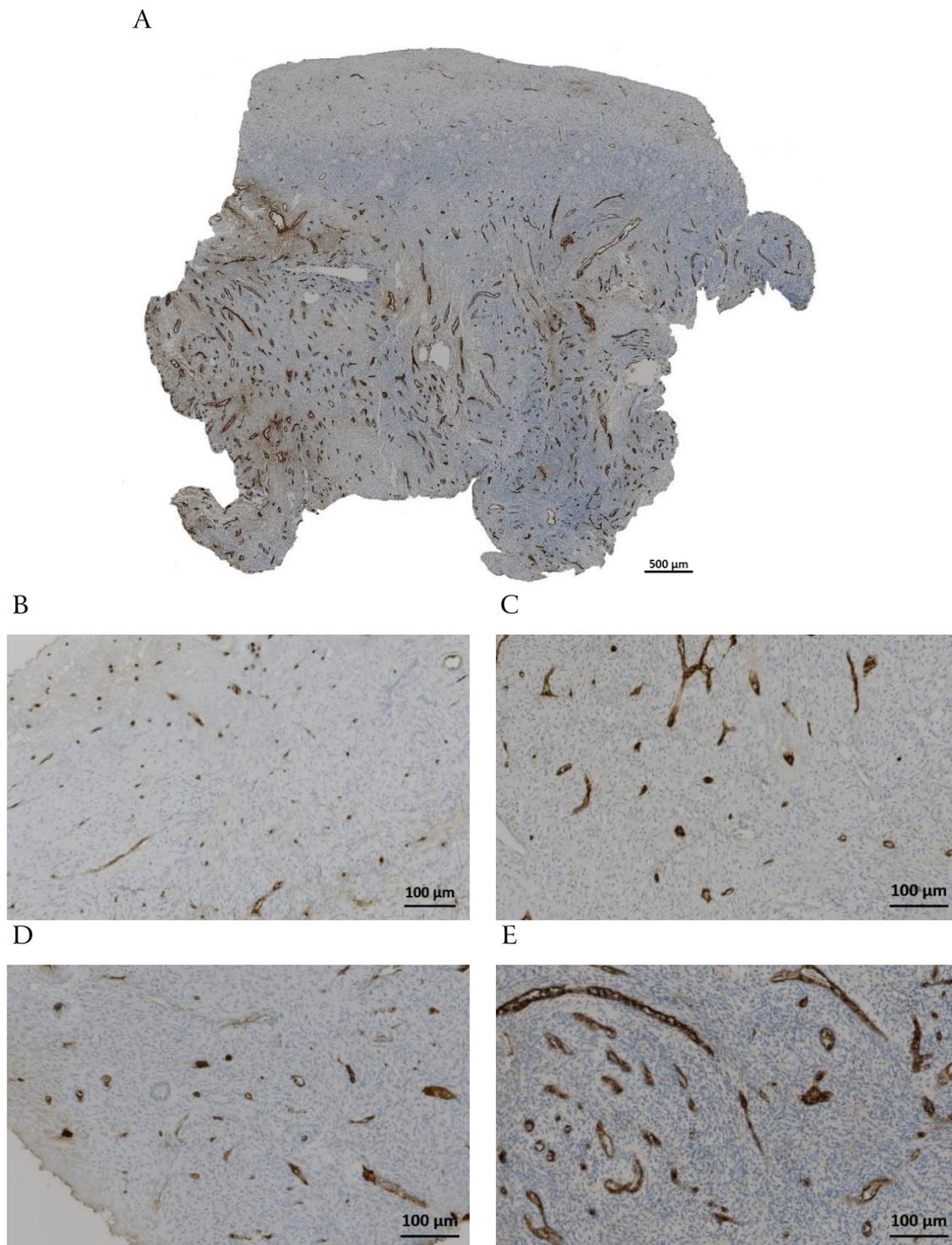


Figura 68. Imagens representativas da marcação imunohistoquímica do fator VIII em tecido ovárico humano. É possível identificar a marcação das células endoteliais com FVIII em tecido ovárico humano imediatamente após a descongelação (A), bem como a diferença na área marcada no grupo controlo após 48 horas de cultura (B) e de acordo com o tratamento *in vitro* com VEGF e FGF (C) e exossomas na concentração de 1 (D) e 3 $\mu\text{g/mL}$ (E). A ampliação da figura A é de 10 \times com barra de escala de 500 μm e das restantes é de 50 \times com a barra de escala de 100 μm .

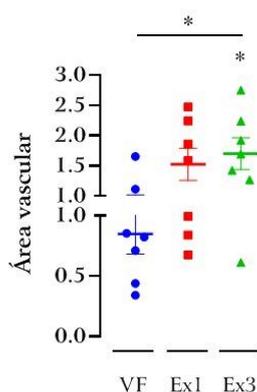


Figura 69. Avaliação da área vascular no tecido ovárico humano submetido a cultura. Foi realizada imunohistoquímica com a marcação anti-FVIII. Os dados são apresentados na forma de média \pm SEM. O asterisco (*) sob os resultados grupo Ex3 representa diferenças significativas relativamente ao controlo, enquanto o outro asterisco (*) representa diferenças significativas entre os dois grupos das extremidades da barra horizontal.

VIII.2.2. Avaliação folicular

As secções de tecido ovárico corado com hematoxilina-eosina foram submetidas a avaliação folicular segundo a classificação de Gougeon, como representando na Figura 70. Relativamente à densidade folicular não se verificaram diferenças entre os grupos de estudo na avaliação global nem na análise por estádios de desenvolvimento, como representado na Figura 71 e Figura 72.

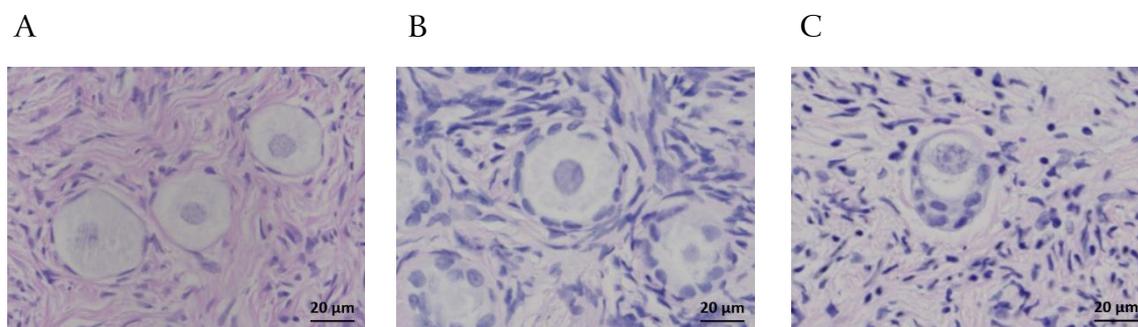


Figura 70. Imagens representativas dos folículos coradas com hematoxilina-eosina. É possível identificar três folículos primordiais (A), um folículo primário (B) e um folículo secundário (C). A ampliação é de 200 \times com a barra de escala de 20 μ m.

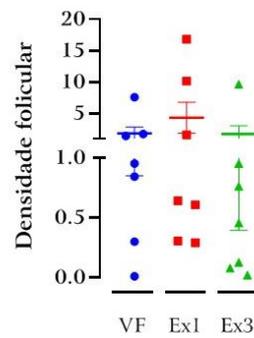


Figura 71. Densidade de folículos morfologicamente normais no tecido ovário humano submetido a cultura. Os dados são apresentados na forma de média \pm SEM.

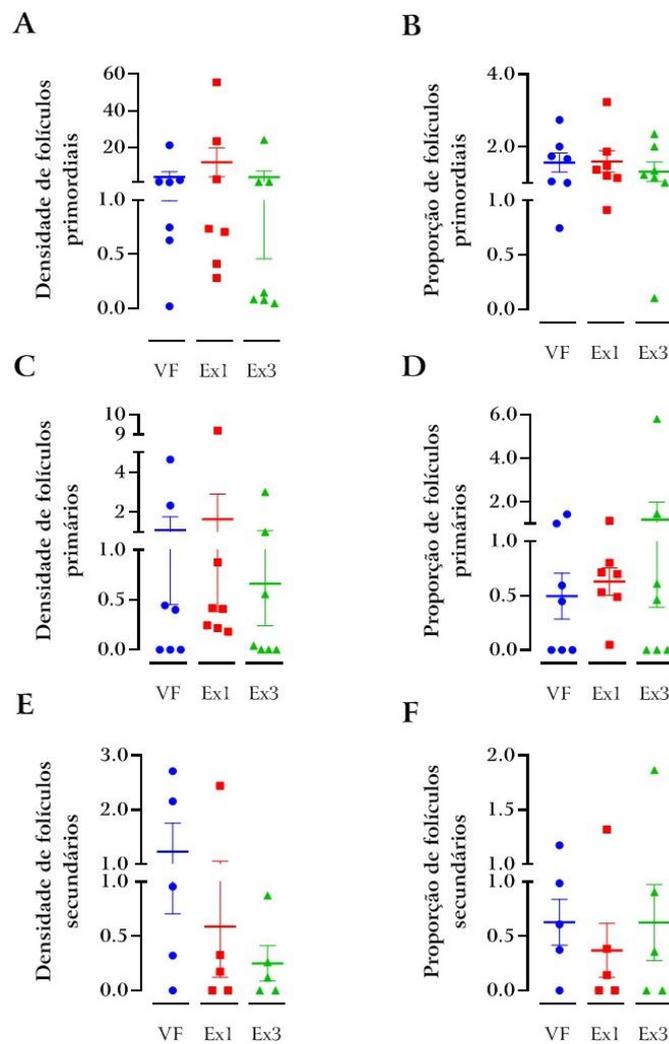


Figura 72. Quantificação dos folículos por estádios de desenvolvimento no tecido ovário humano submetido a cultura. São representados os resultados da densidade folicular (A, C, E) e da percentagem folicular (B, D, F), para os folículos primordiais (A, B), primários (C, D) e secundários (E, F). Os dados são apresentados na forma de média \pm SEM.

Os folículos em proliferação foram identificados pela marcação anti-Ki67, e podem ser observados nas fotografias representativas da Figura 73. No que diz respeito à sua quantificação no tecido ovárico humano submetido a cultura, não se verificaram diferenças entre os grupos de estudo, como pode ser observado na Figura 74.

Os folículos em apoptose estão marcados nas fotografias representativas da Figura 75. Nesta análise, verificou-se que a apoptose foi tendencialmente mais elevada em todos os grupos de tratamento comparativamente com o controlo, sendo a diferença significativa para o tratamento com a dose mais alta de exossomas ($3,017 \pm 1,247$; $p=0,043$), como pode ser observado na Figura 76.

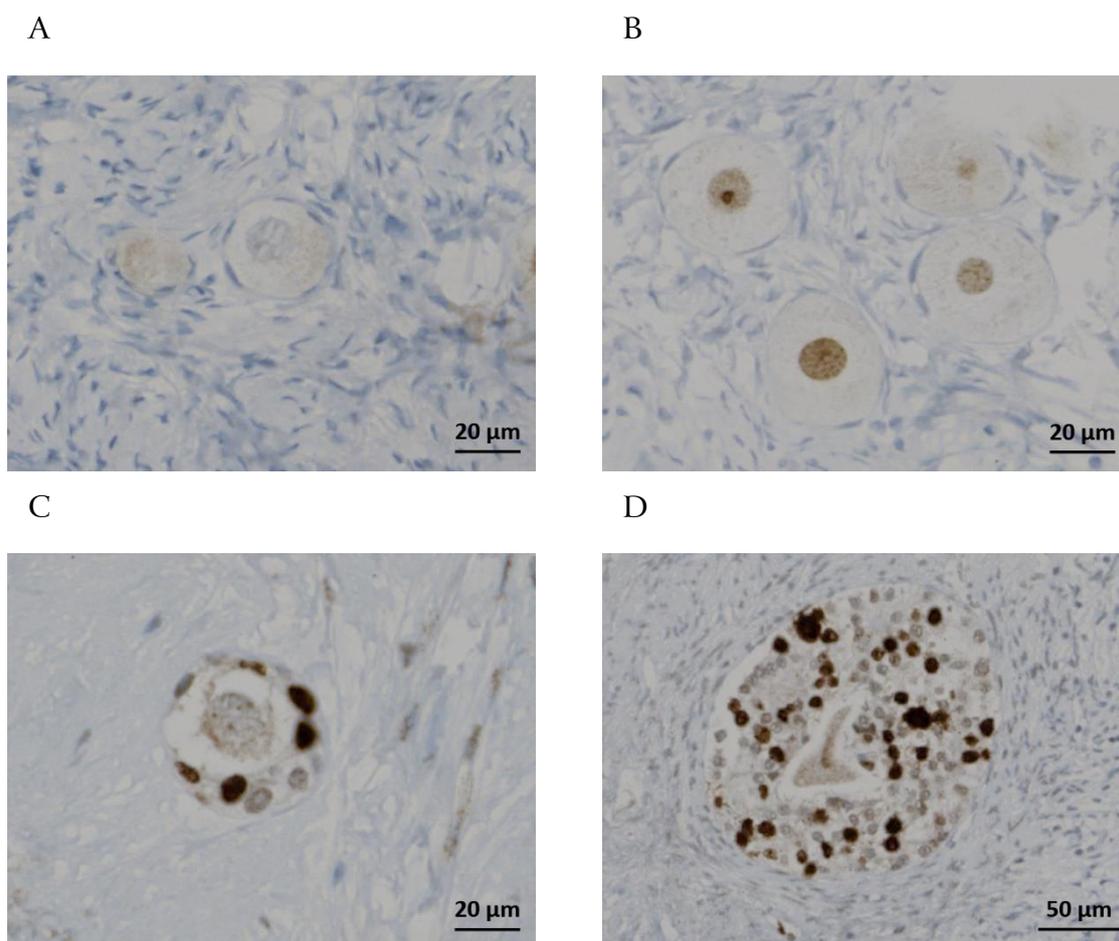


Figura 73. Marcação imunohistoquímica da proliferação nos folículos. Estão representados um folículo primordial negativo para Ki67 (A) e vários folículos positivos, nomeadamente quatro primordiais com (B), um primário (C) e um secundário (D). A ampliação da figura D é de 100× com barra de escala de 50 µm e das restantes é de 200× com a barra de escala de 20 µm.

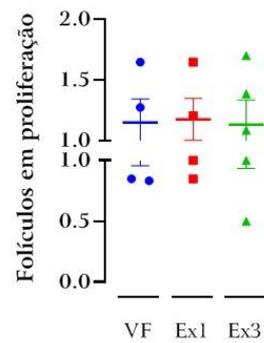


Figura 74. Proliferação nos folículos no tecido ovário humano submetido a cultura. A proliferação foi quantificada pela marcação com Ki67, tendo em conta o número de folículos com marcação positiva no número total de folículos. Os dados são apresentados na forma de média \pm SEM.

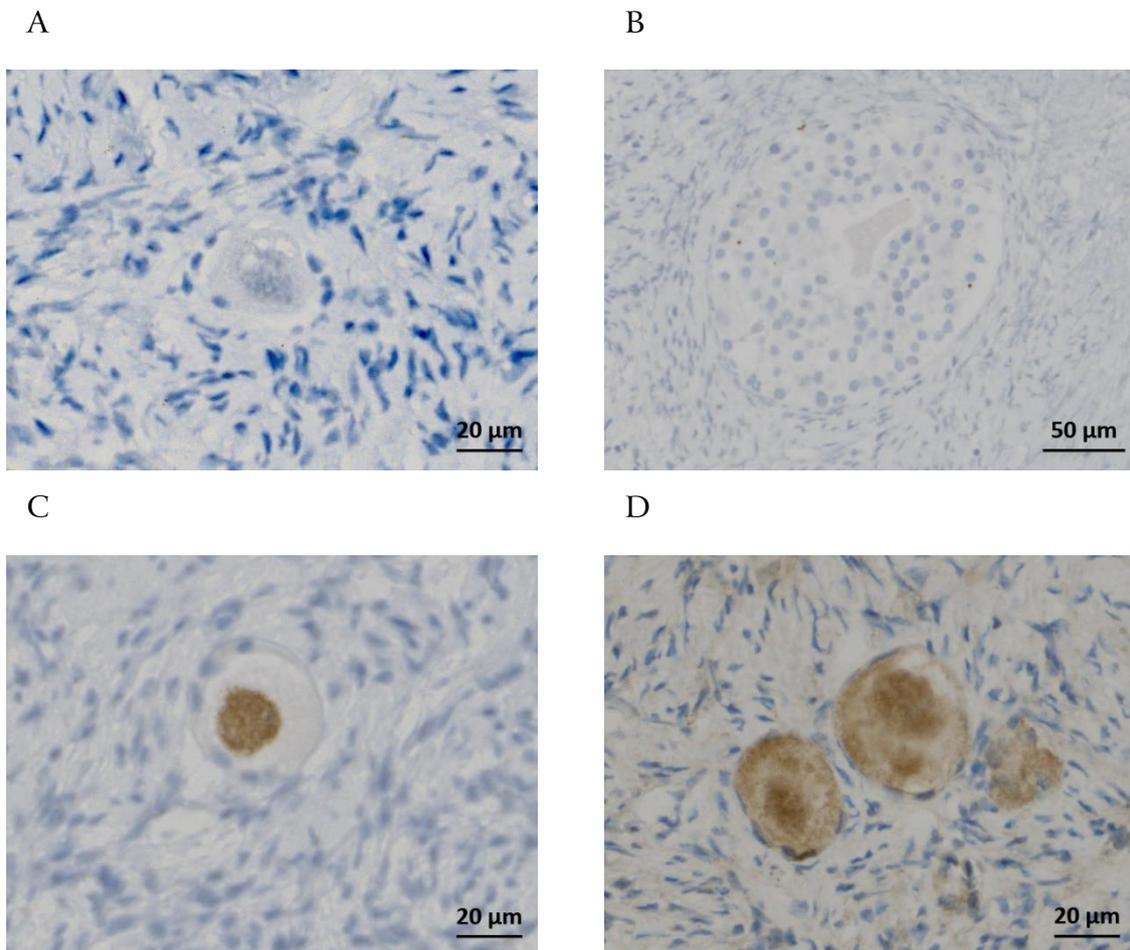


Figura 75. Marcação imunohistoquímica da apoptose nos folículos. Estão representados um folículo primordial (A) e um folículo secundário (B) negativos para caspase 3 e três folículos primordiais positivos (C e D). A ampliação da figura B é de 100 \times com barra de escala de 50 μ m e das restantes é de 200 \times com a barra de escala de 20 μ m.

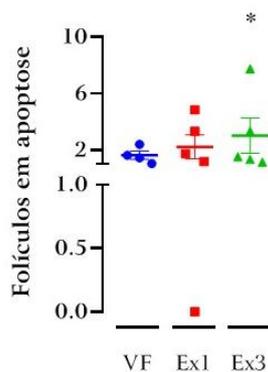


Figura 76. Apoptose nos folículos no tecido ovário humano submetido a cultura. A apoptose foi quantificada pela marcação com caspase 3, tendo em conta o número de folículos com marcação positiva no número total de folículos. Os dados são apresentados na forma de média ± SEM. O asterisco (*) sob os resultados grupo Ex3 representa diferenças significativas relativamente ao controlo.

VIII.2.3. Viabilidade do tecido ovárico humano em cultura

Além da avaliação folicular foi realizada a avaliação do estroma. Na avaliação histológica qualitativa do estroma não foram evidenciadas diferenças nos grupos de estudo.

Relativamente à proliferação e à apoptose, como pode ser observado pelas fotografias representativas da Figura 77, não se verificaram diferenças entre o grupo controlo e os diferentes tratamentos, conforme representado graficamente na Figura 78.

A citotoxicidade, avaliada pela quantidade de LDH no meio de cultura, também não evidenciou diferenças entre os grupos, como representado na Figura 79.

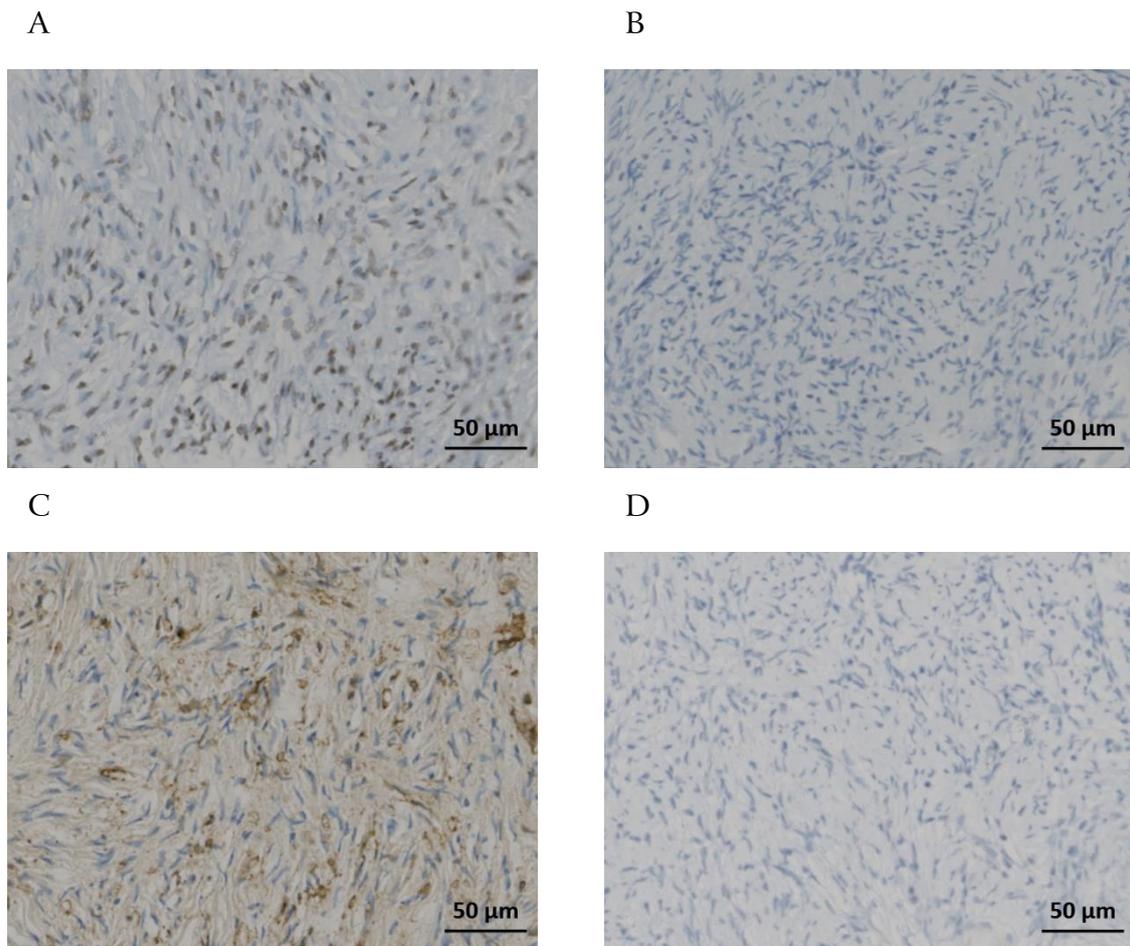


Figura 77. Marcação imunohistoquímica da proliferação e apoptose no estroma do tecido ovárico humano. A proliferação foi avaliada através da marcação para Ki67 (A, B) e a apoptose para caspase 3 (C, D). A ampliação é de 100 \times e a barra de escala é de 50 μ m.

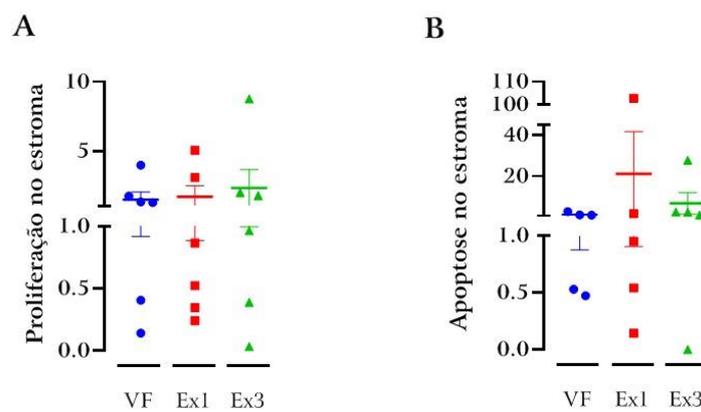


Figura 78. Avaliação da proliferação e da apoptose no estroma do tecido ovárico antes e após a criopreservação. São representados os resultados de acordo com a área marcada para Ki67 (A) e caspase 3 (B) nas células do estroma. Os dados são apresentados na forma de média \pm SEM.

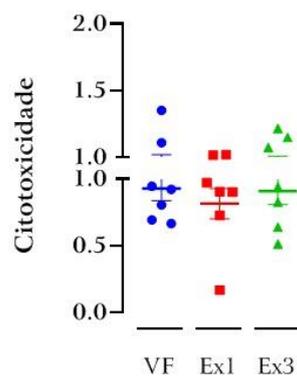


Figura 79. Citotoxicidade no tecido analisada através da quantidade de LDH libertada para o meio de cultura. Os dados são apresentados na forma de média \pm SEM.

VIII.2.4. Internalização dos exossomas no tecido

Através do ensaio de imunofluorescência foi possível identificar a presença dos exossomas no tecido ovárico humano como representado nas imagens da Figura 80.

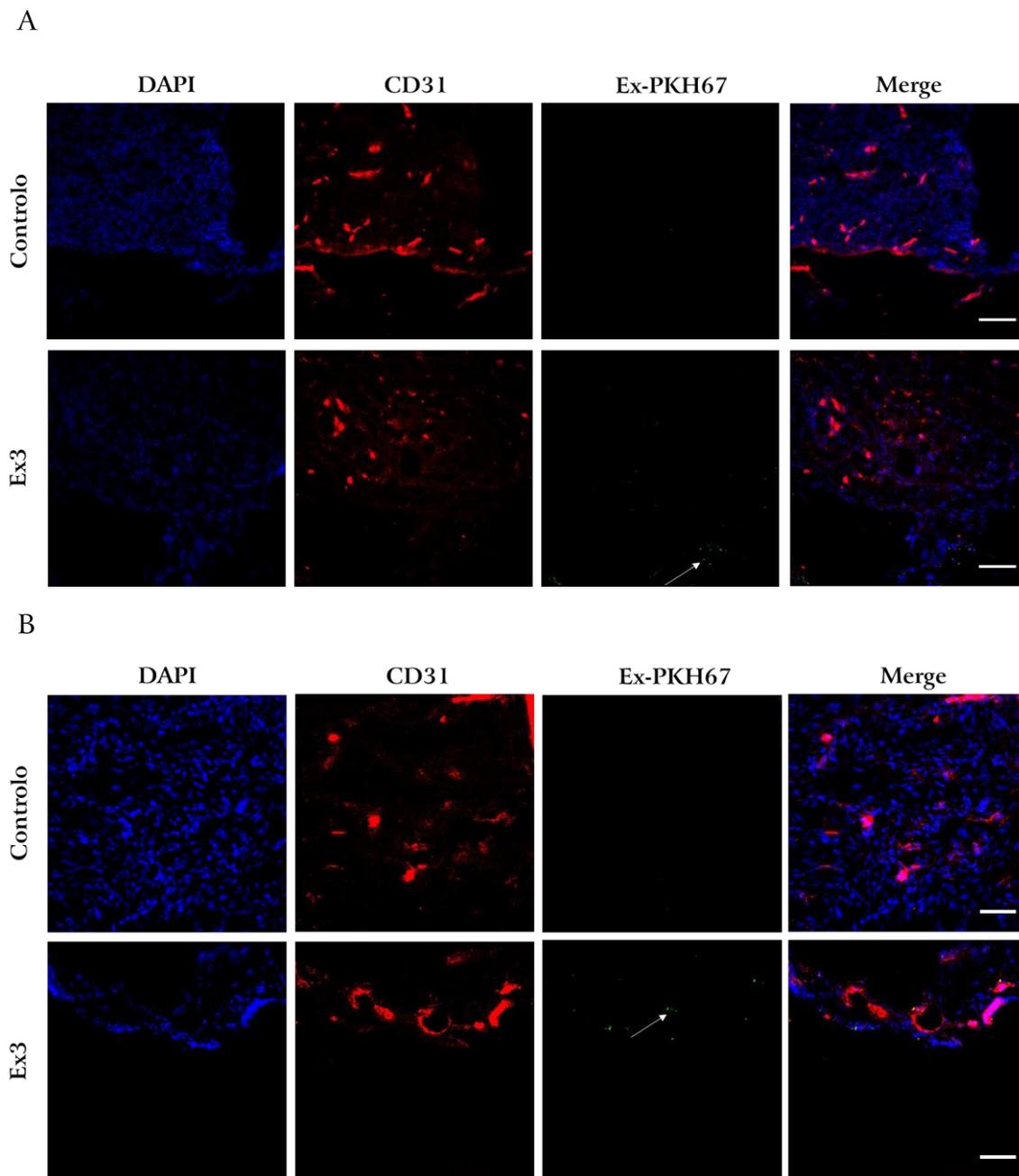


Figura 80. Internalização dos exossomas em duas amostras de tecido ovárico humano (A e B). A ampliação da figura A é de 200× com barra de escala de 100 μm e figura B é de 400× com barra de escala de 50 μm .

VIII.3. Discussão

Este é o primeiro estudo a avaliar o efeito de exossomas na angiogénese do tecido ovárico humano após criopreservação.

Os exossomas são vesículas que se formam através de corpos multivesiculares pela via dos endossomas e que são libertadas por exocitose, por todos os tipos de células, para o espaço extracelular. Participam na comunicação intercelular e medeiam diferentes funções celulares, tais como a sobrevivência e a morte celular (Doyle & Wang, 2019; Ribeiro *et al.*, 2013). Os exossomas podem ser encontrados em todos os fluídos biológicos, nomeadamente no plasma, soro, urina, saliva, líquido broncoalveolar, líquido cefalorraquidiano, leite materno, líquido amniótico, entre outros (Doyle & Wang, 2019).

O conteúdo dos exossomas reflete especificamente a sua localização, origem celular e mecanismo de secreção (Todorova *et al.*, 2017). Estão descritas proteínas que são marcadoras, pelo processo de formação das vesículas através da via dos exossomas, tais como o CD81, o CD63, o Alix (do inglês, *ALG-2-interacting protein X*) e a Tsg101 (do inglês, *tumor susceptibility gene*). Além disso, existem outras proteínas que são variáveis, de acordo com o ambiente e as células nas quais tiveram origem os exossomas, bem como o RNA, o DNA e os lípidos (Doyle & Wang, 2019; Todorova *et al.*, 2017).

Os exossomas têm um papel multifacetado na modulação de respostas biológicas. Nas últimas duas décadas, tem surgido um interesse crescente na comunidade científica em estudar os exossomas como biomarcadores de doença ou como estratégias terapêuticas em medicina regenerativa ou na modulação da angiogénese. Estes têm uma semivida longa em circulação, são bem tolerados pelo corpo humano, são capazes de penetrar nas membranas celulares e atingir tipos específicos de células (Doyle & Wang, 2019; Todorova *et al.*, 2017).

Na saúde da mulher, nomeadamente a relacionada com a fertilidade, os exossomas também podem ser considerados biomarcadores de diagnóstico e/ou terapêutica. Na síndrome de ovário poliquístico e na endometriose, os exossomas mostraram ser úteis para o diagnóstico ou como alvos terapêuticos. Já na síndrome de Asherman e na IOP tem sido investigado o papel dos exossomas no seu tratamento, sendo a última aquela em que existem mais estudos (Esfandyari *et al.*, 2021).

A aplicação de exossomas derivados de células estaminais mesenquimatosas do cordão

umbilical humano (hUCMSCs, do inglês, *human umbilical cord mesenchymal stem cells*) tem sido investigada na IOP, através de estudos *in vitro* e *in vivo*. Salienta-se, porém, que todos os estudos são em modelo animal. Foi demonstrado um efeito protetor nas células da granulosa de ovários de rato, em co-cultura destes exossomas com cisplatina, com diminuição da percentagem de apoptose (Sun *et al.*, 2017; J. Zhang *et al.*, 2020). A administração endovenosa de exossomas derivados de hUCMSCs em murganhos com IOP permitiu a recuperação da função endócrina e a diminuição da apoptose (Deng *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2020). Também a administração intraperitoneal de exossomas derivados de hUCMSCs promoveu a função ovárica e a proliferação através da regulação da via Hippo (Z. Li *et al.*, 2021). Também para reverter a IOP tem sido investigado, apenas em modelo animal, o efeito do tratamento com exossomas de outra origens, nomeadamente, exossomas derivados de células estromais do sangue menstrual (S. Zhang *et al.*, 2021), células mesenquimatosas do líquido amniótico (Thabet *et al.*, 2020) e do tecido adiposo (Huang *et al.*, 2018).

Neste trabalho utilizámos exossomas derivados de células mononucleares do cordão umbilical humano que demonstraram ter um impacto na regeneração de tecidos, nomeadamente com melhoria da angiogénese. O hidrogel tem o potencial de prolongar a disponibilidade local dos exossomas, reduzir a frequência de administração e maximizar a sua eficácia terapêutica (Henriques-Antunes *et al.*, 2019). Assim e como discutido no capítulo V, optámos por aplicar os exossomas na matriz de alginato em cocultura com o tecido ovárico humano.

No nosso trabalho verificou-se uma melhoria da vascularização no tecido ovárico mantido em cultura com exossomas. Com a concentração mais elevada de exossomas (3 $\mu\text{g/mL}$), a área vascular no tecido foi cerca de 1,5 vezes superior do que na cultura sem suplementação e o dobro comparativamente com a associação de VEGF e de bFGF. Este resultado foi semelhante ao estudo no qual foram utilizados exossomas derivados de células mononucleares do cordão umbilical humano para melhorar a cicatrização de feridas em murganhos com diabetes mellitus tipo 1 (Henriques-Antunes *et al.*, 2019). Adicionalmente, mostrou ser superior ao tratamento com o VEGF e o FGF, a terapêutica que tem sido mais investigada para estimulação da angiogénese no tecido ovárico criopreservado (J. Gao *et al.*, 2015; Kang *et al.*, 2016; S.

H. Li *et al.*, 2016; Tavana *et al.*, 2016; L. Wang *et al.*, 2013).

No que diz respeito à avaliação da apoptose, verificámos houve um aumento nos folículos com a concentração mais elevada de exossomas. Este resultado é contraditório com os estudos existentes que mostraram um efeito antiapoptótico no tecido ovárico com a aplicação destas vesículas, *in vitro*, em células da granulosa ao fim de 6 (J. Zhang *et al.*, 2020) e de 48 horas (Sun *et al.*, 2017) ou *in vivo* (Deng *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2020; Thabet *et al.*, 2020). Este efeito mostrou ser mediado pelo miRNA21 através da modulação das vias apoptóticas de PTEN e de caspase 3 (Thabet *et al.*, 2020). Apesar dos exossomas utilizados no nosso trabalho terem uma origem diferente, também apresentaram sobreexpressão de miRNA21 (Henriques-Antunes *et al.*, 2019).

Na restante avaliação que realizámos, verificou-se uma preservação do tecido, sem que os exossomas tivessem impacto na citotoxicidade e na proliferação celular, bem como na densidade folicular.

Em conclusão, este é o primeiro estudo com a aplicação *in vitro* de exossomas derivados de células mononucleares do cordão umbilical ao tecido ovárico humano após criopreservação tendo-se verificado um aumento da área vascular no tecido. Assim, a utilização de exossomas pode ser uma estratégia terapêutica para melhorar a angiogénese e diminuir a lesão de isquemia/reperfusão com o transplante.

PARTE III – Conclusões e perspectivas futuras

Os resultados obtidos no trabalho experimental foram apresentados e discutidos ao longo deste manuscrito. Contudo, há conclusões que importa destacar assim como, perspetivar o trabalho que se pretende realizar no futuro.

A cultura de tecido ovárico é um desafio pela complexidade deste órgão em que a interação entre os folículos, que são a unidade morfofuncional, e o estroma, que é o tecido de suporte do ovário, é essencial na sua dinâmica. A cultura 3D de tecido ovárico em matriz de alginato foi semelhante à cultura convencional, para culturas de curta duração (até 48 horas). Assim, a matriz de alginato pode ser uma alternativa a outras matrizes descritas na literatura para avaliar o efeito de um determinado estímulo terapêutico *in vitro*.

Neste estudo, realizámos uma análise histopatológica estruturada, com a caracterização detalhada do tecido ovárico e o desenvolvimento de um *score* histopatológico da viabilidade do tecido, que incluiu a avaliação de três parâmetros morfológicos tais como a percentagem de tecido em necrose, a degeneração dos folículos e o edema intersticial.

No entanto, alguns pontos merecem ser abordados no futuro, nomeadamente o estudo das interações tecido-matriz.

O protocolo de criopreservação lenta com etilenoglicol e sacarose utilizado na prática clínica não mostrou ser deletério para o tecido ovárico de rato, preservando a densidade folicular e a morfologia do tecido, com diminuição da apoptose. Adicionalmente verificou-se um aumento da vascularização do tecido ovárico após criopreservação, com alteração da expressão génica.

Para melhorar o resultado do transplante de tecido ovárico foram avaliadas várias estratégias para a estimulação da angiogénese.

A associação de VEGF, de FGF e de hMG à cultura do tecido ovárico de rato após criopreservação mostrou aumentar a densidade vascular após o autotransplante, preservando a morfologia, a proliferação e a apoptose, bem como os folículos, nomeadamente os primordiais.

Como a angiogénese é um processo complexo que envolve várias vias de sinalização, neste trabalho experimental foi realizada, pela primeira vez, uma caracterização pormenorizada da expressão de genes relacionados com a angiogénese no tecido ovárico após a cultura com os diferentes estímulos. Para estudos futuros temos guardados extratos de proteína que permitirão melhorar a caracterização do efeito dos estímulos.

A avaliação da função endócrina é raramente realizada nos estudos publicados, pelo que este foi um dos pontos fortes do nosso trabalho. Porém como limitações temos o reduzido número de animais nos quais foi realizada a citologia, além da avaliação da função endócrina ter sido realizada em apenas um momento. Como perspectivas futuras, pretendemos aumentar o número de casos com avaliação da função endócrina e realizar o transplante ortotópico, de modo a prolongar o transplante permitindo comparar a sua longevidade e avaliar a restituição da fertilidade.

A utilização dos exossomas demonstrou ser uma estratégia promissora para melhorar a angiogénese do tecido ovárico, salientando-se a mais-valia deste estudo ter sido realizado em tecido ovárico humano. Como perspectivas futuras pretendemos realizar estudos de proteómica, o que nos permitirá uma melhor caracterização deste efeito, bem como avaliar esta estratégia terapêutica com o xenotransplante.

Em todo o trabalho experimental, um dos pontos fortes foi a avaliação dos resultados de histologia e de imunohistoquímica por dois investigadores independentes e desconhecedores das condições de estudo. Este cuidado permitiu aferir que a melhor metodologia para avaliação da densidade vascular é a área vascular, tendo em conta a concordância interobservador e a reprodutibilidade da técnica.

Em suma, com este trabalho experimental foi possível identificar diferentes estratégias para estimular a angiogénese do tecido ovárico, com o intuito de melhorar a longevidade do transplante e otimizar a técnica de criopreservação de tecido ovárico para preservação da fertilidade feminina.

PARTE IV – Referências bibliográficas

- Abir, R., Fisch, B., Jessel, S., Felz, C., Ben-Haroush, A., & Orvieto, R. (2011). Improving posttransplantation survival of human ovarian tissue by treating the host and graft. *Fertility and Sterility*, 95(4), 1205–1210. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.07.1082>
- Alvarez, R. M., & Ramanathan, P. (2018). Fertility preservation in female oncology patients: The influence of the type of cancer on ovarian stimulation response. *Human Reproduction*, 33(11), 2051–2059. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew158>
- American Society for Reproductive Medicine. (2014). Ovarian tissue cryopreservation: A committee opinion. *Fertility and Sterility*, 101(5), 1237–1243. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.02.052>
- American Society for Reproductive Medicine. (2021). In vitro maturation: a committee opinion. *Fertility and Sterility*, 115(2), 298–304. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.11.018>
- Amonn, F., Baumann, U., Wiesmann, U. N., Hofmann, K., & Herschkowitz, N. (1978). Effects of antibiotics on the growth and differentiation in dissociated brain cell cultures. *Neuroscience*, 3(4), 465–468. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0306-4522\(78\)90049-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0306-4522(78)90049-0)
- Amorim, C. A., David, A., Dolmans, M. M., Camboni, A., Donnez, J., & Van Langendonck, A. (2011). Impact of freezing and thawing of human ovarian tissue on follicular growth after long-term xenotransplantation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 28(12), 1157–1165. <https://doi.org/10.1007/s10815-011-9672-z>
- Amorim, C. A., Van Langendonck, A., David, A., Dolmans, M. M., & Donnez, J. (2009). Survival of human pre-antral follicles after cryopreservation of ovarian tissue, follicular isolation and in vitro culture in a calcium alginate matrix. *Human Reproduction*, 24(1), 92–99. <https://doi.org/10.1093/humrep/den343>
- Anazodo, A., Ataman-Millhouse, L., Jayasinghe, Y., & Woodruff, T. K. (2018). Oncofertility – An Emerging Discipline rather than a Special Consideration. *Pediatr Blood Cancer.*, 65(11), 1–19.

<https://doi.org/10.1002/pbc.27297>.Oncofertility

- Andersen, T., Auk-Emblem, P., & Dornish, M. (2015). 3D Cell Culture in Alginate Hydrogels. *Microarrays*, 4(2), 133–161. <https://doi.org/10.3390/microarrays4020133>
- Anderson, R. A., Amant, F., Braat, D., D'Angelo, A., Chuva de Sousa Lopes, S. M., Demeestere, I., Dwek, S., Frith, L., Lambertini, M., Maslin, C., Moura-Ramos, M., Nogueira, D., Rodriguez-Wallberg, K., Vermeulen, N., ESHRE, F. F. P. G. D. G., Anderson, R. A., Amant, F., Braat, D., D'Angelo, A., ... Vermeulen, N. (2020). ESHRE guideline: female fertility preservation. *Human Reproduction Open*, 2020(4), 1–17. <https://doi.org/10.1093/hropen/hoaa052>
- Anderson, R. A., Brewster, D. H., Wood, R., Nowell, S., Fischbacher, C., Kelsey, T. W., & Wallace, W. H. B. (2018). The impact of cancer on subsequent chance of pregnancy: A populationbased analysis. *Human Reproduction*, 33(7), 1281–1290. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey216>
- Asfour, V., Polson, A., Varma, R., & Menon, P. (2015). Evaluating ovarian preservation after ovarian torsion using the ovarian preservation score and tissue necrosis score. *Clinical Obstetrics, Gynecology and Reproductive Medicine*, 1(2), 34–39. <https://doi.org/10.15761/cogrm.1000110>
- Baerwald, A. R., Adams, G. P., & Pierson, R. A. (2012). Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: A review. *Human Reproduction Update*, 18(1), 73–91. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmr039>
- Bancroft, J. D., & Layton, C. (2019). 10 - The hematoxylin and eosin. In S. K. Suvarna, C. Layton, & J. D. Bancroft (Eds.), *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques (Eighth Edition)* (Eighth Edi, pp. 126–138). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6864-5.00010-4>
- Barbee, J. H., & Cokelet, G. R. (1971). The Fahraeus effect. *Microvascular Research*, 3(1), 6–16. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0026-2862\(71\)90002-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0026-2862(71)90002-1)
- Barć, P., Antkiewicz, M., Śliwa, B., Frączkowska, K., Guziński, M., Dawiskiba, T., Małodobra-Mazur, M., Witkiewicz, W., Kupczyńska, D., Strzelec, B., Janczak,

- D., & Skóra, J. P. (2021). Double VEGF/HGF Gene Therapy in Critical Limb Ischemia Complicated by Diabetes Mellitus. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 14(3), 409–415. <https://doi.org/10.1007/s12265-020-10066-9>
- Barrett, S. L., & Woodruff, T. K. (2010). Gamete Preservation. *Cancer Treat Res*, 156, 25–39. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6518-9>
- Bedaiwy, M. A., & Falcone, T. (2010). Whole ovary transplantation. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 53(4), 797–803. <https://doi.org/10.1097/GRF.0b013e3181f97c94>
- Belli, M., Vigone, G., Merico, V., Redi, C. A., Zuccotti, M., & Garagna, S. (2012). Towards a 3D culture of mouse ovarian follicles. *International Journal of Developmental Biology*, 56(10–12), 931–937. <https://doi.org/10.1387/ijdb.120175mz>
- Bender, H. R., Trau, H. A., & Duffy, D. M. (2018). Placental growth factor is required for ovulation, luteinization, and angiogenesis in primate ovulatory follicles. *Endocrinology*, 159(2), 710–722. <https://doi.org/10.1210/en.2017-00739>
- Bentley, K., & Chakravartula, S. (2017). The temporal basis of angiogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1720). <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0522>
- Brito, I. R., Lima, I. M. T., Xu, M., Shea, L. D., Woodruff, T. K., & Figueiredo, J. R. (2014). Three-dimensional systems for in vitro follicular culture: Overview of alginate-based matrices. *Reproduction, Fertility and Development*, 26(7), 915–930. <https://doi.org/10.1071/RD12401>
- Brown, K., Awan, N. A., Le, P. H., & Wilson, A. M. (2021). Histology, Cell Death. *StatPearls*.
- Burri, P. H., & Tarek, M. R. (1990). A novel mechanism of capillary growth in the rat pulmonary microcirculation. *The Anatomical Record*, 228(1), 35–45. <https://doi.org/10.1002/ar.1092280107>
- Busnelli, A., Vitagliano, A., Mensi, L., Acerboni, S., Bulfoni, A., Filippi, F., & Somigliana, E. (2020). Fertility in female cancer survivors: a systematic review

- and meta-analysis. *Reproductive BioMedicine Online*, 41(1), 96–112. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2020.02.008>
- Byers, S. L., Wiles, M. V., Dunn, S. L., & Taft, R. A. (2012). Mouse estrous cycle identification tool and images. *PLoS ONE*, 7(4), 1–5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035538>
- Cacciottola, L., Donnez, J., & Dolmans, M. M. (2021). Ovarian tissue damage after grafting: systematic review of strategies to improve follicle outcomes. *Reproductive BioMedicine Online*, 43(3), 351–369. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2021.06.019>
- Caligioni, C. (2009). Assessing Reproductive Status/Stages in Mice Claudia. *Curr Protoc Neurosci*, July, 1–11. <https://doi.org/10.1002/0471142301.nsa04is48.Assessing>
- Campos, J. R., Rosa-e-Silva, J. C., Carvalho, B. R., Vireque, A. A., Silva-de-Sá, M. F., & Rosa-e-Silva, A. C. J. de S. (2011). Cryopreservation time does not decrease follicular viability in ovarian tissue frozen for fertility preservation. *Clinics*, 66(12), 2093–2097. <https://doi.org/10.1590/S1807-59322011001200015>
- Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 473(7347), 298–307. <https://doi.org/10.1038/nature10144>
- Cébe-Suarez, S., Zehnder-Fjällman, A., & Ballmer-Hofer, K. (2006). The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(5), 601–615. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5426-3>
- Cha, S. K., Shin, D. H., Kim, B. Y., Yoon, S. Y., Yoon, T. K., Lee, W. S., Chung, H. M., & Lee, D. R. (2014). Effect of human endothelial progenitor cell (EPC)- or mouse vascular endothelial growth factor-derived vessel formation on the survival of vitrified/warmed mouse ovarian grafts. *Reproductive Sciences*, 21(7), 859–868. <https://doi.org/10.1177/1933719113518983>
- Chan, J. K. C. (2014). The wonderful colors of the hematoxylin-eosin stain in diagnostic surgical pathology. *International Journal of Surgical Pathology*, 22(1), 12–32. <https://doi.org/10.1177/1066896913517939>

- Chen, B., Zhang, Y., Chen, S., Xuran, L., Dong, J., Chen, W., Tao, S., Yang, W., & Zhang, Y. (2021). The role of vascular endothelial growth factor in ischemic stroke. *Pharmazie*, 76(4), 127–131. <https://doi.org/10.1691/ph.2021.1315>
- Cho, I. A., Lee, Y. J., Lee, H. J., Choi, I. Y., Shin, J. K., Lee, S. A., Lee, J. H., & Choi, W. J. (2018). Angiopoietin-1 and -2 and vascular endothelial growth factor expression in ovarian grafts after cryopreservation using two methods. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, 45(3), 143–148. <https://doi.org/10.5653/cerm.2018.45.3.143>
- Clark, E. R., & Clark, E. L. (1940). Microscopic observations on the extra-endothelial cells of living mammalian blood vessels. *American Journal of Anatomy*, 66(1), 1–49. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/aja.1000660102>
- Cobo, A., García-Velasco, J. A., Remohí, J., & Pellicer, A. (2021). Oocyte vitrification for fertility preservation for both medical and nonmedical reasons. *Fertility and Sterility*, 115(5), 1091–1101. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2021.02.006>
- Cohen, G. M. (1997). Caspases: Executioners of Apoptosis. *Biochemical Journal*, 326, 1–16. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386456-7.01411-8>
- Cohen, Y., Dafni, H., Avni, R., Fellus, L., Bochner, F., Rotkopf, R., Raz, T., Benjamin, L. E., Walsh, K., & Neeman, M. (2016). Genetic and pharmacological modulation of Akt1 for improving ovarian graft revascularization in a mouse model. *Biology of Reproduction*, 94(1), 1–11. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.131987>
- Cooper, H. C., Long, J., & Aye, T. (2022). Fertility preservation in transgender and non-binary adolescents and young adults. *Plos One*, 17(3), e0265043. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0265043>
- Cora, M. C., Kooistra, L., & Travlos, G. (2015). Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. *Toxicologic Pathology*, 43(6), 776–793. <https://doi.org/10.1177/0192623315570339>
- Costa Miranda, A., Mayer-da-Silva, A., & Brito, L. G. C. (2021). *Registo Oncológico*

Nacional de Todos os Tumores na População Residente em Portugal, em 2018 (R. O. Nacional (Ed.)). Reprografia do Instituto Português de Oncologia de Lisboa de Francisco Gentil - E. P. E.

Damous, L. L., Nakamuta, J. S., de Carvalho, A. E., Soares-Jr, J. M., de Jesus Simoes, M., Krieger, J. E., & Baracat, E. C. (2015). Adipose tissue-derived stem cell therapy in rat cryopreserved ovarian grafts. *Stem Cell Research and Therapy*, 6(57). <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0068-3>

Damous, L. L., Nakamuta, J. S., Satri de Carvalho, A. E. E. T. E., Carvalho, K. C., Soares-Jr, J. M., Simões, M. de J., Krieger, J. E., & Baracat, E. C. (2015). Does adipose tissue-derived stem cell therapy improve graft quality in freshly grafted ovaries? *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13(1), 108. <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0104-2>

Daneshpoya, F., Karimipour, M., Zirak Javanmard, M., & Pourheydar, B. (2017). Effects of n-acetylcysteine on ovarian tissue autografted into granulation tissue compared to back muscle in rats. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 47(6), 1931–1939. <https://doi.org/10.3906/sag-1704-170>

Dath, C., Van Eyck, A. S., Dolmans, M. M., Romeu, L., Delle Vigne, L., Donnez, J., & Van Langendonck, A. (2010). Xenotransplantation of human ovarian tissue to nude mice: Comparison between four grafting sites. *Human Reproduction*, 25(7), 1734–1743. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq131>

de Macêdo, L. B., Pimentel, M. M. L., Santos, F. A. dos, Bezerra, M. B., Ladd, F. V. L., & de Moura, C. E. B. (2018). Equine chorionic gonadotrophin improved vascularization of feline ovarian tissue xenografted into immunosuppressed mice. *Theriogenology*, 121, 78–81. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.08.006>

De Michele, F., Poels, J., Weerens, L., Petit, C., Evrard, Z., Ambroise, J., Gruson, D., & Wyns, C. (2017). Preserved seminiferous tubule integrity with spermatogonial survival and induction of Sertoli and Leydig cell maturation after long-term organotypic culture of prepubertal human testicular tissue. *Human Reproduction*, 32(1), 32–45. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew300>

De Rosa, L., Di Stasi, R., & D'Andrea, L. D. (2018). Pro-angiogenic peptides in

- biomedicine. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 660, 72–86. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.10.010>
- De Spiegelaere, W., Casteleyn, C., Van Den Broeck, W., Plendl, J., Bahramsoltani, M., Simoens, P., Djonov, V., & Cornillie, P. (2012). Intussusceptive angiogenesis: A biologically relevant form of angiogenesis. *Journal of Vascular Research*, 49(5), 390–404. <https://doi.org/10.1159/000338278>
- DeLisser, H. M., Christofidou-Solomidou, M., Strieter, R. M., Burdick, M. D., Robinson, C. S., Wexler, R. S., Kerr, J. S., Garlanda, C., Merwin, J. R., Madri, J. A., & Albelda, S. M. (1997). Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *American Journal of Pathology*, 151(3), 671–677.
- Demeestere, I. (2022). Fertility Preservation in Children and Adolescents. In M. Grynberg & P. Patrizio (Eds.), *Female and Male Fertility Preservation* (pp. 279–292). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-47767-7_21
- Deng, T., He, J., Yao, Q., Wu, L., Xue, L., Wu, M., Wu, D., Li, C., & Li, Y. (2021). Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Improve Ovarian Function in Chemotherapy-Induced Premature Ovarian Failure Mice Through Inhibiting Apoptosis and Inflammation via a Paracrine Mechanism. *Reproductive Sciences*, 28(6), 1718–1732. <https://doi.org/10.1007/s43032-021-00499-1>
- Desai, N., Alex, A., AbdelHafez, F., Calabro, A., Goldfarb, J., Fleischman, A., & Falcone, T. (2010). Three-dimensional in vitro follicle growth: Overview of culture models, biomaterials, design parameters and future directions. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8(1), 119. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-119>
- Detti, L., Fletcher, N. M., Saed, G. M., Sweatman, T. W., Uhlmann, R. A., Pappo, A., & Peregrin-Alvarez, I. (2018). Xenotransplantation of pre-pubertal ovarian cortex and prevention of follicle depletion with anti-Müllerian hormone (AMH). *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 35(10), 1831–1841. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1260-z>
- Di Loreto, V. E., Pera, L. I., & Rigalli, A. (2009). *Experimental Surgical Models in the Laboratory Rat* (A. Rigalli & V. Di Loreto (Eds.); 1st Editio, Issue 29).

- Direcção-Geral da Saúde. (2011). Saúde Reprodutiva Infertilidade. In *Norma nº 003/2011 de 19/01/2011* (Vol. 1, Issue 1, p. 9). <http://www.dgs.pt/upload/membro.id/ficheiros/i018596.pdf>
- Dolmans, M. M., Binda, M. M., Jacobs, S., Dehoux, J. P., Squifflet, J. L., Ambroise, J., Donnez, J., & Amorim, C. A. (2015). Impact of the cryopreservation technique and vascular bed on ovarian tissue transplantation in cynomolgus monkeys. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 32(8), 1251–1262. <https://doi.org/10.1007/s10815-015-0542-y>
- Dolmans, M. M., & Donnez, J. (2021). Fertility preservation in women for medical and social reasons: Oocytes vs ovarian tissue. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 70, 63–80. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2020.06.011>
- Dolmans, M. M., Luyckx, V., Donnez, J., Andersen, C. Y., & Greve, T. (2013). Risk of transferring malignant cells with transplanted frozen-thawed ovarian tissue. *Fertility and Sterility*, 99(6), 1514–1522. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.03.027>
- Dolmans, M. M., von Wolff, M., Poirot, C., Diaz-Garcia, C., Cacciottola, L., Boissel, N., Liebenthron, J., Pellicer, A., Donnez, J., & Andersen, C. Y. (2021). Transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a series of 285 women: a review of five leading European centers. *Fertility and Sterility*, 115(5), 1102–1115. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2021.03.008>
- Donnez, J., Cacciottola, L., & Dolmans, M.-M. (2022). Techniques for Ovarian Tissue Transplantation. In M. Grynberg & P. Patrizio (Eds.), *Female and Male Fertility Preservation* (pp. 163–174). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-47767-7_12
- Donnez, J., & Dolmans, M.-M. (2017). Fertility Preservation in Women. *New England Journal of Medicine*, 377(17), 1657–1665. <https://doi.org/10.1056/nejmra1614676>
- Donnez, J., & Dolmans, M.-M. M. (2013). Fertility preservation in women. *Nature Reviews Endocrinology*, 9(12), 735–749. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.205>

- Donnez, J., & Dolmans, M. M. (2021). Fertility preservation in men and women: Where are we in 2021? Are we rising to the challenge? *Fertility and Sterility*, *115*(5), 1089–1090. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2021.03.028>
- Donnez, J., Dolmans, M. M., Demylle, D., Jadoul, P., Pirard, C., Squifflet, J., & Langendonck, A. Van. (2005). Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Obstetrics & Gynecology*, *105*(1), 214. <https://doi.org/10.1097/01.aog.0000150288.43243.34>
- Donnez, J., Dolmans, M. M., Pellicer, A., Diaz-Garcia, C., Sanchez Serrano, M., Schmidt, K. T., Ernst, E., Luyckx, V., & Andersen, C. Y. (2013). Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: A review of 60 cases of reimplantation. *Fertility and Sterility*, *99*(6), 1503–1513. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.03.030>
- Donnez, J., Martinez-Madrid, B., Jadoul, P., Van Langendonck, A., Demylle, D., & Dolmans, M. M. (2006). Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: A review. *Human Reproduction Update*, *12*(5), 519–535. <https://doi.org/10.1093/humupd/dml032>
- Doyle, L. M., & Wang, M. Z. (2019). Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*, *8*(727), 1–24.
- Drummond, A. E., Tellbach, M., Dyson, M., & Findlay, J. K. (2007). Fibroblast growth factor-9, a local regulator of ovarian function. *Endocrinology*, *148*(8), 3711–3721. <https://doi.org/10.1210/en.2006-1668>
- Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F., & Yang, L. (2014). Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay and Drug Development Technologies*, *12*(4), 207–218. <https://doi.org/10.1089/adt.2014.573>
- Eelen, G., Treps, L., Li, X., & Carmeliet, P. (2020). Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis Updated. *Circulation Research*, 310–329. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.316851>

- El Cury-Silva, T., Nunes, M. E. G., Casalechi, M., Comim, F. V., Rodrigues, J. K., & Reis, F. M. (2021). Cryoprotectant agents for ovarian tissue vitrification: Systematic review. *Cryobiology*, *103*(July), 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.08.001>
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, *35*(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Eser, A., Hizli, D., Haltas, H., Namuslu, M., Kosus, A., Kosus, N., & Kafali, H. (2015). Effects of curcumin on ovarian ischemia-reperfusion injury in a rat model. *Biomedical Reports*, *3*(6), 807–813. <https://doi.org/10.3892/br.2015.515>
- Esfandyari, S., Elkafas, H., Chugh, R. M., Park, H. S., Navarro, A., & Al-Hendy, A. (2021). Exosomes as biomarkers for female reproductive diseases diagnosis and therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(4), 1–26. <https://doi.org/10.3390/ijms22042165>
- Fabbri, R., Pasquinelli, G., Keane, D., Mozzanega, B., Magnani, V., Tamburini, F., & Venturoli, S. (2009). Culture of cryopreserved ovarian tissue: state of the art in 2008. *Fertility and Sterility*, *91*(5), 1619–1629. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.03.109>
- Fabbri, R., Venturoli, S., D'Errico, A., Iannascoli, C., Gabusi, E., Valeri, B., Seracchioli, R., & Grigioni, W. F. (2003). Ovarian tissue banking and fertility preservation in cancer patients: Histological and immunohistochemical evaluation. *Gynecologic Oncology*, *89*(2), 259–266. [https://doi.org/10.1016/S0090-8258\(02\)00098-7](https://doi.org/10.1016/S0090-8258(02)00098-7)
- Fathi, R., Valojerdi, M. R., Ebrahimi, B., Eivazkhani, F., Akbarpour, M., Tahaei, L. S., & Abtahi, N. S. (2017). Fertility Preservation in Cancer Patients: In Vivo and In Vitro Options. *Cell Journal (Yakhteh)*, *19*(10), 173–183. <https://doi.org/10.22074/cellj.2016.4880.Introduction>
- Fauque, P., Ben Amor, A., Joanne, C., Agnani, G., Bresson, J. L., & Roux, C. (2007). Use of trypan blue staining to assess the quality of ovarian cryopreservation. *Fertility and Sterility*, *87*(5), 1200–1207. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.08.115>

- Felmeden, D. C., Blann, A. D., & Lip, G. Y. H. (2003). Angiogenesis: Basic pathophysiology and implications for disease. *European Heart Journal*, *24*(7), 586–603. [https://doi.org/10.1016/S0195-668X\(02\)00635-8](https://doi.org/10.1016/S0195-668X(02)00635-8)
- Fertility statistics*. (2022). Eurostat. https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Fertility_statistics#Total_fertility_rate_and_age_of_women_at_birth_of_first_child
- Fortune, J. E., Cushman, R. A., Wahl, C. M., & Kito, S. (2000). The primordial to primary follicle transition. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *163*(1–2), 53–60. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(99\)00240-3](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(99)00240-3)
- Fransolet, M., Labied, S., Henry, L., Masereel, M. C., Rozet, E., Kirschvink, N., Nisolle, M., & Munaut, C. (2014). Strategies for using the sheep ovarian cortex as a model in reproductive medicine. *PLoS ONE*, *9*(3), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091073>
- Fransolet, M. M., Henry, L., Labied, S., Masereel, M.-C. C., Blacher, S., Noël, A., Foidart, J.-M. M., Nisolle, M., Munaut, C., Noel, A., Foidart, J.-M. M., Nisolle, M., & Munaut, C. (2015). Influence of mouse strain on ovarian tissue recovery after engraftment with angiogenic factor. *Journal of Ovarian Research*, *8*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13048-015-0142-6>
- Friedman, O., Orvieto, R., Fisch, B., Felz, C., Freud, E., Ben-Haroush, A., & Abir, R. (2012). Possible improvements in human ovarian grafting by various host and graft treatments. *Human Reproduction*, *27*(2), 474–482. <https://doi.org/10.1093/humrep/der385>
- Fritz, M. A., & Speroff, L. (2010). *Clinical gynecologic endocrinology and infertility* (Eighth). Lippincott Williams & Wilkins.
- Gabhann, F. Mac, Qutub, A. A., Annex, B. H., & Popel, A. S. (2010). Systems biology of pro-angiogenic therapies targeting the VEGF system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.*, *2*(6), 694–707. <https://doi.org/10.1002/wsbm.92>
- Gamble, M. (2008). 9 - The Hematoxylin and Eosin. In J. D. Bancroft & M. Gamble (Eds.), *Theory and Practice of Histological Techniques (Sixth Edition)* (Sixth Edit, pp.

121–134). Churchill Livingstone. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-443-10279-0.50016-6>

- Ganta, V. C., & Annex, B. H. (2021). Peripheral vascular disease: preclinical models and emerging therapeutic targeting of the vascular endothelial growth factor ligand-receptor system. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 25(5), 381–391. <https://doi.org/10.1080/14728222.2021.1940139>
- Gao, J.-M., Yan, J., Li, R., Li, M., Yan, L. Y., Wang, T. R., Zhao, H. C., Zhao, Y., Yu, Y., & Qiao, J. (2013). Improvement in the quality of heterotopic allotransplanted mouse ovarian tissues with basic fibroblast growth factor and fibrin hydrogel. *Human Reproduction*, 28(10), 2784–2793. <https://doi.org/10.1093/humrep/det296>
- Gao, J., Huang, Y., Li, M., Zhao, H., Zhao, Y., Li, R., Yan, J., Yu, Y., & Qiao, J. (2015). Effect of local basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor on subcutaneously allotransplanted ovarian tissue in ovariectomized mice. *PLoS ONE*, 10(7), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134035>
- Gardino, S. L., & Emanuel, L. L. (2010). Choosing Life When Facing Death: Understanding Fertility Preservation Decision-Making for Cancer Patients. *Cancer Treat Res*, 156, 1–11. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6518-9>
- Gastal, G. D. A., Aguiar, F. L. N., Alves, B. G., Alves, K. A., de Tarso, S. G. S., Ishak, G. M., Cavinder, C. A., Feugang, J. M., & Gastal, E. L. (2017). Equine ovarian tissue viability after cryopreservation and in vitro culture. *Theriogenology*, 97, 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.04.029>
- Gellert, S. E., Pors, S. E., Kristensen, S. G., Bay-Bjørn, A. M., Ernst, E., & Yding Andersen, C. (2018). Transplantation of frozen-thawed ovarian tissue: an update on worldwide activity published in peer-reviewed papers and on the Danish cohort. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 35(4), 561–570. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1144-2>
- Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H. H., Schwab, U., & Stein, H. (1984). Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 133(4), 1710–1715.

- Ghezelayagh, Z., Khoshdel-Rad, N., & Ebrahimi, B. (2022). Human ovarian tissue in vitro culture: primordial follicle activation as a new strategy for female fertility preservation. *Cytotechnology*, 74(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s10616-021-00510-2>
- Gil-Arribas, E., Blockeel, C., Pennings, G., Nekkebroeck, J., Velasco, J. A. G., Serna, J., & De Vos, M. (2022). Oocyte vitrification for elective fertility preservation: a SWOT analysis. *Reproductive Biomedicine Online*. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2022.02.001>
- Gosden, R. G., Baird, D. T., Wade, J. C., & Webb, R. (1994). Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196 degrees C. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 9(4), 597–603. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a138556>
- Goshchynsky, V., Migenko, B., Lugoviy, O., & Migenko, L. (2020). Perspectives on Using Platelet-Rich Plasma and Platelet-Rich Fibrin for Managing Patients with Critical Lower Limb Ischemia After Partial Foot Amputation. *Journal of Medicine and Life*, 13(1), 45–49. <https://doi.org/10.25122/jml-2020-0028>
- Gougeon, A. (1996). Regulation of ovarian follicular development in primates: Facts and hypotheses. *Endocrine Reviews*, 17(2), 121–155. <https://doi.org/10.1210/edrv-17-2-121>
- Grynberg, M. (2022). Female and Male Fertility Preservation. In *Female and Male Fertility Preservation*. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-47767-7>
- Gurski, L., Jha, A., Zhang, C., Jia, X., & Farach-Carson, M. (2009). Hyaluronic acid-based hydrogels as 3D matrices for in vitro evaluation of chemotherapeutic drugs using poorly adherent prostate cancer cells. *Biomaterials*, 30(30), 6076–6085. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.054>
- Güven, S., Muci, E., Unsal, M. A., Yulug, E., Alver, A., Duman, M. K., & Mentese, A. (2010). The effects of carbon dioxide pneumoperitoneum on ovarian blood flow, oxidative stress markers, and morphology during laparoscopy: a rabbit model. *Fertility and Sterility*, 93(4), 1327–1332. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.10.053>

- Haas, G., Fan, S., Ghadimi, M., De Oliveira, T., & Conradi, L. C. (2021). Different Forms of Tumor Vascularization and Their Clinical Implications Focusing on Vessel Co-option in Colorectal Cancer Liver Metastases. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9(April). <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.612774>
- Hawes, D., Shi, S.-R., Dabbs, D. J., Taylor, C. R., & Cote, R. J. (2009). Immunohistochemistry. In *Modern Surgical Pathology* (pp. 48–70).
- Heise, M., Koepsel, R., Russell, A. J., & McGee, E. A. (2005). Calcium alginate microencapsulation of ovarian follicles impacts FSH delivery and follicle morphology. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-47>
- Henriques-Antunes, H., Cardoso, R. M. S., Zonari, A., Correia, J., Leal, E. C., Jiménez-Balsa, A., Lino, M. M., Barradas, A., Kostic, I., Gomes, C., Karp, J. M., Carvalho, E., & Ferreira, L. (2019). The Kinetics of Small Extracellular Vesicle Delivery Impacts Skin Tissue Regeneration. *ACS Nano*, 13(8), 8694–8707. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b00376>
- Henry, L., Labied, S., Fransolet, M., Kirschvink, N., Blacher, S., Noel, A., Foidart, J., Nisolle, M., & Munaut, C. (2015). Isoform 165 of vascular endothelial growth factor in collagen matrix improves ovine cryopreserved ovarian tissue revascularisation after xenotransplantation in mice. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 13, 12. <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0015-2>
- Henry, L., Labied, S., Jouan, C., & Nisolle, M. (2022). Preservation of female fertility: The current therapeutic strategy. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 156(1), 3–9. <https://doi.org/10.1002/ijgo.13698>
- Herraiz, S., Monzó, S., Gómez-Giménez, B., Pellicer, A., & Díaz-García, C. (2020). Optimizing ovarian tissue quality before cryopreservation: comparing outcomes of three decortication methods on stromal and follicular viability. *Fertility and Sterility*, 113(3), 609-617.e3. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.10.030>
- Herraiz, S., Novella-Maestre, E., Rodríguez, B., Díaz, C., Sánchez-Serrano, M., Mirabet, V., & Pellicer, A. (2014). Improving ovarian tissue cryopreservation for oncologic patients: Slow freezing versus vitrification, effect of different

- procedures and devices. *Fertility and Sterility*, 101(3).
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.11.016>
- Higuchi, C. M., Maeda, Y., Horiuchi, T., & Yamazaki, Y. (2015). A simplified method for three-dimensional (3-D) Ovarian tissue culture yielding oocytes competent to produce full-term offspring in mice. *PLoS ONE*, 10(11).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143114>
- Hoarau-Véchet, J., Rafii, A., Touboul, C., & Pasquier, J. (2018). Halfway between 2D and animal models: Are 3D cultures the ideal tool to study cancer-microenvironment interactions? *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1).
<https://doi.org/10.3390/ijms19010181>
- Hormozi, M., Talebi, S., Reza, H., Khorshid, K., Zarnani, H., Kamali, K., Jedditehrani, M., & Akhondi, M. M. (2015). The effect of Setarud (IMODTM) on angiogenesis in transplanted human ovarian tissue to nude mice. *Iran J Reprod Med*, 13(10), 605–614.
- Hossay, C., Donnez, J., & Dolmans, M. M. (2020). Whole ovary cryopreservation and transplantation: A systematic review of challenges and research developments in animal experiments and humans. *Journal of Clinical Medicine*, 9(10), 1–30.
<https://doi.org/10.3390/jcm9103196>
- Hovatta, O., Silye, R., Krausz, T., Abir, R., Margara, R., Trew, G., Lass, A., & Winston, R. M. L. (1996). Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol-sucrose as cryoprotectants. *Human Reproduction*, 11(6), 1268–1272.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a019370>
- Huang, B., Lu, J., Ding, C., Zou, Q., Wang, W., & Li, H. (2018). Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells improve ovary function of premature ovarian insufficiency by targeting SMAD. *Stem Cell Research and Therapy*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0953-7>
- Hunt, C. J. (2017). Cryopreservation: Vitrification and Controlled Rate Cooling. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1590). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6921-0_5

- Hussein, M. R. (2005). Apoptosis in the ovary: Molecular mechanisms. *Human Reproduction Update*, 11(2), 161–177. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmi001>
- Hussein, R. S., Zhao, Y., & Khan, Z. (2021). Does type of cancer affect ovarian response in oncofertility patients? *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction*, 50(6), 101944. <https://doi.org/10.1016/j.jogoh.2020.101944>
- Idrisova, K. F., Zeinalova, A. K., Masgutova, G. A., Bogov, A. A., Allegrucci, C., Syromiatnikova, V. Y., Salafutdinov, I. I., Garanina, E. E., Andreeva, D. I., Kadyrov, A. A., Rizvanov, A. A., & Masgutov, R. F. (2022). Application of neurotrophic and proangiogenic factors as therapy after peripheral nervous system injury. *Neural Regeneration Research*, 17(6), 1240–1247. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.327329>
- Im, K., Mareninov, S., Diaz, F. P., & Yong, W. H. (2019). An introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods Mol Biol.*, 1897, 299–301. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_26
- Imam, S. S., Al-Abbasi, F. A., Hosawi, S., Afzal, M., Nadeem, M. S., Ghoneim, M. M., Alshehri, S., Alzarea, S. I., Alquraini, A., Gupta, G., & Kazmi, I. (2022). Role of platelet rich plasma mediated repair and regeneration of cell in early stage of cardiac injury. *Regenerative Therapy*, 19, 144–153. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2022.01.006>
- Israely, T., Dafni, H., Nevo, N., Tsafiriri, A., & Neeman, M. (2004). Angiogenesis in ectopic ovarian xenotransplantation: Multiparameter characterization of the neovasculature by dynamic contrast-enhanced MRI. *Magnetic Resonance in Medicine*, 52(4), 741–750. <https://doi.org/10.1002/mrm.20203>
- Iussig, B., Maggiulli, R., Fabozzi, G., Bertelle, S., Vaiarelli, A., Cimadomo, D., Ubaldi, F. M., & Rienzi, L. (2019). A brief history of oocyte cryopreservation: Arguments and facts. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 98(5), 550–558. <https://doi.org/10.1111/aogs.13569>
- Izawa, M., Nguyen, P. H., Kim, H. H., & Yeh, J. (1998). Expression of the apoptosis-related genes, caspase-1, caspase-3, DNA fragmentation factor, and apoptotic protease activating factor-1, in human granulosa cells. *Fertility and Sterility*, 70(3),

549–552. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(98\)00194-0](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(98)00194-0)

Jackson, K. S., Inoue, K., Davis, D. A., Hilliard, T. S., & Burdette, J. E. (2009). Three-dimensional ovarian organ culture as a tool to study normal ovarian surface epithelial wound repair. *Endocrinology*, *150*(8), 3921–3926. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1674>

Javed, M. H., Azimuddin, S. M. I., Hussain, A. N., Ahmed, A., & Ishaq, M. (1997). Purification and characterization of lactate dehydrogenase from Varanus liver. *Experimental and Molecular Medicine*, *29*(1), 25–30. <https://doi.org/10.1038/emm.1997.4>

Jensen, C., & Teng, Y. (2020). Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Front Mol Biosci*, *7*(March), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00033>

Johnson, L. N. C., Dillon, K. E., Sammel, M. D., Efymow, B. L., Mainigi, M. A., Dokras, A., & Gracia, C. R. (2013). Response to ovarian stimulation in patients facing gonadotoxic therapy. *Reproductive BioMedicine Online*, *26*(4), 337–344. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.01.003>

Junqueira, L., & Carneiro, J. (2004). *Histologia Básica* (10th ed.). Guanabara Koogan S.A., ed., Rio de Janeiro.

Kalocsai, P., & Shams, S. (1999). Visualization and Analysis of Gene Expression Data. *JALA - Journal of the Association for Laboratory Automation*, *4*(5). <https://doi.org/10.1016/s1535-5535-04-00033-4>

Kang, B. J., Wang, Y., Zhang, L., Xiao, Z., & Li, S. W. (2016). bFGF and VEGF improve the quality of vitrified-thawed human ovarian tissues after xenotransplantation to SCID mice. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *33*(2), 281–289. <https://doi.org/10.1007/s10815-015-0628-6>

Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., Ibbs, M., Bliźniak, R., Łuczewski, Ł., & Lamperska, K. (2018). 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science*, *14*(4), 910–919. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.63743>

- Kawamura, K., Cheng, Y., Suzuki, N., Deguchi, M., Sato, Y., Takae, S., Ho, C. H., Kawamura, N., Tamura, M., Hashimoto, S., Sugishita, Y., Morimoto, Y., Hosoi, Y., Yoshioka, N., Ishizuka, B., & Hsueh, A. J. (2013). Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(43), 17474–17479. <https://doi.org/10.1073/pnas.1312830110>
- Keshaw, H., Forbes, A., & Day, R. M. (2005). Release of angiogenic growth factors from cells encapsulated in alginate beads with bioactive glass. *Biomaterials*, *26*(19), 4171–4179. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.10.021>
- Khajuria, D. K., Razdan, R., & Mahapatra, D. R. (2012). Descrição de um novo método de ooforectomia em ratas. *Rev Bras Reumatol*, *52*(3), 462–470. <http://www.scielo.br/pdf/rbr/v52n3/v52n3a16.pdf>
- Khattak, S. F., Spatara, M., Roberts, L., & Roberts, S. C. (2006). Application of colorimetric assays to assess viability, growth and metabolism of hydrogel-encapsulated cells. *Biotechnology Letters*, *28*(17), 1361–1370. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9104-9>
- Kim, J. M., Kim, S., & Lee, S. (2021). Role of stem cells in the ovarian tissue cryopreservation and transplantation for fertility preservation. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(22). <https://doi.org/10.3390/ijms222212482>
- Kimáková, P., Solár, P., Solárová, Z., Komel, R., & Debeljak, N. (2017). Erythropoietin and its angiogenic activity. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(7), 19–22. <https://doi.org/10.3390/ijms18071519>
- King, S. M., Quartuccio, S., Hilliard, T. S., Inoue, K., & Burdette, J. E. (2011). Alginate hydrogels for three-dimensional organ culture of ovaries and oviducts. *Journal of Visualized Experiments*, *52*(52), 1–5. <https://doi.org/10.3791/2804>
- Kinnear, H. M., Tomaszewski, C. E., Chang, F. L., Moravek, M. B., Xu, M., Padmanabhan, V., & Shikanov, A. (2020). The ovarian stroma as a new frontier. *Reproduction*, *160*(3), R25–R39. <https://doi.org/10.1530/REP-19-0501>
- Klocke, S., Bündgen, N., Köster, F., Eichenlaub-Ritter, U., & Griesinger, G. (2015).

- Slow-freezing versus vitrification for human ovarian tissue cryopreservation. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 291(2), 419–426. <https://doi.org/10.1007/s00404-014-3390-6>
- Kolusari, A., Okyay, A. G., & Koçkaya, E. A. (2018). The Effect of Erythropoietin in Preventing Ischemia–Reperfusion Injury in Ovarian Tissue Transplantation. *Reproductive Sciences*, 25(3), 406–413. <https://doi.org/10.1177/1933719117715127>
- Kometas, M., Christman, G. M., Kramer, J., & Rhoton-Vlasak, A. (2021). Methods of Ovarian Tissue Cryopreservation: Is Vitrification Superior to Slow Freezing?—Ovarian Tissue Freezing Methods. *Reproductive Sciences*, 28(12), 3291–3302. <https://doi.org/10.1007/s43032-021-00591-6>
- Kong, H. S., Lee, J., Youm, H. W., Kim, S. K., Lee, J. R., Suh, C. S., & Kim, S. H. (2017). Effect of treatment with angiopoietin-2 and vascular endothelial growth factor on the quality of xenografted bovine ovarian tissue in mice. *PLoS ONE*, 12(9), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184546>
- Kopec, M., & Abramczyk, H. (2022). The role of pro- and antiangiogenic factors in angiogenesis process by Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 268, 120667. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.120667>
- Korzeniewski, C., & Callewaert, D. M. (1983). An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods*, 64(3), 313–320. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90438-6](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90438-6)
- Krajewska, M., Wang, H. G., Krajewski, S., Zapata, J. M., Shabaik, A., Gascoyne, R., & Reed, J. C. (1997). Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of CPP32 (Caspase-3), a cell death protease. *Cancer Research*, 57(8), 1605–1613.
- Kumar, R., & Yarmand-Bagheri, R. (2001). The role of HER2 in angiogenesis. *Seminars in Oncology*, 28, 27–32. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0093-7754\(01\)90279-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0093-7754(01)90279-9)

- Labied, S., Delforge, Y., Munaut, C., Blacher, S., Colige, A., Delcombel, R., Henry, L., Fransolet, M., Jouan, C., D'Hauterive, S. P., Noël, A., Nisolle, M., & Foidart, J. M. (2013). Isoform 111 of vascular endothelial growth factor (VEGF111) improves angiogenesis of ovarian tissue xenotransplantation. *Transplantation*, *95*(3), 426–433. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e318279965c>
- Labrune, E., Jaeger, P., Santamaria, C., Fournier, C., Benchaib, M., Rabilloud, M., Salle, B., & Lornage, J. (2020). Cellular and Molecular Impact of Vitrification Versus Slow Freezing on Ovarian Tissue. *Tissue Engineering - Part C: Methods*, *26*(5), 276–285. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2020.0063>
- Langbeen, A., Ginneken, C. Van, Fransen, E., Bosmans, E., Leroy, J. L. M. R., & Bols, P. E. J. (2016). Morphometrical analysis of preantral follicular survival of VEGF-treated bovine ovarian cortex tissue following xenotransplantation in an immune deficient mouse model. *Animal Reproduction Science*, *168*(2016), 73–85. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.02.029>
- Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, *37*(1), 106–126. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>
- Lee, S., Cho, H. W., Kim, B., Lee, J. K., & Kim, T. (2021). The effectiveness of anti-apoptotic agents to preserve primordial follicles and prevent tissue damage during ovarian tissue cryopreservation and xenotransplantation. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(5), 1–11. <https://doi.org/10.3390/ijms22052534>
- Lee, S., Ozkavukcu, S., & Ku, S. Y. (2021). Current and Future Perspectives for Improving Ovarian Tissue Cryopreservation and Transplantation Outcomes for Cancer Patients. *Reproductive Sciences*, *28*(6), 1746–1758. <https://doi.org/10.1007/s43032-021-00517-2>
- Lee, S., Ryu, K. J., Kim, B., Kang, D., Kim, Y. Y., & Kim, T. (2019). Comparison between slow freezing and vitrification for human ovarian tissue cryopreservation and xenotransplantation. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(13). <https://doi.org/10.3390/ijms20133346>
- Lee, S. Y., Ju, M. K., Jeon, H. M., Jeong, E. K., Lee, Y. J., Kim, C. H., Park, H. G.,

- Han, S. I., & Kang, H. S. (2018). Regulation of Tumor Progression by Programmed Necrosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/3537471>
- Li, S. H., Hwu, Y. M., Lu, C. H., Chang, H. H., Hsieh, C. E., & Lee, R. K. K. (2016). VEGF and FGF2 improve revascularization, survival, and oocyte quality of cryopreserved, subcutaneously-transplanted mouse ovarian tissues. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(8), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms17081237>
- Li, Z., Zhang, M., Zheng, J., Tian, Y., Zhang, H., Tan, Y., Li, Q., Zhang, J., & Huang, X. (2021). Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Improve Ovarian Function and Proliferation of Premature Ovarian Insufficiency by Regulating the Hippo Signaling Pathway. *Frontiers in Endocrinology*, 12(August), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.711902>
- Liao, Z., Liu, C., Wang, L., Sui, C., & Zhang, H. (2021). Therapeutic Role of Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles in Female Reproductive Diseases. *Frontiers in Endocrinology*, 12(June), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.665645>
- Liebenthron, J., Köster, M., Drengner, C., Reinsberg, J., Van Der Ven, H., & Montag, M. (2013). The impact of culture conditions on early follicle recruitment and growth from human ovarian cortex biopsies in vitro. *Fertility and Sterility*, 100(2). <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.03.046>
- Liu, C., Yin, H., Jiang, H., Du, X., Wang, C., Liu, Y., Li, Y., & Yang, Z. (2020). Extracellular Vesicles Derived from Mesenchymal Stem Cells Recover Fertility of Premature Ovarian Insufficiency Mice and the Effects on their Offspring. *Cell Transplantation*, 29, 1–11. <https://doi.org/10.1177/0963689720923575>
- Lofgren, J. L. S., Foley, P. L., & Golledge, H. D. R. (2020). Chapter 17 - Anesthesia, Analgesia, and Euthanasia. In M. A. Suckow, F. C. Hankenson, R. P. Wilson, & P. L. Foley (Eds.), *The Laboratory Rat (Third Edition)* (Third Edit, pp. 699–745). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814338-4.00017-9](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814338-4.00017-9)
- Logsdon, E. A., Finley, S. D., Popel, A. S., & MacGabhann, F. (2014). A systems

- biology view of blood vessel growth and remodelling. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 18(8), 1491–1508. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12164>
- Luyckx, V., Scalercio, S., Jadoul, P., Amorim, C. A., Soares, M., Donnez, J., & Dolmans, M. M. (2013). Evaluation of cryopreserved ovarian tissue from prepubertal patients after long-term xenografting and exogenous stimulation. *Fertility and Sterility*, 100(5). <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.07.202>
- Machtlinger, R., Baccarelli, A. A., & Wu, H. (2021). Extracellular vesicles and female reproduction. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 38(3), 549–557. <https://doi.org/10.1007/s10815-020-02048-2>
- Maeda, K., Ohkura, S., & Tsukamura, H. (2000). Chapter 9 - Physiology of Reproduction. In G. J. Krinke (Ed.), *The Laboratory Rat* (pp. 145–176). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012426400-7.50048-0>
- Magen, R., Shufaro, Y., Daykan, Y., Oron, G., Tararashkina, E., Levenberg, S., Anuka, E., Ben-Haroush, A., Fisch, B., & Abir, R. (2021). Use of Simvastatin, Fibrin Clots, and Their Combination to Improve Human Ovarian Tissue Grafting for Fertility Restoration After Anti-Cancer Therapy. *Frontiers in Oncology*, 10(January), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.598026>
- Mahmoodi, M., Mehranjani, M. S., Shariatzade, S. M. A., Eimani, H., Shahverdi, A., Shariatzadeh, S. M. A., Eimani, H., & Shahverdi, A. (2014). Effects of erythropoietin on ischemia, follicular survival, and ovarian function in ovarian grafts. *Reproduction*, 147(5), 733–741. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0379>
- Man, L., Park, L., Bodine, R., Ginsberg, M., Zaninovic, N., Man, O. A., Schattman, G., Rosenwaks, Z., & James, D. (2017). Engineered endothelium provides angiogenic and paracrine stimulus to grafted human ovarian tissue. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08491-z>
- Man, L., Park, L., Bodine, R., Ginsberg, M., Zaninovic, N., Schattman, G., Schwartz, R. E., Rosenwaks, Z., & James, D. (2018). Co-transplantation of human ovarian tissue with engineered endothelial cells: A cell-based strategy combining accelerated perfusion with direct paracrine delivery. *Journal of Visualized Experiments*, 2018(135), 1–10. <https://doi.org/10.3791/57472>

- Manavella, D. D., Cacciottola, L., Desmet, C. M., Jordan, B. F., Donnez, J., Amorim, C. A., & Dolmans, M. M. (2018). Adipose tissue-derived stem cells in a fibrin implant enhance neovascularization in a peritoneal grafting site: A potential way to improve ovarian tissue transplantation. *Human Reproduction*, *33*(2), 270–279. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex374>
- Manavella, D. D., Cacciottola, L., Payen, V. L., Amorim, C. A., Donnez, J., & Dolmans, M. M. (2019). Adipose tissue-derived stem cells boost vascularization in grafted ovarian tissue by growth factor secretion and differentiation into endothelial cell lineages. *Molecular Human Reproduction*, *25*(4), 184–193. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaz008>
- Manavella, D. D., Cacciottola, L., Pommé, S., Desmet, C. M., Jordan, B. F., Donnez, J., Amorim, C. A., & Dolmans, M. M. (2018). Two-step transplantation with adipose tissue-derived stem cells increases follicle survival by enhancing vascularization in xenografted frozen-thawed human ovarian tissue. *Human Reproduction*, *33*(6), 1107–1116. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey080>
- Martin, L. J. (2021). Delaying, debating and declining motherhood. *Culture, Health and Sexuality*, *23*(8), 1034–1049. <https://doi.org/10.1080/13691058.2020.1755452>
- Milenkovic, M., Diaz-Garcia, C., Wallin, A., & Brännström, M. (2012). Viability and function of the cryopreserved whole rat ovary: Comparison between slow-freezing and vitrification. *Fertility and Sterility*, *97*(5), 1176–1182. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.01.123>
- Monniaux, D., Cadoret, V., Clément, F., Dalbies-Tran, R., Elis, S., Fabre, S., Maillard, V., Monget, P., & Uzbekova, S. (2018). Folliculogenesis. In *Encyclopedia of Endocrine Diseases* (pp. 377–398). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64550-6>
- Moomjy, M., & Rosenwaks, Z. (1998). Ovarian tissue cryopreservation: The time is now. Transplantation or in vitro maturation: The time awaits. *Fertility and Sterility*, *69*(6), 999–1000. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(98\)00091-0](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(98)00091-0)
- Morewood, T., Getreu, N., Fuller, B., Morris, J., & Hardiman, P. (2017). The effect

- of thawing protocols on follicle conservation in human ovarian tissue cryopreservation. *Cryo-Letters*, 38(2), 137–144.
- Nakamura, Y., Obata, R., Okuyama, N., Aono, N., Hashimoto, T., & Kyono, K. (2017). Residual ethylene glycol and dimethyl sulphoxide concentration in human ovarian tissue during warming/thawing steps following cryopreservation. *Reproductive BioMedicine Online*, 35(3), 311–313. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2017.05.016>
- Nakano, M. S., Simoes, R. S., Baracat, M. C. P., Lobel, A., & ... (2020). Live birth rate after ovarian tissue cryopreservation followed by autotransplantation in cancer patients: a systematic review. *Gynecological and Reproductive. Gynecological and Reproductive Endocrinology and Metabolism*, 1(2), 89–94. https://gremjournal.com/wp-content/uploads/2020/06/04_Soares.pdf
- National Cancer Institute. (2022). *Cancer Stat Facts: Cancer Among Adolescents and Young Adults (AYAs) (Ages 15–39)*. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/aya.html>
- Nazaré, P. F., Fernandes Pais, A. S., & Figueiredo-Dias, M. (2021). Postponing Motherhood: A Demographic and Contemporary Issue. *Current Women s Health Reviews*, 18(1), 1–9. <https://doi.org/10.2174/1573404817666210208203220>
- Newton, H., Aubard, Y., Rutherford, A., Sharma, V., & Gosden, R. (1996). Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 11(7), 1487–1491. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(99\)00248-8](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(99)00248-8)
- Nottola, S. A., Camboni, A., Van Langendonck, A., Demylle, D., Macchiarelli, G., Dolmans, M. M., Martinez-Madrid, B., Correr, S., & Donnez, J. (2008). Cryopreservation and xenotransplantation of human ovarian tissue: an ultrastructural study. *Fertility and Sterility*, 90(1), 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.05.069>
- Nowak-Sliwinska, P., Alitalo, K., Allen, E., Anisimov, A., Aplin, A. C., Auerbach, R., Augustin, H. G., Bates, D. O., van Beijnum, J. R., Bender, R. H. F., Bergers, G., Bikfalvi, A., Bischoff, J., Böck, B. C., Brooks, P. C., Bussolino, F., Cakir, B., Carmeliet, P., Castranova, D., ... Griffioen, A. W. (2018). Consensus guidelines

- for the use and interpretation of angiogenesis assays. In *Angiogenesis* (Vol. 21, Issue 3). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s10456-018-9613-x>
- Nugent, D., Newton, H., Gallivan, L., & Gosden, R. G. (1998). Protective effect of vitamin E on ischaemia-reperfusion injury in ovarian grafts. *Journal of Reproduction and Fertility*, *114*(2), 341–346. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1140341>
- Oktaç, K. (2006). Spontaneous conceptions and live birth after heterotopic ovarian transplantation: Is there a germline stem cell connection? *Human Reproduction*, *21*(6), 1345–1348. <https://doi.org/10.1093/humrep/del007>
- Olesen, H. Ø., Pors, S. E., Jensen, L. B., Grønning, A. P., Lemser, C. E., Nguyen Heimbürger, M. T. H., Mamsen, L. S., Getreu, N., Christensen, S. T., Andersen, C. Y., & Kristensen, S. G. (2021). N-acetylcysteine protects ovarian follicles from ischemia-reperfusion injury in xenotransplanted human ovarian tissue. *Human Reproduction*, *36*(2), 429–443. <https://doi.org/10.1093/humrep/deaa291>
- Orive, G., Ponce, S., Hernández, R. M., Gascón, A. R., Igartua, M., & Pedraz, J. L. (2002). Biocompatibility of microcapsules for cell immobilization elaborated with different type of alginates. *Biomaterials*, *23*(18), 3825–3831. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00118-7](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00118-7)
- Otala, M., Erkkilä, K., Tuuri, T., Sjöberg, J., Suomalainen, L., Suikkari, A. M., Pentikäinen, V., & Dunkel, L. (2002). Cell death and its suppression in human ovarian tissue culture. *Molecular Human Reproduction*, *8*(3), 228–236. <https://doi.org/10.1093/molehr/8.3.228>
- Pache, J. C. (2006). Epidermal Growth Factors. *Encyclopedia of Respiratory Medicine, Four-Volume Set*, *2*, 129–133. <https://doi.org/10.1016/B0-12-370879-6/00138-1>
- Page, D. J., Thuret, R., Venkatraman, L., Takahashi, T., Bentley, K., & Herbert, S. P. (2019). Positive Feedback Defines the Timing, Magnitude, and Robustness of Angiogenesis. *Cell Reports*, *27*(11), 3139–3151.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.05.052>
- Pangas, S. A., Saudye, H., Shea, L. D., & Woodruff, T. K. (2003). Novel Approach for the Three-Dimensional Culture of Granulosa Cell-Oocyte Complexes. *Tissue*

Engineering, 9(5).

- Papetti, M., & Herman, I. M. (2002). Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 282(5 51-5). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00389.2001>
- Park, C. J., Oh, J. E., Feng, J., Cho, Y. M., Qiao, H., & Ko, C. M. (2022). Lifetime changes of the oocyte pool: Contributing factors with a focus on ovulatory inflammation. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, 49(1), 16–25. <https://doi.org/10.5653/cerm.2021.04917>
- Pegg, D. E. (2007). Principles of cryopreservation. In J. G. Day & G. N. Stacey (Eds.), *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols (Methods in Molecular Biology, 368)* (2nd ed., Vol. 368, pp. 39–57). Humana Press. <https://doi.org/10.3109/9780203092873.002>
- Peyvandi, F., Garagiola, I., & Baronciani, L. (2011). Role of von Willebrand factor in the haemostasis. *Blood Transfusion*, 9(SUPPL. 2), 3–8. <https://doi.org/10.2450/2011.002S>
- PORDATA. (n.d.). *Idade média da mãe ao nascimento do primeiro filho*. Retrieved March 27, 2022, from <https://www.pordata.pt/Portugal/Idade+média+da+mãe+ao+nascimento+do+primeiro+filho-805>
- Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. (2019). Fertility preservation in patients undergoing gonadotoxic therapy or gonadectomy: a committee opinion. *Fertility and Sterility*, 112(6), 1022–1033. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.09.013>
- Price, C. A. (2016). Mechanisms of fibroblast growth factor signaling in the ovarian follicle. *Journal of Endocrinology*, 228(2), R31–R43. <https://doi.org/10.1530/JOE-15-0414>
- Rahimi, N., & Kazlauskas, A. (1999). A role for cadherin-5 in regulation of vascular endothelial growth factor receptor 2 activity in endothelial cells. *Molecular Biology of the Cell*, 10(10), 3401–3407. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.10.3401>

- Ramos, L., Galbinski, S., Nacul, A., Jiménez, M. F., Frantz, N., & Bos-Mikich, A. (2021). Detailed Morphological Analysis of Cryoinjury in Human Ovarian Tissue Following Vitrification or Slow Freezing. *Reproductive Sciences*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s43032-021-00716-x>
- Reese-Petersen, A. L., Genovese, F., & Karsdal, M. A. (2019). The signals of the extracellular matrix. In *Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin: Structure, Function and Biomarkers* (Second Edi). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817068-7.00033-1>
- Ribeiro, M. F., Zhu, H., Millard, R. W., & Fan, G. C. (2013). Exosomes function in pro- and anti-angiogenesis. *Current Angiogenesis*, 2(1), 54–59. <https://doi.org/10.2174/22115528113020020001>
- Rivas Leonel, E. C., Lucci, C. M., & Amorim, C. A. (2019). Cryopreservation of Human Ovarian Tissue: A Review. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 46(3), 173–181. <https://doi.org/10.1159/000499054>
- Rizov, M., Andreeva, P., & Dimova, I. (2017). Molecular regulation and role of angiogenesis in reproduction. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 56(2), 127–132. <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2016.06.019>
- Robinson, R. S., Woad, K. J., Hammond, A. J., Laird, M., Hunter, M. G., & Mann, G. E. (2009). Angiogenesis and vascular function in the ovary. *Reproduction*, 138(6), 869–881. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0283>
- Ronn, R., & Holzer, H. E. G. (2013). Oncofertility in Canada: An overview of Canadian practice and suggested action plan. *Current Oncology*, 20(5), 465–474. <https://doi.org/10.3747/co.20.1361>
- RORENO. (2016). *Registo Oncológico Nacional 2010* (Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil – EPE (Ed.)).
- Rosendahl, M., Schmidt, K. T., Ernst, E., Rasmussen, P. E., Loft, A., Byskov, A. G., Andersen, A. N., & Andersen, C. Y. (2011). Cryopreservation of ovarian tissue for a decade in Denmark: A view of the technique. *Reproductive BioMedicine Online*, 22(2), 162–171. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2010.10.015>

- Rust, R., Gantner, C., & Schwab, M. E. (2019). Pro-and antiangiogenic therapies: Current status and clinical implications. *FASEB Journal*, *33*(1), 34–48. <https://doi.org/10.1096/fj.201800640RR>
- Sanfilippo, S., Canis, M., Romero, S., Sion, B., Déchelotte, P., Pouly, J. L., Janny, L., Smitz, J., & Brugnon, F. (2013). Quality and functionality of human ovarian tissue after cryopreservation using an original slow freezing procedure. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *30*(1), 25–34. <https://doi.org/10.1007/s10815-012-9917-5>
- Sanfins, A., Rodrigues, P., & Albertini, D. F. (2018). *GDF-9 and BMP-15 direct the follicle symphony The oocyte-a key player in ovarian function.* 20–29. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1268-4>
- Sang, Q. X. (1998). Complex role of matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Cell Research*, *8*(3), 171–177. <https://doi.org/10.1038/cr.1998.17>
- Scalercio, S. R., Amorim, C. A., Brito, D. C., Percário, S., Oskam, I. C., Domingues, S. F. S. S., & Santos, R. R. (2015). Trolox enhances follicular survival after ovarian tissue autograft in squirrel monkey (*Saimiri collinsi*). *Reprod Fertil Dev*, *28*(11), 1854–1864. <https://doi.org/10.1071/RD14454>
- Schluter, C., Duchrow, M., Wohlenberg, C., Becker, M. H. G., Key, G., Flad -, H. D., & Gerdes, J. (1993). The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: A very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *Journal of Cell Biology*, *123*(3), 513–522. <https://doi.org/10.1083/jcb.123.3.513>
- Scott, J. E., Carlsson, I. B., Bavister, B. D., & Hovatta, O. (2004). Human ovarian tissue cultures: Extracellular matrix composition, coating density and tissue dimensions. *Reproductive BioMedicine Online*, *9*(3), 287–293. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)62143-8](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)62143-8)
- Secord, A. A., & Siamakpour-Reihani, S. (2017). Angiogenesis. In *Translational Advances in Gynecologic Cancers*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803741-6.00005-7>

- Sengupta, P. (2013). The laboratory rat: Relating its age with human's. *International Journal of Preventive Medicine*, 4(6), 624–630.
- Shi, Q., Xie, Y., Wang, Y., & Li, S. (2017). Vitrification versus slow freezing for human ovarian tissue cryopreservation: A systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09005-7>
- Shibutani, M. (2000). Chapter 26 - Anesthesia, Artificial Ventilation and Perfusion Fixation. In G. J. Krinke (Ed.), *The Laboratory Rat* (pp. 511–521). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012426400-7.50065-0>
- Shikanov, A., Zhang, Z., Xu, M., Smith, R. M., Rajan, A., Woodruff, T. K., & Shea, L. D. (2011). Fibrin encapsulation and vascular endothelial growth factor delivery promotes ovarian graft survival in mice. *Tissue Engineering - Part A*, 17(23–24), 3095–3104. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2011.0204>
- Shojafar, E., Soleimani Mehranjani, M., & Shariatzadeh, S. M. A. (2018). Adipose-derived mesenchymal stromal cell transplantation at the graft site improves the structure and function of autografted mice ovaries: a stereological and biochemical analysis. *Cytotherapy*, 20(11), 1324–1336. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2018.09.006>
- Siebzehnrübl, E., Kohl, J., Dittrich, R., & Wildt, L. (2000). Freezing of human ovarian tissue - Not the oocytes but the granulosa is the problem. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 169(1–2), 109–111. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(00\)00362-2](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(00)00362-2)
- Silber, S. J. (2012). Ovary cryopreservation and transplantation for fertility preservation. *Molecular Human Reproduction*, 18(2), 59–67. <https://doi.org/10.1093/molehr/gar082>
- Silva, C., & Almeida-Santos, T. (2015). *Preservação da fertilidade em doentes oncológicos*. (SPMR (Ed.); 1ª edição).
- Smitz, J., Dolmans, M. M., Donnez, J., Fortune, J. E., Hovatta, O., Jewgenow, K., Picton, H. M., Plancha, C., Shea, L. D., Stouffer, R. L., Telfer, E. E., Woodruff, T. K., & Zelinski, M. B. (2010). Current achievements and future research

- directions in ovarian tissue culture, in vitro follicle development and transplantation: implications for fertility preservation. *Human Reproduction Update*, 16(4), 395–414. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmp056>
- Soleimani, R., Heytens, E., & Oktay, K. (2011). Enhancement of neoangiogenesis and follicle survival by sphingosine-1-phosphate in human ovarian tissue xenotransplants. *PLoS ONE*, 6(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019475>
- Souza, S. S., Aguiar, F. L. N., Alves, B. G., Alves, K. A., Brandão, F. A. S., Brito, D. C. C., Raposo, R. da S., Gastal, M. O., Rodrigues, A. P. R., Figueiredo, J. R., Teixeira, D. Í. A., & Gastal, E. L. (2021). Equine ovarian tissue xenografting: impacts of cooling, vitrification, and VEGF. *Reproduction and Fertility*, 2(4), 251–266. <https://doi.org/10.1530/raf-21-0008>
- Suckow, M., Weisbroth, S., & Franklin, C. (2005). The laboratory rat. In *2nd edition*.
- Sugishita, Y., Taylan, E., Kawahara, T., Shahmurzada, B., Suzuki, N., & Oktay, K. (2021). Comparison of open and a novel closed vitrification system with slow freezing for human ovarian tissue cryopreservation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 38(10), 2723–2733. <https://doi.org/10.1007/s10815-021-02297-9>
- Sun, L., Li, D., Song, K., Wei, J., Yao, S., Li, Z., Su, X., Ju, X., Chao, L., Deng, X., Kong, B., & Li, L. (2017). Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against cisplatin-induced ovarian granulosa cell stress and apoptosis in vitro. *Scientific Reports*, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02786-x>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Suzuki, N., Yoshioka, N., Takae, S., Sugishita, Y., Tamura, M., Hashimoto, S., Morimoto, Y., & Kawamura, K. (2015). Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency. *Human Reproduction*, 30(3), 608–615. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu353>

- Tahergorabi, Z., & Khazaei, M. (2012). A review on angiogenesis and its assays. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, *15*(6), 1110–1126. <https://doi.org/10.3791/51766>
- Takae, S., & Suzuki, N. (2019). Current state and future possibilities of ovarian tissue transplantation. *Reproductive Medicine and Biology*, *18*(3), 217–224. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12268>
- Tammiste, T., Kask, K., Padrik, P., Idla, K., Rosenstein, K., Jatsenko, T., Veerus, P., & Salumets, A. (2019). A case report and follow-up of the first live birth after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue in Eastern Europe. *BMC Women's Health*, *19*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12905-019-0764-8>
- Tanaka, A., Nakamura, H., Tabata, Y., Fujimori, Y., Kumasawa, K., & Kimura, T. (2018). Effect of sustained release of basic fibroblast growth factor using biodegradable gelatin hydrogels on frozen-thawed human ovarian tissue in a xenograft model. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, *44*(10), 1947–1955. <https://doi.org/10.1111/jog.13726>
- Tavana, S., Valojerdi, M. R., Azarnia, M., & Shahverdi, A. (2016). Restoration of ovarian tissue function and estrous cycle in rat after autotransplantation using hyaluronic acid hydrogel scaffold containing VEGF and bFGF. *Growth Factors*, *34*(3–4), 97–106. <https://doi.org/10.1080/08977194.2016.1194835>
- Terren, C., Fransolet, M., Ancion, M., Nisolle, M., & Munaut, C. (2019). Slow Freezing Versus Vitrification of Mouse Ovaries: from Ex Vivo Analyses to Successful Pregnancies after Auto-Transplantation. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56182-8>
- Terren, C., & Munaut, C. (2021). Molecular Basis Associated with the Control of Primordial Follicle Activation During Transplantation of Cryopreserved Ovarian Tissue. *Reproductive Sciences*, *28*(5), 1257–1266. <https://doi.org/10.1007/s43032-020-00318-z>
- Terren, C., Nisolle, M., & Munaut, C. (2021). Pharmacological inhibition of the PI3K/PTEN/Akt and mTOR signalling pathways limits follicle activation induced by ovarian cryopreservation and in vitro culture. *Journal of Ovarian Research*, *14*(1),

1–15. <https://doi.org/10.1186/s13048-021-00846-5>

Thabet, E., Yusuf, A., Abdelmonsif, D. A., Nabil, I., Mourad, G., & Mehanna, R. A. (2020). Extracellular vesicles miRNA-21: a potential therapeutic tool in premature ovarian dysfunction. *Molecular Human Reproduction*, *26*(12), 906–919. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaaa068>

The American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Gynecologic Practice. (2002). ACOG CO 589 - Female Age-Related Fertility Decline. *Obstetrics & Gynecology*, *99*(4), 679–680.

The Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and the Society for Assisted Reproductive Technology. (2013). Mature oocyte cryopreservation: A guideline. *Fertility and Sterility*, *99*(1), 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.09.028>

Todorova, D., Simoncini, S., Lacroix, R., Sabatier, F., & Dignat-George, F. (2017). Extracellular vesicles in angiogenesis. *Circulation Research*, *120*(10), 1658–1673. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.309681>

Tryde Schmidt, K. L., Andersen, C. Y., Starup, J., Loft, A., Byskov, A. G., & Andersen, A. N. (2004). Orthotopic autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue to a woman cured of cancer - Follicular growth, steroid production and oocyte retrieval. *Reproductive BioMedicine Online*, *8*(4), 448–453. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60929-7](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60929-7)

Tuncer, S., Atilgan, R., Pala, Ş., Kuloğlu, T., Artaş, G., & Aydın, S. (2018). N-Acetylcysteine and Benfotiamine Protect Autotransplanted Ovarian Tissue From Ischemia-Reperfusion Injury: An Experimental Study. *Experimental and Clinical Transplantation: Official Journal of the Middle East Society for Organ Transplantation*, 1–8. <https://doi.org/10.6002/ect.2017.0320>

Van Eyck, A. S., Bouzin, C., Feron, O., Romeu, L., Van Langendonck, A., Donnez, J., & Dolmans, M. M. (2010). Both host and graft vessels contribute to revascularization of xenografted human ovarian tissue in a murine model. *Fertility and Sterility*, *93*(5), 1676–1685. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.04.048>

- Ventana. (2011). *OptiView DAB IHC Detection Kit* (pp. 1–40). Ventana.
- Volodarsky-Perel, A., Cohen, Y., Arab, S., Son, W. Y., Suarthana, E., Dahan, M. H., Tulandi, T., & Buckett, W. (2019). Effects of cancer stage and grade on fertility preservation outcome and ovarian stimulation response. *Human Reproduction*, *34*(3), 530–538. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey382>
- Wagner, M., Yoshihara, M., Douagi, I., Damdimopoulos, A., Panula, S., Petropoulos, S., Lu, H., Pettersson, K., Palm, K., Katayama, S., Hovatta, O., Kere, J., Lanner, F., & Damdimopoulou, P. (2020). Single-cell analysis of human ovarian cortex identifies distinct cell populations but no oogonial stem cells. *Nature Communications*, *11*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14936-3>
- Waimey, K. E., Duncan, F. E., Su, H. I., Smith, K., Wallach, H., Jona, K., Coutifaris, C., Gracia, C. R., Shea, L. D., Brannigan, R. E., Chang, R. J., Zelinski, M. B., Stouffer, R. L., Taylor, R. L., & Woodruff, T. K. (2013). Future Directions in Oncofertility and Fertility Preservation: A Report from the 2011 Oncofertility Consortium Conference. *Journal of Adolescent and Young Adult Oncology*, *2*(1), 25–30. <https://doi.org/10.1089/jayao.2012.0035>
- Walker, C. A., Bjarkadottir, B. D., Fatum, M., Lane, S., & Williams, S. A. (2019). Variation in follicle health and development in cultured cryopreserved ovarian cortical tissue: a study of ovarian tissue from patients undergoing fertility preservation. *Human Fertility*, *0*(0), 1–11. <https://doi.org/10.1080/14647273.2019.1616118>
- Wallace, W. H. B., & Kelsey, T. W. (2010). Human ovarian reserve from conception to the menopause. *PLoS ONE*, *5*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008772>
- Wang, L., Ma, R., Liu, C., Liu, H., Zhu, R., Guo, S., Tang, M., Li, Y., Niu, J., Fu, M., Gao, S., & Zhang, D. (2016). *Salvia miltiorrhiza*: A Potential Red Light to the Development of Cardiovascular Diseases. *Current Pharmaceutical Design*, *23*(7), 1077–1097. <https://doi.org/10.2174/1381612822666161010105242>
- Wang, L., Ying, Y. F., Ouyang, Y. L., Wang, J. F., & Xu, J. (2013). VEGF and bFGF increase survival of xenografted human ovarian tissue in an experimental rabbit

- model. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 30(10), 1301–1311. <https://doi.org/10.1007/s10815-013-0043-9>
- Wang, Y. Y., Chang, Q., Sun, J., Dang, L., Ma, W., Hei, C., Shen, X., Zhao, C., Cai, Y., Pei, X., Zhang, X., Wang, Y. Y., & Jiang, X. (2012). Effects of HMG on revascularization and follicular survival in heterotopic autotransplants of mouse ovarian tissue. *Reproductive BioMedicine Online*, 24(6), 646–653. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.02.025>
- Wang, Y., Yuan, Y., Meng, D., Liu, X., Gao, Y., Wang, F., Li, Y., & He, W. (2021). Effects of environmental, social and surgical factors on ovarian reserve: Implications for age-relative female fertility. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 154(3), 451–458. <https://doi.org/10.1002/ijgo.13567>
- Warton, C., & McDougall, R. J. (2022). Fertility preservation for transgender children and young people in paediatric healthcare: a systematic review of ethical considerations. *Journal of Medical Ethics*, medethics-2021-107702. <https://doi.org/10.1136/medethics-2021-107702>
- Whaley, D., Damyar, K., Witek, R. P., Mendoza, A., Alexander, M., & Lakey, J. R. T. (2021). Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations. *Cell Transplantation*, 30, 1–12. <https://doi.org/10.1177/0963689721999617>
- WHO. (2022). *Infertility*. <https://icd.who.int/browse11/l-m/en#/http://id.who.int/icd/entity/1237004558>
- Woodruff, T. K. (2007). The emergence of a new interdisciplinary: oncofertility. *Cancer Treatment and Research*, 138, 3–11. https://doi.org/10.1007/978-0-387-72293-1_1
- Wu, D., Lei, Y., Tong, Y., Tang, F., Qian, Y., & Zhou, Y. (2010). Angiogenesis of the frozen-thawed human fetal ovarian tissue at the early stage after xenotransplantation and the positive effect of *Salviae miltiorrhizae*. *Anatomical Record*, 293(12), 2154–2162. <https://doi.org/10.1002/ar.21228>
- Xia, X., Yin, T., Yan, J., Yan, L., Jin, C., Lu, C., Wang, T., Zhu, X., Zhi, X., Wang, J., Tian, L., Liu, J., Li, R., & Qiao, J. (2015). Mesenchymal stem cells enhance

- angiogenesis and follicle survival in human cryopreserved ovarian cortex transplantation. *Cell Transplantation*, 24(10), 1999–2010. <https://doi.org/10.3727/096368914X685267>
- Xie, Q., Cheng, Z., Chen, X., Lobe, C. G., & Liu, J. (2017). The role of Notch signalling in ovarian angiogenesis. *Journal of Ovarian Research*, 10(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13048-017-0308-5>
- Xu, M., West, E., Shea, L. D., & Woodruff, T. K. (2006). Identification of a stage-specific permissive in vitro culture environment for follicle growth and oocyte development. *Biology of Reproduction*, 75(6), 916–923. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.054833>
- Yang, H., Lee, H. H. H. C., Lee, H. H. H. C., Ko, D. S., & Kim, S. S. (2008). Assessment of vascular endothelial growth factor expression and apoptosis in the ovarian graft: can exogenous gonadotropin promote angiogenesis after ovarian transplantation? *Fertility and Sterility*, 90(4 SUPPL.), 1550–1558. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.08.086>
- Yang, M. Y., & Fortune, J. E. (2007). Vascular Endothelial Growth Factor Stimulates the Primary to Secondary Follicle Transition in Bovine Follicles In Vitro. *Mol Reprod Dev*, 74, 1095–1104. <https://doi.org/10.1002/mrd>
- Yang, Y., Chen, J., Wu, H., Pei, X., Chang, Q., Ma, W., Ma, H., Hei, C., Zheng, X., Cai, Y., Zhao, C., Yu, J., & Wang, Y. (2015). The Increased Expression of Connexin and VEGF in Mouse Ovarian Tissue Vitrification by Follicle Stimulating Hormone. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/397264>
- Yang, Z., Du, X., Wang, C., Zhang, J., Liu, C., Li, Y., & Jiang, H. (2019). Therapeutic effects of human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived microvesicles on premature ovarian insufficiency in mice. *Stem Cell Research and Therapy*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1327-5>
- Yildirim, N., Yigitturk, G., Sahingoz Yildirim, A. G., Akdemir, A., Ilgen, O., Yenieli, O., Ergenoglu, M., & Erbas, O. (2015). Octreotide protects ovary against ischemia-reperfusion injury in rats: Evaluation of histological and biochemical

- parameters. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 41(10), 1591–1597. <https://doi.org/10.1111/jog.12770>
- Yin, H., Kristensen, S. G., Jiang, H., Rasmussen, A., & Andersen, C. Y. (2016). Survival and growth of isolated pre-antral follicles from human ovarian medulla tissue during long-term 3D culture. *Human Reproduction*, 31(7), 1531–1539. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew049>
- Yoo, S. Y., & Kwon, S. M. (2013). Angiogenesis and its therapeutic opportunities. *Mediators of Inflammation*, 2013(1). <https://doi.org/10.1155/2013/127170>
- Youm, H. W., Lee, J., Kim, E. J., Kong, H. S., Lee, J. R., Suh, C. S., & Kim, S. H. (2016). Effects of angiopoietin-2 on transplanted mouse ovarian tissue. *PLoS ONE*, 11(11), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166782>
- Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., Dyer, S., Racowsky, C., de Mouzon, J., Sokol, R., Rienzi, L., Sunde, A., Schmidt, L., Cooke, I. D., Simpson, J. L., & van der Poel, S. (2017). The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Fertility and Sterility*, 108(3), 393–406. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.06.005>
- Zhang, C.-H., Wu, L., & Li, P.-Q. (2016). Clinical study of the impact on ovarian reserve by different hemostasis methods in laparoscopic cystectomy for ovarian endometrioma. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology*, 55(4), 507–511. <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2015.08.026>
- Zhang, J., Yin, H., Jiang, H., Du, X., & Yang, Z. (2020). The protective effects of human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles on cisplatin-damaged granulosa cells. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 59(4), 527–533. <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2020.05.010>
- Zhang, S., Huang, B., Su, P., Chang, Q., Li, P., Song, A., Zhao, X., Yuan, Z., & Tan, J. (2021). Concentrated exosomes from menstrual blood-derived stromal cells improves ovarian activity in a rat model of premature ovarian insufficiency. *Stem Cell Research and Therapy*, 12(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02255-3>

- Zhang, Y., Xia, X., Yan, J., Yan, L., Lu, C., Zhu, X., Wang, T., Yin, T., Li, R., Chang, H. M., & Qiao, J. (2017). Mesenchymal stem cell-derived angiogenin promotes primordial follicle survival and angiogenesis in transplanted human ovarian tissue. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *15*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12958-017-0235-8>
- Zheng, X., Chen, J., Yang, Y., Pei, X., Ma, W., Ma, H., Hei, C., Cai, Y., Zhao, C., Wang, Y., & Chang, Q. (2020). Exogenous luteinizing hormone promotes ovarian survival and function during cryopreservation and transplantation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *526*(2), 424–430. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.03.014>
- Zhou, X. H., Zhang, D., Shi, J., & Wu, Y. J. (2016). Comparison of vitrification and conventional slow freezing for cryopreservation of ovarian tissue with respect to the number of intact primordial follicles A meta-analysis. *Medicine (United States)*, *95*(39). <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000004095>

PARTE V – Símbolos e abreviaturas

18s rRNA	18S ribossomal N5
2D	bidimensional
3D	tridimensional
ABVD	adriamicina, bleomicina, vimblastina, dacarbazina
Actb	actin, beta
AdMSCs	células estromais mesenquimatosas derivadas do tecido adiposo (do inglês, <i>adipose-mesenchymal derived stem cells</i>)
aFGF	FGF ácido
Akt	proteína quinase B
Alotx	alotransplante
Angpt1	angiopoietin 1
Angpt2	angiopoietin 2
Anpep	alanyl (membrane) aminopeptidase
ASCs	células estaminais derivadas de tecido adiposo (do inglês, <i>adipose-derived stem cells</i>)
ASRM	Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (do inglês, <i>American Society for Reproductive Medicine</i>)
Autotx	autotransplante
BEACOPP	bleomicina, etoposido, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, procarbazona e prednisona
BEP/EP	bleomicina, etoposide e cisplatina
bFGF	FGF básico
BMP	a proteína morfogenética óssea (do inglês, <i>bone morphogenetic protein</i>)
CaCl ₂	cloreto de cálcio
caderina-VE	caderina do endotélio vascular
CC1	do inglês, <i>cell conditioner 1</i>
Cdh5	cadherin 5
CHOP	ciclofosfamida, doxorubicina e cloridrato de prednisolona
Col18a1	collagen, type XVIII, alpha 1
Col4a3	collagen, type IV, alpha 3
CPL	criopreservação lenta
Ct	<i>cycle threshold</i>

Ctgf	connective tissue growth factor
Cx	conexina
DAB	diaminobenzidina
DGAV	Direção Geral de Alimentação e Veterinária do Ministério da Agricultura
Dll4	Delta-like 4
DMSO	dimetilsulfóxido
DPBS	do inglês, <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
EA	do inglês, <i>Eosin Azure</i>
eCG	gonadotrofinas coriônicas equinas
Egf	epidermal growth factor
EGF	fator de crescimento epidérmico (do inglês, <i>epidermal growth factor</i>)
Eng	Endoglin
eNOS	do inglês, <i>endothelial nitric oxide synthase</i>
Epas1	endothelial PAS domain protein 1
EPC	células endoteliais progenitoras
EPO	eritropoietina
ErbB2	v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene 2
ESHRE	Sociedade Europeia de Medicina da Reprodução Humana e Embriologia (do inglês, <i>European Society of Human Reproduction and Embryology</i>)
FGF	fator de crescimento de fibroblastos (do inglês, <i>fibroblast growth factor</i>)
Figf	c-fos induced growth factor
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FIV	fertilização <i>in vitro</i>
Flt1	FMS-related tyrosine kinase 1
Fn1	fibronectin 1
FSH	hormona folículo-estimulante (do inglês, <i>follicle-stimulating hormone</i>)
FtoM	<i>female to male</i>
FVIII	fator VIII
GDF	o fator de crescimento e diferenciação celular (do inglês, <i>growth differentiation factor</i>)

GFR	fator de crescimento reduzido
GnRH	hormona libertadora das gonadotrofinas (do inglês, <i>gonadotropin-releasing hormone</i>)
hCG	gonadotrofina coriônica humana (do inglês, <i>human chorionic gonadotropin</i>)
HE	Hematoxilina-Eosina
HGF	fator de crescimento de hepatócitos (do inglês, <i>hepatocyte growth factor</i>)
HIF1 β /ARNT	do inglês, <i>HIF1 beta/aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i>
HIFs	fatores de transcrição induzíveis por hipoxia (do inglês, <i>hypoxia-inducible factors</i>)
hMG	gonadotrofina menopáusicas humana ou menotropina (do inglês, <i>human menopausal gonadotropin</i>)
Hprt1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
HRP	do inglês, <i>horseradish peroxidase multimer</i>
IF	imunofluorescência
IGF-1	fator de crescimento semelhante à insulina-1 (do inglês, <i>insulin-like growth factor 1</i>)
IHC	do inglês, <i>immunohistochemical</i>
IHQ	imunohistoquímica
IMOD TM	setarud
iNOS	do inglês, <i>inducible nitric oxide synthase</i>
IOP	insuficiência ovárica prematura
Itga5	do inglês, <i>integrin alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)</i>
Itgav	do inglês, <i>integrin alpha V</i>
Itgb3	do inglês, <i>integrin beta 3</i>
IVM	maturação ovocitária <i>in vitro</i> (do inglês, <i>in vitro maturation</i>)
LASER	do inglês, <i>light amplification by stimulated emission of radiation</i>
LDH	lactato desidrogenase
LH	hormona luteinizante (do inglês, <i>luteinizing hormone</i>)
MCPI	do inglês, <i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MEC	matriz extracelular
miRNAs	microRNAs

MMP	metaloproteínases da matriz
MSCs	células estaminais mesenquimatosas (do inglês, <i>mesenchymal stem cells</i>)
NAC	N-acetilcisteína
NaCl	cloreto de sódio
NARP	proteína de repetição de anquirina regulada por Notch (do inglês <i>Notch-regulated ankyrin-repeat protein</i>)
nNOS	do inglês, <i>neuronal nitric oxide synthase</i>
Nos3	nitric oxide synthase 3, endothelial cell
OD	densidade ótica (do inglês, <i>optical density</i>)
OMS	Organização Mundial de Saúde
OT	do inglês, <i>ovarian tissue</i>
ORBEA	Órgão Responsável pelo Bem-Estar dos Animais
p/v	peso/volume
PAI-1	inibidor do ativador de plasminogénio-1 (do inglês, <i>plasminogen activator inhibitor 1</i>)
PCR	do inglês, <i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas (do inglês, <i>platelet-derived growth factor</i>)
PDGFR- β	recetor do PDGF-B
Pecam1	platelet/endothelial cell adhesion molecule 1
PGF	do inglês, <i>placental growth factor</i>
PI3K	fosfoinositol-3-quinase (do inglês, <i>phosphoinositide 3-kinase</i>)
PMA	Procriação Medicamente Assistida
PMSG	gonadotrofina sérica da égua prenhe
PRP	plasma enriquecido em plaquetas (do inglês, <i>platelet-rich plasma</i>)
PTEN	fosfatase homóloga à tensina
RM	ressonância magnética
RNU	Rowett Nude
RON	Registo Oncológico Nacional
Rplp1	ribosomal protein, large, P1
RT-PCR	real-time PCR
S1P	esfingosina-1-fosfato (do inglês, <i>sphingosine-1-phosphate</i>)

SEM	erro padrão da média
Tek	TEK tyrosine kinase, endothelial
TGF	fator de crescimento transformador (do inglês, <i>transforming growth factor</i>)
Tie1	tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1
TIMPs	inibidores teciduais de MMPs (do inglês, <i>tissue inhibitors of metalloproteinases</i>)
TOC	tecido ovárico criopreservado
TOF	tecido ovárico fresco
TOPC	tecido ovárico pós-criopreservação
tPA	ativador do plasminogénio tecidual (do inglês, <i>tissue plasminogen activator</i>)
uPA	ativador do plasminogénio do tipo uroquinase (do inglês, <i>urokinase-type plasminogen activator</i>)
v/v	volume/volume
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular (do inglês, <i>vascular endothelial growth factor</i>).
VEGFR	recetor do VEGF
VT	vitrificação
vWF	fator de <i>von Willebrand</i>
WB	do inglês, <i>Western-blot</i>
Wnt	do inglês, <i>Wingless/Integrated</i>
Z-VAD-FMK	do inglês, <i>carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone</i>
α SMA	α actina do músculo liso
KDR	kinase insert domain receptor
VF	VEGF + FGF
H	hMG
SEVs	vesículas extracelulares pequenas (do inglês, <i>small extracellular vesicles</i>)
CNC	Centro de Neurociências e Biologia Celular
Ex1	exossomas na concentração de 1 μ g/mL
Ex3	exossomas na concentração de 3 μ g/mL

Alix	do inglês, <i>ALG-2-interacting protein X</i>
Tsg101	do inglês, <i>tumor susceptibility gene</i>
hUCMSCs	células estaminais mesenquimatosas do cordão umbilical humano (do inglês, <i>human umbilical cord mesenchymal stem cells</i>)

PARTE VI – Anexos

Anexo I – Publicações relacionadas com a Tese de Doutoramento

Artigos publicados em revistas indexadas com arbitragem científica:

1. Azevedo AR*, Pais AS*, Almeida Santos T, Pires VMR, Pessa P, Marques CC, Nolasco S, Castelo-Branco P, Prates JA, Lopes-da-Costa L, Laranjo M, Botelho F, Pereira RMLN, Pimenta J. *Medical grade honey as a promising treatment to improve ovarian tissue transplantation. Bioengineering* 2022, 9(8), 357; <https://doi.org/10.3390/bioengineering9080357>. *1.^a autoria.
 - Revista indexada na *Scopus* (Q2, *CiteScore* 2021 = 6,3) e na *Web of Science* (Q2, FI 2021 = 5,046).
2. Ferro R, Pais AS, Sousa AP, Almeida Santos T. *Fertility preservation in patients with haematological malignancies. Hum Fertil (Camb)*. 2022 Feb 21:1-10. doi: 10.1080/14647273.2022.2042605.
 - Revista indexada na *Scopus* (Q3, *CiteScore* 2021 = 4,2) e na *Web of Science* (Q4, FI 2021 = 2,186).
3. Pais AS, Reis S, Laranjo M, Caramelo F, Silva F, Botelho MF, Almeida-Santos T. *The challenge of ovarian tissue culture: 2D versus 3D culture. J Ovarian Res*. 2021 Nov 1;14(1):147. doi: 10.1186/s13048-021-00892-z.
 - Revista indexada na *Scopus* (Q1, *CiteScore* 2021 = 6,3) e na *Web of Science* (Q1, fator de impacto (FI) 2021 = 5,506).
4. Santos ML, Pais AS, Almeida Santos T. *Fertility preservation in ovarian cancer patients. Gynecol Endocrinol*. 2021;37(6):483-489. Doi: 10.1080/09513590.2021.1872534.
 - Revista indexada na *Scopus* (Q2, *CiteScore* 2021 = 3,9) e na *Web of Science* (Q3, FI 2021 = 2,277).

5. Pais AS, Flagothier C, Tebache L, Almeida Santos T, Nisolle M. *Impact of surgical management of endometrioma on AMH levels and pregnancy rates: a review of recent literature. J Clin Med.* 2021;10(3):414. Doi: 10.3390/jcm10030414.
 - Revista indexada na *Scopus* (Q1, *CiteScore* 2021 = 4,4) e na *Web of Science* (Q2, FI 2021 = 4,964).

6. Pais AS, Guerra N, Couto D, Sousa AP, Almeida-Santos T. *Fertility preservation with successful pregnancy outcome in a patient with transplanted heart and non-Hodgkin's lymphoma - a case report. BMC Pregnancy Childbirth.* 2019;19(1):421. Doi: 10.1186/s12884-019-2587-x.
 - Revista indexada na *Scopus* (Q1, *CiteScore* 2019 = 3,8) e na *Web of Science* (Q2, FI 2019 = 2,239).

Resumos publicados em revistas indexadas:

1. Moura-Ramos M, Sousa AP, Couto D, Carvalho A, Pais AS, Almeida-Santos T. *Who and when are the young women returning for using their cryopreserved material after fertility preservation for cancer treatment? A 10-year experience of an oncofertility center. J Assist Reprod Genet.* 2020; 37: 987–1015.

2. Almeida-Santos T, Pais AS, Reis S, Laranjo M, Caramelo F, Silva F, Botelho F. *The challenge of ovarian tissue culture: 2D versus 3D. Hum Reprod.* 2021: 36, Suppl, pp. i1–i513.

Prémios e Bolsas:

1. Prémio de investigação 2015 da SPG - Promoção da angiogénese precoce do enxerto de tecido ovárico humano após criopreservação em contexto de preservação da fertilidade de doentes oncológicas. Almeida Santos T, Pais AS. 185^a Reunião da SPG, Braga, 3 e 4/06/2016.

2. Bolsa investigação do CHUC - Preservação do potencial reprodutivo na doente oncológica: estimulação da angiogénese do enxerto de tecido ovárico criopreservado. I Encontro “A Ciência e os Internos”, CHUC, Coimbra, 13 e 14/10/2016.
3. Melhor póster - Estimulação in vitro da angiogénese de tecido ovárico. Pais AS, Reis MC, Laranjo M, Reis S, Jorge J, Gonçalves AC, Botelho F, Almeida Santos T. 7º Congresso Português de Medicina da Reprodução, Porto, 9 a 11/05/2019.

Comunicações realizadas como palestrante convidada:

1. Apresentação de casos clínicos. Curso prático avançado em Medicina da Reprodução – GENUS. XXXVI Jornadas Internacionais de Estudos da Reprodução, Figueira da Foz, 03/05/2018.
2. FERTILIDADE, avaliação da reserva ovárica e critérios PMA. Workshop Gravidez após os 40 anos, Cascais, 11/04/2019.
3. Infertilidade e disfunção sexual na mulher. 16º Congresso Nacional Cancro Digestivo, online, 16/10/2020.
4. *Preservation of reproductive potential in oncological patients - Angiogenesis stimulation of cryopreserved ovarian tissue.* iCBR (Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research) *Scientific Meetings* 2021, 20/01/2021.
5. Infertilidade e preservação da fertilidade em doentes oncológicos. Curso de Formação para Farmacêuticos, Núcleo Regional do Centro da LPCC, *online*, 27/01/2021.
6. Fertilidade após o Cancro. Curso de Formação para Profissionais de Saúde, Núcleo Regional do Centro da LPCC, *online*, 07/05/2021.
7. Preservação da fertilidade - uma decisão partilhada. 12º Congresso Nacional de Enfermagem Oncológica, *online*, 25/11/2021.

8. Estimulação da angiogénese do enxerto de tecido ovárico criopreservado. *Generating Meetings*, Porto, 30/04/2022.

Comunicações originais em reuniões nacionais:

- Comunicação oral:
 1. Preservação do potencial reprodutivo na doente oncológica: estimulação da angiogénese do enxerto de tecido ovárico criopreservado. I Encontro “A Ciência e os Internos”, CHUC, Coimbra, 13 e 14/10/2016.
 2. Preservação da fertilidade em doentes com neoplasias hematológicas. Ferro R, Pais AS, Sousa AP, Almeida Santos T. Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Hematologia, Braga, 14 a 16/11/19.
- Poster:
 1. Xenotransplante de tecido ovárico bovino na preservação da fertilidade. Azevedo AR, Pais AS, Pereira RMLN, Almeida Santos T, Pires VMR, Pessa P, Marques CC, Laranjo M, Nolasco S, Castelo-Branco P, Botelho F, Prates JA, Lopes-da-Costa L, Pimenta J. 9º Encontro de Formação da Ordem dos Médicos Veterinários (EFOMV), Lisboa, 6 e 7/04/2019.
 2. Estimulação in vitro da angiogénese de tecido ovárico. Pais AS, Reis MC, Laranjo M, Reis S, Jorge J, Gonçalves AC, Botelho F, Almeida Santos T. 7º Congresso Português de Medicina da Reprodução, Porto, 9 a 11/05/2019.
 3. 3D na cultura de tecido ovárico, uma tecnologia acessível? Reis S, Sousa AP, Pais AS, Ramalho-Santos J, Almeida-Santos T. 7º Congresso Português de Medicina da Reprodução, Porto, 9 a 11/05/2019.

Comunicações originais em reuniões internacionais:

- Comunicação oral:
 1. Criopreservação de tecido ovárico para preservação da fertilidade. Pais AS, Carvalho A, Sousa AP, Brito R, Cortesão P, Almeida Santos T. XXXIV Jornadas Internacionais de Estudos da Reprodução, Tróia, 7 a 8/10/2016.
 2. *Who and when are the young women returning for using their cryopreserved material after fertility preservation for cancer treatment? A 10-year experience of an oncofertility center.* Moura-Ramos M, Sousa AP, Couto D, Carvalho A, Pais AS, Almeida-Santos T. *6th World Congress of the International Society for Fertility Preservation (ISFP)*, Nova Iorque, 14 a 16/11/2019.

- Poster:
 1. *Angiogenesis stimulation of cryopreserved ovarian tissue.* Pais AS, Laranjo M, Reis C, Reis S, Sousa AP, Silva F, Jorge J, Gonçalves C, Botelho F, Almeida-Santos T. *27th European Congress of Obstetrics and Gynaecology, online/Atenas*, 2 a 4/09/2021.
 2. *Fertility preservation in patients with hematologic malignancies.* Ferro R, Pais AS, Sousa AP, Almeida Santos T. *2019 Oncofertility Conference*, Chicago, Illinois, 11 a 13/11/2019.
 3. *The challenge of ovarian tissue culture: 2D versus 3D.* Almeida-Santos T, Pais AS, Reis S, Laranjo M, Caramelo F, Silva F, Botelho F. *ESHRE's virtual 37th Annual Meeting, Online*, 26/06 a 01/07/2021.

PUBLICAÇÕES E CERTIFICADOS

Artigos publicados em revistas indexadas com arbitragem científica

1. Azevedo AR*, Pais AS*, Almeida Santos T, Pires VMR, Pessa P, Marques CC, Nolasco S, Castelo-Branco P, Prates JA, Lopes-da-Costa L, Laranjo M, Botelho F, Pereira RMLN, Pimenta J. *Medical grade honey as a promising treatment to improve ovarian tissue transplantation. Bioengineering* 2022, 9(8), 357; <https://doi.org/10.3390/bioengineering9080357>. *1.^a autoria.

Article

Medical Grade Honey as a Promising Treatment to Improve Ovarian Tissue Transplantation

Ana Rita Azevedo ^{1,*,†}, Ana Sofia Pais ^{2,3,4,5,6,7,8,9,†}, Teresa Almeida-Santos ^{2,3,9}, Virginia M. R. Pires ^{10,11}, Pedro Pessa ¹², Carla C. Marques ¹, Sofia Nolasco ^{10,13}, Pedro Castelo-Branco ¹⁴, José A. M. Prates ^{10,15}, Luís Lopes-da-Costa ^{10,15}, Mafalda Laranjo ^{4,5,6,7,8}, Maria Filomena Botelho ^{4,5,6,7,8}, Rosa M. L. N. Pereira ^{1,10} and Jorge M. B. G. A. Pimenta ^{1,10}

¹ INIAV—Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária I.P., Unidade de Biotecnologia e Recursos Genéticos, Quinta da Fonte Boa, 2005-048 Vale de Santarém, Portugal; nvarandamarques@gmail.com (C.C.M.); rosa.linoneto@iniav.pt (R.M.L.N.P.); jorgepimenta7@gmail.com (J.M.B.G.A.P.)

² Reproductive Medicine Unit, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, 3000-075 Coimbra, Portugal; asfpais@uc.pt (A.S.P.); anateresasantos.tas@gmail.com (T.A.-S.)

³ Faculty of Medicine, University of Coimbra, Azinhaga de Santa Comba, Celas, 3000-548 Coimbra, Portugal

⁴ Institute of Biophysics, Faculty of Medicine, University of Coimbra, 3000-548 Coimbra, Portugal; mafaldalaranjo@gmail.com (M.L.); mfbotelho@fmed.uc.pt (M.F.B.)

⁵ Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research (iCBR), Faculty of Medicine, University of Coimbra, 3000-548 Coimbra, Portugal

⁶ Center for Innovative Biomedicine and Biotechnology (CIBB), University of Coimbra, 3000-548 Coimbra, Portugal

⁷ Centre of Investigation in Environment, Genetics and Oncobiology (CIMAGO), Faculty of Medicine, University of Coimbra, 3000-548 Coimbra, Portugal

⁸ Clinical Academic Center of Coimbra (CACCC), 3004-561 Coimbra, Portugal

⁹ CNC—Center for Neuroscience and Cell Biology, CIBB, University of Coimbra, Azinhaga de Santa Comba, Celas, 3004-504 Coimbra, Portugal

¹⁰ CIISA—Centre for Interdisciplinary Research in Animal Health, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, 1300-477 Lisboa, Portugal; virginia.pires@nzytech.com (V.M.R.P.); sofia.nolasco@gmail.com (S.N.); japrates@fmv.ulisboa.pt (J.A.M.P.); lcosta@fmv.ulisboa.pt (L.L.-d.-C.)

¹¹ NZYTech—Genes and Enzymes, Campos do Lumiar, Edifício E, 1649-038 Lisboa, Portugal

¹² Serviço de Anatomia Patológica, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, 3000-075 Coimbra, Portugal; p.pessa59@gmail.com

¹³ ESTeSL—Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa, 1990-096 Lisboa, Portugal

¹⁴ Faculdade de Medicina, Universidade do Algarve, 8005-139 Faro, Portugal; castelobranco.pedro@gmail.com

¹⁵ Laboratório Associado para Ciência Animal e Veterinária (AL4Animals), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, 1300-477 Lisboa, Portugal

* Correspondence: ana_rita_azevedo@hotmail.com

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Azevedo, A.R.; Pais, A.S.; Almeida-Santos, T.; Pires, V.M.R.; Pessa, P.; Marques, C.C.; Nolasco, S.; Castelo-Branco, P.; Prates, J.A.M.; Lopes-da-Costa, L.; et al. Medical Grade Honey as a Promising Treatment to Improve Ovarian Tissue Transplantation. *Bioengineering* **2022**, *9*, 357. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9080357>

Academic Editors: Haihui Huang and Xiaoming He

Received: 20 June 2022

Accepted: 26 July 2022

Published: 30 July 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Ovarian tissue cryopreservation is a female fertility preservation technique that presents major challenges for the maintenance of follicular viability after transplantation. The aim of this study was to evaluate and compare the application of L-Mesitran Soft[®], a product containing 40% medical grade honey (MGH), with other strategies to improve ovarian grafts' viability. For this purpose, bovine ovarian tissue was vitrified, warmed and randomly assigned to culture groups: (1) control, (2) MGH 0.2% in vitro, (3) MGH in vivo (direct application in the xenotransplantation), (4) vascular endothelial growth factor (VEGF 50 ng/mL) and (5) vitamin D (100 Nm), during a 48 h period. A sixth group (6) of fragments was thawed on transplantation day and was not cultured. The tissue was xenotransplanted into immunodeficient (Rowett nude homozygous) ovariectomized rats. Grafts were analyzed 48 h after culture, and 7 and 28 days after transplantation. The tissue was subjected to histological and immunohistochemical analysis. Treatments using MGH showed the highest angiogenic and cell proliferation stimulation, with cellular apoptosis, within a healthy cellular turnover pathway. In conclusion, MGH should be considered as a potentially effective and less expensive strategy to improve ovarian tissue transplantation.

Keywords: xenografting; ovarian; vitrification; honey; fertility; cryopreservation

1. Introduction

Fertility preservation strategies have emerged with the evolution of assisted reproductive technologies [1,2]. Ovarian tissue cryopreservation is the main option for prepubertal females and for those who cannot delay cancer treatment. This technique offers great potential, as it can preserve thousands of ovarian follicles at one time, allowing restoration not only of fertility, but also of endocrine function [3,4].

One crucial factor for the success of the ovarian tissue transplantation technique is directly related to the speed of revascularization, due to ischemic injuries. The ischemia that occurs until the establishment of graft revascularization leads to the loss of more than 50% of primordial follicles. This occurs predominantly in the first 5 days after transplantation and can compromise the durability of the transplant [4–7]. Thus, angiogenesis is important, since hypoxia and ischemia are two critical factors for post-transplant survival.

Angiogenesis is a complex physiological process regulated by multiple angiogenic factors, components of the extracellular matrix and endothelial cells [8]. In women, angiogenesis is particularly important for the function of the reproductive organs, namely follicular development and the formation of the corpus luteum [9,10]. The growth of endothelial cells is regulated through a balance between endogenous proangiogenic factors, such as VEGF, and antiangiogenic factors, such as angiostatin and endostatin [8,11,12].

L-Mesitran Soft[®] exhibits an angiogenic stimulation capacity comparable to VEGF; it is associated with higher levels of endothelial density and an apparent lower cellular toxicity [13]. This product includes in its composition 40% gamma-sterilized medical grade honey (MGH) and has been used over the past decades to treat wounds, given its antioxidant and antibacterial properties, as well as its ability to stimulate autolytic debridement, angiogenesis, cell migration and proliferation [14,15]. More recently, it has been studied as a natural cryoprotectant due to its antioxidant properties, which protect cells from thermal damage [16].

Vitamin D continues to stand out, with biological action far beyond the regulation of calcium metabolism and anticancer properties [17]. Vitamin D acts on follicular development during early folliculogenesis; however, the mechanisms involved and the necessary amounts of vitamin D are not fully understood [18]. Additionally, it seems to be able to influence angiogenesis, although its role is controversial; some studies suggest that it has antiangiogenic actions, while other reports claim proangiogenic effects [19–22].

Therefore, the aim of this study was to evaluate the application of a commercial product containing 40% MGH (L-Mesitran Soft[®]) in improving ovarian tissue endothelial density after transplantation and comparing it with VEGF and vitamin D supplementation.

2. Materials and Methods

2.1. Ethical Statement

The present study was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation (authorization number 11060495/23-11-2016) of the Faculty of Medicine of the University of Coimbra (FMUC) and performed according to European Guidelines and Portuguese Law. Animals were cared for according to the recommendations presented in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health. Experimental protocols were performed and reported according to ARRIVE guidelines [23].

2.2. Study Design

Given the ethical and practical restrictions of research in the field of human reproduction, animal models that show considerable similarities are often used. As such, the bovine model was used, given its physiological analogies (single ovulation, oocyte maturation and embryonic metabolism) and due to its similarity in size and structure. The rat model is more appropriate for tumor studies and postimplantation studies [24–26].

Bovine ovaries from 3 cows aged 14 to 18 months were collected at a regional slaughterhouse and transported to the laboratory within 1 h. Ovaries were dissected and the obtained ovarian cortical fragments were vitrified.

Afterward, warmed tissue samples were distributed into the following five groups of in vitro culture during a 48 h period: (1) control (absence of factor), (2) L-Mesitran Soft® in vitro (0.2%, [13]), (3) L-Mesitran in vivo (control during culture and with direct application of L-Mesitran in the act of xenotransplantation), (4) VEGF (50 ng/mL [18]) and (5) vitamin D (100 Nm [15,19]). A sixth group (6) of fragments was thawed on the day of the transplant, without in vitro culture (direct transfer).

Of the 40 fragments of cryopreserved bovine ovarian tissue, 3 were analyzed immediately after thawing (group 0) and 14 samples were analyzed after 48 h of culturing. The remaining 23 fragments proceeded to the in vivo study; that is, to xenotransplantation into immunosuppressed rats. Seventeen grafts were removed after 7 days and the remaining six grafts, at 28 days after transplantation. The study design is represented in Figure 1.

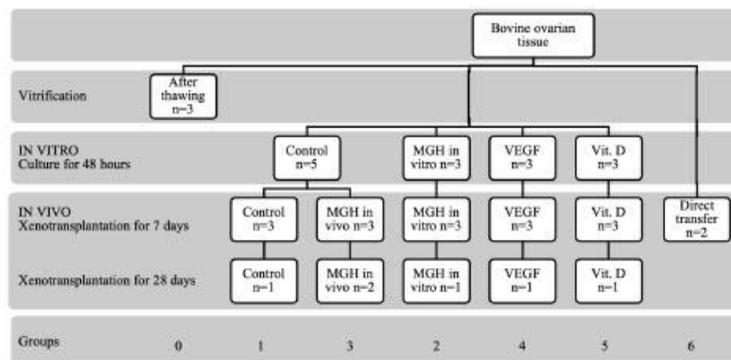


Figure 1. Experimental layout. Cortical fragments of bovine ovarian tissue were cryopreserved, thawed and distributed to each group. Forty ovarian fragments were removed for histological and immunohistochemical analysis at each stage of the study. The number (*n*) indicates the number of different bovine samples in each condition; all were analyzed in two sections by two independent investigators. MGH, medical grade honey—L-Mesitran Soft® 0.2%; VEGF, vascular endothelial growth factor; Vit.D, vitamin D.

Two sections for each probe and animal were evaluated using histological and immunohistochemistry techniques with antibodies anti-Ki-67, Caspase-3 and factor VIII.

2.3. Ovaries Collection, Vitrification, Thawing and Culture

In the laboratory, each ovary was divided into 2 identical parts, under laminar flow conditions, in a culture dish containing the same enriched solution (TCM-199 culture medium with 10% bovine serum). The medullary zone was removed with the aid of a scalpel blade, preventing any damage in the cortical tissue. After isolation, the cortical zone was cut into several fragments of approximately 1 cm² and 0.5 mm of thickness.

Vitrification was performed, as follicular morphology is better preserved after in vitro culture [27]. Ovarian cortical fragments were first transferred to the equilibrium medium, containing 7.5% dimethyl sulphoxide (DMSO) and 7.5% ethylene glycol (EG) in TCM-199, supplemented with 20% newborn calf serum (NBCS), for 15 min at room temperature. They were subsequently transferred to the vitrification solution, containing 15% DMSO, 15% EG and 0.5 M sucrose in TCM-199 with 20% NBCS, for 2 min, also at room temperature. Ovarian pieces were placed in a 1.8 mL cryovial (Nunc CryoTubesT M, Catalog number: 363401) prefilled with liquid nitrogen, closed and then plunged into liquid nitrogen. Cryovials were stored in a tank until analysis.

For warming, cryovials were withdrawn from the liquid nitrogen tank using forceps, kept in air for 20 s and then placed in a water bath at 37 °C for 20 s. Thawed ovarian

fragments were incubated in 1 mL of TCM-199 plus 20% NBCS solution supplemented with 1 M sucrose for 5 min, in the same cryovials. Ovarian pieces were then successively transferred to petri dishes containing TCM-199 plus 20% NBCS solution supplemented with 0.5 M, 0.1 M and 0.0 sucrose, in this order, respectively, for 5 min each.

Ovarian tissue fragments from groups 1 to 5 were cultured for 48 h with TCM-199 culture medium supplemented with 10% bovine serum. Culture medium was supplemented with L-Mesitran Soft® in vitro at 0.2% for group 2, VEGF in a concentration of 50 ng/mL for group 4, and vitamin D in a concentration of 100 Nm for group 5. Cultivation was carried out at 37 °C in air with 5% CO₂.

2.4. Experimental Animals

Twelve female Rowett nude rats (RNU, homozygous), aged 8–10 weeks, were provided by the animal facility of the FMUC. Rats were housed in individually ventilated cages under a 12 h light/dark cycle, with access to a standard diet and filtered water ad libitum. Paper rolls and strips were provided as environmental enrichment. Animals were distributed in a randomized manner throughout the study groups and identified by ear markings. Throughout the process, animal welfare was checked every 72 h; no significant issues were found throughout the study timeline.

2.5. Ovariectomy

All surgical procedures were performed under anaesthesia with sevoflurane (5%) and subcutaneous analgesia with carprofen (5 mg/kg, making a total of 0.2 mL per animal) [28–30].

For bilateral ovariectomy, each rat was placed in a supine position and the abdominal wall was shaved, cleaned and sterilized with povidon-iodine solution. A longitudinal median laparotomy was performed, with a 2 to 3 cm incision in the lower area of the abdomen (Figure 2). The ovaries were identified and removed after ligation of the vascular pedicle. After ensuring adequate hemostasis, the abdominal cavity was closed in layers [28,31]. Animals were kept without ovaries for 1 to 2 weeks, so that ovarian xenotransplantation would mimic clinical practice transplantation conditions in women with ovarian failure, and as per procedures in other xenotransplantation studies [5,32–34].



Figure 2. Surgical procedures performed on female Rowett nude rats. For ovariectomy, a longitudinal median laparotomy in the lower area of the abdomen was performed (A), the ovaries were identified and removed (B) and, after abdominal wall suture, they were administered a subcutaneous analgesia (C). Bovine ovarian tissue was transplanted after a blunt dissection of a subcutaneous pocket (D–F). Fragments were recovered after 7 (G,H) and 28 days (I).

2.6. Xenotransplantation

After in vitro culture, tissue samples were randomly distributed among the animals. A single 2 cm incision was made in the abdominal wall, followed by blunt dissection of

a 1 cm subcutaneous pocket using a pair of fine-curved watchmaker's forceps (Figure 2). Fragments were inserted subcutaneously along the abdominal muscular fascia. Finally, the skin incision was closed using a single absorbable suture. Heterotopic transplantation is simpler, making the graft more accessible, and all locations are similar for short-time transplantations [34–41]. Thus, in this experimental work, and after the culture of hemiovaries, heterotopic autotransplantation of ovarian tissue was performed at the subcutaneous level. Grafts were recovered from each group on day 7 and 28 after grafting and the animals were immediately euthanized.

2.7. Histological Evaluation

Bovine ovarian tissue fragments were fixed in 4% buffered paraformaldehyde (VWR, Leuven, Belgium), included in a paraffin block and then serially sectioned at 3 μ m thick in a microtome. The sections were stained with hematoxylin-eosin and then used for immunostaining.

Morphological analyses of ovarian tissue were performed via histological evaluation with the support of hematoxylin and eosin staining, according to the protocol performed by the Department of Pathology of Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra. Slides were submitted to the following series of reagents: xylol (VWR, Fontenay-sous-Bois, France); absolute and 95% alcohol for 4 min; water for 2 min; Hematoxylin Gill 1 (Leica, Richmond, VA, USA); water to wash, eosin 1% aqueous solution (Bio-optica, Milan, Italy); 95% *v/v* alcohol for 30 s; absolute alcohol; and xylol (VWR, Fontenay-sous-Bois, France).

Observation of the slides was carried out via transmission microscopy (Axio Imager Z2 microscope) with $\times 20$ magnification, a light intensity of 3.81 V, 0.8 DIC, a brightness of 23% and photographed with the Zen2 blue edition program (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany, 2011) (Figure 3). Next, follicular classification was performed blindly by two independent observers using the Zen2 blue edition program (Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2011).

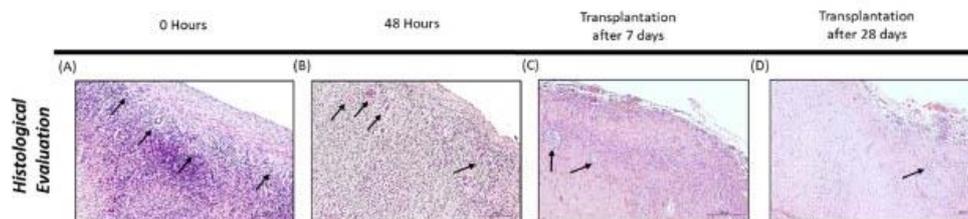


Figure 3. Histological evaluation of bovine ovarian fragments immediately after thawing (A), from the control group of *in vitro* culture (B) and after transplantation (C,D). Arrows indicate some of the identified follicles in the tissue. Source: authors' images.

All follicles were counted and classified according to Gougeon classification (1986) as primordial (composed of a single layer of flattened granulosa cells), primary (presenting a single layer of cuboid granulosa cells) or secondary (composed by two or more layers of granulosa cells around the oocyte) [42]. Preantral and antral follicles were grouped with secondary follicles.

2.8. Immunohistochemistry Evaluation

Endothelial cell density was evidenced by immunostaining with anti-FVIII antibody (Cell Marque 760-2642, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), which is validated for microvessel staining [43] (Figure 4). Factor VIII is a glycoprotein exclusively synthesized by endothelial cells, specifically in Weibel-Palade bodies, and megakaryocytes. It usually binds to the von Willebrand factor, regulating the adhesion of thrombocytes to subendothelial connective tissue [44]. To evaluate cell proliferation and apoptosis, staining with anti-Ki-67 (PA5-19462, ThermoFisher, Waltham, MA, USA; Figure 4) and anti-Caspase-3 (AHP2286,

Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA; Figure 4) antibodies was performed, respectively. Briefly, blade dewaxing was carried out by heating to 72 °C, followed by cell conditioning (cc) and ultra CC, for 3 cycles. Next, preprimary peroxidase inhibitor was added to the primary antibody by heating the blade, followed by the application of a drop of anti-Caspase-3 antibody (1/100), anti-Ki-67 antibody (1/300) or anti-FVIII antibody (1/300) and incubation for 36 min. After this, color optimization reaction occurred using the Optiview system (OptiView DAB IHC Detection Kit, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) and incubation with peroxidase HRP Multimer for 16 min. Finally, a drop of haematoxylin and a drop of bluing reagent (postcontrast) were applied with an incubation period of 4 min.

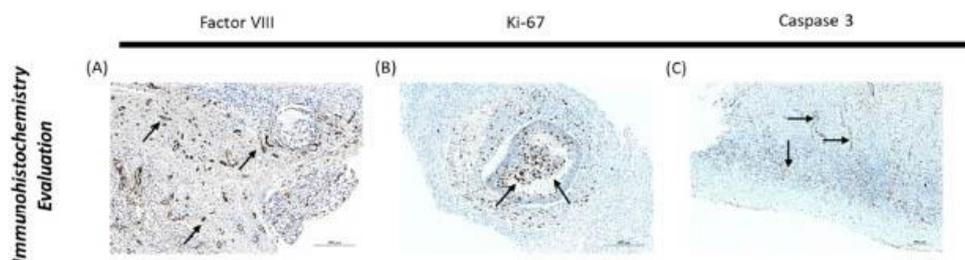


Figure 4. Immunohistochemistry evaluation of ovarian tissue. (A) Immunostaining with factor VIII. (B) Immunostaining with Ki-67. (C) Immunostaining with Caspase-3. Arrows indicate positive staining. Source: authors' images.

Slides were analyzed in the Axio Imager Z2 microscope by activating the ApoTome 2 and DIC-TLM imaging system, which is a microscope with thermal contrast lenses using differential interference. Images were acquired with a $\times 20$ magnification and photographed with the aid of the Zen2 blue edition program (Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2011), using 0.8 DIC, 4.0 V light and a brightness of 23% as constant settings.

Quantification of the stromal area marked by each antibody was carried out using Image J software (Fiji version, 1.8.0, USA) by two different evaluators. Five positions for each sample were randomly selected through the application of a rectangular grid (494×320 pixels), and the threshold was adjusted to the real image with the results subsequently presented as an average [45,46].

In addition, primordial, primary and secondary follicles were classified as positive or negative for Ki-67 and Caspase-3; positive classification was noted when staining was observed in the oocyte and at least half of the granulosa cells.

2.9. Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using Statistical Analysis System (SAS) software 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). PROC MIXED and PROC GLIMMIX were used to determine significant differences between groups and over time. The means of each treatment were calculated and compared using the PDIFF test of multiple comparisons. A *p*-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

Throughout the text, significant differences obtained between groups and over time will be described and represented by different letters.

3. Results

3.1. Histological Evaluation

The number of primordial follicles was significantly higher in the L-Mesitran group *in vivo* 7 days after transplantation than in the other groups ($p < 0.01$) (Figure 5A,D). Regarding primary follicles, higher numbers were observed in fragments treated *in vivo*

with L-Mesitran, 28 days after transplantation ($p < 0.03$) (Figure 5B,E). No significant differences were obtained for the number of secondary follicles (Figure 5C,F).

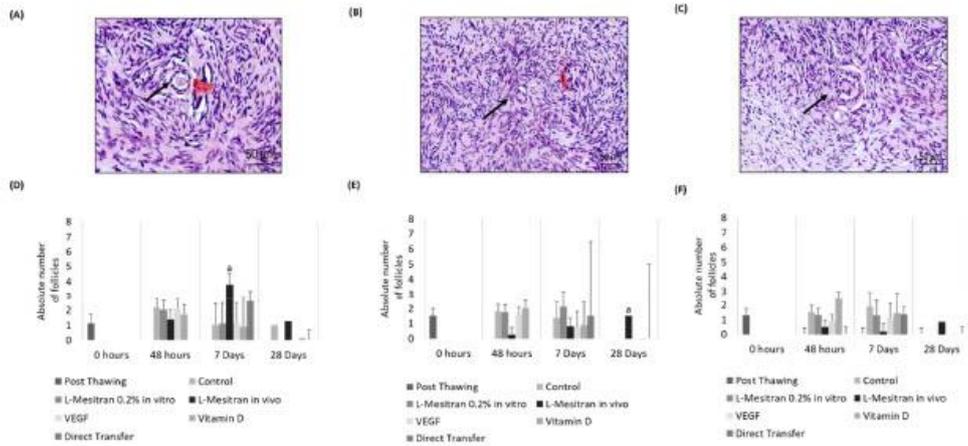


Figure 5. Follicular Quantification. (A,D) Primordial Follicles. (B,E) Primary Follicles. (C,F) Secondary Follicles. Arrows indicate some of the identified follicles in the tissue; a: indicate statistical differences ($p \leq 0.05$). Source: authors' images.

3.2. Endothelial Density

A higher endothelial density was observed after culture (48 h) in the presence of L-Mesitran ($p = 0.0096$), VEGF ($p = 0.027$) and vitamin D ($p = 0.0028$) (Figure 6B). These increments were not maintained 7 days after transplantation (Figure 6B). At day 28, the endothelial density of fragments cultured in the presence of L-Mesitran is significantly higher ($p < 0.001$) (Figure 6B).

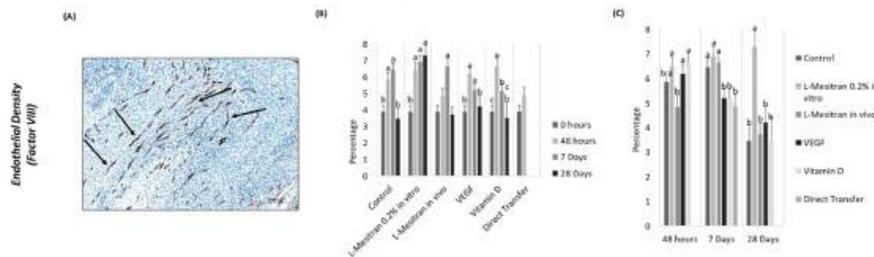


Figure 6. Endothelial Density in ovarian tissue. (A) Immunostaining with factor VIII (arrows indicate positive staining). (B) Endothelial density, with factor VIII marking at 48 h, 7 and 28 days. (C) Endothelial density over time, with factor VIII marking. Arrows indicate positive staining. a-c indicate statistical differences ($p \leq 0.05$). Source: authors' images

Over time, the L-Mesitran in vitro group was the only group to present a higher percentage of positive cells for FVIII when compared to the tissue immediately after thawing (0 h) and over the three analyzed periods ($p < 0.001$). Additionally, within the 7-day groups, only the direct transfer group did not show higher values in relation to the tissue immediately after thawing (Figure 6C).

Moreover, the L-Mesitran in vivo group showed a significant increase in FVIII staining at day 7 after transplantation when compared to the in vitro culture of 48 h ($p = 0.0028$), which was not observed at other time points. In the case of vitamin D, a reduction in factor VIII expression/presence was observed between the mentioned time points ($p = 0.0089$) (Figure 6C).

3.3. Cell Proliferation

The fragment culture per se did not induce differences in cell proliferation between treatments (48 h). Moreover, 7 days after xenotransplantation, the fragments where L-Mesitran was administered in vivo were the only ones showing higher Ki-67 labelling than the control ($p = 0.011$). This higher proliferation was also significant in this group 28 days after xenotransplantation ($p < 0.02$, Figure 7D).

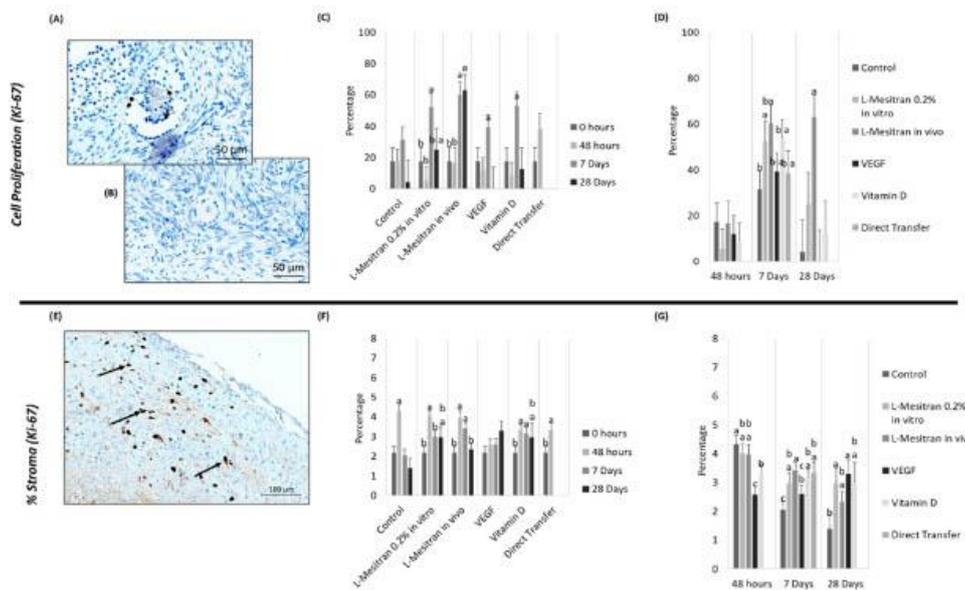


Figure 7. Cell Proliferation in ovarian tissue. (A) Follicle with positive marking for Ki-67. (B) Follicle with negative marking for Ki-67. (C) Cellular proliferation in the follicles, with Ki-67 marking at 48 h, 7 and 28 days. (D) Cellular proliferation in the follicles, with Ki-67 marking over time. (E) Stroma quality marking with Ki-67 (arrows indicate positive staining). (F) Stroma quality, w with Ki-67 marking at 48 h, 7 and 28 days. (G) Stroma quality, with Ki-67 marking over time. Arrows indicate positive staining. a-c indicate statistical differences ($p \leq 0.05$). Source: authors' images.

Follicular cell proliferation was significantly higher in all groups ($p < 0.05$) between 48 h and 7 days, except for the control group. In the case of the L-Mesitran in vivo group, this increase was extended to 28 days ($p < 0.001$), showing a more consistent increase in cell proliferation labelling over time (Figure 7C). The direct transfer group did not show a significant increase from 0 h to 7 days (Figure 7C).

Stromal labelling with anti-Ki-67 was also evaluated (Figure 7E). At 48 h, the VEGF group had a lower value than the control and the L-Mesitran in vitro and in vivo groups ($p < 0.003$). The vitamin D group was also inferior to the control group ($p = 0.013$). At day 7, Ki-67 marking was higher in all groups in relation to the control ($p < 0.05$), except

for the treatment of VEGF; the L-Mesitran in vivo group was superior compared to VEGF ($p = 0.048$) (Figure 7G). Finally, at day 28, a higher cell proliferation marking was evident in the L-Mesitran in vitro and VEGF groups compared to the control group ($p = 0.0026$ and $p = 0.0077$, respectively) (Figure 7G).

An initial increase in anti-Ki-67 immunostaining between 0 and 48 h ($p < 0.008$) was observed (Figure 7F) in all groups, except for the VEGF group. Furthermore, the L-Mesitran in vivo, vitamin D and direct transfer groups showed values higher at day 7 compared to 0 h ($p < 0.03$). Between 48 h and 7 days, the L-Mesitran in vivo, vitamin D and VEGF groups were the only ones in which no decrease in staining was observed, whereas in the case of VEGF, these values were not different from the control group (Figure 7F). Between days 7 and 28 there was a stabilization of the stromal immunostaining, with a decrease in only the L-Mesitran in vivo group ($p = 0.018$, Figure 7F).

3.4. Cell Apoptosis

No significant differences in follicular cell apoptosis among groups were obtained (Figure 8C).

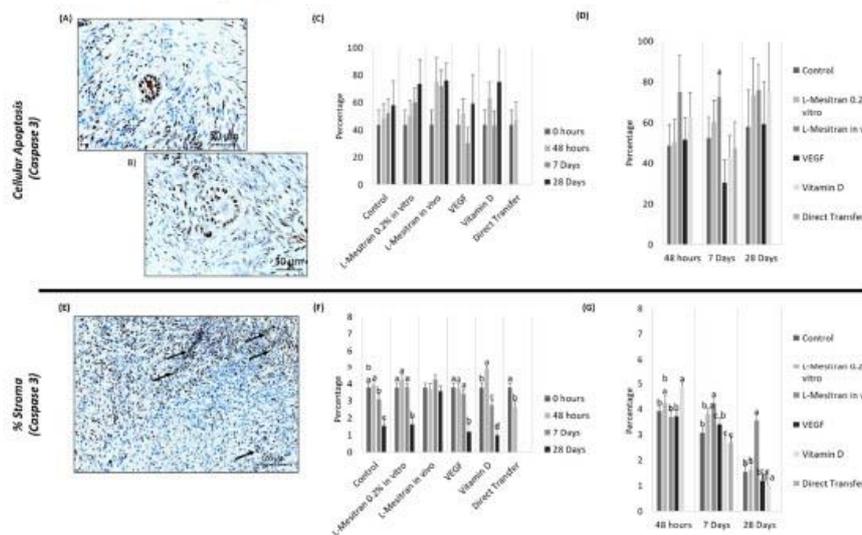


Figure 8. Cellular Apoptosis in ovarian tissue. (A) Follicle with positive marking for Caspase-3. (B) Follicle with negative marking for Caspase-3. (C) Cellular apoptosis in the follicles, with Caspase-3 marking at 48 h, 7 and 28 days. (D) Cellular apoptosis in the follicles, with Caspase-3 marking over time. (E) Stroma quality marking with Caspase-3 (arrows indicate positive staining). (F) Stroma quality with Caspase-3 marking at 48 h, 7 and 28 days. (G) Stroma quality with Caspase-3 marking over time. Arrows indicate positive staining. a–c indicate statistical differences ($p \leq 0.05$). Source: authors' images.

Conversely, stromal labelling by anti-Caspase-3 antibodies show several significant differences between groups and over time (Figure 8E–G). At 48 h, the vitamin D group had a higher percentage of stroma marked with Caspase-3 ($p < 0.01$), except in comparison with the L-Mesitran in vitro group (Figure 8.G). At day 7 after transplantation, the L-Mesitran in vivo group displayed higher values compared to other groups ($p < 0.02$), except for the L-Mesitran in vitro group. Similarly, at 28 days, the L-Mesitran in vivo group showed the highest percentage of stromal labelling ($p < 0.001$) (Figure 8G).

As shown in Figure 8F, the vitamin D group was the only one in which Caspase-3 labelling increased from 0 to 48 h ($p = 0.0055$). In contrast, the L-Mesitran in vivo group was the only one in which there was no decrease in marking between 7 and 28 days ($p < 0.001$).

4. Discussion

Ovarian tissue cryopreservation with subsequent transplantation is the most promising technique for female fertility preservation, as it can restore both fertility and endocrine function, decreasing the consequences of premature ovarian failure in young cancer survivor patients. Furthermore, it is the only method to preserve fertility for prepubertal girls. Very recently, the American Society for Reproductive Medicine concluded that cryopreservation of ovarian tissue is no longer an experimental technique [3]. Therefore, it should be considered an established medical procedure with limited effectiveness that should be offered to carefully selected patients. In terms of efficacy, it can be compromised by follicular depletion that occurs after ovarian tissue transplantation, until tissue revascularization occurs [5]. This work analyzed several parameters, aiming to contribute to the improvement of this fertility preservation strategy.

Neo-angiogenesis is a key requirement to increase the survival of ovarian tissue after transplantation. Takae and Suzuki [47] reviewed therapeutic options that proved effective in this field, namely, growth factors such as VEGF, hormones and antioxidant and cell therapies. MGH is a therapeutic approach used for wound healing that also has angiogenic properties [48,49]; however, it had never been applied to ovarian tissue prior to the present study.

One of the critical factors for ovarian tissue transplantation is the ability to minimize ischemic injuries throughout the angiogenic process. Our results highlight the importance of in vitro culture, as the culture of the vitrified, warmed ovarian tissue prior to transplantation allowed establishment of conditions required for vascular development. When control and direct transfer groups were compared at day 7, the tissue that was previously under culture (control) had a higher endothelial density, with no differences in the follicular analysis.

Through histological and immunohistochemical evaluation, it was possible to analyze vascular and follicular dynamics in ovarian tissue grafts exposed to different treatments. According to Yang et al. (2008), the angiogenic process needs more than 48 h to be completed. During its development, a tissue graft is subjected to hypoxia situations responsible for follicular loss. Follicular survival and development depend in part on vascular growth, which, in turn, is dependent on the ability to be stimulated by angiogenic factors [39].

Through endothelial density evaluation, we demonstrated a progressive development of the vascular endothelium in almost all groups, essentially up to 7 days after xenotransplantation. However, the capacity for angiogenic stimulation of L-Mesitran in vitro up to 28 days after xenotransplantation stands out; it has a higher endothelial density compared to the other treatment options, demonstrating its importance as an alternative approach to using VEGF. Additionally, when we analyzed the effect of L-Mesitran in vitro treatment over time, after 48 h there was a significant increase in culture that remained after transplantation. This is in contrast with the other groups, in which endothelial density decreased after a longer transplantation period.

Taken together, these results and the higher stromal cell proliferation in the L-Mesitran in vitro group at day 28 after transplantation are in accordance with what has been described in [50], given that the endothelial cells present quite high mitotic rates until they reach the mature phase, providing adequate vascularization [51].

In the context of cell proliferation, L-Mesitran treatments (in vitro and in vivo) showed high levels of Ki-67 expression in stromal cells 7 days after transplantation. It was possible to demonstrate that cell recovery occurs over time when compared to control. These findings are in agreement with the results of Gastal et al., who reached proliferative potential and

tissue survivability after 7 days in culture [52]. Furthermore, several authors [28,31,50] describe the presence of necrotic regions in the first days after transplantation.

Regarding cell death, there were significant differences in stromal cells' apoptosis in the present study. The group with the highest expression was L-Mesitran *in vivo*, which may be correlated with the high cellular activity observed through Ki-67 staining. This may be related to the cell turnover mechanism, i.e., the remodeling process necessary for cell differentiation and enucleation, which closely correlate with Caspase-3 activation. Although caspases are related to cell apoptosis, caspase-mediated proteolysis also controls several non-lethal cellular activities, such as proliferation and cytoskeleton reorganization, among others [53]. Thus, a greater endothelial density and cell proliferation, mediated by higher apoptosis, seems to be related to normal processes in terms of the adaptation and remodeling of an ovarian cortex graft [43].

Historically, ovarian research has focused on its functional units, the follicles. The ovarian stroma is gaining in importance, as it contains several cells and components that are crucial to complex ovarian dynamics [54]. Therefore, the viability of the stroma was also analyzed. With the application of MGH, high rates of vascularization were observed, essentially up to 7 days after transplantation, in parallel with better tissue viability as evaluated by staining with Ki-67 and Caspase-3.

Follicle viability, as previously mentioned, can be threatened by hypoxia and the consequent ischemic injury that occurs after transplantation; therefore, the expression of Ki-67 and Caspase-3 was assessed in granulosa cells. In the present study, there were no significant differences in granulosa cells' apoptosis. Regarding cell proliferation, only the L-Mesitran *in vivo* group evidenced the ability to stimulate follicular development. The same effect was observed with the administration of antiapoptotic agents before freezing and by injection after transplantation [55].

However, according to Winkler-Crepaz et al. (2008), after the transplantation of ovarian tissue cortex, follicular loss is unlikely to occur solely due to ischemic apoptosis. Therefore, the high recruitment of primordial follicles is a mechanism to consider. In this way, the density and viability of follicles present in the cortex of the transplanted ovarian tissue is significant [56]. The L-Mesitran *in vivo* group may have higher follicular recruitment, as it had a higher number of primordial follicles at day 7 and primary follicles at day 28 after transplantation, in parallel with higher levels of follicular proliferation and apoptosis.

The major strength of this study is that it is the first to evaluate and compare a product containing medical grade honey with other strategies to improve ovarian tissue transplantation. However, some points, such as an increase in sample size and the evaluation of endocrine function, can be addressed in future research.

5. Conclusions

L-Mesitran Soft[®] seems to have a positive influence on ovarian tissue xenotransplantation. It demonstrated potential for revascularization with apparent low cytotoxicity. Additionally, the results obtained regarding cell proliferation are very promising and seem to be in line with the apoptosis rates that were detected and necessary, from the perspective of cell turnover, for tissue remodeling after ovarian transplantation. It must also be stressed that L-Mesitran Soft[®] is an inexpensive product and easy to handle, which are also advantages over other potential treatments.

The animal model used, which involved xenotransplantation of bovine ovarian cortex in ovariectomized immunodeficient rats at the level of abdominal muscular fascia, was consolidated as a model applicable to other studies and products in the field of human fertility.

Finally, we can conclude that the incorporation of L-Mesitran Soft[®] may constitute an additional treatment to improve transplanted ovarian tissue vascularization and viability, either through its administration *in vitro* (culture medium) or *in vivo* (transplant site); thus, improving graft survival and transplant durability in women's fertility preservation.

Author Contributions: Conceptualization, J.M.B.G.A.P., R.M.L.N.P., A.R.A. and A.S.P.; methodology, A.R.A., A.S.P., M.L., C.C.M., J.M.B.G.A.P., R.M.L.N.P., V.M.R.P. and P.P.; validation, M.L., M.F.B., T.A.-S., J.M.B.G.A.P., R.M.L.N.P., S.N., P.C.-B., J.A.M.P., L.L.-d.-C. and V.M.R.P.; formal analysis and investigation, A.R.A. and A.S.P.; resources, J.M.B.G.A.P., R.M.L.N.P., M.L., M.F.B. and T.A.-S.; writing—original draft preparation, A.R.A. and A.S.P.; writing—review and editing, J.M.B.G.A.P., R.M.L.N.P., M.L., M.F.B., T.A.-S., S.N., P.C.-B., P.P., L.L.-d.-C. and J.A.M.P.; supervision, J.M.B.G.A.P., R.M.L.N.P., M.F.B. and T.A.-S.; funding acquisition, J.M.B.G.A.P., R.M.L.N.P., A.S.P., M.F.B. and T.A.-S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by FCT UIDB-00276-2020 (CIISA); Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal; Sociedade Portuguesa de Ginecologia (SPG), Merck SA (CSD006003); the Foundation for Science and Technology (FCT), Portugal (Strategic Projects UID/NEU/04539/2013 and UID/NEU/04539/2019), COMPETE-FEDER (POCI-01-0145-FEDER-007440) and Fundação para a Ciência e a Tecnologia, Portugal, through CIISA (UIDB/00276/2020) and AL4Animals (LA/P/0059/2020) grants.

Institutional Review Board Statement: The present study was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation (ORBEA, authorization number 11060495/23-11-2016) of the Faculty of Medicine of the University of Coimbra (FMUC) and performed according to European Guidelines and Portuguese Law. Animals were cared for according to the recommendations presented in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health. Experimental protocols were performed and reported according to ARRIVE guidelines [19].

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: No new data were created or analyzed in this study. Data sharing is not applicable to this article.

Acknowledgments: The authors thank Biolotus (Portugal) and Triticum L-Mesitran (The Netherlands) for supplying medical grade honey.

Conflicts of Interest: There are no conflicts of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported. Medical grade honey preparations were supplied without conditions, but free of charge, by the distributor (Biolotus, Portugal) and Triticum L-Mesitran (The Netherlands).

References

1. Fisch, B.; Abir, R. Female fertility preservation: Past, present and future. *Reproduction* **2018**, *156*, F11–F27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. ESHRE Guideline Group on Female Fertility Preservation; Anderson, R.A.; Amant, F.; Braat, D.; D'Angelo, A.; Chuva de Sousa Lopes, S.M.; Demeestere, I.; Dwek, S.; Frith, L.; Lambertini, M.; et al. ESHRE guideline: Female fertility preservation. *Hum. Reprod. Open* **2020**, *2020*, hoaa052. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Fertility preservation in patients undergoing gonadotoxic therapy or gonadectomy: A committee opinion. *Fertil. Steril.* **2019**, *112*, 1022–1033. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Donnez, J.; Dolmans, M.-M.; Pellicer, A.; Diaz-Garcia, C.; Sanchez Serrano, M.; Schmidt, K.T.; Ernst, E.; Luyckx, V.; Andersen, C.Y. Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: A review of 60 cases of reimplantation. *Fertil. Steril.* **2013**, *99*, 1503–1513. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Wang, L.; Ying, Y.F.; Ouyang, Y.L.; Wang, J.F.; Xu, J. VEGF and bFGF increase survival of xenografted human ovarian tissue in an experimental rabbit model. *J. Assist. Reprod. Genet.* **2013**, *30*, 1301–1311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Donnez, J.; Cacciottola, L.; Dolmans, M.-M. Techniques for Ovarian Tissue Transplantation. In *Female and Male Fertility Preservation*; Grynberg, M., Patrizio, P., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2022; pp. 163–174. ISBN 978-3-030-47767-7.
7. Dolmans, M.-M.; Donnez, J. Fertility preservation in women for medical and social reasons: Oocytes vs ovarian tissue. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **2021**, *70*, 63–80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Logsdon, E.A.; Finley, S.D.; Popel, A.S.; Mac Gabhann, F.A. A systems biology view of blood vessel growth and remodelling. *J. Cell. Mol. Med.* **2014**, *18*, 1491–1508. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Tahergorabi, Z.; Khazaei, M. A review on angiogenesis and its assays. *Iran. J. Basic Med. Sci.* **2012**, *15*, 1110–1126. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23653839> (accessed on 1 June 2022).
10. Rizov, M.; Andreeva, P.; Dimova, I. Molecular regulation and role of angiogenesis in reproduction. *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.* **2017**, *56*, 127–132. [[CrossRef](#)]
11. Denny, K.J.; Kelly, C.F.; Kumar, V.; Witham, K.L.; Cabiera, R.M.; Finnell, R.H.; Taylor, S.M.; Jeanes, A.; Woodruff, T.M. Autoantibodies against homocysteinylated protein in a mouse model of folate deficiency-induced neural tube defects. *Birth. Defects Res. A Clin. Mol. Teratol.* **2016**, *106*, 201–207. [[CrossRef](#)]

12. Bisht, M.; Dhasmana, D.C.; Bist, S.S. Angiogenesis: Future of pharmacological modulation. *Indian J. Pharmacol.* **2010**, *42*, 2–8. [[CrossRef](#)]
13. Roesiter, K.; Cooper, A.J.; Voegeli, D.; Lwaleed, B.A. Honey promotes angiogenic activity in the rat aortic ring assay. *J. Wound Care* **2010**, *19*, 440–446. [[CrossRef](#)]
14. Smaropoulos, E.; Cremers, N.A.J. Medical grade honey for the treatment of paediatric abdominal wounds: A case series. *J. Wound Care* **2020**, *29*, 94–99. [[CrossRef](#)]
15. Pleeqing, C.C.F.; Coenye, T.; Mossialos, D.; de Rooster, H.; Chrysoctomou, D.; Wagener, F.A.D.T.G.; Cremers, N.A.J. Synergistic antimicrobial activity of supplemented medical-grade honey against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and eradication. *Antibiotics* **2020**, *9*, 866. [[CrossRef](#)]
16. Cheepa, F.F.; Liu, H.; Zhao, G. The Natural Cryoprotectant Honey for Fertility Cryopreservation. *Bioengineering* **2022**, *9*, 88. [[CrossRef](#)]
17. Shahrokhi, S.Z.; Ghaffari, F.; Kazerouni, F. Role of vitamin D in female reproduction. *Clin. Chim. Acta* **2016**, *455*, 33–38. [[CrossRef](#)]
18. Xu, J.; Hennebold, J.D.; Seifer, D.B. Direct vitamin D3 actions on rhesus macaque follicles in three-dimensional culture: Assessment of follicle survival, growth, steroid, and antimüllerian hormone production. *Fertil. Steril.* **2016**, *106*, 1815–1820.e1. [[CrossRef](#)]
19. Grundmann, M.; Haidar, M.; Placzko, S.; Niendorf, R.; Darashchonak, N.; Hubel, C.A.; von Versen-Höyneck, F. Vitamin D improves the angiogenic properties of endothelial progenitor cells. *Am. J. Physiol. Physiol.* **2012**, *303*, C954–C962. [[CrossRef](#)]
20. Nema, J.; Sundrani, D.; Joshi, S. Role of vitamin D in influencing angiogenesis in preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* **2019**, *38*, 201–207. [[CrossRef](#)]
21. Jamali, N.; Sorenson, C.M.; Sheibani, N. Vitamin D and regulation of vascular cell function. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2018**, *314*, H753–H765. [[CrossRef](#)]
22. Aliashrafi, S.; Ebrahimi-Mameghani, M. A systematic review on vitamin D and angiogenesis. *BMJ Open.* **2017**, *7* (Suppl. S1), A3–A4. [[CrossRef](#)]
23. Kilkenny, C.; Browne, W.; Cuthill, I.C.; Emerson, M.; Altman, D.G. Animal research: Reporting in vivo experiments: The ARRIVE guidelines. *Br. J. Pharmacol.* **2010**, *160*, 1577–1579. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Bols, P.E.J.; Aerts, J.M.J.; Langbeek, A.; Goovaerts, I.G.F.; Leroy, J.L.M.R. Xenotransplantation in immunodeficient mice to study ovarian follicular development in domestic animals. *Theriogenology* **2010**, *73*, 740–747. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Langbeek, A.; De, H.E.M.; Bartholomeus, E.; Leroy, J.L.M.R.; Bols, E.J. Bovine in vitro reproduction models can contribute to the development of (female) fertility preservation strategies. *Theriogenology* **2015**, *84*, 477–489. [[CrossRef](#)]
26. Kagawa, N.; Silber, S.; Kuwayama, M. Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue. *Reprod. Biomed. Online* **2009**, *18*, 568–577. [[CrossRef](#)]
27. Aguiar, E.L.N.; Gastal, G.D.A.; Alves, K.A.; Alves, B.G.; Figueiredo, J.R.; Gastal, E.L. Supportive techniques to investigate in vitro culture and cryopreservation efficiencies of equine ovarian tissue: A review. *Theriogenology* **2020**, *156*, 296–309. [[CrossRef](#)]
28. Rigalli, A.; Di Loreto, V.E. *Experimental Surgical Models in the Laboratory Rat*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2009.
29. Lofgren, J.L.S.; Foley, P.L.; Golledge, H.D.R. Chapter 17—Anesthesia, Analgesia, and Euthanasia. In *American College of Laboratory Animal Medicine*; Suckow, M.A., Hankenson, E.C., Wilson, R.P., Foley, P., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2020; pp. 699–745. ISBN 978-0-12-814338-4.
30. Shibutani, M. Chapter 26—Anesthesia, Artificial Ventilation and Perfusion Fixation. In *Handbook of Experimental Animals*; Krinke, G.J., Bullock, G., Bunton, T., Eds.; Academic Press: London, UK, 2000; pp. 511–521. ISBN 1874480X.
31. Khajuria, D.K.; Razdan, R.; Mahapatra, D.R. Descrição de um novo método de ooforectomia em ratas. *Rev. Bras. Reumatol.* **2012**, *52*, 466–470. [[CrossRef](#)]
32. Terren, C.; Bindels, J.; Nisolle, M.; Noël, A.; Munaut, C. Evaluation of an alternative heterotopic transplantation model for ovarian tissue to test pharmaceutical improvements for fertility restoration. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2022**, *20*, 35. [[CrossRef](#)]
33. de Macêdo, L.B.; Pimentel, M.M.L.; Dos Santos, F.A.; Bezerra, M.B.; Ladd, F.V.L.; de Moura, C.E.B. Equine chorionic gonadotrophin improved vascularization of feline ovarian tissue xenografted into immunosuppressed mice. *Theriogenology* **2018**, *121*, 78–81. [[CrossRef](#)]
34. Olesen, H.Ø.; Pors, S.E.; Jensen, L.B.; Grønning, A.P.; Lemmer, C.E.; Nguyen Heimbürger, M.T.H.; Mamsen, L.S.; Getreu, N.; Christensen, S.T.; Andersen, C.Y.; et al. N-acetylcysteine protects ovarian follicles from ischemia-reperfusion injury in xenotransplanted human ovarian tissue. *Hum. Reprod.* **2021**, *36*, 429–443. [[CrossRef](#)]
35. American Society for Reproductive Medicine Ovarian tissue cryopreservation: A committee opinion. *Fertil. Steril.* **2014**, *101*, 1237–1243. [[CrossRef](#)]
36. Dath, C.; Van Eyck, A.S.; Dolmans, M.M.; Romeu, L.; Delle Vigne, L.; Donnez, J.; Van Langendonck, A. Xenotransplantation of human ovarian tissue to nude mice: Comparison between four grafting sites. *Hum. Reprod.* **2010**, *25*, 1734–1743. [[CrossRef](#)]
37. Hormozi, M.; Talebi, S.; Khorram Khorshid, H.R.; Zarnani, A.-H.; Kamali, K.; Jedd-Tehrani, M.; Soltangorae, H.; Akhondi, M.M. The effect of Setarud (IMOD(TM)) on angiogenesis in transplanted human ovarian tissue to nude mice. *Iran. J. Reprod. Med.* **2015**, *13*, 605–614.
38. Cha, S.K.; Shir, D.H.; Kim, B.Y.; Yoon, S.-Y.; Yoon, T.K.; Lee, W.S.; Chung, H.M.; Lee, D.R. Effect of Human Endothelial Progenitor Cell (EPC) or Mouse Vascular Endothelial Growth Factor-Derived Vessel Formation on the Survival of Vitrified/Warmed Mouse Ovarian Grafts. *Reprod. Sci.* **2014**, *21*, 859–868. [[CrossRef](#)]

39. Yang, H.; Ph, D.; Lee, H.; Sc, M.; Lee, C.; Sc, M.; Ko, S.; Sc, M. 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*, 1550–1558. [\[CrossRef\]](#)
40. Kong, H.S.; Lee, J.; Youm, H.W.; Kim, S.K.; Lee, J.R.; Suh, C.S.; Kim, S.H. Effect of treatment with angiopoietin-2 and vascular endothelial growth factor on the quality of xenografted bovine ovarian tissue in mice. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0184546. [\[CrossRef\]](#)
41. Gao, J.-M.; Yan, J.; Li, R.; Li, M.; Yan, L.-Y.; Wang, T.-R.; Zhao, H.-C.; Zhao, Y.; Yu, Y.; Qiao, J. Improvement in the quality of heterotopic allotransplanted mouse ovarian tissues with basic fibroblast growth factor and fibrin hydrogel. *Hum. Reprod.* **2013**, *28*, 2784–2793. [\[CrossRef\]](#)
42. Gougeon, A. Dynamics of follicular growth in the human: A model from preliminary results. *Hum Reprod.* **1986**, *1*, 81–87. [\[CrossRef\]](#)
43. Giattomanolaki, A.; Koukourakis, M.L.; Theodossiou, D.; Barbatis, K.; O'Byrne, K.; Harris, A.L.; Gatter, K.C. Comparative evaluation of angiogenesis assessment with anti-factor-VIII and anti-CD31 immunostaining in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **1997**, *3*, 2485–2492.
44. Van de Goot, E.R.W.; Korkmaz, H.I.; Fronczek, J.; Witte, B.I.; Visser, R.; Ulrich, M.M.W.; Begieneman, M.P.V.; Rozendaal, L.; Krijnen, P.A.J.; Niessen, H.W.M. 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.* **2014**, *244*, 128–135. [\[CrossRef\]](#)
45. Wu, D.; Lei, Y.; Tong, Y.; Tang, F.; Qian, Y.; Zhou, Y. Angiogenesis of the frozen-thawed human fetal ovarian tissue at the early stage after xenotransplantation and the positive effect of *Salvia miltiorrhiza*. *Anat. Rec.* **2010**, *293*, 2154–2162. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Xia, X.; Yin, T.; Yan, J.; Yan, L.; Jin, C.; Lu, C.; Wang, T.; Zhu, X.; Zhi, X.; Wang, J.; et al. Mesenchymal Stem Cells Enhance Angiogenesis and Follicle Survival in Human Cryopreserved Ovarian Cortex Transplantation. *Cell Transplant.* **2015**, *24*, 1999–2010. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Takae, S.; Suzuki, N. Current state and future possibilities of ovarian tissue transplantation. *Reprod. Med. Biol.* **2019**, *18*, 217–224. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Chaudhary, A.; Bag, S.; Banerjee, P.; Chatterjee, J. Wound healing efficacy of Jamun honey in diabetic mice model through reepithelialization, collagen deposition and angiogenesis. *J. Tradit. Complement. Med.* **2020**, *10*, 529–543. [\[CrossRef\]](#)
49. Roesi, M.; Marrazzo, P. The Potential of Honeybee Products for Biomaterial Applications. *Biomimetics* **2021**, *6*, 6. [\[CrossRef\]](#)
50. Yin, H.; Kristensen, S.G.; Jiang, H.; Rasmussen, A.; Andersen, C.Y. Survival and growth of isolated pre-antral follicles from human ovarian medulla tissue during long-term 3D culture. *Hum. Reprod.* **2016**, *31*, 1531–1539. [\[CrossRef\]](#)
51. Redmer, D.A.; Reynolds, L.P. Angiogenesis in the ovary. *Rev. Reprod.* **1996**, *1*, 182–192. [\[CrossRef\]](#)
52. Gastal, G.D.A.; Aguiar, F.L.N.; Ishak, G.M.; Cavinder, C.A.; Willard, S.T.; Ryan, P.L.; Feugang, J.M.; Gastal, E.L. Effect of cryopreservation techniques on proliferation and apoptosis of cultured equine ovarian tissue. *Theriogenology* **2019**, *126*, 88–94. [\[CrossRef\]](#)
53. Nakajima, Y.; Kurana, E. Caspase-dependent non-apoptotic processes in development. *Cell Death Differ.* **2017**, *24*, 1422–1430. [\[CrossRef\]](#)
54. Kinnear, H.M.; Tomaszewski, C.E.; Chang, F.L.; Moravek, M.B.; Xu, M.; Padmanabhan, V.; Shikanov, A. The ovarian stroma as a new frontier. *Reproduction* **2020**, *160*, R25–R39. [\[CrossRef\]](#)
55. Lee, S.; Cho, H.-W.; Kim, B.; Lee, J.K.; Kim, T. The Effectiveness of Anti-Apoptotic Agents to Preserve Primordial Follicles and Prevent Tissue Damage during Ovarian Tissue Cryopreservation and Xenotransplantation. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2534. [\[CrossRef\]](#)
56. Silber, S. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: Scientific implications. *J. Assist. Reprod. Genet.* **2016**, *33*, 1595–1603. [\[CrossRef\]](#)

2. Ferro R, Pais AS, Sousa AP, Almeida Santos T. *Fertility preservation in patients with haematological malignancies*. *Hum Fertil (Camb)*. 2022 Feb 21:1-10. doi: 10.1080/14647273.2022.2042605.

Fertility preservation in patients with haematological malignancies

Rafael Ferro¹, Ana Sofia Pais¹⁻⁵, Ana Paula Sousa^{5,6}, Teresa Almeida Santos^{1,5}

¹Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

²University of Coimbra, Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research (iCBR), Faculty of Medicine, Coimbra, Portugal

³University of Coimbra, Center for Innovative Biomedicine and Biotechnology (CIBB), Coimbra, Portugal

⁴Clinical Academic Center of Coimbra (CACC), Coimbra, Portugal

⁵Reproductive Medicine Unit, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal

⁶Biology of Reproduction and Stem Cells group, Center for Neuroscience and Cell Biology (CNC), University of Coimbra, Coimbra, Portugal

Contact: rafael21ferro@gmail.com

ORCID: 0000-0002-7008-2051

Abbreviations

ABVD - Doxorubicin, bleomycin, vinblastine, dacarbazine

AMH - Anti-Müllerian hormone

BEACOPP - Bleomycin, etoposide, doxorubicin, cyclophosphamide, vincristine, procarbazine, prednisone

BMI - Body mass index

COPADM - Cyclophosphamide, vincristine, prednisone, doxorubicin, methotrexate

DA-EPOCH-R - Dose-adjusted etoposide, prednisone, vincristine, cyclophosphamide, doxorubicin, rituximab

DGGG - German Society of Gynaecology and Obstetrics

DGRM - German Society of Reproductive Medicine

DGU - German Society of Urology

ESHAP - Etoposide, methylprednisolone, cisplatin, cytarabine

Linker - Daunorubicin, vincristine, prednisone, L-asparaginase

FSH - Follicle-stimulating hormone

HSCT - Haematopoietic stem cell transplantation

Hyper-CVAD - Cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, dexamethasone

m-BACOD - Methotrexate, bleomycin, doxorubicin, cyclophosphamide, vincristine, dexamethasone

OCs - Oral contraceptives

R-CHOP - Cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone, rituximab

SD - Standard deviation

Abstract

Introduction: The incidence of haematological malignancies is increasing in women of childbearing age. Survival rates accompany this increase, making it essential to assess the impact of treatments on patients' future quality of life.

Aim: Evaluate the impact of each treatment on ovarian reserve and what were the fertility preservation techniques used by patients with hematologic malignancies.

Methods: A retrospective study was made after data collection of 61 patients diagnosed with haematological malignancies and followed in a fertility preservation centre from January 2008 to June 2019.

Results: Cancer treatments caused a decrease in ovarian reserve, demonstrated by an increase in FSH levels and a decrease in AMH levels. When assessing which treatments have the greatest impact on AMH levels, we found that BEACOPP regimen, the agents vincristine, etoposide, procarbazine, prednisone and the haematopoietic stem cell transplantation were the main responsible for its decrease. Regarding pregnancy after oncological treatments, of the eleven women who became pregnant, ten did so spontaneously.

Conclusion: This study reinforces the importance of referring patients to a fertility preservation consultation before starting oncological treatment, as most of them opt to preserve fertility. This work also helps to clarify the impact of each chemotherapeutic agent on the ovarian reserve.

Keywords: Fertility preservation, haematological malignancies, ovarian reserve, women of reproductive age, retrospective study.

Introduction

Hematologic malignancies represent about 6,8% of cancers in women of childbearing age (15-44 years old) [1]. The incidence has increased in recent decades. Five-year survival rates follow the same rising trajectory, being above 80% for lymphomas and 60% for leukaemias [2]. This increase is due not only to earlier diagnosis but also to improved treatments, such as radiotherapy, chemotherapy and bone marrow transplantation. Despite their development in recent years, these treatments may have a negative impact on ovarian reserve, increasing the risk of infertility and premature ovarian insufficiency. According to the literature, the main gonadotoxic treatments are alkylating agents in chemotherapy, radiotherapy with abdominal or pelvic irradiation and bone marrow transplantation. The gonadotoxic effect of these treatments depends on the patient's age, basal ovarian reserve and the administered dose. [3] Therefore, fertility preservation becomes a key point to ensure the future quality of life of these women.

Fertility preservation can be accomplished through various techniques. These include oocytes, embryos and ovarian tissue cryopreservation. Oocytes cryopreservation requires ovulatory induction that takes 2 weeks. This is done using clomiphene citrate, gonadotropins or aromatase inhibitors [4]. Ovarian tissue cryopreservation is a surgical technique, no longer considered experimental, that allows preserving fertility and restoring endocrine function after ovarian tissue transplantation [5,6,7]. Embryos cryopreservation has been decreasing in its use because it raises ethical issues and does not ensure reproductive autonomy.

The influence of pre-treatment ovarian reserve and patient age on post-treatment ovarian reserve recovery is unclear [8]. The aim of our study was to evaluate the impact of each treatment on ovarian reserve and the fertility preservation techniques used by patients with hematologic malignancies.

Methods

Study design

A retrospective study was made after data collection of 61 patients, aged 15-36 years old, diagnosed with haematological malignancies referred to a fertility preservation centre from January 2008 to June 2019. Exclusion criteria were age over 40 years old, surgical history of bilateral oophorectomy and premature ovarian insufficiency. Electronic clinical files have been reviewed for personal and family history of gynaecological and oncological diseases. The type of treatment and doses administered, as well as staging at initial diagnosis were also analysed. Ovarian reserve was retrospectively assessed through plasma levels of follicle-stimulating hormone (FSH) and anti-Müllerian hormone (AMH) measured at the first appointment and in the follow-up visit, after oncological treatments.

The study is approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medicine of the University of Coimbra.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS Statistics, Version 25.0 (IBM Corp., Armonk NY USA). For quantitative variables, the mean, standard deviation, median, maximum and minimum were calculated. Qualitative variables were expressed as numbers and percentage. For these variables, the statistical test used was Fisher's exact test. For continuous variables, the Kolmogorov-Smirnov test was used if $N > 10$ and the Shapiro-Wilk test if $N < 10$. In these tests, if $p \leq 0.05$ the nonparametric test was performed and if $p > 0.05$ the t-test for paired samples (when comparing FSH and AMH values from the same individuals before and after treatment) or the t-test for independent samples (assessing the impact of treatment on FSH and AMH levels) were used. All tests were 2 tailed and the level of significance was set at $p \leq 0.05$.

Results

Characteristics of the participants

In our study, 61 patients with hematologic malignancies who attended fertility preservation consultation were included. The average age in our sample was 25.97 ± 6.03 [15-36] years old. Of the studied patients, the mean age at menarche was 12.41 ± 1.74 [6-18] years old, 80.3% (n=49) were nulliparous, 52.5% used oral contraception before starting treatment and the mean body mass index (BMI) was 22.54 ± 3.38 [17.80-33.43] kg/m².

Most patients were diagnosed with Hodgkin's lymphoma (n=35, 57.4%) or non-Hodgkin's lymphoma (n=20, 32.9%) followed by acute lymphoblastic leukaemia (n=3, 4.9%) and others (n=3, 4.9%), which includes promyelocytic leukaemia and myelodysplastic syndrome.

The Ann Arbor stage at initial diagnosis was mainly stage II in 21 patients (34.4%), followed by stage IV in 9 patients (14.7%) and stage I and III in 2 patients each (3.3%). In 44.3% (n=27) of the patients, it was not possible to determine the patient's stage due to a lack of information.

In our population, the most used chemotherapy regimen was the ABVD (doxorubicin, bleomycin, vinblastine, dacarbazine) (n=19, 31.1%), followed by R-CHOP (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone, rituximab) (n=10, 16.4%) and BEACOPP regimen (n=8, 13.1%) (bleomycin, etoposide, doxorubicin, cyclophosphamide, vincristine, procarbazine, prednisone). The remaining patients (n=21, 34.4%) used other regimens such as m-BACOD (methotrexate, bleomycin, doxorubicin, cyclophosphamide, vincristine, dexamethasone), Hyper-CVAD (cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, dexamethasone), ESHAP (etoposide, methylprednisolone, cytarabine, cisplatin), Linker (daunorubicin, vincristine, prednisone, L-asparaginase), DA-EPOCH-R (dose-adjusted etoposide, prednisone, vincristine, cyclophosphamide, doxorubicin, rituximab) and COPADM (cyclophosphamide, vincristine, prednisone, doxorubicin, methotrexate). In addition, among the patients who underwent chemotherapy, 19 (31.1%) also had radiotherapy and 10 (16.4%) bone marrow transplantation.

Most patients chose to preserve fertility (n=35, 57.4%), with oocyte cryopreservation being the most used method (n=18, 29.5%), followed by ovarian tissue cryopreservation (n=14, 23%), embryo and oocyte simultaneously (n=2, 3.3%) and embryo cryopreservation (n=1, 1.6%). For those who did not preserve fertility, the main reason for not doing so was personal choice (n=9, 13.1%) followed by absence of ovarian response (n=3, 4.9%), oncological treatment already started (n=3, 4.9%) and diagnosis of other pathologies (Wilson's disease and ovarian injury) in 2 cases (3.3%).

Moreover, pregnancy after treatment occurred in 11 cases and 10 of them were spontaneous. Among the 4 women who resorted to cryopreserved material (1 for each cryopreservation technique), only 1 did become pregnant, using the cryopreserved oocytes.

Patients' characteristics are summarized in Table I.

Clinical factors that might predict fertility preservation decision

We found that age influenced the decision of whether or not to preserve fertility ($p = 0.048$). Women who chose not to preserve fertility were significantly older than women who preserved fertility (27.730 ± 5.855 [15-36] vs 24.660 ± 5.896 [16-35] years old).

It was also analysed if the stage at initial diagnosis of each patient influenced their option for preserving fertility. There was no relationship between the staging of the disease and the decision to preserve fertility ($p > 0.05$ for all stages).

When analysing women who preserved fertility according to parity, we found a positive correlation with nulliparity. Of the 49 nulliparous, 33 chose to preserve fertility. None of the women who had already a child chose to preserve fertility ($p < 0.001$).

Regarding the marital status of each patient, we found a relationship between being single and preserving fertility ($p = 0.021$). Of the 34 single women, 25 chose to preserve fertility.

Influence of demographic factors on ovarian reserve

The age of diagnosis did not have a negative impact on FSH and AMH levels after treatment. Only women aged between 25 and 30 years had a significant decrease in AMH (2.279 ± 1.775 [0.250-4.900] vs 0.479 ± 0.811 [0.010- 0.510] ng/mL, $p = 0.033$) and an increase in FSH (5.239 ± 3.489 [3.200-24.000] vs 53.263 ± 51.329 [0.200-122.000] mIU/mL, $p = 0.038$) when assessing levels before and after treatment.

Likewise, BMI did not seem to influence the ovarian reserve after treatment.

Finally, the use of oral contraceptives (OCs) during chemotherapy did not demonstrate a protective effect on the ovarian reserve, according the levels of FSH ($p = 0.138$) and AMH ($p = 0.064$).

Impact of haematological diagnosis on the ovarian reserve

In our sample, haematological diagnosis (Hodgkin's or non-Hodgkin's lymphoma) did not negatively influence the ovarian reserve before treatment.

There were no differences neither in FSH nor in AMH levels before treatment in patients diagnosed with Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma ($p > 0.05$ in both). Therefore, the diagnosis alone had no impact on the ovarian reserve.

Impact of cancer treatments on ovarian reserve

FSH and AMH levels were assessed in the fertility preservation consultation before starting the treatment and later, in the follow-up visit, about two years after the first appointment. When comparing FSH measurements before (9.47 ± 22.87 [0.30 - 156] mIU/mL) and after cancer treatment (37.41 ± 48.22 [0.10-148] mIU/mL), we found a significant increase in FSH levels ($p = 0.02$; Figure 1.A.). In turn, when we performed the same analysis for AMH levels, it revealed a significant decrease in these levels (0.52 ± 0.06 [0.01-3.70] vs 2.19 ± 1.89 [0.06-7.70] ng/mL, $p < 0.001$; Figure 1.B.).

In patients who had already initiated cancer treatments at the fertility preservation consultation ($n=10$, 16.4%), we compared FSH and AMH levels with the pre-treatment levels of the remaining patients. We found that patients who had already initiated cancer treatments had lower levels of AMH (0.944 ± 0.907 [0.060-2.500] vs 2.447 ± 1.948 [0.080-7.700] ng/mL, $p = 0.055$), but no differences were evident in FSH ($p = 0.759$).

Impact of chemotherapy regimen on ovarian reserve

To assess the impact of each chemotherapy regimen on the ovarian reserve, we compared FSH and AMH levels after treatment in patients submitted to the three most used regimens and in patients that were not submitted to none of those.

In our study, 7 patients (11.5%) have been treated with the BEACCOOP regimen. We noticed that AMH levels of patients treated with the BEACCOOP regimen were lower than those from the patients submitted to other treatments (0.034 ± 0.025 [0.010-0.060] vs 0.881 ± 1.129 [0.010-3.700] ng/mL, $p < 0,001$; Figure 2). However, there are no differences when comparing FSH levels in patients undergoing this chemotherapy regimen.

In the ABVD regimen, we also observed that there were no statistically significant differences in FSH levels ($p = 0.124$). However, a tendency for higher AMH levels was found (1.573 ± 1.385 [0.060-3.700] vs 0.342 ± 0.672 [0.010-3.00] ng/mL, $p = 0.058$).

FSH and AMH levels in women treated with R-CHOP regimen were similar to those of women undergoing other treatments ($p = 1.000$ and $p = 0.820$, respectively).

Impact of each chemotherapeutic agent on ovarian reserve

We analysed the effect of each chemotherapeutic agent, comparing the post-treatment levels of FSH and AMH of patients submitted to an agent with post-treatment FSH and AMH measurements of patients who had not been submitted to the study agent.

Vincristine negatively affects the levels of AMH (0.341 ± 0.690 [0.010-3.000] vs 1.266 ± 1.348 [0.010-3.700] ng/mL, $p = 0.037$), but not those of FSH ($p = 0.124$). Also etoposide (0.034 ± 0.025 [0.010-0.060] vs 0.839 ± 1.117 [0.010-3.700] ng/mL, $p = 0.002$) and procarbazine (0.034 ± 0.025 [0.010-0.060] vs 0.839 ± 1.117 [0.010-3.700] ng/mL, $p = 0.002$)

had a negative impact on AMH levels. However, these agents did not have a detrimental effect on FSH levels ($p = 0.241$ for both).

Furthermore, prednisone had a negative impact on the ovarian reserve, translated by the effect on FSH levels (53.240 ± 55.353 [0.200-148.00] vs 6.880 ± 9.824 [0.100-34.000] mUI/mL, $p = 0.041$) and AMH levels (0.311 ± 0.714 [0.010-3.000] vs 1.143 ± 1.248 [0.010-3.700] ng/mL, $p = 0.013$).

Vinblastine and dacarbazine showed a tendency towards less impact on AMH levels (1.573 ± 1.385 [0.060-3.700] vs 0.362 ± 0.659 [0.010-3.000] ng/mL, $p = 0.056$). No impact was seen in FSH levels ($p = 0.124$).

On the contrary, doxorubicin ($p = 0.160$; $p = 0.590$), bleomycin ($p = 0.637$; $p = 0.856$), cyclophosphamide ($p = 0.388$; $p = 0.072$) and rituximab ($p = 0.669$; $p = 0.408$) did not have an effect on ovarian reserve, since no significant alterations on the levels of FSH and AMH were found.

Influence of radiotherapy and haematopoietic stem cell transplantation on ovarian reserve

In patients submitted to radiotherapy, there was no decrease in ovarian reserve ($p > 0.05$). In our sample, 4 patients were submitted to cervical and thoracic irradiation simultaneously, 7 underwent thoracic irradiation, 1 realized pelvic irradiation and in 7 patients we were unable to ascertain what type of irradiation they underwent. However, patients who underwent haematopoietic stem cell transplantation (HSCT), a statistically significant reduction in ovarian reserve was found (Figure 3). In these patients, the levels of FSH are higher (77.367 ± 59.464 [3.200-135.000] vs 28.846 ± 41.906 [0.100-148.000] mUI/mL, $p = 0.023$) and the AMH levels are lower (0.633 ± 0.980 [0.010-3.700] ng/mL vs 0.039 ± 0.027 [0.010-0.060] ng/mL, $p = 0.015$).

The occurrence of pregnancy according to demographic factors and ovarian reserve after treatment

Of the 11 pregnancies, only one occurred in the period between the end of the treatment and the follow-up consultation. The remaining 10 women became pregnant after the follow-up consultation, that is, most pregnancies occurred at least 2 years after diagnosis. Regarding the 11 patients who became pregnant, 6 were submitted to the ABVD regimen, 2 to the R-CHOP, 1 to the BEACOPP, 1 to the m-BACOD and in 1 patient we were unable to ascertain which regimen she was submitted to. It is important to note that of these patients, 5 also underwent radiotherapy (1 with cervical and thoracic irradiation simultaneously, 2 with thoracic irradiation, 1 with pelvic irradiation and 1 missing data). Only one patient submitted to HSCT was able to become pregnant.

When we compare the occurrence of pregnancy with age, we found that the patients that got pregnant were significantly older (28.820 ± 4.895 [22-36] vs 24.640 ± 6.031 [15-36] years old, $p = 0.038$).

BMI was not correlated with pregnancy in our study ($p = 0.456$).

In our study, we found no relationship between women who became pregnant after the end of treatment and the post-treatment levels of FSH ($p = 0.592$) and AMH ($p = 0.535$).

Discussion

The impact of each cancer treatment *per se* on the ovarian reserve is still unknown. Some treatments seem to affect the ovarian reserve more, but we do not know how long it takes to recover. Fertility preservation is increasingly a reality for women diagnosed with cancer and, therefore, it is essential to analyse which factors influence the decision to preserve fertility, in order to guarantee adequate advice to each patient regarding their fertility in the present and in the future.

In our study, in patients diagnosed with Hodgkin's or non-Hodgkin's lymphoma the ovarian reserve was according to the expected for the age prior to starting treatments. Thus, our results are in line with the results obtained by Paradisi *et al.* [9], who demonstrated no differences between Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma for AMH levels pre-treatment. These results can be explained by the young age of the sample. However, the small sample size and the lack of studies do not allow us to draw this conclusion.

In our sample, age influenced the decision to preserve fertility. Younger, nulliparous and single women tend to undergo fertility preservation techniques more often than older women. This can be explained by the fact that older women already have children or do not wish to become pregnant again. The potential loss of fertility is a key concern of young women treated for cancer [10] so referral to fertility preservation consultations should be done in an appropriate period of time, allowing the patient to choose whether or not to preserve fertility.

The role of OCs in preserving fertility is still controversial. A randomized trial, that was prematurely ended by Behringer *et al.* [11], concluded that OCs had no protective effect on gonadal function in patients treated with BEACOPP-escalated for Hodgkin lymphoma. The same authors conducted a retrospective study [12], in which they concluded that women who took OCs during treatments had a lower risk of amenorrhea. In our study sample, OCs did not demonstrate a protective effect on the ovarian reserve. To clarify the effect of OCs on ovarian reserve, further studies are needed.

According to the literature, cancer treatments, such as chemotherapy, radiotherapy and HSCT, have a negative effect on ovarian reserve [13-23]. In our study, the combination of these treatments caused a decrease in ovarian reserve, as evidenced by the increase in FSH levels and the decrease in AMH levels. In patients who had already started cancer treatment at the first fertility preservation consultation we found that there was a tendency towards a decrease in AMH levels, reinforcing the deleterious effect of treatments on the ovarian reserve in the short and medium-term.

Then we assessed the impact of each of these treatments. Regarding radiotherapy, the current literature is unanimous in terms of its effect on the ovarian reserve, since it has different risks of causing ovarian failure depending on the patient's age, dose and location of irradiation [18,19,31]. In our study population, we did not see changes in FSH and AMH levels after treatment. Most patients underwent thoracic irradiation, but we were unable to clarify how many underwent total body irradiation. All patients undergoing radiotherapy were also submitted to chemotherapy (5 ABVD regimen, 4 BEACOPP and 3 R-CHOP). We also do not know the total amount dose that was administered, so the results in this field should be viewed with some reservations.

In our study, patients undergoing HSCT had a decrease in ovarian reserve, demonstrated by an increase in FSH levels and a decrease in AMH levels. These results are in agreement with the meta-analysis by Gerstl *et al.* [30], who evaluated 14 studies and showed that there is a lower rate of pregnancy in patients undergoing HSCT. It should be noted that, in our sample, we were not able to differentiate patients who had allogeneic or autologous HSCT. This data is relevant, since the impact on the ovarian reserve seems to be lower in patients undergoing autologous HSCT [30].

According to the guidelines of the German Society of Gynaecology and Obstetrics (DGGG), coordinated with the German Society of Urology (DGU) and the German Society of Reproductive Medicine (DGRM) [18], ovarian toxicity depends on the type of chemotherapy regimen used, the number of cycles performed and the patient's age. In our study, the BEACOPP regimen demonstrated a negative impact on AMH levels after treatment. Among the patients undergoing this regimen, 4 were between 25-35 years old and 3 were under 25 years old. The same guidelines [18] differentiate the impact of the BEACOPP regimen considering the patient's age. For ages over 35 years old, 6 to 8 cycles have a high risk of causing amenorrhea. In turn, the risk decreases to intermediate if the patients are between 25-35 years old and low if they are less than 25 years old. Although our study did not evaluate amenorrhea in these patients, the AMH levels decreased after the treatment with this regimen, which is in line with the negative effect of the BEACOPP regimen in these age groups. It is important to consider that 1 patient underwent 4 cycles, 3 patients underwent 6 cycles and, in the remaining 3, we were unable to ascertain the number of cycles performed.

Regarding the ABVD regimen, the most recent data indicate that it has a low risk of causing amenorrhea [18]. AMH has a tendency towards higher levels after this treatment when compared to the other treatments. Only 7 patients undergoing this regimen had FSH and AMH assays and, consequently, the small sample size may skew the results.

Relatively to the R-CHOP regimen, the risk of amenorrhea is intermediate, if the patient is > 35 years old and low if the patient is < 35 years old [18]. This negative impact of the R-CHOP regimen on AMH levels was evidenced by Meissner *et al.* [34]. However, in our study, we did not obtain statistically significant changes in the levels of FSH and AMH in patients undergoing R-CHOP regimen. It is important to note that we were only able to isolate this regimen in 2 patients. The remaining patients who underwent this regimen were also submitted to other chemotherapy regimens, radiotherapy or HSCT.

We analysed the impact of each chemotherapeutic agent on the ovarian reserve. In this field, changes in FSH and AMH levels may be due to the simultaneous use of other drugs, since each agent is included in one or more chemotherapy regimens. According to the literature, alkylating agents have a high risk of gonadal toxicity and amenorrhea [18,19]. In our study population, cyclophosphamide did not have a negative impact on the ovarian reserve. This result can be explained by the small number of patients in our sample, so, in this field, the results should be interpreted with caution.

Contrarily, patients undergoing vincristine experienced a significant decrease in AMH levels which is contradicted by other studies that defined vincristine as an agent with very little or no risk of causing amenorrhea [18,25]. Vincristine is present in several chemotherapy regimens of our study (BEACOPP, R-CHOP, COPADM, DA-EPOCH-R, Linker, Hyper-CVAD and m-BACOD). This agent was not administered alone, but combined with other

chemotherapeutic agents (bleomycin, etoposide, doxorubicin, cyclophosphamide, procarbazine, prednisone, methotrexate, rituximab, daunorubicin, L-asparaginase or dexamethasone). Out of the 27 patients submitted to vincristine, 7 were treated simultaneously with radiotherapy and 2 with HSCT. From all regimens that include vincristine, only BEACOPP regimen had a negative impact on the ovarian reserve; the R-CHOP regimen did not have a negative impact on the ovarian reserve and the sample was not large enough to evaluate the impact of the remaining regimens on the ovarian reserve. Despite never having been administered alone, vincristine has proven to have a negative impact on a very heterogeneous sample of patients, which allows to increase the reliability of these results.

In addition, patients treated with etoposide and procarbazine agents also experienced a decrease in AMH levels. Swerdlow *et al.* [26] found an increased risk of premature ovarian insufficiency in patients undergoing etoposide. It should be noted that there are no studies on the effect of etoposide alone on AMH levels, so more studies are needed to confirm its impact on ovarian reserve. Regarding procarbazine, several studies report a detrimental effect on ovarian reserve, increasing the likelihood of ovarian dysfunction [19,27]. In our sample, the results are in line with other studies [19,27], showing a decrease in AMH levels in patients submitted to this agent. However, in our study, etoposide and procarbazine were always administered together, so we can only conclude about their combined effect.

According to Trull *et al.* [3], vinblastine has a low risk of gonadal toxicity while other studies have shown that dacarbazine has a high risk of gonadal toxicity [3,27]. Our results showed that AMH levels tended to increase in patients who underwent these chemotherapeutic agents. However, in our study, vinblastine and dacarbazine were always administered together in the ABVD regimen, so we can only draw conclusions about this regimen and not about each agent alone. Thus, further studies are needed to clarify the isolated impact of vinblastine and dacarbazine on ovarian reserve.

There is insufficient data in the literature about the secondary effects of prednisone on the ovarian reserve. Jenny *et al.* [28] found an increase in time to pregnancy in patients taking a daily dose > 7.5mg of prednisone. In an experimental study in rats [29], methylprednisolone had a negative effect on ovarian reserve. In our study, prednisone had a negative impact on ovarian reserve, as shown by an increase in FSH levels and a decrease in AMH levels. Prednisone was part of several regimens (BEACOPP, R-CHOP, COPADM, DA-EPOCH-R, ESHAP and Linker) and it was always administered with other chemotherapeutic agents (bleomycin, etoposide, doxorubicin, cyclophosphamide, vincristine, procarbazine, methotrexate, rituximab, cisplatin, cytarabine). Moreover, out of the 24 patients submitted to prednisone, only 7 were submitted to radiotherapy and 2 were submitted to HSCT. In fact, although it was never administered alone, prednisone's deleterious effect on the ovarian reserve is reinforced by the constant negative impact on ovarian reserve observed in patients submitted to this corticosteroid. However, more studies should be done on the isolated impact of prednisone on the ovarian reserve.

Hamy AS *et al.* [32] demonstrated that AMH levels do not have a positive correlation with short-term fertility in women after cancer treatment. Although the concentration of AMH is not related to the occurrence of short-term pregnancy [5], it can help to predict the age of menopause and thus calculate the opportunity to achieve pregnancy in the longer term [33]. In

our study, we also found no relationship between women who became pregnant after the end of treatment and the post-treatment levels of AMH.

Despite its retrospective character, this work helps to clarify the impact of each chemotherapeutic agent on the ovarian reserve, since existing studies contain contradictory information. In addition, studies about fertility preservation in patients with haematological malignancies are scarce. Therefore, this study encourages discussion on these topics and contributes to the future development of guidelines which can be used by clinical teams to advise their patients.

Limitations

There are limitations that need to be addressed when interpreting reproductive outcomes. The best parameter to assess fertility is pregnancy, however the occurrence of this depends on the patients' own will, so we can have patients with normal fertility, but who do not want to become pregnant, thus conditioning the main parameter of fertility assessment. The radiation dose and the use of total body irradiation in radiotherapy were not considered, two important factors to be able to correctly assess the impact of this treatment on the ovarian reserve. In HSCT, we were unable to differentiate which patients were submitted to allogeneic or autologous HSCT, failing to assess the impact of each of these types of HSCT on ovarian reserve. The retrospective design of the study is the main limitation since it does not allow us to fill in the missing data. The sample size and the small number of patients who performed each treatment also contributes to the bias of the results.

Conclusion

In our centre, more than 50 % of the patients referred to consultations chose to preserve fertility. The main reason for not preserving fertility was personal choice. However, about 1 in 6 patients had started oncological treatment before fertility preservation consultation. Patients of childbearing potential should be referred to a fertility preservation centre at an appropriate time, giving them the option to choose to preserve their fertility or not.

Regarding oncological treatment, the ABVD regimen was found to have less impact on AMH levels compared to the other treatments. A significant decrease in ovarian reserve was observed after cancer treatment, namely after BEACOPP regimen and HSCT.

Vincristine, etoposide, procarbazine and prednisone caused a decrease in AMH levels.

Further studies are needed to assess the impact of each chemotherapeutic agent on the ovarian reserve, as well as the relationship between AMH levels and the occurrence of short, medium and long term pregnancies. That will allow to better inform patients on the effect on their fertility and the chances of getting pregnant in the future.

Declarations

Funding: No funds, grants, or other support was received.

Conflicts of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethics approval and Consent to participate: Ethical approval and participants consent were waived by the local Ethics Committee of University of Coimbra Faculty of Medicine in view of the retrospective nature of the study, all the procedures being performed were part of the routine care and database was anonymized.

Availability of data: Data available on request from the authors.

Code availability: Not applicable.

Authors' contributions:

- Conceptualization: Teresa Almeida Santos, Rafael Sousa Ferro;
- Methodology: Rafael Sousa Ferro, Ana Sofia Pais;
- Formal analysis and investigation: Rafael Sousa Ferro; Ana Sofia Pais;
- Writing – original draft preparation: Rafael Sousa Ferro;
- Writing – review and editing: Ana Sofia Pais, Teresa Almeida Santos, Ana Paula Sousa;
- Supervision - Ana Sofia Pais, Teresa Almeida Santos, Ana Paula Sousa.

References

1. International Agency for Research on Cancer (2018). Estimated number of new cases in 2018, worldwide, females, ages 15-44. <https://bit.ly/2Hhh7xb>
2. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al (2016). SEER 8 Surveillance, Epidemiology and End Results) Cancer Statistics Review, 1975-2013, National Cancer Institute 2016.
3. César Díaz García, Dolors Manau Trullás (2018). Recomendaciones sobre la preservación de la fertilidad en enfermedades hematológicas. Grupo de Interés de Preservación de la Fertilidad (GIPF).
4. Teresa Almeida Santos (2018), Temas de Medicina da Reprodução – Reprodução Medicamentosa Assistida, Sociedade Portuguesa de Medicina da Reprodução.
5. Committee P, Society A (2019). Fertility preservation in patients undergoing gonadotoxic therapy or gonadectomy: a committee opinion. *Fertil Steril* [Internet]. 2019;112(6):1022–33. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2019.09.013
6. Donnez J, Dolmans MM (2014). Transplantation of ovarian tissue. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2014 Nov;28((8)):1188–97. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2014.09.003
7. Dolmans MM (2018). Recent advances in fertility preservation and counseling for female cancer patients. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2018 Feb;18((2)):115–20. DOI: 10.1080/14737140.2018.1415758
8. Anderson RA, Remedios R, Kirkwood AA et al (2018). Determinants of ovarian function after response-adapted therapy in patients with advanced Hodgkin's lymphoma (RATHL): a secondary analysis of a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2018 Oct;19(10):1328–1337. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30500-X. Epub 2018 Sep 13.
9. Paradisi R, Vicenti R, Sc B, Macciocca M, Ph D, Seracchioli R (2016). High cytokine expression and reduced ovarian reserve in patients with Hodgkin lymphoma or non-Hodgkin lymphoma. *Fertil Steril*. 2016 Oct;106(5):1176–1182. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2016.06.035
10. Peate M, Meiser B, Hickey M, Friedlander M (2009). The fertility-related concerns, needs and preferences of younger women with breast cancer: A systematic review. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;116(2):215–23. DOI: 10.1007/s10549-009-0401-6
11. Behringer K, Wildt L, Mueller H, et al. (2010). German Hodgkin Study Group. No protection of the ovarian follicle pool with the use of GnRH analogues or oral contraceptives in young women treated with escalated BEACOPP for advanced-stage Hodgkin lymphoma. Final results of a phase II trial from the German Hodgkin Study Group. *Ann Oncol*. 2010 Oct; 21(10): 2052–60. DOI: 10.1093/annonc/mdq066
12. Behringer K, Breuer K, Reineke T, et al (2005). German Hodgkin's Lymphoma Study Group. Secondary amenorrhea after Hodgkin's lymphoma is influenced by age at treatment, stage of disease, chemotherapy regimen, and the use of oral contraceptives during therapy: a report from the German Hodgkin's Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol*. 2005 Oct; 23(30): 7555–64. DOI: 10.1200/JCO.2005.08.138
13. Spears N, Lopes F, Stefansdottir A et al (2019). Ovarian damage from chemotherapy and current approaches to its protection. *Hum Reprod Update*. 2019;25(6):673–93. DOI: 10.1093/humupd/dmz027
14. Chow EJ, Stratton KL, Leisenring WM et al (2016). Pregnancy after chemotherapy in male and female survivors of childhood cancer treated between 1970 and 1999: A report from the Childhood Cancer Survivor Study cohort. *Lancet Oncol*. 2016;17(5):567–76. DOI: 10.1016/S1470-2045(16)00086-3

15. Van Dorp W, Haupt R, Anderson RA et al (2018). Reproductive function and outcomes in female survivors of childhood, adolescent, and young adult cancer: a review. *J Clin Oncol* 2018;36:2169–2180. DOI: 10.1200/JCO.2017.76.3441
16. Bedoschi G, Navarro PA, Oktay K (2016). Chemotherapy-induced damage to ovary: mechanisms and clinical impact. *Future Oncol* 2016;12: 2333–2344. DOI: 10.2217/fon-2016-0176
17. Bedoschi GM, Navarro PA, Oktay KH (2019). Novel insights into the pathophysiology of chemotherapy-induced damage to the ovary. *Panminerva Med* 2019;61:68–75. DOI: 10.23736/S0031-0808.18.03494-8
18. Dittrich R, Kliesch S, Schüring A et al (2018). Fertility Preservation for Patients with Malignant Disease Guideline of the DGGG, DGU and DGRM (S2k-Level, AWMF Registry No. 015/082, November 2017) - Recommendations and Statements for Girls and Women. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2018;78(6):567–84. DOI: 10.1055/a-0611-5549
19. Trudgen K, Ayensu-Coker L (2014). Fertility preservation and reproductive health in the pediatric, adolescent, and young adult female cancer patient. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2014;26(5):372–80. DOI: 10.1097/GCO.000000000000107
20. Wo JY, Viswanathan AN (2009). Impact of Radiotherapy on Fertility, Pregnancy, and Neonatal Outcomes in Female Cancer Patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2009;73(5):1304–12. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2008.12.016
21. Sanders JE, Hawley J, Levy W et al (1996). Pregnancies following high-dose cyclophosphamide with or without high-dose busulfan or total-body irradiation and bone marrow transplantation. *Blood* 1996 April 1;87:3045–52.
22. Wallace WH, Shalet SM, Crowne EC, Morris-Jones PH, Gattamaneni HR (1989). Ovarian failure following abdominal irradiation in childhood: natural history and prognosis. *Clin Oncol (R coll Radiol).* 1989;1(2):75–9. DOI: 10.1016/s0936-6555(89)80039-1
23. Wallace WH, Thomson AB, Kelsey TW (2003). The radiosensitivity of the human oocyte. *Hum Reprod.* 2003;18(1):117–21. DOI : 10.1093/humrep/deg016
24. De Bruin ML, Huisbrink J, Hauptmann M et al (2008). Treatment-related risk factors for premature menopause following Hodgkin lymphoma. *Blood* 2008; 111: 101–108. DOI: 10.1182/blood-2007-05-090225
25. Lee SJ, Schover LR, Partridge AH et al (2006). American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. *J Clin Oncol.* 2006;24(18):2917–31. DOI: 10.1200/JCO.2006.06.5888
26. Swerdlow AJ, Cooke R, Bates A et al (2014). Risk of premature menopause after treatment for Hodgkin's lymphoma. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106(9). DOI: 10.1093/jnci/dju207
27. Cancer A. ACOG Committee Opinion No. 747: Gynecologic Issues in Children and Adolescent Cancer Patients and Survivors. *Obstet Gynecol.* 2018;132(2):e67–77.
28. Brouwer J, Hazes JMW, Laven JSE, Dolhain RJEM (2015). Fertility in women with rheumatoid arthritis : influence of disease activity and medication. *Ann Rheum Dis.* 2015 Oct;74(10):1836–41. DOI: 10.1136/annrheumdis-2014-205383
29. Osmana MA, Usul H, Yulu E, Kesim M, Karahan SC (2013). Hormonal and histological changes in the ovaries with high-doses of methylprednisolone administration for acute spinal cord injury : An experimental study. *J Obstet Gynaecol.* 2013; Aug;33(6):585–90. DOI: 10.3109/01443615.2013.789833
30. Gerstl B, Sullivan E, Koch J et al (2019). Reproductive outcomes following a stem cell transplant for a haematological malignancy in female cancer survivors: a systematic

- review and meta-analysis. *Support Care Cancer*. 2019;27(12):4451–60. DOI: 10.1007/s00520-019-05020-8
31. Rodriguez-Wallberg KA, Oktay K (2014). Fertility preservation during cancer treatment: Clinical guidelines. *Cancer Manag Res*. 2014;6(1):105–17. DOI: 10.2147/CMAR.S32380
 32. Hamy AS, Porcher R, Eskenazi S et al (2016). Anti-Müllerian hormone in breast cancer patients treated with chemotherapy: A retrospective evaluation of subsequent pregnancies. *Reprod Biomed Online [Internet]*. 2016;32(3):299–307. DOI: 10.1016/j.rbmo.2015.12.008
 33. Depmann M, Faddy MJ, Van Der Schouw YT et al (2015). The relationship between variation in size of the primordial follicle pool and age at natural menopause. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(6):E845–51. DOI: 10.1210/jc.2015-1298
 34. Meissner J, Tichy D, Katzke V, Kühn T, Dietrich S, Schmitt T, et al (2015). Long-term ovarian function in women treated with CHOP or CHOP plus etoposide for aggressive lymphoma. *Ann Oncol*. 2015;26(8):1771–6. DOI: 10.1093/annonc/mdv227

Table I. Patients Characteristics

Variable	N= 61	Percentage (%)
Age at initial diagnostic, mean ± standard deviation (SD) [range] (years old)	25.97 ± 6.03 [15-36]	
15-19	12	19.7
20-24	10	16.4
25-30	23	37.7
31-36	16	26.2
Nulliparous	49	80.3
Age of menarche, mean ± SD [range] (years old)	12.41 ± 1.74 [6-18]	
Oral contraception	32	52.5
BMI, mean ± SD [range] (kg/m2)	22.54 ± 3.38 [17.80-33.43]	
14.5-19.9		21.3
20-24.9	13	52.4
25-29.9	32	19.7
≥ 30	12	3.3
Missing data	2	3.3
	2	
Hematologic malignancies		
Hodgkin lymphoma	35	57.4
Non-Hodgkin lymphoma	20	32.9
Acute lymphoblastic leukaemia	3	4.9
Others* ¹	3	4.9
Ann Arbor stage at initial diagnosis		
I	2	3.3
II	21	34.4
III	2	3.3
IV	9	14.7
IV	27	44.3
Missing data		
Chemotherapy regimens		
ABVD	19	31.1
R-CHOP	10	16.4
BEACOPP	8	13.1
Others* ²	21	34.4
Radiotherapy	19	31.1
Hematopoietic stem cell transplantation	10	16.4

Fertility preservation		
Did not	26	42.6
Personal choice	8	13.1
For having already started treatments	3	4.9
Absence of ovarian response	3	4.9
Other pathology	2	3.3
Missing data	10	16.4
Oocyte cryopreservation	18	29.5
Ovarian tissue cryopreservation	14	23
Embryo and oocyte simultaneously	2	3.3
Embryo cryopreservation	1	1.6
Pregnancy after treatment	11	18.0
Spontaneous pregnancy	10	16.4
Using cryopreserved oocytes	1	1.6
Used cryopreserved material	4	6.6
Oocyte cryopreservation	1	1.6
Ovarian tissue cryopreservation	1	1.6
Embryo and oocyte cryopreservation simultaneously	1	1.6
Embryo cryopreservation	1	1.6

*1: promyelocytic leukaemia and myelodysplastic syndrome and one missing

*2: m-BACOD, Hyper-CVAD, ESHAP, Linker, DA-EPOCH-R and COPADM (missing data 19.7%, n=12)

N: patients' number.

The missing data are explained by the retrospective nature of the study.

Figures:

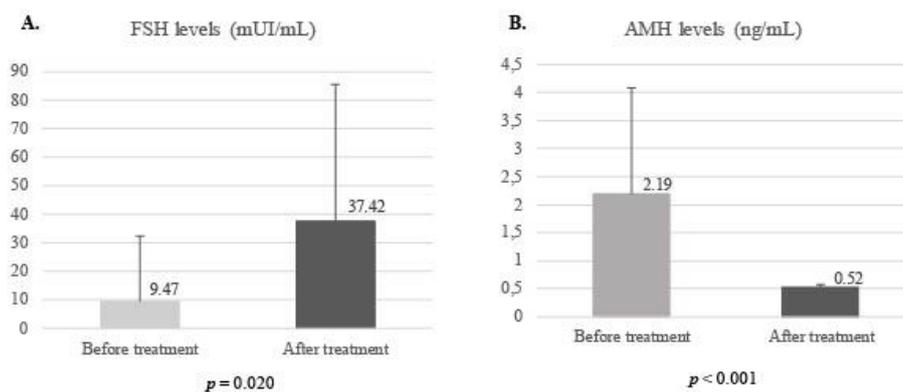


Figure 1. Analysis of the impact of oncological treatments for hematologic malignancies in ovarian reserve. A - FSH levels before and after cancer treatments. B - AMH levels before and after cancer treatments.

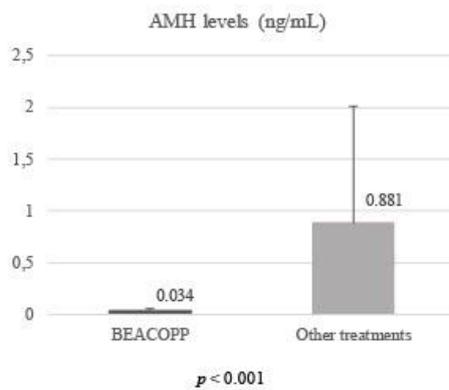


Figure 2. AMH levels in patients undergoing the BEACOPP regimen compared to other treatments.

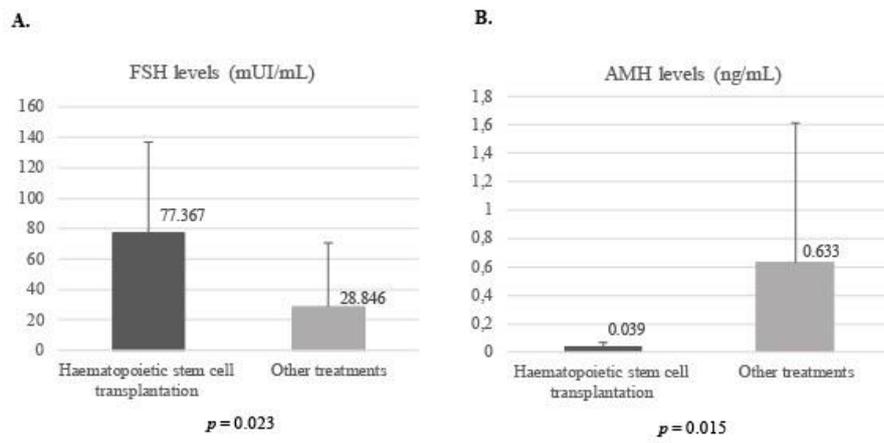


Figure 3. Ovarian reserve assessment in patients undergoing haematopoietic stem cell transplantation compared to patients undergoing other treatments, according FSH (A) and AMH (B) level analysis.

3. Pais AS, Reis S, Laranjo M, Caramelo F, Silva F, Botelho MF, Almeida-Santos T. *The challenge of ovarian tissue culture: 2D versus 3D culture.* *J Ovarian Res.* 2021 Nov 1;14(1):147. doi: 10.1186/s13048-021-00892-z.

RESEARCH

Open Access

The challenge of ovarian tissue culture: 2D versus 3D culture



Ana Sofia Pais^{1,2,3,4,5*}, Sandra Reis^{1,6,7}, Mafalda Laranjo^{3,4,5}, Francisco Caramelo^{3,4,5}, Fátima Silva⁸, Maria Filomena Botelho^{3,4,5} and Teresa Almeida-Santos^{1,5,6,9}

Abstract

Background: Cryopreservation of ovarian tissue is a powerful technique for preserving female fertility, as it can restore fertility and endocrine function. To increase the longevity of the transplant and decrease the risk of reimplantation of neoplastic cells, several studies have been carried out with culture of ovarian tissue. The aim of this study was to compare a conventional (2D) culture with an alginate matrix three-dimensional (3D) model for ovarian tissue culture.

Results: The ovarian tissue culture within the alginate matrix (3D) was similar to 2D culture, regarding follicular density and cell apoptosis in follicles and stroma. The proliferation rate remained stable in both models for follicles, but for stromal cell proliferation it decreased only in 3D culture ($p = 0.001$). At 24h of culture, cytotoxicity was lower in the 3D model ($p = 0.006$). As culture time increased, cytotoxicity seemed similar. Degradation of the tissue was suggested by the histological score analysis of tissue morphology after 72h of culture. Tissue injury was greater ($p = 0.01$) in 3D culture due to higher interstitial oedema ($p = 0.017$) and tissue necrosis ($p = 0.035$).

Conclusion: According to our results, 3D culture of ovarian tissue has no advantage over 2D culture; it is more time consuming and difficult to perform and has worse reproducibility.

Keywords: Alginate, Ovary, Fertility preservation, Tissue culture techniques

Background

Over the past decade, cancer incidence has been stable in women, with an overall decline in cancer mortality [1, 2]. This improvement in cancer survival is closely related to the availability of oncological treatments with higher levels of effectiveness, resulting in the focus on issues related to quality of life and long-term survival [3]. Treatments for cancer can be potentially gonadotoxic by directly affecting not only the ovarian follicle pool, but also the ovarian stroma or the blood supply [4]. Thus, premature ovarian failure may arise in patients of reproductive age and, consequently, infertility. Several approaches can be

proposed for cancer patients, such as immature/mature oocyte cryopreservation, embryo cryopreservation and ovarian tissue cryopreservation (OTC) [4].

Fertility preservation through OTC is a powerful technique for preserving female reproductive potential; it can preserve thousands of ovarian follicles at once and simultaneously restore endocrine function and fertility, thus allowing spontaneous conception [5, 6] and is the only option for prepubertal girls and women who cannot delay the start of oncological treatments [7]. According to the American Society for Reproductive Medicine (ASRM), this approach is no longer considered experimental [6]. However, there are some concerns about the graft's survival after transplantation and the potential risk of reimplantation of tumour cells [5, 6]. Therefore, many studies are underway to overcome these limitations and

*Correspondence: asfpais@ucp.pt

¹ Reproductive Medicine Unit, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), E.P.E., Coimbra, Portugal

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2021. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

new and experimental techniques have been developed, such as in vitro maturation [8–10].

The ovarian follicles are the morpho-functional unit in the ovary and are composed of an oocyte surrounded by somatic granulosa and theca cells. Basal folliculogenesis is a complex process, involving a dialogue between the oocyte and its closely surrounding cells, through autocrine and paracrine bidirectional signalling [11, 12]. Due to this cross talk, the maintenance of the follicle's three-dimensional nature during the whole growth process is crucial for the correct acquisition of developmental competence [11]. However, research on in vitro follicle culture has shifted from two dimensional (2D) toward the use of three-dimensional (3D) structures [11]. The use of a matrix maintains the follicle's 3D architecture and mimics in vivo conditions, with variable access to oxygen and nutrients [11, 13]. This contributes to bridging the gap between conventional cell culture and animal models [14].

Historically, ovarian research is focused on folliculogenesis, but recently the ovarian stroma has become an exciting new field of research, holding critical keys to understanding complex ovarian dynamics [15]. Activation of primordial follicles involves signalling pathways that reach the follicle through microvascularization present in the ovarian cortex [12]. Additionally, stromal tissue also plays an important role for the continued growth of follicles; a vascularized theca differentiates by recruitment of progenitor cells present in the ovarian cortex immediately adjacent to the follicle [12, 16]. Therefore, the culture of fragments of ovarian tissue maintains the integrity and three-dimensional structure of the follicles supporting stromal tissue [16].

By culturing organs in pieces, several cultures from a single organ can be generated, increasing the number of experiments from a single animal [17]. Culture of these tissue types in alginate hydrogels provides mechanical support in order to maintain the three dimensional architecture of the tissue, while the gel itself does not interact with the cells [17].

Alginate offers several advantages over other types of matrices. It is a biocompatible and bioactive natural matrix that floats in standard cell culture medium and provides mechanical support for growing tissues [17, 18].

The aim of this study was to compare a conventional 2D culture with an alginate matrix scaffold for ovarian tissue culture optimization.

Results

Tissue morphology and viability

The comparison of histopathologic scores is shown in Fig. 1. During the study period, degeneration of tissue

morphology was observed, with a significant increase in the score of all parameters.

According to Fig. 1A, the increase of tissue necrosis score (TNS) is larger in the 3D culture ($p < 0.001$, $B = 0.033$, $R^2_{adj} = 0.663$) than for 2D ($p < 0.001$, $B = 0.023$, $R^2_{adj} = 0.381$). At 72 h of culture, specimens of the ovary cultured within the alginate matrix (3D) showed higher scores for tissue necrosis ($2D = 1.700 \pm 0.291$ vs. $3D = 2.550 \pm 0.138$, $p = 0.017$).

The proportion of the degenerated follicles increased over time and was very similar in the two models ($2D$, $p < 0.001$, $B = 0.028$, $R^2_{adj} = 0.617$; $3D$, $p < 0.001$, $B = 0.031$, $R^2_{adj} = 0.696$; Fig. 1B).

For the score of interstitial oedema (Fig. 1C), a greater increase in the 3D culture was observed ($2D$, $p = 0.001$, $B = 0.018$, $R^2_{adj} = 0.253$; $3D$, $p < 0.001$, $B = 0.024$, $R^2_{adj} = 0.428$). At 72 h of culture, interstitial oedema was more evident in the 3D group compared to 2D ($2D = 2.000 \pm 0.224$ vs. $3D = 2.650 \pm 0.130$, $p = 0.035$).

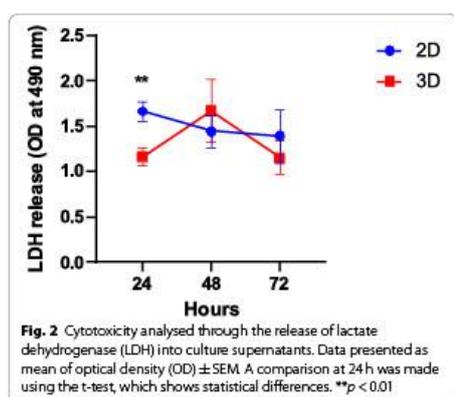
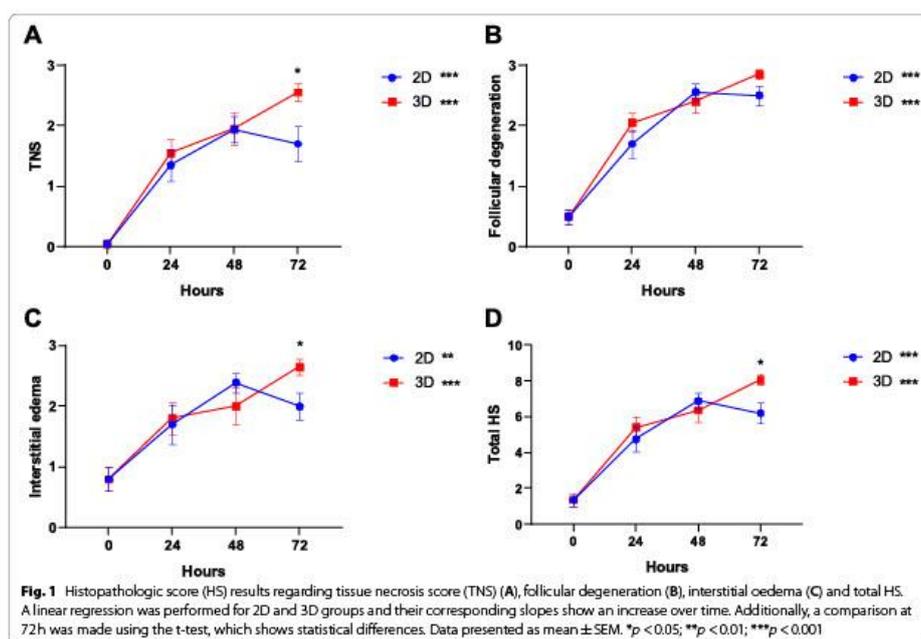
The total histopathologic score (HS), which is the total score of three ovarian injury parameters, increased in both groups but more sharply in 3D culture ($2D$, $p < 0.001$, $B = 0.069$, $R^2_{adj} = 0.477$; $3D$, $p < 0.001$, $B = 0.088$, $R^2_{adj} = 0.657$; Fig. 1D). Also, after 72 h of culture, the total score was significantly higher in 3D culture than 2D culture ($2D = 6.200 \pm 0.569$ vs. $3D = 8.050 \pm 0.302$, $p = 0.01$).

During the study period, there were no changes in the amount of lactate dehydrogenase (LDH) released into the culture medium (Fig. 2). The amount of LDH released was lower in culture with the alginate matrix than in conventional culture (1.16 ± 0.10 vs. 1.66 ± 0.11 , $p = 0.006$), after 24 h. However, no differences were found at 48 and 72 h of culture.

Follicular analysis

From the histological evaluation, we observed that density of morphologically normal follicles was maintained during the 72 h of culture (Fig. 3A). However, the density of atretic follicles increased significantly in both groups ($2D$, $p = 0.027$, $B = 0.007$, $R^2_{adj} = 0.102$; $3D$, $p < 0.001$, $B = 0.009$, $R^2_{adj} = 0.412$; Fig. 3B).

Regarding follicular classification, there was a significant decrease of primordial follicles in both types of culture ($2D$, $p = 0.009$, $B = -0.008$, $R^2_{adj} = 0.169$; $3D$, $p = 0.036$, $B = -0.006$, $R^2_{adj} = 0.11$; Fig. 3D and G). The density of primary and secondary follicles remained the same during the 72 h of culture (Fig. 3E, F, H and I, respectively). At 72 h of culture, the density of primary follicles was significantly higher in the samples cultured with the alginate matrix ($2D = 0.138 \pm 0.064$ vs. $3D = 0.318 \pm 0.063$ follicles/mm², $p = 0.035$; Fig. 3E).



Proliferation and apoptosis in ovarian tissue

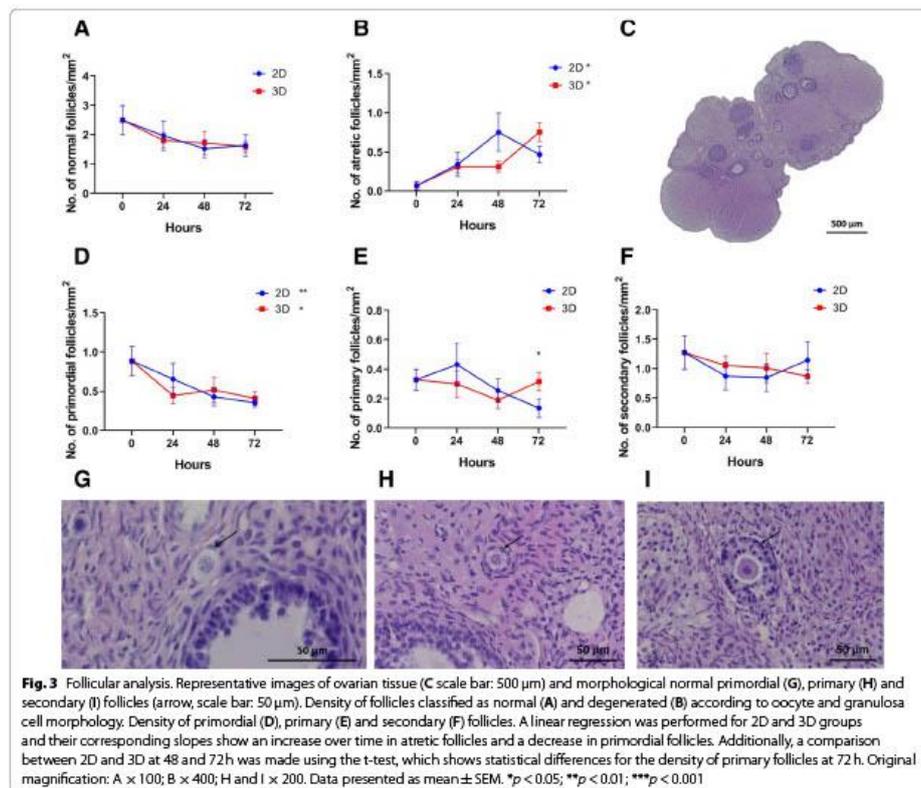
The levels of apoptosis assessed by the percentage of caspase-3 positive follicles and stromal cells remained stable during the culture period; no significant differences were found (Fig. 4).

The percentage of proliferative follicles, assessed with Ki67 staining, remained stable during the culture period in both groups (Fig. 5A, C and D). However, the evaluation of proliferation in stromal cells revealed a significant decrease in the 3D culture ($p = 0.001$, $B = -0.003$, $R^2_{adj} = 0.220$; Fig. 5B and E).

Discussion

Cryopreservation of ovarian tissue has been considered a reliable possibility for preservation of fertility in young women at risk of iatrogenic premature ovarian failure due to oncological treatments [19]. This is the only option for prepubertal girls and women who cannot delay the beginning of chemotherapy or cannot undergo an ovarian stimulation protocol for oocyte or embryo cryopreservation [19, 20].

The cryopreservation of ovarian tissue began in the 1950s; in the following years, several improvements were accomplished in the post-thaw viability of rat and mouse ovarian tissue. But only in the 1990s, after the successful delivery of a live birth from a frozen-thawed mouse primordial follicle [21], was this technique envisaged as an option for preservation of fertility [22].

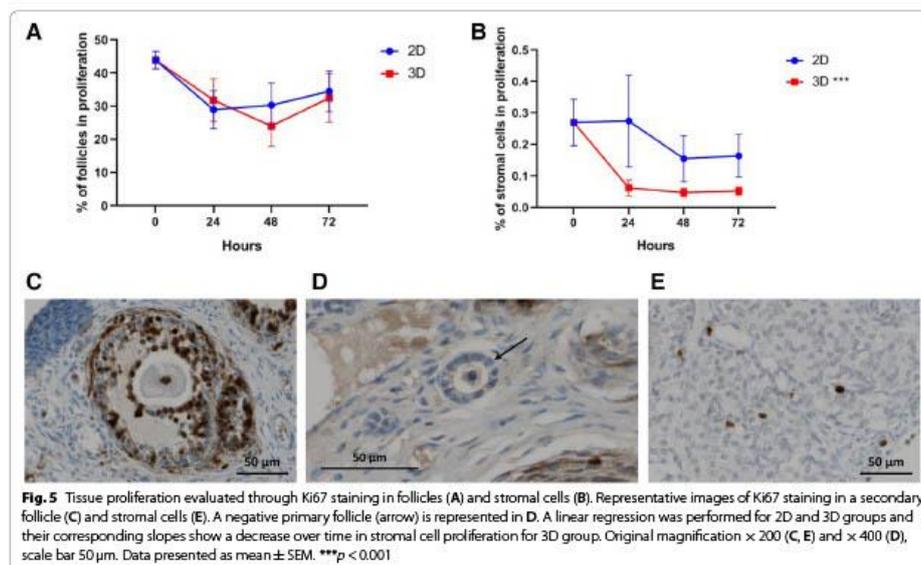
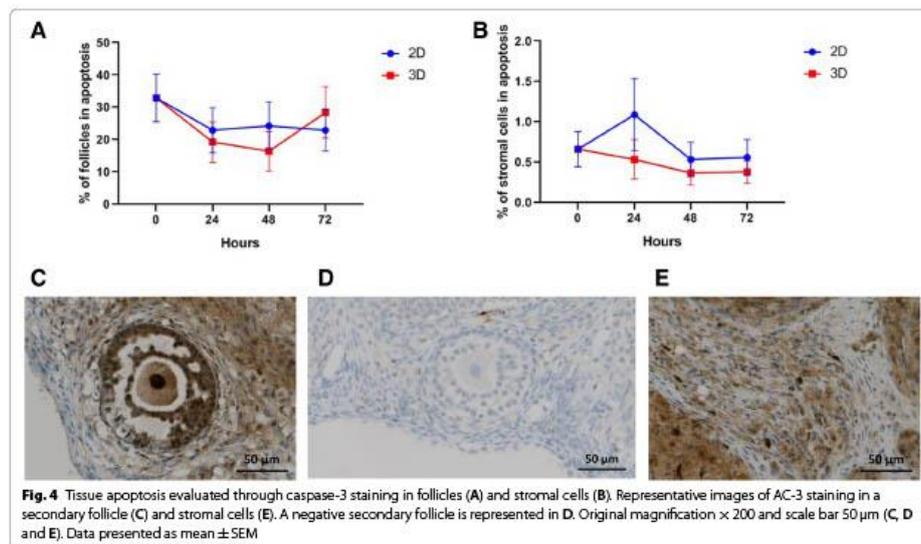


The possibility of achieving complete oocyte development *in vitro*, in primates and most domestic species, has boosted research in this field. Different options were evaluated in order to overcome technical difficulties and an *in vitro* system was developed for culturing small pieces of ovarian cortex [20, 23]. The cortical fragments are the main reservoir of dormant primordial follicles in the postnatal ovary, which determines the woman's fertile lifespan [20, 24].

Many culture approaches have been developed for different animal models [25]; however, the optimal model has not been achieved. Further efforts are needed in order to establish a reliable model for tissue culture [23, 26]. Higuchi et al. described the *in situ* ovarian tissue culture as an innovative and promising methodology to grow follicles *in vitro* due to its easy and safe handling, and more importantly the possibility of reconstituting the

ovarian microenvironment or manipulating some conditions to induce follicle growth [27, 28].

Our work aimed to evaluate some drawbacks concerning the culture of ovarian tissue in a 3D model. In this model, OT was cultured in an alginate matrix, which has been widely used for the *in vitro* culture of isolated follicles in mice [29, 30] and rats [31]. The biochemical properties of this matrix make it a good candidate for 3D models. It has gained recognition for: its physicochemical and biological properties, such as its ability to make hydrogels under physiological conditions, providing little disruption to the tissue when encapsulated; the fact that the dissolution of gels for cell/tissue retrieval is easy to control; and its transparency for microscopic evaluation [17]. The physical features of the alginate hydrogel pore network allow the diffusion of nutrients and waste materials, namely the bidirectional diffusion of hormones and



other proteins that are essential for tissue survival and also follicular development [32, 33]. Also, it is not of animal origin, which makes it biocompatible [33].

The histopathological evaluation of ovarian tissue (Fig. 1) elicited a global deterioration of tissue viability, and this decrease is time dependent. Tissue deterioration was observed in both models, with no differences between 2D and 3D within the first 48 h. This is in accordance with other previously published works that report no difference in cell viability in the first days of culture in the 2D and 3D models [34]. However, after 72 h there is a significant decrease in tissue viability in the 3D model. A decrease in tissue viability when the culture time is prolonged was previously described and a possible explanation for this is that the organ structure might retain the cellular waste produced and possibly induce a shortfall in the supply of oxygen and nutrients [35]. In the 3D model, the architecture is complex, with the tissue presenting three layers: (i) an outer layer with a high proliferation rate, (ii) a middle layer with senescent cells and (iii) a hypoxic core; this organization affects the supply of oxygen and nutrients, retaining the cellular waste produced [35, 36].

To measure cell death, LDH assay was performed in culture medium; this assay is based on the ability of LDH to convert pyruvate to lactate while consuming NADH [37]. In our data, we demonstrate that it is possible to detect and quantify LDH in the medium in both models, as previously described [37]. In the first 24 h, the 3D model presents a low cytotoxicity when compared with conventional culture. At 48 h and 72 h hours of culture, no difference was observed in the amount of LDH released in culture medium for both models. This effect may occur due to LDH retention in the alginate matrix. Although alginate matrix has higher porosity, allowing the diffusion of small substrates (molecular weight (MW) < 20 kDa) at the same speed as water [38], some proteins with higher MW, such as albumin (MW = 69 kDa), have a lower diffusion. Our results suggest that LDH (140 kDa) [39] may be retained longer in the spheroid structure. The diffusion resistance of alginate matrix was described for the first time, in 2006, in HepG2 cells encapsulated in alginate beads [37].

In order to establish a more detailed histopathological evaluation, we developed a score, based on the evaluation of three histologic parameters: TNS, interstitial oedema and follicular cell degeneration [40–42]. TNS and interstitial oedema are closely related parameters. Necrosis is characterized as an unprogrammed cell death process, which begins with cell swelling and results in cell membrane rupture and release of cell cytoplasmic content into the extracellular space [43], creating an extracellular movement of fluids. Our data show an increase in

TNS and in interstitial oedema over experimental time in both models. However, after 72 h the increase in both parameters was greater in 3D culture. In the interior of the 3D structure, the bioavailability of oxygen and nutrients may be limited, affecting cell survival over time and conditioning higher level of necrosis and release of intracellular content when compared to more superficial cells [35]. In our characterization of tissue degeneration in the *in vitro* culture models, we detected an abundant level of follicular degeneration (Fig. 1B), and no differences were observed in the 2D model versus the 3D. A more detailed analysis reveals an increase in follicular atresia (Fig. 3B) accompanied by a decrease in primordial follicles (Fig. 3D). Our results are in line with previous work, which showed a time-related increase of follicular atresia in culture [44].

The biocompatibility of alginate matrix was intensively investigated using *in vitro* and *in vivo* models, and it was described as not inducing an immune response [45], first because of the absence of cell receptors to recognize alginate and second due to the high-purity commercialized alginate. This compound is extracted from brown algae, and may contain various impurities such as heavy metals, endotoxins, proteins, and polyphenolic compounds [46]; however, multi-step purification ensures a high level of purity in the alginate. Despite the safety of this compound, its widespread use has been challenged by some drawbacks concerning the molecular size, charges and viscosity of alginate, different culture models, different implantation sites and different animal models employed [45].

A different proliferation rate is observed when 2D and 3D models are compared. As shown in Fig. 5B, the proliferation rate of stromal cells is decreased in the 3D model. The difference in the proliferation rates between 2D and 3D models was previously described; cell lines cultured in the 3D system showed a reduced proliferation when compared with the 2D model, which proliferate at an unnaturally rapid rate [14]; these effects are dependent on the 3D model employed, and more specifically are matrix dependent, and also dependent on specific cells properties [14, 36]. In the field of fertility preservation, this effect was also reported in follicular *in vitro* culture; some authors have described that the physical properties of alginate matrices can limit the growth and development of earlier secondary follicles [17, 28, 30]. However, this topic is very controversial, and it is continuously under review. Different reasons have been suggested to explain these findings. In the context of our work, the rigidity of alginate matrix may be a possible explanation for the decreased proliferation rate [27]. Softer matrices with lower alginate concentrations [30] or the combination of different elements in the matrix to allow more

space and the diffusion of macromolecules responsible for the tissue survival and growth were proposed [28].

Additionally, we evaluated cellular death using a caspase-3 antibody as a marker for programmed cell death. Caspase-3 is a well characterized protease which plays an effective role in apoptosis [47, 48]. The caspase-3 expression was already studied in granulosa [49] and theca cells [50] and also in oocytes [44]. In our study, apoptosis was evaluated in stromal cells and follicles, with the level of apoptosis in stromal cells and follicles being stable during the experimental time with no difference between conditions (2D vs. 3D model) (Fig. 4). However, it is important to keep in mind that apoptosis is a central process in ovarian function and development and occurs from foetal life on; it mainly affects the oocyte, until adult life when it affects the granulosa cells in growing follicles [47, 51].

In this study, we performed a well-structured histopathological analysis and the major strengths of our study are the sample size and the duplicate and blind analysis of results. However, some points could be addressed in future research to step up the 3D model, namely the study of the tissue-matrix interactions and culture medium supplementation to decrease follicular atresia.

Conclusions

In conclusion, the ovarian tissue culture within an alginate matrix was similar to 2D culture, regarding follicular density, follicular cell proliferation and cell apoptosis in follicles and stroma. In 3D culture, greater levels of tissue injury and oedema and lower stromal cell proliferation were seen. Therefore, there is no clear advantage in the 3D culture of ovarian tissue, as it is more time-consuming, difficult to perform and less reproducible.

Methods

Ethical statement

The present study was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation (ORBEA Authorization number 11060495/23-11-2016) of the Faculty of Medicine of the University of Coimbra and performed according to European Guidelines and Portuguese Law. The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health was followed to take care of the animals and the ARRIVE guidelines to perform and report the experimental protocols.

Study design

The experimental scheme is shown in Fig. 6. Briefly, ovarian tissue (OT) preparation, cryopreservation, 2D

system or encapsulated model procedure and timescale for the experiment are shown.

Experimental animals

The animal facility of the Faculty of Medicine of the University of Coimbra provided 12 female Rowett nude rats (RNU, homozygous) aged 8-10 weeks and with an average weight of 200 g. Housing, under a 12-h light/dark cycle, was in individually ventilated cages, with access to standard diet and filtered water ad libitum. Animals were distributed in a randomized manner into the study groups described below.

Ovaries collection

Surgical procedures were performed under inhalation anaesthesia with sevoflurane (5%) and with subcutaneous analgesia with carprofen (5 mg/kg, making a total of 0.2 mL per animal).

For bilateral ovariectomy, animals were placed in a supine position and the abdominal wall was shaved, cleaned and sterilized with povidone-iodine solution. A longitudinal median laparotomy was performed with a 2–3 cm incision in the lower area of the abdomen. The ovaries were identified and removed with the ligation of the vascular pedicle [52, 53]. After ensuring adequate haemostasis, the abdominal cavity was closed in layers.

After ovariectomy, the ovaries were placed in cold Dulbecco's phosphatase-buffered solution (DPBS) (Biological Industries, Sartorius, Gottingen, Germany)

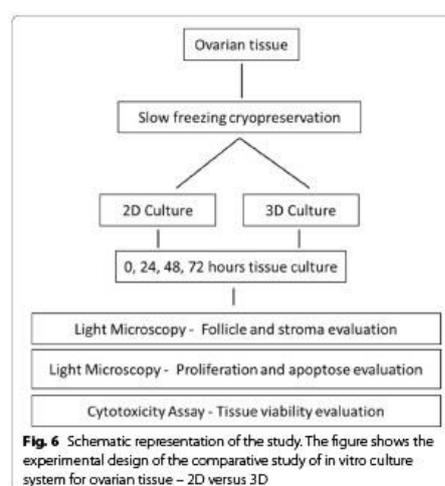


Fig. 6 Schematic representation of the study. The figure shows the experimental design of the comparative study of in vitro culture system for ovarian tissue – 2D versus 3D

supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS) (Biological Industries, Sartorius, Gottingen, Germany) and each ovary was cut in 2 hemi-ovaries ($3 \times 2 \times 1$ mm). The fragments were maintained for 30 min in cold DPBS + 10% FBS before cryopreservation.

Cryopreservation and thawing protocols

The cryopreservation protocol consisted of a slow freezing and a rapid thawing method, adapted from Rosendahl M et al. [54]. The fragments were placed in plastic cryovials (Nunc, Thermo Fisher) containing 1.5 mL of freezing media consisting of 1.5 M ethylene glycol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), 0.1% sucrose (Merck, Darmstadt, Germany) and 10 mg/mL human albumin serum (HAS) (Grifols, Barcelona, Spain), and maintained in an ice bath. The cryovials were transferred to a rolling system for 30 min at 4°C to allow the cryoprotectant to enter the tissue. Then, cooling in a programmable freezer (Planner cryo 10 Series 2 Freezer) followed the subsequent protocol. The starting temperature was 0°C, and it was slowly reduced to -9°C at a rate of -2°C/min. After a 5-min holding time at -9°C, manual seeding was performed, after then the cryovials were cooled to -40°C, at a rate of -0.3°C/min, and the final step, a rapid decrease to -140°C (-10°C/min). When the programme was completed, cryovials were transferred into liquid nitrogen tank and stored for 1 week until thawing.

On the day of the experiment, ovarian fragments were thawed. The vials were air-warmed for 30 s and then immersed in a 37°C water bath for 5 min. The freezing media was removed at room temperature by stepwise dilution of freezing media in sequential thawing media stabilized at room temperature. Three culture dishes were filled with thawing medium I (0.75 M ethylene glycol + 0.25 M sucrose in PBS + 10 mg/mL HAS), medium II (0.25 M Sucrose in PBS + 10 mg/mL HAS), and medium III (PBS + 10 mg/mL HAS). Ovarian fragments were transferred into thawing medium I using sterile forceps and stirred for 10 min at room temperature. The same procedure was performed for thawing media II and III. Thawed tissue was transferred to PBS before culture.

Ovary culture

Hemi-ovaries ($3 \times 2 \times 1$ mm) were cultured in the growth media with and without encapsulation in an alginate matrix scaffold. The conventional culture was defined as 2D and the use of the scaffold as 3D. A 1.5% (w/v) solution of sodium alginate (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) was prepared by mixing into sterile DPBS and heating to 37°C. To encapsulate the ovarian fragments, the agarose (Invitrogen, California, USA) ring protocol was used, adapted from Henry,

2015 [55]. Agarose rings were filled with a layer of alginate matrix, fragments were placed in the ring and they were covered with matrix. Cross-linking solution (50 mM CaCl_2 + 140 mM NaCl) was added, allowing the solution to solidify into a gel around the ovarian organoid.

The gel-organoid was then placed in the growth media to be cultured for 24 h, 48 h and 72 h. The growth media consisted of α -MEM (22561-021, ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA), 10% FBS and 1/1000 penicillin/streptomycin (15140-122, Gibco, ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA).

Tissue morphology and viability

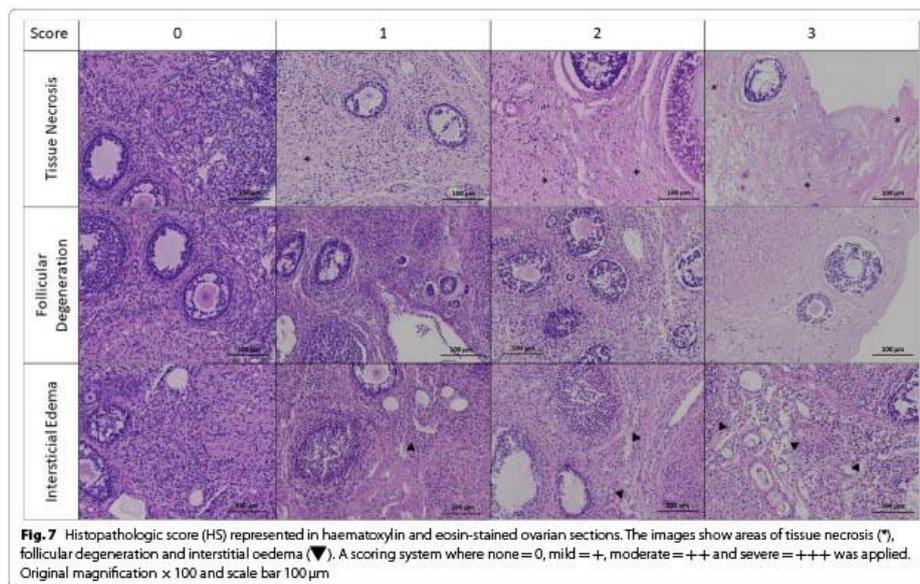
The ovaries were fixed in 4% formaldehyde (Panreac Quimica Sau, Barcelona, Spain), embedded in paraffin, and sectioned serially at 5 μ m. Three sections per transplant were stained with haematoxylin and eosin (HE) for morphological analysis. The images were acquired on the Axioscan Z1 (Carl Zeiss), with a Plan-Apochromat 10x/0.8 lens, and photographed with the Zen 2 program blue edition (Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2011). Histological analysis was performed blindly by a researcher, at two different points in time, using the Image J software.

The criteria for ovarian tissue viability was adapted from criteria previously described for ovarian tissue injury after in vivo experiments of ischemia/reperfusion [40–42, 56]. As shown in Fig. 7, histopathological examination of the tissue damage was performed in terms of three visual parameters: interstitial oedema, follicular cell degeneration and percentage of tissue in necrosis (TNS).

The follicles were histologically classified as degenerated when they included cells with pyknotic nucleus, shrunken ooplasm and disorganized granulosa cells. Follicular degeneration score was calculated as a proportion of the degenerated follicles to the total number of follicles [56]. Oedema is analysed by the subjective quantity of intercellular liquid. The extent of overall necrosis within each ovary was quantified by a visual assessment of the percentage of area in necrosis (TNS) for each specimen [40]. Necrotic cells typically present cytoplasmic hyper eosinophilia, cellular swelling, blebbing, and loss of microvilli [57]. Each parameter was scored using a scale ranging from 0 to 3 (0, none; 1, mild or < 33%; 2, moderate or 33–66%; 3, severe or > 66%) [41]. Total scores were calculated according to these parameters [41]. Ovary sections were analyzed double blind.

Follicular analysis

Follicles were quantified manually and, to avoid double counting, only follicles with a visible nucleus were taken into account. Only morphologically normal follicles were taken into consideration for quantitative analysis. Follicles were then classified according to their maturity



as primordial (constituted by a single layer of flattened granulosa cells), primary (they present a single layer of cuboid granulosa cells) and secondary (composed by two or more layers of granulosa cells around the oocyte) [58]. The pre-antral and antral follicles were grouped with the secondary follicles. Follicle atresia was assessed with morphologic criteria, such as irregular shape, granulosa cell pyknosis, cytoplasmic contraction, presence of vacuoles and ooplasm eosinophilia [58]. Follicular densities were calculated as the number of follicles per area (number/ mm^2), after measuring the tissue by manual surrounding of the surface (Fig. 3C) [59].

Proliferation and apoptosis evaluation

Immunohistochemistry assay was performed with the cell proliferation biomarker rabbit polyclonal antibody Ki-67 (diluted 1:300; PA5-19462, Thermofisher, Waltham, Massachusetts, USA) and cell apoptosis rabbit polyclonal antibody caspase-3 (diluted 1:100; AHP2286, Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA). Antigen retrieval was performed with CC1, pH 8 EDTA/Tris-based buffer (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, USA), followed by primary antibody incubation according to the manufacturer's procedures and the dilutions

previously mentioned. Detection of immunostaining was performed with OptiView DAB IHC Detection Kit (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, USA) in accordance with the manufacturer's recommendations, by the detection of DAB chromogenic substrate precipitated. All the immunostained sections were then nuclear counterstained with haematoxylin, dehydrated in a graded series of ethanol, cleared in xylene and mounted using a synthetic mounting medium.

After the immunohistochemistry protocol, in which the incubation with the cell proliferation indicator (Ki-67) and cell apoptosis (caspase-3), the images were acquired on the Axioscan Z1 (Carl Zeiss), with a Plan-Apochromat 10x/0.8 lens and photographed with the aid of the Zen 2 blue edition program (Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2011). The results analysis was double and blinded.

Follicles were classified as positive or negative for Ki67 and caspase-3 (Figs. 4C, D and 5C, D). For this, positivity was considered when staining was observed in the oocyte and/or in at least one granulosa cell [60, 61]. Regarding the stroma, the quantification of the area marked with each antibody was performed using the Image J program (Fiji version, 1.8.0, USA). Five zones of each sample were randomly selected through the application of a

rectangular grid and the results subsequently presented as an average (Figs. 4E and 5E).

Cytotoxicity evaluation

To evaluate the tissue viability, the lactate dehydrogenase (LDH) released in the culture medium from damaged cells was measured using CytoTox96[®] non-radioactive cytotoxicity assay (Promega G1780, Madison, Wisconsin, USA) [62–64]. The assay was performed according to the manufacturer's protocol. Briefly, after 24 h, 48 h and 72 h of culture, the supernatant of each condition was collected and stored at -20°C . On the day of LDH assay, the CytoTox96[®] reagent was prepared mixing the buffer assay with the substrate mix. To test the effects of 2D vs. 3D culture, 50 μL of culture medium was transferred to a 96 multi-well, flat, clear-bottom plate and mixed with 50 μL CytoTox96[®] reagent and incubated for 30 min, protected from light. After that, 50 μL of stop solution was added to each well, and the optical density at 490 nm was measured using an EnSpire microplate reader. The absorbance values from the conditioned media supernatant were normalized to mean absorbance values calculated from control samples.

Statistical analyses

The number of ovaries to be used was estimated using the G*Power software version 3.1.9.4 (Kiel, Germany). A comparison of results between the seven described groups was considered, with a type I error of 0.05 and a statistical power of 0.90, for an effect size of 0.60. In this way, a total sample size of 66 fragments (9.4 per group) was estimated, with an effective power of 0.901. Therefore, 10 hemi-ovaries were used per group.

Statistical analyses were performed using the SPSS version 22.0 (IBM, Armonk, New York, USA). To compare the 2D and 3D groups, simple linear regression over time was performed using a bootstrapping strategy (1000 samples). The regression coefficient (B), which represents the slope, was reported. A positive B-value means an increase over time, while a negative one means a decrease. For example: $p < 0.001$, $B = 0.033$, $R^2_{\text{adj}} = 0.663$, means that per hour there is a significant increase of 0.033 (B) in the analysed variable and the linear model explains 66% (R^2_{adj}) of the variation over time. Normal distribution was then evaluated to compare the two study groups (2D vs. 3D), which visually showed a reasonable difference. Normally distributed variables were compared by means of the Student t-test and non-normally by means of a Mann-Whitney test. A p -value of less than 0.05 was considered statistically significant. The results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM).

Abbreviations

2D: Two-dimensional; 3D: Three-dimensional; ASRM: American Society for Reproductive Medicine; DPBS: Dulbecco's phosphatase-buffered solution; FBS: Foetal bovine serum; HAS: Human albumin serum; HE: Haematoxylin and eosin; HS: Histopathologic score; LDH: Lactate dehydrogenase; OT: Ovarian tissue; OTC: Ovarian tissue cryopreservation; SEM: Standard error of the mean; TNS: Tissue necrosis score.

Acknowledgments

The authors acknowledge to the Microscopy Imaging Center of Coimbra, at the Center for Neuroscience and Cell Biology (MICC-CNC), for their technical assistance.

Authors' contributions

Conceptualization, A.S.P. and S.R.; methodology, A.S.P., S.R., M.L., F.S. and F.C.; validation, M.L., F.L. and T.A.S.; formal analysis, A.S.P.; investigation, A.S.P. and S.R.; resources, M.L., F.L. and T.A.S.; writing—original draft preparation, A.S.P. and S.R.; writing—review and editing, M.L., F.B. and T.A.S.; supervision, F.L. and T.A.S.; funding acquisition, A.S.P., F.L. and T.A.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

The study was funded by Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra (CHUC), Sociedade Portuguesa de Ginecologia (SPG), Merck[®] and National Funds via FCT (Foundation for Science and Technology) through the Strategic Project UIDB/NEU/04539/2019, UIDB/04539/2020 and UIDP/04539/2020 (CIBB), and by COMPETE-FEDER (POCI-01-0145-FEDER-007440).

Availability of data and materials

Not applicable.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The present study was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation (ORBEA Authorization number 11060495/23-11-2016) of the Faculty of Medicine of the University of Coimbra and performed according to the European Guidelines and Portuguese Law.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

None.

Author details

¹Reproductive Medicine Unit, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), E.P.E., Coimbra, Portugal. ²Obstetrics Department, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal. ³University of Coimbra, Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research (ICBR) Area of Environment Genetics and Oncobiology (CIMAGO), Biophysics Institute of Faculty of Medicine, Coimbra, Portugal. ⁴University of Coimbra, Center for Innovative Biomedicine and Biotechnology (CIBB), Coimbra, Portugal. ⁵Clinical Academic Center of Coimbra (CAC), Coimbra, Portugal. ⁶Center for Neuroscience and Cell Biology (CNC), CIBB, Azinhaga de Santa Comba, Celas, University of Coimbra, Coimbra, Portugal. ⁷PhD Programme in Experimental Biology and Biomedicine, IIIUC - Institute for Interdisciplinary Research, University of Coimbra, Coimbra, Portugal. ⁸Pathology Unit, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), E.P.E., Coimbra, Portugal. ⁹University of Coimbra, Faculty of Medicine, Coimbra, Portugal.

Received: 24 April 2021 Accepted: 6 October 2021

Published online: 01 November 2021

References

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*. 2020;70(1):7–30.

2. Arnold M, Rutherford MJ, Bardot A, Ferlay J, Andersson TML, Myklebust TÅ, et al. Progress in cancer survival, mortality, and incidence in seven high-income countries 1995–2014 (ICBP SURVMARK-2): a population-based study. *Lancet Oncol*. 2019;20(11):1493–505.
3. Akasha AM, Woodruff TK. Oncofertility: preservation of ovarian function after a cancer diagnosis. In: *The ovary*. 3rd ed. Elsevier Inc.; 2019. p. 501–8. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813209-8.00031-5>.
4. Anderson RA, Amant F, Braat D, D'Angelo A, Chuva de Sousa Lopes SM, Demeestere I, et al. ESHRE guideline: female fertility preservation. *Hum Reprod Open*. 2020;2020(4):1–17.
5. Duncan FE, Feinberg E, Brannigan RE, Edmonds M, Ataman L, Woodruff TK. Fertility preservation. In: Yen & Jaffe's reproductive endocrinology: physiology, pathophysiology, and clinical management eighth edition. 8th ed. Elsevier Inc.; 2019. p. 857–886.e6. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-47912-7.00033-0>.
6. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Fertility preservation in patients undergoing gonadotoxic therapy or gonadectomy: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2019;112(6):1022–33. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.09.013>.
7. Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Obstet Gynecol*. 2005;105(1):214.
8. Chen J, Todorov P, Isachenko E, Rahimi G, Mallmann P, Isachenko V. Construction and cryopreservation of an artificial ovary in cancer patients as an element of cancer therapy and a promising approach to fertility restoration. *Hum Fertil*. 2021;1:1–21.
9. Lee S, Ozkavukcu S, Ku SY. Current and future perspectives for improving ovarian tissue cryopreservation and transplantation outcomes for cancer patients. *Reprod Sci*. 2021;28(6):1746–58.
10. Terren C, Nisolle M, Munaut C. Pharmacological inhibition of the PI3K / PTEN / Akt and mTOR signalling pathways limits follicle activation induced by ovarian cryopreservation and in vitro culture. *J Ovarian Res*. 2021;1–15. <https://doi.org/10.1186/s13048-021-00946-5>.
11. Belli M, Vigone G, Merco V, Redi CA, Zuccotti M, Garagna S. Towards a 3D culture of mouse ovarian follicles. *Int J Dev Biol*. 2012;56(10–12):931–7.
12. Monniaux D, Cadoret V, Clément F, Dalbès-Tran R, Ellis S, Fabre S, et al. Folliculogenesis. In: Huhtaniemi I, Martini L, editors. *Encyclopedia of Endocrine Diseases* (Second Edition), vol. 2. Oxford Academic Press; 2019. p. 377–98. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64550-6>.
13. Kapałczyńska M, Kolda T, Przybyła W, Zajęczkowska M, Teresiak A, Filas V, et al. State of the art paper 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci*. 2018;14(4):910–9.
14. Jensen C, Teng Y. Is it time to start transitioning from 2D to 3D cell culture? *Front Mol Biosci*. 2020;7(March):1–15.
15. Kinnear HM, Tomaszewski CE, Chang FL, Moravsek MB, Xu M, Padmanabhan V, et al. The ovarian stroma as a new frontier. *Reproduction*. 2020;160(3):R25–39.
16. Scott J, Carlsson IB, Bavister BD, Hovatta O. Human ovarian tissue cultures: extracellular matrix composition, coating density and tissue dimensions. *Reprod Biomed Online*. 2004;9(3):287–93. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(1062\)143-8](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(1062)143-8).
17. King SM, Quartuccio S, Hilliard TS, Inoue K, Burdette JE. Alginate hydrogels for three-dimensional organ culture of ovaries and oviducts. *J Vis Exp*. 2011;52(June):4–9.
18. Jackson KS, Inoue K, Davis DA, Hilliard TS, Burdette JE. Three-dimensional ovarian organ culture as a tool to study normal ovarian surface epithelial wound repair. *Endocrinology*. 2009;150(8):3921–6.
19. Rivas Leonel EC, Lucci CM, Amorim CA. Cryopreservation of human ovarian tissue: a review. *Transfus Med Hemother*. 2019;46(3):173–81.
20. 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.
21. Gunasena KT, Villines PM, Critser ES, Critser JK. Live births after autologous transplant of cryopreserved mouse ovaries. *Hum Reprod*. 1997;12(1):101–6.
22. Eppig JJ, O'Brien MJ. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol Reprod*. 1996;54(1):197–207.
23. Smitz J, Dolmans MM, Donnez J, Fortune JE, Hovatta O, Jewgenow K, et al. Current achievements and future research directions in ovarian tissue culture, in vitro follicle development and transplantation: implications for fertility preservation. *Hum Reprod Update*. 2010;16(4):395–414.
24. Wagner M, Yoshihara M, Douagi I, Damdimopoulos A, Panula S, Petropoulos S, et al. Single-cell analysis of human ovarian cortex identifies distinct cell populations but no oogonial stem cells. *Nat Commun*. 2020;11(1):1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14936-3>.
25. Vanacker J, Amorim CA. Alginate: a versatile biomaterial to encapsulate isolated ovarian follicles. *Ann Biomed Eng*. 2017;45(7):1633–49.
26. Desai N, Alex A, AbdelHafez F, Calabro A, Goldfarb J, Fleischman A, et al. Three-dimensional in vitro follicle growth: overview of culture models, biomaterials, design parameters and future directions. *Reprod Biol Endocrinol*. 2010;8(1):119 Available from: <http://www.rbej.com/content/8/1/119>.
27. Fathi R, Valojerdi MR, Ebrahimi B, Eivazkhani F, Akbarpour M, Tahaei LS, et al. Fertility preservation in cancer patients: in vivo and in vitro options. *Cell J*. 2017;19(10):173–83 Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5412777/pdf/CellJ-19-173.pdf>.
28. Higuchi CM, Maeda Y, Horiuchi T, Yamazaki Y. A simplified method for three-dimensional (3-D) ovarian tissue culture yielding oocytes competent to produce full-term offspring in mice. *PLoS One*. 2015;10(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143114>.
29. Pangas SA, Saudye H, Shea LD, Woodruff TK. Novel approach for the three-dimensional culture of granulosa cell-oocyte complexes. *Tissue Eng*. 2003;9(5):1013–21.
30. Xu M, West E, Shea LD, Woodruff TK. Identification of a stage-specific permissive in vitro culture environment for follicle growth and oocyte development. *Biol Reprod*. 2006;75(6):916–23.
31. Heise M, Koepsel R, Russell AJ, McGee EA. Calcium alginate microencapsulation of ovarian follicles impacts FSH delivery and follicle morphology. *Reprod Biol Endocrinol*. 2005;3:1–8.
32. Amorim CA, Van Langendonck A, David A, Dolmans MM, Donnez J. Survival of human pre-antral follicles after cryopreservation of ovarian tissue, follicular isolation and in vitro culture in a calcium alginate matrix. *Hum Reprod*. 2009;24(1):92–9.
33. Andersen T, Auk-Emblem P, Dornish M. 3D cell culture in alginate hydrogels. *Microarrays*. 2015;4(2):133–61.
34. Gurski L, Jha A, Zhang C, Jia X, Farach-Carson M. Hyaluronic acid-based hydrogels as 3D matrices for in vitro evaluation of chemotherapeutic drugs using poorly adherent prostate cancer cells. *Biomaterials*. 2009;30(30):6076–85 Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>.
35. Hoarau-Véhot J, Rafi A, Touboul C, Pasquier J. Halfway between 2D and animal models: are 3D cultures the ideal tool to study cancer-microenvironment interactions? *Int J Mol Sci*. 2018;19(1):181.
36. Edmondson R, Broglio JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol*. 2014;12(4):207–18.
37. Khattak SF, Spataro M, Roberts L, Roberts SC. Application of colorimetric assays to assess viability, growth and metabolism of hydrogel-encapsulated cells. *Biotechnol Lett*. 2006;28(17):1361–70.
38. Brito IR, Lima IMT, Xu M, Shea LD. Three-dimensional systems for in vitro follicular culture: overview of alginate-based matrices. *Reprod Fertil Dev*. 2014;26:915–30.
39. Javed MH, Azimuddin SMI, Hussain AN, Ahmed A, Ishaq M. Purification and characterization of lactate dehydrogenase from Varanus liver. *Exp Mol Med*. 1997;29(1):25–30.
40. Asfour V, Polson A, Varma R, Menon P. Evaluating ovarian preservation after ovarian torsion using the ovarian preservation score and tissue necrosis score. *Clin Obstet Gynecol Reprod Med*. 2015;1(2):34–9.
41. Guven S, Muci E, Unsal MA, Yulug E, Alver A, Duman MK, et al. The effects of carbon dioxide pneumoperitoneum on ovarian blood flow, oxidative stress markers, and morphology during laparoscopy: a rabbit model. *Fertil Steril*. 2010;93(4):1327–32. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.10.053>.
42. Eser A, Hizi D, Haldas H, Namuslu M, Kosus A, Kosus N, et al. Effects of curcumin on ovarian ischemia-reperfusion injury in a rat model. *Biomed Rep*. 2015;3(6):807–13.
43. Lee SY, Ju MK, Jeon HM, Jeong EK, Lee YJ, Kim CH, et al. Regulation of tumor progression by programmed necrosis. *Oxidative Med Cell Longev*. 2018;2018:3537471.

44. Ojala M, Erkkilä K, Tuuri T, Sjöberg J, Suomalainen L, Suikkari AM, et al. Cell death and its suppression in human ovarian tissue culture. *Mol Hum Reprod*. 2002;8(3):228–36.
45. Orive G, Ponce S, Hernández RM, Gascón AR, Igartua M, Pedraz JL. Biocompatibility of microcapsules for cell immobilization elaborated with different type of alginates. *Biomaterials*. 2002;23(18):3825–31.
46. Lee KY, Mooney DJ. Alginate: properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci*. 2012;37(1):106–26.
47. Hussein MR. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Hum Reprod Update*. 2005;11(2):161–77.
48. Cohen GM. Caspases: executioners of apoptosis. *Biochem J*. 1997;326:1–16.
49. Izawa M, Nguyen PH, Kim HH, Yeh J. Expression of the apoptosis-related genes, caspase-1, caspase-3, DNA fragmentation factor, and apoptotic protease activating factor-1, in human granulosa cells. *Fertil Steril*. 1998;70(3):549–52.
50. Krajewska M, Wang HG, Krajewski S, Zapata JM, Shabaik A, Gascoyne R, et al. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of CPP32 (Caspase-3), a cell death protease. *Cancer Res*. 1997;57(8):1605–13.
51. Milenkovic M, Diaz-Garcia C, Wallin A, Brännström M. Viability and function of the cryopreserved whole rat ovary: comparison between slow-freezing and vitrification. *Fertil Steril*. 2012;97(5):1176–82.
52. Di Loreto VE, Pera LJ, Rigalli A. In: Rigalli A, Di Loreto V, editors. *Experimental surgical models in the laboratory rat*. 1st ed; 2009. p. 149–51.
53. Khajuria DK, Razdan R, Mahapatra DR. Descrição de um novo método de ooforectomia em ratas. *Rev Bras Reum*. 2012;52(3):462–70 Available from: <http://www.scielo.br/pdf/rbr/v52n3/v52n3a16.pdf>.
54. Rosendahl M, Schmidt KT, Ernst E, Rasmussen PE, Loft A, Byskov AG, et al. Cryopreservation of ovarian tissue for a decade in Denmark: a view of the technique. *Reprod Biomed Online*. 2011;22(2):162–71. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2010.10.015>.
55. Henry L, Labied S, Fransolet M, Kirschvink N, Blacher S, Noel A, et al. Isoform 165 of vascular endothelial growth factor in collagen matrix improves ovine cryopreserved ovarian tissue revascularisation after xenotransplantation in mice. *Reprod Biol Endocrinol*. 2015;13:1–10.
56. Yildirim N, Yigitturk G, Sahingoz Yildirim AG, Akdemir A, Ilgen C, Yeniel C, et al. Octreotide protects ovary against ischemia-reperfusion injury in rats: evaluation of histological and biochemical parameters. *J Obstet Gynaecol Res*. 2015;41(10):1591–7.
57. Brown K, Awan NA, Le PH, Wilson AM. *Histology, Cell Death*. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526045/>. [cited April 24, 2021]
58. Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev*. 1996;17(2):121–55.
59. Fransolet M, Labied S, Henry L, Masereel MC, Rozet E, Kirschvink N, et al. Strategies for using the sheep ovarian cortex as a model in reproductive medicine. *PLoS One*. 2014;9(3):1–7.
60. 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):1350–7.
61. Dolmans MM, Binda MM, Jacobs S, Dehoux JP, Squifflet JL, Ambroise J, et al. Impact of the cryopreservation technique and vascular bed on ovarian tissue transplantation in cynomolgus monkeys. *J Assist Reprod Genet*. 2015;32(8):1251–62.
62. Korzeniewski C, Callewaert DM. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J Immunol Methods*. 1983;64(3):313–20.
63. De Michele F, Poels J, Weerens L, Pettit C, Evrard Z, Ambroise J, et al. Preserved seminiferous tubule integrity with spermatogonial survival and induction of Sertoli and Leydig cell maturation after long-term organotypic culture of prepubertal human testicular tissue. *Hum Reprod*. 2017;32(1):32–45.
64. Keshaw H, Forbes A, Day RM. Release of a angiogenic growth factors from cells encapsulated in alginate beads with bioactive glass. *Biomaterials*. 2005;26(19):4171–9.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



4. Santos ML, Pais AS, Almeida Santos T. *Fertility preservation in ovarian cancer patients.* *Gynecol Endocrinol.* 2021;37(6):483-489. Doi: 10.1080/09513590.2021.1872534.

5.

GYNECOLOGICAL ENDOCRINOLOGY
https://doi.org/10.1080/09513590.2021.1872534

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

ORIGINAL ARTICLE

Check for updates

Fertility preservation in ovarian cancer patients

Maria Luísa Santos^a , Ana Sofia Pais^{a,b}  and Teresa Almeida Santos^{a,b} 

^aFaculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal; ^bReproductive Medicine Unit, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal

ABSTRACT
Ovarian cancer is more frequent in post-menopausal women, however it can also occur in young premenopausal women. After diagnosis and cancer staging, health care providers should address the possibility of infertility and might offer fertility preservation options. Chemotherapy, frequently used when treating ovarian cancer, has proven to cause extensive ovarian damage. Standard surgery may be aggressive and the recurrence risk may not be relevant enough to opt for these approaches. Fertility sparing surgery has been progressively accepted and many alternative surgical approaches have proven to be successful in both cancer treatment, fertility preservation and low recurrence rates. Though there are several techniques available for fertility preservation in cancer patients, when dealing with ovarian cancer patients, oocyte and embryo cryopreservation are the only suitable. Ovarian tissue cryopreservation has been largely studied, but no data on ovarian cancer patients exist, due to the risk of reimplanting cancer cells.

ARTICLE HISTORY
Received 23 April 2020
Revised 5 August 2020
Accepted 4 January 2021
Published online 27 January 2021

KEYWORDS
Ovarian neoplasms; fertility preservation; chemotherapy; organ sparing treatments; GnRH

Introduction

According to the American Cancer Society, a woman has a risk of 1 in 78 of having ovarian cancer in her lifetime. Most ovarian cancers occur in post-menopausal women [1], but there is still a significant number of cases in women of reproductive age as 12.1% of ovarian cancer patients are younger than 44-years-old [2].

In the last few years, a concern about these young women who are diagnosed with ovarian cancer has emerged as most therapeutic options cause infertility, either by premature ovarian failure caused by cytotoxic agents in chemotherapy or surgical approaches that include uni or bilateral oophorectomy [2,3]. Thus, fertility preservation should be discussed before beginning treatment [4].

Options for fertility preservation in cancer patients include oocyte, embryo and ovarian tissue cryopreservation as established methods and *in vitro* maturation of oocytes as an experimental method Fertility sparing surgery should also be considered when possible [5–7].

Fertility preservation for cancer patients is a recent area in development and regarding ovarian cancer patients, the existing information is scarce Thus, the purpose of this narrative review is to define the current knowledge on fertility preservation options and indications for ovarian cancer patients, as well as the limitations and the needed studies.

Methods

A research was carried out on PubMed using the MESH terms ‘ovarian neoplasms’, ‘fertility preservation’ and ‘chemotherapy’. Inclusion criteria were articles published in the last 5 years (2014–2019); papers written in portuguese, english and spanish; referring to fertility preservation options in cancer patients;

studies on the use of ovarian suppression during chemotherapy; and articles on fertility preservation methods in ovarian cancer.

Articles who referred to fertility preservation in other cancer, isolated case studies, prognostic and surgical treatment indications for ovarian cancer were excluded.

Results

Chemotherapy and its gonadotoxic effect

Chemotherapy may be indicated to treat ovarian cancer and carries a risk of premature ovarian failure due to its gonadotoxic effect, especially since ovaries are very sensitive to cytotoxic drugs. The ovarian damage induced by chemotherapy is irreversible and progressive [8–11]. The primordial follicles’ apoptosis is accompanied with a reduction of anti-Müllerian hormone (AMH) levels that causes activation of the remaining follicles, leading to the burn-out effect of the ovarian reserve [5,12,13]. This risk depends on the chemotherapy agent used, the dose given, duration of the administration, patient’s age and baseline ovarian reserve. The risk of ovarian failure according to the chemotherapeutic agent used are systematized in Table 1. Even when patients present with the diagnosis of unilateral ovarian cancer, fertility preservation options must be offered considering the chance of damage to the contralateral ovary during chemotherapy [2,15].

According to the American Cancer Society, the chemotherapy regimen recommended for ovarian cancer involves a combination of two drugs: a platinum compound (cisplatin or carboplatin) and a taxane (paclitaxel or docetaxel) [3]. The platinum compounds cause DNA damage by inducing chromosomal damage and DNA cross-links and represent an intermediate risk of gonadotoxicity, premature ovarian failure and a medium risk of amenorrhea (20–80%). Cisplatin affects primarily oocytes. Taxanes are mitotic inhibitors as they inhibit microtubule

CONTACT Maria Luísa Santos  marialuisas@gmail.com  Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal
© 2021 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

Table 1. Risk of ovarian failure according to the chemotherapeutic agents used [14].

Medium risk	Alkylating agents	Cisplatin Carboplatin Doxorubicin Paclitaxel Docetaxel Abraxane Taxotere
	Cytoskeletal disruptors	Bleomycin (antibiotic) Dactinomycin (antibiotic) Methotrexate Mercaptopurine Fluorouracil Vincristine Vinblastine
Low or no risk	Alkylating agents	Cyclophosphamide Ifosfamide
	Antimetabolite agents	Nitrosoureas Chlorambucil Melphalan Busulfan Procarbazine
High risk	Alkylating agents	

formation and spindle function. Its risk for ovarian failure is controversial in literature, but animal studies have found that Paclitaxel damages mature oocytes and affects short-term reproductive potential [2,5,11,12,15–19]. Therefore, fertility preservation options must be completed before starting chemotherapy treatment [5,20,21].

Fertoprotective agents

Fertoprotective adjuvant therapy aims to reduce or eliminate the gonadotoxic effect of chemotherapy by administering an agent before or during the treatment [5].

The most studied option and the only used in clinical practice for preventing premature ovarian failure is the administration of gonadotrophin releasing hormone (GnRH) agonists that temporarily suppress ovarian function. This option is based on evidence that maintenance of ovarian function after chemotherapy is more frequent in women treated before puberty than in women treated after menarche [5,22–24]. Thus, in prepubertal women, this treatment is not recommended, as the ovarian cycle is not settled [8,10,16,22,25–27].

GnRH agonists appear to be more effective in low/medium toxicity treatments than in high toxicity chemotherapy regimens. This may be due to highly toxic agents causing ovarian damage through multiple mechanisms besides follicle destruction: cortical fibrosis, vascular lesions and accelerated atresia [10,14,22].

Although it has been shown that menses and ovulation recover faster, it should not be interpreted as an accurate marker of success, since menstrual resumption post-treatment is not indicative of resumed ovulation and residual ovarian function has been described in patients with persistent amenorrhea [10]. There is no evidence of GnRH analogs' success in long term fertility nor has it shown proof of pregnancy rate improvement after treatment. Furthermore, important side effects after treatment with GnRH agonists have been reported such as bone loss, hot flashes, vaginal dryness, headaches, mood swings and depression and also amenorrhea and possible interference with response to cancer treatment in estrogen-sensitive tumors [5,9,23,26,28].

Drugs such as sphingosine-1-phosphate (S1P), amifostin, imatinib, thalidomide, granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), tamoxifen, ammonium trichloro (dioxoethylene-O,O') tellurate (AS101) and melatonin are being studied in this field

[2,5,17,20,22,29–31]. S1P, amifostin and imatinib inhibit apoptosis [2,5,20,30]. Imatinib mesylate can become particularly useful against cisplatin, because it inhibits apoptosis by blocking c-Abl molecule. However, there are several reports that state that imatinib could not protect dormant oocytes from cisplatin-mediated apoptosis to prevent loss of fertility [2,17,18,22]. S1P therapy is controversial because, as it has both proangiogenic and antiapoptotic effects, it can increase the risk of disease progression [31]. Thalidomide is an inhibitor of vascular endothelial growth factor (VEGF) and reduces ovarian blood flow, thus reducing the concentration of drugs that reach the ovaries [5,20]. G-CSF stimulates bone marrow production of granulocytes and stem cells and stimulates neo-vascularization following ischemia and, in theory, may decrease chemotherapy-related blood vessel loss and the associated focal ischemia, one of the chemotherapy-related causes for follicle loss [20]. Tamoxifen, an antagonist of estrogen receptor, acts as an antioxidant and its administration significantly decreased chemotherapy-induced follicle loss as well as improved fertility [20,22,30]. AS101 causes modulation of follicle activation pathways reducing follicle activation [5,17,18,22,29]. Several studies have demonstrated that melatonin treatment protects depletion of germ cells during chemotherapy and that the combined treatment with cisplatin significantly prevented primordial follicle loss through suppression of the activation of the PIP3/AKT/FOXO3a signaling pathway [30].

All these potentially useful agents for fertility preservation must not only gather proof of their efficacy, but must also demonstrate the absence of interference with the anti-cancer activity of the chemotherapy drugs and with the production of genetically compromised oocytes [20].

Fertility sparing surgery

Fertility concerns may affect the course of treatment decisions in young women with cancer [29]. When dealing with gynecological malignancies, there is an increasing focus on surgical techniques that preserve the reproductive organs without affecting survival rates [32].

Fertility sparing surgery can be suggested depending on histology, stage of disease and preexisting ovarian reserve, but there is not a consensus on the criteria for conservative approach [33]. Thus, conservative surgery should only be considered after adequate staging and followed by careful follow-up [34]. In women with early-stage ovarian cancer, fertility sparing surgery is associated with relapse rates from 9% to 29%, 5-year survival rates from 83% to 100% and recurrences rate in the remaining ovary of 5% [29]. If an unilateral lesion is found and contralateral ovary appears completely normal, the risk of occult malignancy is under 3%, so biopsy of that ovary should be avoided, because it may lead to diminished fertility due to adhesion formation or decreased ovarian reserve [5,8,29].

When dealing with borderline tumors, traditional surgical approach is total hysterectomy with bilateral salpingo-oophorectomy. Conservative treatment involves unilateral salpingo-oophorectomy or ovarian cystectomy and can be performed in patients who have limited disease and wish to preserve fertility. Ovarian cystectomy, although reasonable, carries a 30% risk of recurrence, while unilateral salpingo-oophorectomy carries an approximate risk of 8%. After conservative surgery in patients with early stage borderline tumors, spontaneous pregnancy rate is 54% and the risk of recurrence is 0.5%, while for advanced stage tumors it is 34% and 2%, respectively. Even if recurrent lesions occur, the majority will be located on the contralateral ovary, thus these patients can be

treated with success through a second salvage surgery. Intensive follow-up must be carried out, even if the risk of progressing to carcinoma is small. Complete surgical staging with exploration of the entire abdominal cavity, peritoneal washings, infracolic omentectomy and multiple peritoneal biopsies is essential as 20% of the patients may have noninvasive as well as invasive metastatic implants [5,8,16,29,32].

In case of nonepithelial ovarian tumors, especially germ cell tumors, fertility sparing surgery namely unilateral salpingo-oophorectomy can be an eliminatory safe option, because bilateral disease is uncommon. It is important to remove the complete tumor, to perform washings, examination and palpation of the omentum (and resection if necessary) and examination and palpation of the iliac and aorto-caval nodes. The few case studies which exist on conservative treatment in advanced stages, show that it can have good results on oncologic safety and reproductive outcomes (even in stage IIIc). As this type of tumor is rare to find in advanced stages, more studies are necessary to consider conservative treatment as a choice [5,8,20,35]. In sex cord stromal tumors, fertility-sparing surgery is considered safe in stage I, even though the need for complete bilateral pelvic and para-aortic lymphadenectomy remains controversial [36].

In patients with invasive epithelial ovarian cancer, treatment usually includes hysterectomy, bilateral salpingo-oophorectomy, abdominal pelvic washing, biopsies and full lymphadenectomy and it is followed by chemotherapy in all patients aside from IA grade I and IB grade I lesions. For early stage epithelial ovarian cancer, studies show that fertility sparing surgery in stage I patients does not hold a higher recurrence risk. This can be done as long as there is encapsulated, well differentiated and unilateral disease, with no extra ovarian metastasis, adhesion or ascites. No association was found between overall survival and fertility-sparing surgery, except in certain subgroups of women with aggressive tumor characteristics. Fertility-sparing surgery for

epithelial ovarian cancer includes unilateral salpingo-oophorectomy and surgical staging with peritoneal sampling, omentectomy and pelvic and para-aortic lymphadenectomy [5,8,11,29,32,33,37]. In ovarian clear-cell carcinoma, fertility sparing surgery can be considered in stage I, specially stage IA and IC1.

Table 2 sums up the information gathered on fertility sparing surgery in ovarian tumors.

For patients with stage I disease and grade 3 tumors, fertility sparing surgery is not recommended, due to high risk of local and distant relapses [29].

In stage II-III ovarian cancer, radical surgery remains the standard treatment. In these patients, recurrence and mortality rates reach 42.8% and 23.8% after fertility sparing surgery [29].

Fertility preservation methods

Oocyte cryopreservation

Oocyte cryopreservation is an established method in the clinical field in fertility. It does not carry a risk to reimplant malignant cells [5,15,17,23,25,39]. However, this method does not restore the possibility of spontaneous pregnancy nor ovarian function. Comparing to embryo cryopreservation, this technique maintains woman's reproductive autonomy and provides an option for those who have ethical or religious objections to freezing embryos [5,15,25]. Oocyte cryopreservation is not indicated in women who cannot delay treatment, patients with estrogen-sensitive tumors, pre-pubertal girls and patients that are considered to have a to have a significant risk of infection, bleeding or spreading cancer cells during the oocytes' harvest [5,17,25,40].

There are some case reports on live birth after oocyte cryopreservation in ovarian cancer [41,42]. However, it has been reported that cancer patients have a lower live birth ratio after oocyte vitrification [9,25]. Cancer patients may have diminished

Table 2. Fertility sparing surgery options for ovarian tumors [5,8,16,20,29,32,33,35–38].

Tumor type	Fertility sparing surgery	Indications and limitations
Borderline tumors	Unilateral salpingo-oophorectomy or cystectomy + Complete surgical staging: • Abdominal cavity exploration; • Peritoneal washings; • Infracolic omentectomy; • Multiple peritoneal biopsies.	- Limited disease; - Unilateral salpingo-oophorectomy is preferred – lower risk of recurrence (8%); - Second salvage surgery may be necessary – possible recurrent borderline lesions on the contralateral ovary; - Minor foci of typical endometrioid adenocarcinoma at pathological examination is possible.
Nonepithelial tumors – germ cell tumors	Unilateral salpingo-oophorectomy + - Spare the fallopian tube if not adherent to the tumor + Complete surgical staging: - Peritoneal washings - Examination and palpation of the omentum (and resection, if necessary) - Examination and palpation of the iliac and aorto-caval nodes	- Good results on oncologic safety and reproductive outcomes in advanced stages (even in stage IIIc); - Further studies are necessary.
Epithelial tumors	Unilateral salpingo-oophorectomy Complete surgical staging: - Peritoneal sampling; - Omentectomy; - Pelvic and para-aortic lymphadenectomy.	- In stage I patients, fertility sparing surgery doesn't hold a higher recurrence risk. - Performed if the tumor is encapsulated, well differentiated and unilateral disease, with no extra ovarian metastasis, adhesion or ascites.
Clear-cell carcinoma	Unilateral salpingo-oophorectomy + Full peritoneal staging. Systematic retroperitoneal lymphadenectomy, wedge resection of the contralateral ovary and omentectomy can be necessary.	Fertility sparing surgery can be considered in stage I - IA - IC1.
Sex cord stromal tumors	Unilateral salpingo-oophorectomy preserving the uterus + Necessity of complete bilateral pelvic and para-aortic lymphadenectomy is controversial.	Stage IA/IC

ovarian reserve at the time of diagnosis and a lower response to stimulation. It is not clear if these differences are related to cancer diagnosis itself or to differences in stimulation protocols, since randomized trials are not available [43].

In patients with estrogen-sensitive cancers, such as granulosa cell tumors and breast cancer, it is recommended by the fertility preservation network *FertiPROTEKT* to use ovarian stimulation combined with letrozole 2.5–5 mg daily. Tamoxifen has also been added to these protocols to minimize the estradiol peak. Letrozole, an aromatase inhibitor that abolishes estradiol biosynthesis, is well tolerated and can avoid an estradiol rise, however it has been described that it decreases the total number of oocytes available for cryopreservation [5,17,22,23,44–46].

BRCA mutations can be present in ovarian cancer patients, especially in young women. These mutations are associated with a lower ovarian reserve, even though clinical proof and findings are limited. Studies suggest that these patients have a poorer response to controlled ovarian stimulation. Patients that carry BRCA mutations should opt for oocyte and embryo cryopreservation, since ovarian tissue cryopreservation is not the ideal solution, even in patients with no detected ovarian malignancy at the time of diagnosis. Moreover, preimplantation genetic diagnosis plays an important role, giving the possibility to transmit the BRCA gene mutation [47,48].

There are no data on the risk of relapse after stimulation treatment in patients with ovarian cancers. Although this risk has been reported in borderline tumors, the existent data is scarce [13]. So in ovarian cancer patients, oocytes should be collected during surgery since transvaginal oocyte retrieval can cause ovarian capsule and/or mass rupture and cancer cells spillage with multiple transvaginal needle passes, affecting staging up from IA to IC. Due to possible distortion of the anatomy caused by mass effect and neovascularity there is a higher risk of complications during retrieval. Intraoperative retrieval is advised as it allows direct inspection of the pelvic anatomy and avoidance of the malignant tissue while collecting oocytes [2,44].

Fertility preservation outcomes could improve by combining ovarian tissue retrieval followed by prompt ovarian stimulation. To eliminate the risk to rupture the ovarian mass or the ovarian capsule, retrieval can be done directly from the oophorectomized ovaries. The mature oocytes would then be collected and cryopreserved by vitrification. Studies have shown that it does not diminish the number of oocytes collected and it may increase the procedure's efficacy [22,25,49].

Ex vivo oocyte retrieval is being studied as an option for ovarian cancer patients since conventional *in vivo* oocyte retrieval can cause rupture of the ovarian capsule and subsequent cell spillage in the peritoneal cavity and possible upstaging. This retrieval technique can be carried out after controlled ovarian stimulation or, in case there is no time or safety conditions for ovarian stimulation, followed by *in vitro* maturation. Data gathered shows that controlled ovarian stimulation followed by *ex vivo* retrieval is superior or similar to *ex vivo* retrieval followed by *in vitro* maturation. The time elapsed from the oophorectomy to the oocyte retrieval must be minimum due to the meiotic disruption caused by temperature changes and the ischemia that settles after the ovary removal [50–52].

Embryo cryopreservation

Embryo cryopreservation is one of the most established fertility preservation methods. Its success depends on the number and quality of the oocytes retrieved as well as the resulting embryos

to be stored. It does not involve any risk of malignant cell implantation [5,17,23,25].

Controlled ovarian stimulation is required so the same risks apply to embryo cryoconservation [5,15,17]. No specific information was found on embryo cryopreservation in ovarian cancer patients.

Furthermore, embryo cryopreservation requires a sperm sample for fertilization. This decreases the women's reproductive autonomy and raises important ethical, legal and religious questions about the embryos' future if the patient dies or if the partners separate before using the embryos [5].

Ovarian tissue cryopreservation

Ovarian tissue cryopreservation involves surgically removing the entire ovarian cortex or strips of tissue before initiating gonadotoxic treatments [29]. After collecting the tissue, histopathologic exams should be made in some fragments to determine the presence of malignant cells and evaluate the density of primordial follicles [11,12,16,23,27,31,53].

Ovarian tissue cryopreservation does not delay cancer treatment as it can be done immediately after correct staging and independently from menstrual cycle. It is safe for hormone-dependent tumors as it does not require controlled ovarian stimulation and it is currently the only option available for prepubertal girls. The great advantage of this technique is that it may restore not only fertility but also endocrine function [12,17,18,53].

After oncological treatment, the tissue can be thawed and transplanted back. Pregnancy may then occur spontaneously or through *in vitro* fertilization, if other infertility factors exist [18,39,53].

The major concern about ovarian tissue cryopreservation is the risk of reimplanting malignant cells as these cells can survive the freeze-thaw process. This risk exists, because most cases of fertility preservation are carried out before initiating cancer treatment. Reintroducing the original ovarian tissue could hence reseed malignant cells. The risk of ovarian metastasis varies according to the primary cancer location [2,8,9,11,22,23,40]. Research on the risk of metastasis relies on autopsies' data and do not necessarily represent the real clinical risk for recurrence after ovarian tissue orthotopic transplant, especially in patients who achieve complete disease remission and have a favorable prognosis. So far, few reports of cancer recurrence have been documented [23,53].

Histological analysis may be useful, but it is not enough to exclude the possibility of reintroducing malignant cells. The way to better detect malignant cells in cryopreserved ovarian cortex is currently under investigation [12,16,23,27,31,53]. Moreover, the risk of malignant transformation of the ovarian tissue may be increased by the rapid temperature changes that occur during the cryopreservation process and exposure to cryoprotectant. Although the incidence of subsequent benign or malignant pathology that might appear in ovarian grafts is uncertain, so regular gynecologic surveillance is recommended [12,27,45,46,54].

Specific data about recurrence risk in ovarian cancer patients after ovarian tissue cryopreservation and reimplantation do not exist, but its use is usually restricted to malignancies that do not affect the ovary directly. Some authors have considered benign and borderline ovarian tumors and selected cases of ovarian carcinoma (stage IA) as indications for ovarian tissue cryopreservation [55].

***In vitro* maturation of oocytes**

In vitro culture of immature oocytes is still experimental [2,25,29,44]. The optimal matrix for growing human primordial follicles remains unknown. The cryopreservation protocols and culture system have to be improved [9,17,22,23].

As *in vitro* maturation has been performed in girls as young as 5-year-old, it should be explored as a possibility for fertility preservation in pre-pubertal girls or those who do not have time to go through ovarian stimulation since it can be performed with little or no prior stimulation, thus hoping to avoid both ovarian stimulation and delaying cancer treatment [5,29,44].

The data about its value and safety in cancer patients is scarce. There is no information on whether *in vitro* matured oocytes have the same pregnancy rate results as vitrified-warmed mature oocytes obtained after standard ovarian stimulation [5,16,22,56]. It may be a future safe alternative for ovarian tissue cryopreservation in ovarian cancer, myeloid leukemia and acute lymphocytic leukemia patients [23,32].

Artificial ovary

Isolating primordial follicles and transferring them onto an especially designed scaffold would eliminate the risk of reimplanting malignant cells and enable its use in ovarian cancer patients. Even so, as artificial ovaries require the inclusion of stroma cells, the risk of cancer reseeding may not be completely eliminated [9,22,31].

In the Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology, in 2018, researchers stated that they had successfully isolated and grew human follicles to a point of biofunctionality on a bioengineered ovarian scaffold made of decellularized ovarian tissue. The early stage follicles were isolated from ovarian tissue before cryopreservation [8].

Further studies are necessary to optimize the ovarian scaffold and to evaluate the pregnancy rate using this method [8].

Discussion

Few data are available regarding fertility preservation methods in ovarian cancer patients. Most research focus on general considerations or non-gynecological malignancies.

There is a need for high quality randomized controlled trials or meta-analyses to support the use of GnRH analogs. Given that resuming menses is not an adequate indicator, studies using anti-Müllerian hormone levels should be prioritized and developed. It is equally important to create a consensus on the age of patients considered for ovarian suppression and inclusion in studies [57,58]. Different gonadotoxicity of chemotherapy regimens must be evaluated as it may significantly effect the success of GnRH agonist treatment. It is also imperative to determine whether this method interferes with the success of the chemotherapy treatment [11,58]. Another important limitation is the lack of data on pregnancy rates after GnRH agonist use [28]. Thus, GnRH agonists should not replace proven techniques of fertility preservation and should be considered an experimental intervention until high quality evidence is available to support recommendations for clinical use [10].

As for the remaining fertoprotective agents, most of them are in a preliminary stage of development and must gather proof their value by evaluating the ovarian reserve after chemotherapy and the reproductive outcomes. It must also be confirmed that these drugs do not interfere with cancer treatment nor produce genetically comprised embryos [59].

Data on recurrence after fertility sparing surgery is scarce and must be gathered in other to evaluate its application on different histological cancer types and different staging. Careful considerations should be carried out to properly inform the patients on the recurrence risk. Also, thorough gynecological surveillance is needed and protocols on the follow-up should be established [34].

In ovarian cancer patients, oocyte and embryo cryopreservation are the standard fertility preservation treatments. Embryo cryopreservation is considered as a second option due to its ethical, legal and religious issues. As long as the patient is eligible, conservative gynecologic surgery is also standard treatment [29]. The success of oocyte and embryo cryopreservation in ovarian cancer patients requires further analysis regarding pregnancy rates and births in these patients.

Ovarian cryopreservation followed by orthotopic reimplantation is now considered the best option for prepubertal girls and patients who must undergo urgent gonadotoxic treatment, as it does not require controlled ovarian stimulation [23]. Moreover, this technique has the potential to affect both fertility and endocrine outcome [26]. The absence of data regarding its use in ovarian cancer patients is due to the impossibility to ensure that the ovarian tissue cryopreserved has no cancer cells [23,26]. Even so, some studies consider that ovarian tissue cryopreservation should be considered as an option (benign and borderline ovarian tumors and also in selected cases of ovarian carcinomas) since its beneficial effect surpasses the risk of cancer recurrence [55].

Both *in vitro* maturation of oocytes and the artificial ovary remain experimental strategies with very little data available [25].

Conclusion

In ovarian cancer patients, fertility preservation options are very limited. Oocyte cryopreservation is still the best option and the only one established along with embryo cryopreservation. Fertility preservation surgery must be carefully thought-through and involve a multi-disciplinary assessment of the chance of recurrence. The artificial ovary and *in vitro* maturation of oocytes is a very attractive option in these patients, but further milestones have to be achieved. Ovarian tissue cryopreservation will not be an option as long as the risk of reseeding cancer cells is not fully eliminated. Ovarian protection from chemotherapy using gonadotrophin releasing hormone (GnRH) agonists or other options seem to be appealing but can only be recommended when its value is recognized by high quality evidence studies.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

ORCID

Maria Luís Santos  <http://orcid.org/0000-0002-6597-1524>

Ana Sofia Pais  <http://orcid.org/0000-0002-1977-5258>

Teresa Almeida Santos  <http://orcid.org/0000-0001-7423-2996>

References

- [1] American Cancer Society. Ovarian cancer. <https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/8773.00.pdf>.

- [2] Kim S-Y, Lee JR. Fertility preservation option in young women with ovarian cancer. *Future Oncol*. 2016;12(14):1695-1698.
- [3] American Cancer Society. Ovarian cancer - treatment. <https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer/treating/by-stage.html>.
- [4] Cakmak H, Rosen MP. Random-start ovarian stimulation in patients with cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2015;27(3):215-221.
- [5] Mahajan N. Fertility preservation in female cancer patients: an overview. *J Hum Reprod Sci*. 2015;8(1):3-13.
- [6] Santos TA, Silva C. 2015. *Oncofertilidade - Preservação Da Fertilidade Em Doentes Oncológicos*. Lisbon: LST Artes gráficas.
- [7] Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Fertility preservation in patients undergoing gonadotoxic therapy or gonadectomy: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2019;112:1022-1033.
- [8] McKenzie ND, Kennard JA, Ahmad S. Fertility preserving options for gynecologic malignancies: a review of current understanding and future directions. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2018;132:116-124.
- [9] Donnez J, Dolmans M-M. Fertility preservation in women. *N Engl J Med*. 2017;377(17):1657-1665.
- [10] Serra JC, Roque M, Talim MCT, et al. Gonadotropin-releasing hormone agonists for ovarian protection during cancer chemotherapy: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2018;51(1):77-86.
- [11] Taylan E, Oktay K. Fertility preservation in gynecologic cancers. *Gynecol Oncol*. 2019;155(3):522-529.
- [12] Medrano JV, Andrés MDM, García S, et al. Basic and clinical approaches for fertility preservation and restoration in cancer patients. *Trends Biotechnol*. 2018;36(2):199-215.
- [13] Lawrenz B, Mahajan N, Fatemi HM. The effects of cancer therapy on women's fertility: what do we know now? *Future Oncol*. 2016;12(14):1721-1729.
- [14] Lambertini M, Horicks F, Del Mastro L, et al. Ovarian protection with gonadotropin-releasing hormone agonists during chemotherapy in cancer patients: from biological evidence to clinical application. *Cancer Treat Rev*. 2019;72:65-77.
- [15] Lucas K, Hensel D. Fertility preservation options for women treated for cancer. *Nurs Womens Health*. 2014;18(2):138-147.
- [16] Chan JL, Wang ET. Oncofertility for women with gynecologic malignancies. *Gynecol Oncol*. 2017;144(3):631-636.
- [17] Harada M, Onuga Y. Where are oncofertility and fertility preservation treatments heading in 2016? *Future Oncol*. 2016;12(20):2313-2321.
- [18] Trudgen K, Ayensu-Coker L. Fertility preservation and reproductive health in the pediatric, adolescent, and young adult female cancer patient. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2014;26(3):72-380.
- [19] Wallace WHB, Kelsey TW, Anderson RA. Fertility preservation in pre-pubertal girls with cancer: the role of ovarian tissue cryopreservation. *Fertil Steril*. 2016;105(1):6-12.
- [20] Casorelli A, Panici PB, Palaia I, et al. Fertility management for malignant ovarian germ cell tumors patients. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017;120:34-42.
- [21] Silva C, Caramelo O, Almeida-Santos T, et al. Factors associated with ovarian function recovery after chemotherapy for breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod*. 2016;31(12):2737-2749.
- [22] Fisch B, Abir R. Female fertility preservation: past, present and future. *Reproduction*. 2018;156(1):F11-27.
- [23] Pinelli S, Basile S. Fertility preservation: current and future perspectives for oncologic patients at risk for iatrogenic premature ovarian insufficiency. *Biomed Res Int*. 2018;2018:6465903-6465909.
- [24] Kim S, Lee Y, Lee S, et al. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation in patients with cancer. *Obstet Gynecol Sci*. 2018;61(4):431-442.
- [25] Dolmans MM. Recent advances in fertility preservation and counseling for female cancer patients. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2018;18(2):115-120.
- [26] Hickman LC, Valentine LN, Falcone T. Preservation of gonadal function in women undergoing chemotherapy: a review of the potential role for gonadotropin-releasing hormone agonists. *Am J Obstet Gynecol*. 2016;215(4):415-422.
- [27] Raffoul L, Capito C, Sarnacki S. Fertility considerations and the pediatric oncology patient. *Semin Pediatr Surg*. 2016;25(5):318-322.
- [28] Del Mastro L, Lambertini M. Temporary ovarian suppression with gonadotropin-releasing hormone agonist during chemotherapy for fertility preservation: toward the end of the debate? *Oncologist*. 2015;20(11):1233-1235.
- [29] Lambertini M, Ginsburg ES, Partridge AH. Update on fertility preservation in young women undergoing breast cancer and ovarian cancer therapy. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2015;27(1):98-107.
- [30] Jang H, Hong K, Choi Y. Melatonin and fertility-protective adjuvants prevention against premature ovarian failure during chemotherapy. *IJMS*. 2017;18(6):1221.
- [31] Donnez J, Dolmans MM. Ovarian tissue freezing: current status. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2015;27(3):222-230.
- [32] Ross L, Chung K, Macdonald H. Fertility preservation in the female cancer patient. *J Surg Oncol*. 2014;110(8):907-911.
- [33] Pezzatori F, Pup L, d, Tomao F, et al. Special issues in fertility preservation for gynecologic malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016;97:206-219.
- [34] Letourneau J, Chan J, Salem W, et al. Fertility sparing surgery for localized ovarian cancers maintains an ability to conceive, but is associated with diminished reproductive potential. *J Surg Oncol*. 2015;112(1):26-30.
- [35] Ghaleb M, Bouzaiene H, Slim S, et al. Fertility-sparing surgery in advanced stage malignant ovarian germ cell tumor: a case report. *J Med Case Reports*. 2017;11(1):10-12.
- [36] Ghaleb M, Bouzaiene H, Sghaier S, et al. Fertility sparing surgery for ovarian sex cord stromal tumors: a nine case series. *Pan Afr Med J*. 2018;31:221-226.
- [37] Crahan SM, Cohn DE, Llamocca EN, et al. Fertility-sparing surgery and survival among reproductive-age women with epithelial ovarian cancer in 2 cancer registries. *Cancer*. 2020;126(6):1217-1224.
- [38] Yoshihara M, Kajiyama H, Tamauchi S, et al. Prognostic factors and effects of fertility-sparing surgery in women of reproductive age with ovarian clear-cell carcinoma: a propensity score analysis. *J Gynecol Oncol*. 2019;30(6):e102.
- [39] Balachandren N, Davies M. Fertility, ovarian reserve and cancer. *Manuscr*. 2017;105:64-68.
- [40] Johansen MS, Tanbo TG, Oldereid NB. Fertility after cryopreservation of ovarian tissue due to cancer treatment. *Tidskr Nor Laegeforen*. 2018;138.
- [41] Ciotti P, Moscarini M, Paradisi R, et al. Healthy twins delivered after oocyte cryopreservation and bilateral ovariectomy for ovarian cancer. *Reprod Biomed Online*. 2008;17(2):265-267.
- [42] Alvarez M, Solé M, Devesa M, et al. Live birth using vitrified-warmed oocytes in invasive ovarian cancer: case report and literature review. *Reprod Biomed Online*. 2014;28(6):663-668.
- [43] Levine JM, Kelvin JF, Quinn GP, et al. Infertility in reproductive-age female cancer survivors. *Cancer*. 2015;121(10):1532-1539.
- [44] Whyte JS, Hawkins E, Rausch M, et al. In vivo oocyte retrieval in a young woman with ovarian cancer. *Obstet Gynecol*. 2014;124:484-486.
- [45] Kim S-Y, Kim SK, Lee JR, et al. Toward precision medicine for preserving fertility in cancer patients: existing and emerging fertility preservation options for women. *J Gynecol Oncol*. 2016;27(2):e22.
- [46] Henes M, Neis F, Krämer B, et al. Possibilities of fertility preservation in young patients with ovarian cancer. *Anticancer Res*. 2014;34(7):3851-3854.
- [47] Grynberg M, Raad J, Comtet M, et al. Fertility preservation in BRCA-mutated women: when and how? *Future Oncol*. 2018;14(5):483-490.
- [48] Lambertini M, Goldrat O, Ferreira AR, et al. Reproductive potential and performance of fertility preservation strategies in BRCA-mutated breast cancer patients. *Ann Oncol*. 2018;29(1):237-243.
- [49] Dolmans MM, Marotta ML, Pirard C, et al. Ovarian tissue cryopreservation followed by controlled ovarian stimulation and pick-up of mature oocytes does not impair the number or quality of retrieved oocytes. *J Ovarian Res*. 2014;7:80-86.
- [50] Fatemi HM, Kyrrou D, Al-Azemi M, et al. Ex-vivo oocyte retrieval for fertility preservation. *Fertil Steril*. 2011;95(5):1787.e15-1787.e17.
- [51] Perez de la Blanca E, Fernandez-Perez MF, del Mar Martín-Díaz E, et al. Ultrasound-guided ex-vivo retrieval of mature oocytes for fertility preservation during laparoscopic oophorectomy: a case report. *J Reprod Infert*. 2018;19:174-181.
- [52] Park CW, Lee SH, Yang KM, et al. Cryopreservation of in vitro matured oocytes after ex vivo oocyte retrieval from gynecologic cancer patients undergoing radical surgery. *Clin Exp Reprod Med*. 2016;43(2):119-125.
- [53] Komlichenko E, Kalinina E, Gamzatova Z, et al. Autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue - effective method of fertility preservation in cancer patients. *Gynecol Endocrinol*. 2014;30(supl):43-47.

- [54] Fajau-Prevot C, Le Gac YT, Chevreau C, et al. Ovarian mucinous cystadenoma after ovarian graft. *Obstet Gynecol.* 2017;129(6):1035–1036.
- [55] Duros S, Vinolas C, Comtet M, et al. Fertility preservation in women. *Med Ther Med Reprod Gynecol Endocrinol.* 2018;20:4–10.
- [56] Son W-Y, Bucket W, Monnier P, et al. Immature oocyte retrieval and in vitro oocyte maturation at different phases of the menstrual cycle in women with cancer who require urgent gonadotoxic treatment. *Fertil Steril.* 2017;107(1):198–204. Elsevier Inc.
- [57] Rodriguez-Wallberg K, Turan V, Munster P, et al. Can ovarian suppression with gonadotropin-releasing hormone analogs (GnRHs) preserve fertility in cancer patients? *Ann Oncol.* 2016;27(2):357.
- [58] Blumenfeld Z, Katz G, Evron A. 'An ounce of prevention is worth a pound of cure': the case for and against GnRH-agonist for fertility preservation". *Ann Oncol.* 2014;25(9):1719–1728.
- [59] Roness H, Kalich-Philosoph L, Meirou D. Prevention of chemotherapy-induced ovarian damage: possible roles for hormonal and non-hormonal attenuating agents. *Hum Reprod Update.* 2014;20(5):759–774.

6. Pais AS, Flagothier C, Tebache L, Almeida Santos T, Nisolle M. *Impact of surgical management of endometrioma on AMH levels and pregnancy rates: a review of recent literature.* *J Clin Med.* 2021;10(3):414. Doi: 10.3390/jcm10030414

Review

Impact of Surgical Management of Endometrioma on AMH Levels and Pregnancy Rates: A Review of Recent Literature

Ana Sofia Pais ^{1,2,3,4,5,*}, Clara Flagothier ⁶, Linda Tebache ⁶, Teresa Almeida Santos ^{1,7} and Michelle Nisolle ⁶

- ¹ Reproductive Medicine Unit, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, 3004-561 Coimbra, Portugal; teresaalmeidasantos@chuc.min-saude.pt
 - ² Obstetrics Department, Faculty of Medicine, University of Coimbra, 3000-370 Coimbra, Portugal
 - ³ Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research (iCIBR) Area of Environment Genetics and Oncobiology (CIMAGO), Biophysics Institute of Faculty of Medicine, University of Coimbra, 3000-548 Coimbra, Portugal
 - ⁴ Center for Innovative Biomedicine and Biotechnology (CIBB), University of Coimbra, 3000-548 Coimbra, Portugal
 - ⁵ Clinical Academic Center of Coimbra (CACC), 3000-548 Coimbra, Portugal
 - ⁶ Department of Obstetrics and Gynaecology, Hospital CHR Liège, University of Liège, 4000 Liège, Belgium; clara.flagothier@student.uliege.be (C.F.); linte@hotmial.com (L.T.); michelle.nisolle@chuliege.be (M.N.)
 - ⁷ Faculty of Medicine, University of Coimbra, 3000-370 Coimbra, Portugal
- * Correspondence: asfpais@uc.pt



Citation: Pais, A.S.; Flagothier, C.; Tebache, L.; Almeida Santos, T.; Nisolle, M. Impact of Surgical Management of Endometrioma on AMH Levels and Pregnancy Rates: A Review of Recent Literature. *J. Clin. Med.* 2021, 10, 414. <https://doi.org/10.3390/jcm10030414>

Received: 7 December 2020
Accepted: 18 January 2021
Published: 22 January 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Ovarian endometrioma are found in up to 40% of women with endometriosis and 50% of infertile women. The best surgical approach for endometrioma and its impact on pregnancy rates is still controversial. Therefore, we conducted a literature review on surgical management of ovarian endometrioma and its impact on pregnancy rates and ovarian reserve, assessed by anti-Müllerian hormone (AMH) serum levels. Ovarian cystectomy is the preferred technique, as it is associated with lower recurrence and higher spontaneous pregnancy rate. However, ablative approaches and combined techniques are becoming more popular as ovarian reserve is less affected and there are slightly higher pregnancy rates. Preoperative AMH level might be useful to predict the occurrence of pregnancy. In conclusion, AMH should be included in the preoperative evaluation of reproductive aged women with endometriosis. The surgical options for ovarian endometrioma should be individualized. The endometrioma ablation procedure seems to be the most promising treatment.

Keywords: endometriosis; endometrioma surgery; ovarian reserve; anti-Müllerian hormone; spontaneous pregnancy

1. Introduction

Endometriosis is an inflammatory condition characterized by the presence of endometrial-like tissue outside the uterus. It affects mostly women of reproductive age and approximately 30–50% of women with endometriosis may present infertility [1].

Between 17% and 44% of endometriosis patients have endometriotic ovarian cysts (endometrioma), which are bilateral in about 19–28% of cases [2,3]. The aetiopathogenesis of endometrioma is still uncertain and several hypotheses have emerged. Hughesdon [4] and Brosens et al. [5] demonstrated the formation of a pseudocyst by invagination of the ovarian cortex following the bleeding of a superficial endometriotic implant and the accumulation of menstrual debris. According to Nezhat et al. [6], endometrioma results from the transformation of a functional cyst. More recently, Donnez et al. [7] confirmed the involvement of metaplasia of invaginated coelomic epithelium in the origin of endometrioma.

Recommendations on the different surgical options available for ovarian endometrioma have recently been published by the working group of the European Society for Gynaecological Endoscopy (ESGE), the European Society of Human Reproduction and

Embryology (ESHRE) and the World Endometriosis Society (WES) [8]. In summary, the available approaches for conservative surgical treatment of ovarian endometrioma are cystectomy, ablation or a combined technique.

Laparoscopic ovarian cystectomy is performed by the stripping technique, in which the drained endometrioma and ovarian cortex are pulled apart and haemostasis is applied on the ovarian cyst bed [9]. Traction and counter-traction must be performed using appropriate instruments with low to moderate force to avoid excessive bleeding.

In the ablative approach, endometrioma is fenestrated, drained and washed out and the cyst wall is then destroyed with an energy source, such as a CO₂ laser, bipolar coagulation or plasma energy [9]. Care must be taken to ablate the entire surface of the cyst wall in order to reduce the risk of residual ovarian endometrioma. The entire depth of the cyst capsule must not be ablated as endometriotic tissue is present only superficially, with a mean depth of 0.6 mm [10].

In cases of large ovarian endometrioma, a three-step approach could be suggested, requiring a first laparoscopy for draining the cyst, followed by 3 months of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist therapy [7,11]. At the end of the medical treatment, a second laparoscopy is performed in order to ablate the reduced ovarian endometrioma [7,8].

In order to avoid two laparoscopic procedures, Donnez et al. [11] described a combined technique in which 80–90% of the endometrioma is excised according to the cystectomy technique, and a CO₂ laser is then used to vaporize the remaining 10–20% of the endometrioma close to the ovarian hilus. Indeed, in this region of the ovary, dissection is usually more difficult and is associated with a higher risk of bleeding which needs coagulation close to the ovarian vessels.

Surgical treatment of endometrioma improves patients' symptoms, such as pain, but the most appropriate approach for reproductive outcomes is still controversial, according to the Royal College of Obstetricians and Gynaecologists (RCOG) [12]. The guidelines from the ESHRE and a Cochrane review state that ovarian cystectomy is the preferred technique in terms of recurrence and spontaneous pregnancy rate after surgery [13,14]. In infertile women with stage I/II endometriosis according to the revised American Fertility Society (rAFS) classification of the American Society for Reproductive Medicine (ASRM), ESHRE recommends performing an operative laparoscopy rather than only a diagnostic laparoscopy [13]. On the other hand, ASRM proposed that in the initial stages and in women under than 35 years, expectant management or superovulation/intrauterine insemination can be considered as first-line therapy [15]. For stage III–IV disease, both societies agree with the benefit of surgical therapy [13,15]. However, the safety of this option has been questioned as it may cause ovarian damage, with a negative effect on ovarian reserve.

Ovarian reserve is defined as the functional potential of the ovary and reflects the number and quality of the follicles in the ovaries at any given time. Anti-Müllerian hormone (AMH) is a reliable marker of ovarian reserve [16]. AMH is a glycoprotein secreted by granulosa cells of primary, pre-antral and antral follicles, but it is not produced by primordial follicles. After the AMH peak at 24 years old, it gradually decreases to become undetectable at menopause [17,18].

The risk of postsurgical ovarian failure has reopened the debate between excision and ablation [19]. The deleterious effects of the presence of endometriosis in the ovarian reserve itself as well as the risk of affecting the ovarian reserve by the surgical procedures are taken into account when deciding whether or not to operate on patients who want a pregnancy [20–23]. Therefore, in many centres, patients are directly referred to in vitro fertilization (IVF) instead of offering them an appropriate surgical procedure associated with the possibility of getting pregnant spontaneously. Therefore, as endometriosis is mainly found in women of reproductive age, the impact of endometrioma and its treatment on ovarian function must be evaluated in order to maintain the best chances of pregnancy.

The aim of this review was to evaluate the effect of surgical management of endometrioma on ovarian reserve, assessed by serum AMH concentration, and on pregnancy rates, through a review of the literature.

2. Methods

The literature search was done using the PubMed and Cochrane search engines. The keywords used were “endometrioma”, “surgery”, “ovarian reserve”, “AMH”, “anti-Müllerian hormone” and “spontaneous pregnancy”. This research was limited to English and French language publications, focusing on the last 5 years (2015–2019). The studies were selected based on the abstract. This research was supplemented by the bibliography of experts and the references cited in the documents reviewed. Clinical cases and comments were excluded.

3. Results

3.1. AMH after Surgery for Endometrioma

3.1.1. AMH and Ovarian Cystectomy

A recent systematic review and meta-analysis confirmed previous studies and systematic reviews reporting consistent evidence of a negative impact of excision of endometrioma on ovarian reserve [3,21,22]. In the late postoperative period (9 to 12 months), a 39.5% and 57% reduction in postoperative circulating AMH was observed in patients with unilateral (1.65 ng/mL, 95% confidence interval (CI) 1.15 to 2.15) and bilateral endometriomas (2.03 ng/mL, 95% CI 1.47 to 2.58), respectively [3].

Celik et al. showed that cystectomy leads to a significant and progressive decrease (61%) in serum AMH levels in a prospective study with 65 patients comparing AMH measured preoperatively (1.78 ± 1.71 ng/mL), at 6 weeks (1.32 ± 1.29 ng/mL) and 6 months after surgery (0.72 ± 0.79 ng/mL) [24]. Alborzi et al., in a prospective study with 193 patients, observed the same trend within 9 months of follow-up (baseline AMH = 3.86 ± 3.58 ng/mL; 9 months after surgery = 1.77 ± 1.76 ng/mL) [25].

Subsequent studies assessing AMH levels up to 1 year after surgery revealed that this decrease would be only temporary and could recover [26–30]. Vignali et al., in a prospective study with 22 patients undergoing laparoscopic cystectomy for endometrioma, verified that the mean 1-year postoperative AMH levels were not statistically different from the mean values prior to surgery [26]. Sugita et al. also performed a prospective study including 39 patients and observed that 50% had higher AMH levels 1 year after surgery than 1 month after surgery (20 vs. 19 patients). The comparison of these two groups (increase vs. decrease in AMH levels at 1-year follow-up), showed a significant difference in the number of follicles in specimens due to removal of ovarian cortex during surgery [27]. A larger prospective study with 171 patients performed by Wang et al. showed that, 12 months after surgery, AMH levels were no different from the preoperative assessment in small cysts (≤ 7 cm), unilateral cysts and stage III endometriosis [28]. Kostrzewa et al. also performed a 1-year follow-up and observed a significant decrease in AMH levels 3 months after cystectomy (4.89 ± 3.66 vs. 3.45 ± 3.37 ng/mL, $p < 0.001$), but no further fall in the 1-year assessment (3-months = 3.45 ± 3.37 vs. 1-year = 3.43 ± 3.62 ng/mL, $p > 0.05$) [29]. The same result was achieved by Kovačević et al. in a prospective study that enrolled 54 patients (37 with unilateral endometrioma and 17 with bilateral) [30].

In a prospective cohort study with 59 patients with endometrioma and 16 with other benign cysts, the comparison of the postoperative decline in serum AMH revealed a higher and significant decrease in the group with endometrioma (baseline = 4.3 ± 0.4 vs. 3 months after surgery = 2.8 ± 0.2 ng/mL, $p < 0.001$) [31]. The same result was achieved by Taniguchi et al. in a study that enrolled 40 women with endometrioma and 16 with benign ovarian tumours. The postoperative decline rate of AMH levels had statistically significant differences at 6 months after surgery when patients with endometrioma were compared with those with other ovarian cysts (0.63 (0.26–0.69) vs. 0.24 (–0.86–0.32), $p < 0.05$). However, in the evaluation performed 1 year after surgery, that reduction did not remain significant (0.46 (0.14–0.73) vs. 0.21 (–0.52–0.78), $p = 0.34$) [32]. Kostrzewa et al. also compared a group of patients with endometrioma ($n = 35$) with a group with other benign ovarian tumours ($n = 35$). The decline in serum AMH levels in the first 3 months following surgery was 3 times higher following laparoscopic cystectomy of endometrioma (45.39% vs. 14.87%;

$p = 0.021$) [29]. The same result was observed when comparing laparoscopic cystectomy in patients with endometrioma and dermoid cysts [33].

The reduction in AMH level after surgery is higher in bilateral endometrioma [3,24,26–28,34]. Additionally, it is inversely correlated with the diameter of the cyst, with a clear decrease when the cyst is greater than 5 cm. Nevertheless, this decline is not associated with the follicular loss evaluated by histology [24,28,35].

Kim et al. reported that the decrease in AMH levels was also dependent on the stages of endometriosis, with stages III and IV having a significantly greater decrease in AMH from the pre- to postoperative period in comparison with lower stages [28,31]. However, they showed that the decline was independent of multiplicity, bilaterality and GnRH agonist use [31]. In addition, the postsurgical reduction in patients over 35 years old was greater, highlighting the negative effect of age on ovarian function [32].

In a prospective controlled study, Muzii et al. observed that surgery for recurrent endometriomas is more harmful to ovarian reserve, even though they only used antral follicle count (AFC) and ovarian volume [36].

Recently, in a prospective study with 124 patients, Zhou et al. verified that a decrease in AMH levels after surgery happened in both patients with high (>2 ng/mL) and low (≤ 2 ng/mL) preoperative AMH levels (4.51 ± 1.20 vs. 3.04 ± 0.90 ng/mL, $p < 0.001$; 0.89 ± 0.36 vs. 0.51 ± 0.27 ng/mL, $p < 0.001$, respectively) [37].

The presurgical identification of patients with decreased ovarian reserve and the risk of poor postoperative ovarian response can be predicted using preoperative measurements of serum AMH. Ozaki et al. proposed that 2.1 ng/mL was the best cut-off value of preoperative AMH for predicting diminished ovarian reserve (DOR) at 3 and 6 months in patients undergoing unilateral cystectomy. In cases of bilateral ovarian surgery, the optimal cut-off points were 3.0 ng/mL to predict DOR 3 months after surgery and 3.5 ng/mL to predict DOR 6 months after surgery [34].

After complete excision of the cyst capsule, final hemostasis must be guaranteed [8]. The traditional hemostatic technique is bipolar coagulation, but it might be used with caution to avoid excessive compromise of ovarian reserve [8,38]. A recent systematic review and meta-analysis comparing this approach with suture, ultrasonic energy and intra-ovarian hemostatic sealants showed a lower impact in postoperative AMH levels with the use of suturing [39]. The same result was achieved in a previous meta-analysis comparing just bipolar coagulation vs. suture [40]. In this field, there are two ongoing randomized clinical trials comparing ovarian function after laparoscopic cystectomy for endometrioma complemented with hemostatic approaches, the results of which are highly anticipated [41,42]. Dual-wavelength laser systems (DWLS) are a new instrument that have been described for hemostasis and that seem not to determine a significant reduction of ovarian reserve [43].

3.1.2. AMH and Endometrioma Ablation

Roman et al. conducted a prospective study [44] analysing serum AMH levels at 3 time points (before surgery, 3 months after surgery and >6 months after surgery) in 22 patients with unilateral endometrioma ≥ 30 mm without any history of previous surgery who underwent ablation with vaporization using plasma energy. This resulted in a postoperative drop in the AMH level, followed by a gradual re-increase. There was usually no return to preoperative AMH values, but the difference no longer reached statistical significance >6 months after surgery.

A more recent study by Stochino-Loi et al. [45] gathering 180 patients with stage III and IV endometriosis and intention of pregnancy compared AMH evolution after plasma energy vaporization according to preoperative AMH levels \geq or < 2 ng/mL. Plasma energy ablation caused a temporary decrease in AMH level in both groups.

3.1.3. Comparison of AMH after Ovarian Cystectomy and Endometrioma Vaporization

Saito et al. [46] performed a prospective study comparing AMH levels after cystectomy or endometrioma vaporization with bipolar current forceps in unilateral and bilateral endometrioma. They demonstrated that both methods decrease the ovarian reserve, especially in cases of severe endometriosis or over the age of 38. However, the postoperative decline in AMH was higher after cystectomy than vaporization and was statistically significant for bilateral endometrioma. In patients submitted to bilateral cystectomy, AMH levels declined from 3.1 ± 1.7 ng/mL at preoperative staging to 0.5 ± 0.5 ng/mL at 1 month after surgery, 0.8 ± 0.7 ng/mL at 6 months and 0.8 ± 0.7 ng/mL at 1 year. For bilateral vaporization, preoperative AMH levels were 2.7 ± 1.8 ng/mL and decreased to 0.8 ± 0.6 ng/mL at 1 month after surgery, 1.2 ± 1.3 ng/mL at 6 months and 1.3 ± 1.5 ng/mL at 1 year [46].

The multicentre randomized clinical trial of Candiani et al. [47] compared changes in AMH and antral follicle count (AFC) after cystectomy or CO₂ laser vaporization in 60 patients with endometrioma larger than 3 cm. Three months after surgery, they observed a significant decrease in serum AMH in the subjects treated with cystectomy (from 2.6 ± 1.4 to 1.8 ± 0.8 ng/mL; 95% CI: -1.3 to -0.2 ; $p = 0.012$), while no significant reduction was evident in the group treated with CO₂ laser vaporization (from 2.3 ± 1.1 to 1.9 ± 0.9 ng/mL; 95% CI: -1 to -0.2 ; $p = 0.09$).

A retrospective study with prospective recording of data performed by the same group showed that postoperative recurrence rates were comparable between patients that underwent CO₂ fiber laser vaporization or cystectomy [48]. During a 3-year follow-up, no difference was observed in recurrence of ovarian endometriosis (cystectomy group = 6.3% vs. vaporization group = 4.9%, $p = 0.74$) and of endometriosis-related pain (cystectomy group = 7.8% vs. vaporization group = 9.8%, $p = 0.67$).

For large endometriomas (>5 cm), a prospective randomized study performed by Giampaolino et al. revealed that the decrease of AMH levels assessed 3 months after surgery was greater following excisional surgery than ablative treatment ($-24.1 \pm 9.3\%$ vs. $-14.8 \pm 6.7\%$, $p = 0.011$) [49].

3.1.4. AMH and the Combined Technique

The combined approach, using excision of 80–90% of the cyst and ablation of the rest, has been proven not to be deleterious to the ovary through comparison of the ovarian volume and AFC. AMH serum levels were not analysed in this study published by Donnez et al. [11].

Tsolakidis et al. [50] performed a prospective randomized clinical trial comparing AMH levels before and 6 months after laparoscopic cystectomy for endometrioma or the three-step procedure. They found that AMH is less diminished after the three-step procedure (from 4.5 ± 0.4 to 3.99 ± 0.6 ng/mL, $p > 0.05$) compared with cystectomy of endometrioma (from 3.9 ± 0.4 to 2.9 ± 0.2 ng/mL; $p = 0.026$). This is explained by the fact that vaporization avoids ovarian tissue ablation and excessive thermal damage.

3.2. Pregnancy Rate after Surgery for Endometrioma

The role of surgery to improve the pregnancy rate in infertile women with endometriosis is controversial.

In a retrospective study with 43 infertile women with surgically proven endometriosis and no other factors, Lee et al. reported that the spontaneous conception rate was 41.9% during the first year after laparoscopic surgery, which involved the destruction or removal of all visible endometriotic implants and the lysis of adhesions [51].

For endometrioma, surgery seems to improve the success rates of fertility treatment by between 20% and 60% [9,52–54]. A recent meta-analysis compared pregnancy rates based on four different treatments for endometrioma in infertile women: surgery (excisional and/or ablative) + assisted reproductive technology (ART), surgery + spontaneous pregnancy, aspiration ± sclerotherapy + ART and only ART. There was no difference among groups. However, the success rate of surgery was higher (43.8%, confidence interval (CI): 22.5–66.4), while the success rate of only ART was the lowest (32%, CI: 15.0–52.0) [55].

3.2.1. Pregnancy Rate and Ovarian Cystectomy

In a meta-analysis by Vercellini et al., the chance of pregnancy after laparoscopic excision of endometriomas ranged from 30% to 67%, with an overall weighted mean of about 50% [56]. Zhou et al. recently conducted a prospective study with 124 patients that was consistent with these results, with a total spontaneous pregnancy rate of 50.49% within 24 months after excisional surgery [37]. Taniguchi et al. also reported a cumulative pregnancy rate of 50% after cystectomy for ovarian endometrioma [32].

Women with higher AMH levels had a significantly higher cumulative pregnancy rate after surgery for endometrioma [37,54,57]. Ozaki et al. compared patients according to preoperative ovarian reserve and observed that the rate of spontaneous pregnancy was greater in patients with AMH ≥ 1.1 ng/mL (59.2% vs. 14.3%, $p = 0.04$) [34]. According to Dong et al., the best cut-off point of the preoperative AMH for postoperative spontaneous pregnancy is > 3.68 ng/mL (Hazard ratio (HR): 2.383; 95% CI, 1.093–5.197) [57]. A very similar value was proposed by Zhou et al. (3.545 ng/mL; sensitivity 80.39%; specificity 69.23%) [37]. Thus, preoperative AMH level might be a useful marker to predict the occurrence of natural pregnancy and could be offered as part of patient assessment [37].

Studies comparing AMH level after cystectomy between patients who became pregnant and those who did not showed a higher AMH level 1 year after surgery in the group of pregnant women [32,58].

When the likelihood of spontaneous pregnancy after laparoscopic cystectomy of endometriomas was compared with other benign ovarian cysts, it was observed that it is more than 3 times higher in the group of patients with other benign tumours (HR 3.57; $p = 0.03$) [29].

3.2.2. Pregnancy Rate and Endometrioma Ablation

A retrospective pilot study by Roman et al. [59] evaluated recurrence and pregnancy rates in 55 patients with endometrioma treated by ablation using plasma energy. Recurrence (10.9%) and pregnancy rates (67%, spontaneously in 59%) are encouraging and are comparable to the reported results after endometrioma cystectomy. A more recent study by the same group enrolled 22 patients with unilateral endometrioma ≥ 30 mm and no history of previous surgery who underwent ablation with vaporization using plasma energy. The overall pregnancy rate during postoperative follow-up reached 73% [44].

Stochino-Loi et al. [45] performed a retrospective comparative study with 180 patients with stage III and IV endometriosis and pregnancy intention. They observed that the probability of postoperative pregnancy was comparable between women with low and normal AMH levels (AMH levels < 2 ng/mL = 73.9% and AMH levels ≥ 2 ng/mL = 74.6%); most of them got pregnant spontaneously (58.8% and 54%, respectively).

Motte et al. [60] conducted a retrospective case control study in which plasma energy ablative therapy demonstrated a higher implantation, pregnancy and delivery rates per IVF cycle, albeit with a lower number of oocytes retrieved. Thus, plasma energy has been suggested as a more favourable ablative technique for endometrioma management.

3.2.3. Comparison of Pregnancy Rate after Ovarian Cystectomy and Endometrioma Vaporization

A Cochrane review by Hart et al. published in 2008 showed a beneficial effect of excisional surgery over drainage or ablation of endometrioma when considering achievement of spontaneous pregnancy in subfertile women (odds ratio (OR) 5.21, CI 2.04–13.29) [14]. However, there were only two studies that addressed this issue, so publication bias cannot be excluded.

3.2.4. Pregnancy Rate and the Combined Technique

In a descriptive and prospective study, Donnez et al. reported a pregnancy rate of 41% at a mean follow-up of 8.3 months after the combined approach for endometrioma [11].

4. Discussion

The benefit of endometrioma excision for pain management is consensual, but surgical excision for the sole purpose of improving reproductive outcomes is controversial [9]. Ovarian involvement with endometriosis might have a negative impact on ovarian reserve [23,26,32]. That fact, alongside the risk of postsurgical ovarian failure, has reopened the debate between excision and ablation [19].

The reduction of ovarian reserve after surgery for endometrioma is inevitable, regardless of the technique. Both excisional and ablative approaches lead to a postsurgical decrease of up to 60% in AMH levels. However, studies comparing the two techniques show a higher and significant decrease after cystectomy [46,47].

The decline in ovarian reserve after ovarian surgery is multifactorial. Healthy ovarian tissue may be unintentionally removed during ovarian cystectomy due to the absence of a clear histologic cleavage plane, which can result in loss of follicles. This justifies the theory that ovarian reserve is better preserved by ablation than by cystectomy. However, other proposed mechanisms for the ovarian reserve decline include thermal damage caused by bipolar coagulation, ovarian vascular injury and postoperative inflammatory response [19,24,28,61]. Therefore, bipolar electrocoagulation should be kept to a minimum, especially for patients with reproductive goals [61]. With the use of a CO₂ laser, the glandular epithelium and the underlying stroma [11,47] are destroyed without reaching the fibrous capsule surrounding the endometrioma or healthy neighbouring ovarian cortex. The CO₂ laser would provide better control of the depth of vaporization, remaining superficial compared to bipolar electrocoagulation [47,50]. This is an advantage as it would not be necessary to destroy the entire fibrous capsule by vaporization, as only 1.0–1.5 mm of the inner lining would be sufficient [62]. The CO₂ laser as well as plasma energy are techniques for sparing ovarian tissue with a shallower thermal diffusion [50,59]. Their low thermal energy avoids excessive ischaemic damage while providing high precision and optimal coagulation, reducing the need for electrocoagulation or suturing [19,50]. Thus, CO₂ technology may be used to treat endometrioma with minimal damage to the adjacent healthy ovarian tissue and it might be an alternative treatment in women with a desire for pregnancy.

Excision of the ovarian cortex could be involved in the reduction of ovarian reserve just after surgery, but a continuous decrease could be attributed to other factors, such as vascular compromise by excessive coagulation or adhesiolysis as well as postsurgical inflammation [24,26,27,44].

The number of studies that have evaluated changes in ovarian reserve after cystectomy over a period longer than 6 months is limited, but it seems that the decrease in AMH following surgery for endometrioma is temporary and can be recovered. This can be explained by surgery-related reversible mechanisms related to ovarian vasculature and inflammation-mediated injuries. After ovarian injury, compensatory mechanisms may include the recruitment and growth of primordial follicles and the excessive activation of granulosa cells [28]. This leads to rearrangements of the cohort of follicles, including follicles producing AMH, which can explain the “recovery” in the ovarian reserve. The delay in this recovery is explained by the approximate 180-day duration of folliculogenesis from the primordial follicles to the pre-ovulatory follicles [27]. A similar pattern of AMH recovery has been reported in young women after chemotherapy, in which a complete restoration of AMH levels was observed [26,63]. However, some studies showed that ovarian reserve cannot be fully restored in all patients after surgery for endometrioma, indicating some elements of permanent damage. Since the literature on the late postoperative period is scarce, recovery of the ovarian reserve should be interpreted with caution [3]. Furthermore, factors like AMH decline with age and endometriosis must be considered [23,64].

Bilaterality, size of endometrioma, stage of endometriosis and patient’s age are independent factors that should be also considered when planning a surgery in patients who are interested in preserving their fertility [3,30]. Bilateral endometriomas, stage III/IV endometriosis and patients over the age of 35 have a higher impact on postsurgical AMH

levels. For large cysts, a proportional loss of healthy ovarian tissue with the diameter of the cyst can explain the higher decrease of AMH levels [35,65]. Additionally, for endometriomas with more than 5 cm, ablative treatment seems to have low impact in postoperative AMH levels than excisional surgery [49]. For recurrent endometrioma, a second surgery is associated with higher loss of ovarian tissue and is more harmful to the ovarian reserve [36]. Indications for surgery for recurrent endometrioma should thus be considered with caution and excisional surgery must be avoided [36]. Medical treatment may be the first option, but when surgery may still be indicated, an ablative approach can be considered, as recurrence rates are similar [48].

All of these factors will allow clinicians to select therapies to prevent further decline of ovarian reserve, especially for infertile patients with ovarian endometrioma [34]. Therefore, surgery should be performed when mandatory, such as pain refractory to medical therapy, pain associated with otherwise unexplained infertility and in the case of non-reassuring features of the cyst on preoperative ultrasound [66]. Individual reproductive plans and oocyte or ovarian tissue cryopreservation should be discussed with patients before surgery. Ideally, surgery can be postponed until the reproductive project is complete [3].

The decline of AMH levels after surgery is higher in patients with ovarian endometrioma than in those with other benign tumours [29,31–33]. This is in line with the impact per se of endometriosis in ovarian reserve and the fact that it is also present when surgery is performed by a specialised surgeon [26,32,66]. The likelihood of spontaneous pregnancy after surgery is also lower in patients with endometrioma [29].

According to the ESHRE guideline, there is evidence to suggest that ovarian cystectomy via stripping is the preferable surgical technique for management of endometrioma, compared with other excisional/ablative techniques in terms of the pregnancy rate [13,14]. However, studies carried out later show a higher overall pregnancy rate after the ablative approach than the excisional (67–73% vs. 30–67%) [44,59]. This fact is in line with the lowest impact on AMH levels.

Favourable preoperative ovarian reserve and its postoperative maintenance together may be implicated in postsurgical pregnancy after surgery for endometrioma [34,37]. The potential risk of postsurgical poor ovarian response could be predicted by using optimal cut-off points of presurgical AMH levels (2.1 ng/mL of unilateral endometrioma; 3 and 3.5 ng/mL for bilateral endometrioma at 3 and 6 months after surgery, respectively) [34]. The cut-off value to predict spontaneous pregnancy rates after endometrioma cystectomy is approximately 3.5 ng/mL, with higher AMH levels associated with a higher pregnancy rate [37,54,57]. Thus, after cystectomy, better ovarian reserve with optimal rearrangement of the follicle cohort may be related to subsequent pregnancy [58]. In patients at risk, alternative management of cystectomy should be foreseen. However, AMH is a quantitative but not qualitative surrogate for oocytes [34].

In patients with stage III and IV endometriosis submitted to ablative surgery, the probability of pregnancy and the risk of decreasing ovarian reserve is similar in patients with high and low preoperative AMH levels [45]. Therefore, a young patient suffering from severe endometriosis with a decreased ovarian reserve and a preoperative AMH level below normal could benefit from surgical management. This surgery could restore the capacity of spontaneous pregnancy in this population and may be an alternative to ART [45].

This review highlights the importance of preoperative evaluation of AMH in the therapeutic planning of patients with endometrioma and in the selection of the surgical technique. Based on this value, it is possible to offer more detailed preoperative counselling regarding the pregnancy rate after surgery and the risk of decreased ovarian reserve, assessed through AMH values. Recent studies suggest that the ablative approach, namely, with the use of a CO₂ laser, seems to be the most interesting surgical technique, with the least impact on postoperative AMH levels and better pregnancy rates. However, this review has some limitations as more studies, namely, randomized clinical trials, are needed to draw definitive conclusions. Additionally, more studies assessing live birth rate rather

than pregnancy rate are needed, as live birth rate was recently defined as a core outcome set for endometriosis [67].

5. Conclusions

In conclusion, measurement of AMH should be included in the evaluation of reproductive-age women with endometriosis. The indication of surgery for an ovarian endometrioma should be thoroughly discussed with the patient, with particular emphasis on the issue of possible damage to the ovarian reserve. The review of the literature demonstrates that the endometrioma ablation procedure, even if performed in patients with a decreased ovarian reserve, is beneficial in terms of pregnancy.

Author Contributions: Conceptualization, M.N. and L.T.; methodology, A.S.P.; data curation, A.S.P.; writing—original draft preparation, A.S.P. and C.F.; writing—review and editing, T.A.S. and M.N.; supervision, M.N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Verkauf, B.S. Incidence, symptoms, and signs of endometriosis in fertile and infertile women. *J. Fla. Med. Assoc.* **1987**, *74*, 671–675.
- Chapron, C.; Vercellini, P.; Barakat, H.; Vieira, M.; Dubuisson, J.-B. Management of ovarian endometriomas. *Hum. Reprod. Update* **2002**, *8*, 591–597. [[CrossRef](#)]
- Younis, J.S.; Shapso, N.; Fleming, R.; Ben-Shlomo, I.; Izhaki, I. Impact of unilateral versus bilateral ovarian endometriotic cystectomy on ovarian reserve: A systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod. Update* **2018**, *25*, 375–391. [[CrossRef](#)]
- Hughesdon, P.E. The structure of endometrial cysts of the ovary. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* **1957**, *64*, 481–487. [[CrossRef](#)]
- Brosens, J.J.; Puttemans, P.J.; Deprest, J. The endoscopic localization of endometrial implants in the ovarian chocolate cyst. *Fertil. Steril.* **1994**, *61*, 1034–1038. [[CrossRef](#)]
- Nezhat, F.; Nezhat, C.; Allan, C.J.; Metzger, D.; Sears, D.L. Clinical and histologic classification of endometriomas. Implications for a mechanism of pathogenesis. *J. Reprod. Med.* **1992**, *37*, 771–776. [[PubMed](#)]
- Donnez, J.; Nisolle, M.; Gillet, N.; Smets, M.; Bassil, S.; Casanas-Roux, F. Large ovarian endometriomas. *Hum. Reprod.* **1996**, *11*, 641–645. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Saridogan, E.; Becker, C.M.; Feki, A.; Grimbizis, G.F.; Hummelshoj, L.; Keckstein, J.; Nisolle, M.; Tanos, V.; Ulrich, U.A.; Vermeulen, N.; et al. Recommendations for the surgical treatment of endometriosis—Part I: Ovarian endometrioma. *Gynecol. Surg.* **2017**, *14*, 27. [[CrossRef](#)]
- Cranney, R.; Condous, G.; Reid, S. An update on the diagnosis, surgical management, and fertility outcomes for women with endometrioma. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **2017**, *96*, 633–643. [[CrossRef](#)]
- Muzii, L.; Bianchi, A.; Bellati, F.; Cristì, E.; Pernice, M.; Zullo, M.A.; Angioli, R.; Panici, P.B. Histologic analysis of endometriomas: What the surgeon needs to know. *Fertil. Steril.* **2007**, *87*, 362–366. [[CrossRef](#)]
- Donnez, J.; Lousse, J.-C.; Jadoul, P.; Donnez, O.; Squifflet, J. Laparoscopic management of endometriomas using a combined technique of excisional (cystectomy) and ablative surgery. *Fertil. Steril.* **2010**, *94*, 28–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Jayaprakasan, K.; Becker, C.; Mittal, M.; on behalf of the Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. The Effect of Surgery for Endometriomas on Fertility. Scientific Impact Paper No. 55. *BJOG-AN Int. J. Obstet. Gynaecol.* **2017**, *125*, e19–e28. [[CrossRef](#)]
- Dunselman, G.A.J.; Vermeulen, N.; Becker, C.; Calhaz-Jorge, C.; D’Hooghe, T.; De Bie, B.; Heikinheimo, O.; Horne, A.W.; Kiesel, L.; Nap, A.; et al. ESHRE guideline: Management of women with endometriosis. *Hum. Reprod.* **2014**, *29*, 400–412. [[CrossRef](#)]
- Hart, R.; Hickey, M.; Maouris, P.; Buckett, W. Excisional surgery versus ablative surgery for ovarian endometriomata. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2008**, *16*, CD004992. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Endometriosis and infertility: A committee opinion. *Fertil. Steril.* **2012**, *98*, 591–598. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- La Marca, A.; Giuliani, S.; Tirelli, A.; Bertucci, E.; Marsella, T.; Xella, S.; Volpe, A. Anti-Müllerian hormone measurement on any day of the menstrual cycle strongly predicts ovarian response in assisted reproductive technology. *Hum. Reprod.* **2007**, *22*, 766–771. [[CrossRef](#)]
- Seifer, D.B.; Baker, V.L.; Leader, B. Age-specific serum anti-Müllerian hormone values for 17,120 women presenting to fertility centers within the United States. *Fertil. Steril.* **2011**, *95*, 747–750. [[CrossRef](#)]
- Anderson, R.A.; Wallace, W.H.B. Antimüllerian hormone, the assessment of the ovarian reserve, and the reproductive outcome of the young patient with cancer. *Fertil. Steril.* **2013**, *99*, 1469–1475. [[CrossRef](#)]
- Somigliana, E.; Ragni, G.; Benedetti, F.; Borroni, R.; Vegetti, W.; Crosignani, P. Does laparoscopic excision of endometriotic ovarian cysts significantly affect ovarian reserve? Insights from IVF cycles. *Hum. Reprod.* **2003**, *18*, 2450–2453. [[CrossRef](#)]

20. Muzii, L.; Di Tucci, C.; Di Feliciano, M.; Galati, G.; Di Donato, V.; Musella, A.; Palaia, I.; Panici, P.B. Antimüllerian hormone is reduced in the presence of ovarian endometriomas: A systematic review and meta-analysis. *Fertil. Steril.* **2018**, *110*, 932–940. [CrossRef]
21. Somigliana, E.; Berlanda, N.; Benaglia, L.; Viganò, P.; Vercellini, P.; Fedele, L. Surgical excision of endometriomas and ovarian reserve: A systematic review on serum antimüllerian hormone level modifications. *Fertil. Steril.* **2012**, *98*, 1531–1538. [CrossRef] [PubMed]
22. Raffi, F.; Metwally, M.; Amer, S. The Impact of Excision of Ovarian Endometrioma on Ovarian Reserve: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2012**, *97*, 3146–3154. [CrossRef] [PubMed]
23. Romanski, P.A.; Brady, P.C.; Farland, L.V.; Thomas, A.M.; Hornstein, M.D. The effect of endometriosis on the antimüllerian hormone level in the infertile population. *J. Assist. Reprod. Genet.* **2019**, *36*, 1179–1184. [CrossRef] [PubMed]
24. Celik, H.G.; Dogan, E.; Okyay, E.; Ulukus, C.; Saatli, B.; Uysal, S.; Koyuncuoglu, M. Effect of laparoscopic excision of endometriomas on ovarian reserve: Serial changes in the serum antimüllerian hormone levels. *Fertil. Steril.* **2012**, *97*, 1472–1478. [CrossRef] [PubMed]
25. Alborzi, S.; Keramati, P.; Younesi, M.; Samsami, A.; Dadras, N. The impact of laparoscopic cystectomy on ovarian reserve in patients with unilateral and bilateral endometriomas. *Fertil. Steril.* **2014**, *101*, 427–434. [CrossRef]
26. Vignali, M.; Mabrouk, M.; Ciocca, E.; Alabiso, G.; Di Prun, A.B.; Gentilini, D.; Busacca, M. Surgical excision of ovarian endometriomas: Does it truly impair ovarian reserve? Long term anti-Müllerian hormone (AMH) changes after surgery. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* **2015**, *41*, 1773–1778. [CrossRef]
27. Sugita, A.; Iwase, A.; Goto, M.; Nakahara, T.; Nakamura, T.; Kondo, M.; Osuka, S.; Mori, M.; Saito, A.; Kikkawa, F. One-year follow-up of serum antimüllerian hormone levels in patients with cystectomy: Are different sequential changes due to different mechanisms causing damage to the ovarian reserve? *Fertil. Steril.* **2013**, *100*, 516–522. [CrossRef]
28. Wang, Y.; Ruan, X.; Lu, D.; Sheng, J.; Mueck, A.O. Effect of laparoscopic endometrioma cystectomy on anti-Müllerian hormone (AMH) levels. *Gynecol. Endocrinol.* **2019**, *35*, 494–497. [CrossRef]
29. Kostorzewa, M.; Wilczyński, J.R.; Glowacka, E.; Zyla, M.; Szyblo, K.; Stachowiak, G. One-year follow-up of ovarian reserve by three methods in women after laparoscopic cystectomy for endometrioma and benign ovarian cysts. *Int. J. Gynecol. Obstet.* **2019**, *146*, 350–356. [CrossRef]
30. Kovačević, V.M.; Andelić, L.M.; Mitrović-Jovanović, A. Changes in serum antimüllerian hormone levels in patients 6 and 12 months after endometrioma stripping surgery. *Fertil. Steril.* **2018**, *110*, 1173–1180. [CrossRef]
31. Kim, Y.-J.; Cha, S.-W.; Kim, H.-O. Serum anti-Müllerian hormone levels decrease after endometriosis surgery. *J. Obstet. Gynaecol.* **2017**, *37*, 342–346. [CrossRef] [PubMed]
32. Taniguchi, F.; Sakamoto, Y.; Yabuta, Y.; Azuma, Y.; Hirakawa, E.; Nagira, K.; Uegaki, T.; Deura, I.; Hata, K.; Harada, T. Analysis of pregnancy outcome and decline of anti-Müllerian hormone after laparoscopic cystectomy for ovarian endometriomas. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* **2016**, *42*, 1534–1540. [CrossRef] [PubMed]
33. Karadağ, C.; Demircan, S.; Turgut, A.; Çalışkan, E. Effects of laparoscopic cystectomy on ovarian reserve in patients with endometrioma and dermoid cyst. *J. Turk. Soc. Obstet. Gynecol.* **2020**, *17*, 15–20. [CrossRef] [PubMed]
34. Ozaki, R.; Kumakiri, J.; Tinelli, A.; Grimbizis, G.F.; Kitade, M.; Takeda, S. Evaluation of factors predicting diminished ovarian reserve before and after laparoscopic cystectomy for ovarian endometriomas: A prospective cohort study. *J. Ovarian Res.* **2016**, *9*, 37. [CrossRef]
35. Marcellin, L.; Santulli, P.; Bourdon, M.; Comte, C.; Maignien, C.; Just, P.A.; Streuli, I.; Borghese, B.; Chapron, C. Serum antimüllerian hormone concentration increases with ovarian endometrioma size. *Fertil. Steril.* **2019**, *111*, 944–952. [CrossRef]
36. Muzii, L.; Achilli, C.; Lecce, F.; Bianchi, A.; Franceschetti, S.; Marchetti, C.; Marchetti, C.; Panici, P.B. Second surgery for recurrent endometriomas is more harmful to healthy ovarian tissue and ovarian reserve than first surgery. *Fertil. Steril.* **2015**, *103*, 738–743. [CrossRef]
37. Zhou, Y.; Chen, C.; Hu, C.; Wang, Y.; Zhang, X.; Wu, R. Predictive value of the serum anti-Müllerian level for spontaneous pregnancy in women after endometriosis surgery. *J. Int. Med. Res.* **2019**, *47*, 5643–5649. [CrossRef]
38. Zhang, C.-H.; Wu, L.; Li, P.-Q. Clinical study of the impact on ovarian reserve by different hemostasis methods in laparoscopic cystectomy for ovarian endometrioma. *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.* **2016**, *55*, 507–511. [CrossRef]
39. Baracat, C.M.F.; Abdalla-Ribeiro, H.S.A.; Araujo, R.S.D.C.; Bernardo, W.M.; Ribeiro, P.A. The Impact on Ovarian Reserve of Different Hemostasis Methods in Laparoscopic Cystectomy: A Systematic Review and Meta-analysis. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet. RBGO Gynecol. Obstet.* **2019**, *41*, 400–408. [CrossRef]
40. Ding, W.; Li, M.; Teng, Y. The impact on ovarian reserve of haemostasis by bipolar coagulation versus suture following surgical stripping of ovarian endometrioma: A meta-analysis. *Reprod. Biomed. Online* **2015**, *30*, 635–642. [CrossRef]
41. Araujo, R.S.D.C.; Maia, S.S.B.; Baracat, C.M.F.; Lima, M.D.; Soares, E.S.S.; Ribeiro, H.S.A.A.; Ribeiro, P.A.A.G. Ovarian function after the use of various hemostatic techniques during treatment for endometrioma: Protocol for a randomized clinical trial. *Trials* **2019**, *20*, 1–8. [CrossRef] [PubMed]
42. Chung, J.; Law, T.; Chung, C.; Mak, J.S.; Sahota, D.S.; Li, T.-C.; Chung, J.P.W.; Law, T.S.M.; Chung, C.H.S.; Mak, J.S.M. Impact of haemostatic sealant versus electrocoagulation on ovarian reserve after laparoscopic ovarian cystectomy of ovarian endometriomas: A randomised controlled trial. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* **2019**, *126*, 1267–1275. [CrossRef] [PubMed]

43. Nappi, L.; Angioni, S.; Sorrentino, F.; Cinnella, G.; Lombardi, M.; Græco, P. Anti-Müllerian hormone trend evaluation after laparoscopic surgery of monolateral endometrioma using a new dual wavelengths laser system (DWLS) for hemostasis. *Gynecol. Endocrinol.* **2015**, *32*, 34–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Roman, H.; Bubenheim, M.; Auber, M.; Marpeau, L.; Puscasiu, L. Antimüllerian Hormone Level and Endometrioma Ablation Using Plasma Energy. *J. Soc. Laparosc. Surg.* **2014**, *18*. [[CrossRef](#)]
45. Stochino-Loi, E.; Darwish, B.; Mircea, O.; Touleimat, S.; Millochau, J.-C.; Abo, C.; Angioni, S.; Roman, H. Does preoperative antimüllerian hormone level influence postoperative pregnancy rate in women undergoing surgery for severe endometriosis? *Fertil. Steril.* **2017**, *107*, 707–713. [[CrossRef](#)]
46. Saito, N.; Yamashita, Y.; Okuda, K.; Kokunai, K.; Terai, Y.; Ohmichi, M. Comparison of the impact of laparoscopic endometriotic cystectomy and vaporization on postoperative serum anti-Müllerian hormone levels. *Asian J. Endosc. Surg.* **2018**, *11*, 23–29. [[CrossRef](#)]
47. Candiani, M.; Ottolina, J.; Posadzka, E.; Ferrari, S.; Castellano, L.M.; Tandoi, I.; Pagliardini, L.; Nocuñ, A.; Jach, R. Assessment of ovarian reserve after cystectomy versus ‘one-step’ laser vaporization in the treatment of ovarian endometrioma: A small randomized clinical trial. *Hum. Reprod.* **2018**, *33*, 2205–2211. [[CrossRef](#)]
48. Candiani, M.; Ottolina, J.; Schimberni, M.; Tandoi, I.; Bartiromo, L.; Ferrari, S. Recurrence Rate after “One-Step” CO₂ Fiber Laser Vaporization versus Cystectomy for Ovarian Endometrioma: A 3-Year Follow-up Study. *J. Minim. Invasive Gynecol.* **2020**, *27*, 901–908. [[CrossRef](#)]
49. Giampaolino, P.; Bifulco, G.; Sardo, A.D.S.; Mercurio, A.; Bruzzese, D.; Di Carlo, C. Endometrioma size is a relevant factor in selection of the most appropriate surgical technique: A prospective randomized preliminary study. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **2015**, *195*, 88–93. [[CrossRef](#)]
50. Tsolakidis, D.; Pados, G.; Vavilis, D.; Athanatos, D.; Tsalikis, T.; Giannakou, A.; Tarlatzis, B.C. The impact on ovarian reserve after laparoscopic ovarian cystectomy versus three-stage management in patients with endometriomas: A prospective randomized study. *Fertil. Steril.* **2010**, *94*, 71–77. [[CrossRef](#)]
51. Lee, H.J.; Lee, J.E.; Ku, S.-Y.; Kim, S.H.; Kim, J.G.; Moon, S.Y.; Choi, Y.M. Natural conception rate following laparoscopic surgery in infertile women with endometriosis. *Clin. Exp. Reprod. Med.* **2013**, *40*, 29–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Raffi, F.; Amer, S.A. Long-term reproductive performance after surgery for ovarian endometrioma. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **2014**, *172*, 80–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Maggiore, U.L.R.; Scala, C.; Tafi, E.; Racca, A.; Biscaldi, E.; Vellone, V.G.; Venturini, P.L.; Ferrero, S. Spontaneous fertility after expectant or surgical management of rectovaginal endometriosis in women with or without ovarian endometrioma: A retrospective analysis. *Fertil. Steril.* **2017**, *107*, 969–976.e5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Dubinskaya, E.D.; Gasparov, A.S.; Radzinsky, V.E.; Barabanova, O.E.; Dutov, A.A.; Dutov, A.A. Surgery for endometriomas within the context of infertility treatment. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **2019**, *241*, 77–81. [[CrossRef](#)]
55. Alborzi, S.; Sorouri, Z.Z.; Askari, E.; Poordast, T.; Chamanara, K. The success of various endometrioma treatments in infertility: A systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Reprod. Med. Biol.* **2019**, *18*, 312–322. [[CrossRef](#)]
56. Vercellini, P.; Somigliana, E.; Viganò, P.; Abbiati, A.; Barbara, G.; Crosignani, P.G. Surgery for endometriosis-associated infertility: A pragmatic approach. *Hum. Reprod.* **2009**, *24*, 254–269. [[CrossRef](#)]
57. Dong, Z.; An, J.; Xie, X.; Wang, Z.; Sun, P. Preoperative serum anti-Müllerian hormone level is a potential predictor of ovarian endometrioma severity and postoperative fertility. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **2019**, *240*, 113–120. [[CrossRef](#)]
58. Iwase, A.; Nakamura, T.; Kato, N.; Goto, M.; Takikawa, S.; Kondo, M.; Osuka, S.; Mori, M.; Kikkawa, F. Anti-Müllerian hormone levels after laparoscopic cystectomy for endometriomas as a possible predictor for pregnancy in infertility treatments. *Gynecol. Endocrinol.* **2015**, *32*, 1–5. [[CrossRef](#)]
59. Roman, H.; Auber, M.; Bourdel, N.; Martin, C.; Marpeau, L.; Puscasiu, L. Postoperative Recurrence and Fertility after Endometrioma Ablation Using Plasma Energy: Retrospective Assessment of a 3-Year Experience. *J. Minim. Invasive Gynecol.* **2013**, *20*, 573–582. [[CrossRef](#)]
60. Motte, I.; Roman, H.; Clavier, B.; Jumeau, F.; Chanavaz-Lacheray, I.; Letailleur, M.; Darwish, B.; Rives, N. In vitro fertilization outcomes after ablation of endometriomas using plasma energy: A retrospective case-control study. *Gynecol. Obstet. Fertil.* **2016**, *44*, 541–547. [[CrossRef](#)]
61. Deckers, P.; Ribeiro, S.C.; Simões, R.D.S.; Miyahara, C.B.D.F.; Baracat, E.C. Systematic review and meta-analysis of the effect of bipolar electrocoagulation during laparoscopic ovarian endometrioma stripping on ovarian reserve. *Int. J. Gynecol. Obstet.* **2018**, *140*, 11–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Donnez, J.; Wyns, C.; Nisolle, M. Does ovarian surgery for endometriomas impair the ovarian response to gonadotropin? *Fertil. Steril.* **2001**, *76*, 662–665. [[CrossRef](#)]
63. Brougham, M.E.H.; Crofton, P.M.; Johnson, E.J.; Evans, N.; Anderson, R.A.; Wallace, W.H.B. Anti-Müllerian Hormone Is a Marker of Gonadotoxicity in Pre- and Postpubertal Girls Treated for Cancer: A Prospective Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2012**, *97*, 2059–2067. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. La Marca, A.; Spada, E.; Grisendi, V.; Argento, C.; Papaleo, E.; Milani, S.; Volpe, A. Normal serum anti-Müllerian hormone levels in the general female population and the relationship with reproductive history. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **2012**, *163*, 180–184. [[CrossRef](#)]

65. Roman, H.; Tarta, O.; Pura, L.; Opris, I.; Bourdel, N.; Marpeau, L.; Sabourin, J.-C. Direct proportional relationship between endometrioma size and ovarian parenchyma inadvertently removed during cystectomy, and its implication on the management of enlarged endometriomas. *Hum. Reprod.* **2010**, *25*, 1428–1432. [[CrossRef](#)]
66. Muzii, L.; Di Tucci, C.; Di Feliciano, M.; Galati, G.; Pecorella, L.; Radicioni, A.; Anzuini, A.; Piccioni, M.G.; Patacchiola, F.; Panici, P.B. Ovarian Reserve Reduction with Surgery Is Not Correlated with the Amount of Ovarian Tissue Inadvertently Excised at Laparoscopic Surgery for Endometriomas. *Reprod. Sci.* **2019**, *26*, 1493–1498. [[CrossRef](#)]
67. Duffy, J.M.N.; Hirsch, M.; Vercoe, M.; Abbott, J.; Barker, C.; Collura, B.; Drake, R.; Evers, J.; Hickey, M.; Horne, A.W.; et al. A core outcome set for future endometriosis research: An international consensus development study. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* **2020**, *127*, 967–974. [[CrossRef](#)]

7. Pais AS, Guerra N, Couto D, Sousa AP, Almeida-Santos T. *Fertility preservation with successful pregnancy outcome in a patient with transplanted heart and non-Hodgkin's lymphoma - a case report*. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2019;19(1):421. Doi: 10.1186/s12884-019-2587-x.

Pais et al. *BMC Pregnancy and Childbirth* (2019) 19:421
<https://doi.org/10.1186/s12884-019-2587-x>

BMC Pregnancy and Childbirth

CASE REPORT

Open Access

Fertility preservation with successful pregnancy outcome in a patient with transplanted heart and non-Hodgkin's lymphoma – a case report



Ana Sofia Pais^{1,2,3*}, Nuno Guerra², Daniela Couto¹, Ana Paula Sousa^{1,4} and Teresa Almeida-Santos^{1,3,4}

Abstract Background: Fertility preservation must be discussed with reproductive age women before cancer treatment. Heart transplantation raises complex issues in pregnancy. Pregnancy in a heart transplant woman after pelvic irradiation involves close multidisciplinary follow-up to avoid complications in the mother and the foetus. We report the first live birth in a heart transplant woman after pelvic irradiation, chemotherapy and fertility preservation.

Case presentation: A 36-year-old heart transplant woman with pelvic non-Hodgkin lymphoma spared her fertility, with cryopreservation of oocytes and embryos, before chemotherapy and pelvic irradiation. After multidisciplinary discussion and pre-conception evaluation, pregnancy was achieved. A close follow-up by a multidisciplinary team allowed a normal pregnancy without maternal or foetal complications and the delivery of a healthy infant.

Conclusions: Achieving pregnancy in heart transplant women with iatrogenic ovarian failure after oncologic treatment including pelvic irradiation is possible and can be successful. Careful and close surveillance by a multidisciplinary team is mandatory due to increased risk of maternal and foetal complications.

Keywords: Pregnancy, Oocyte cryopreservation, Pelvic irradiation, Heart transplant

Background

A growing number of women have an oncological diagnosis before ending or even starting their reproductive project. Nevertheless, many cancers are curable, so the quality of life after cancer needs to be addressed, as the risk of impairing gonadal function is high [1]. Fertility preservation treatments give hope for a successful pregnancy once the disease is overcome, but individualized reproductive counselling is mandatory both before and after cancer treatment [1, 2].

As well as premature ovarian failure, previous pelvic irradiation is associated with smaller uterine volume, which can be related to direct damage and/or hormonal depletion [2]. However, available evidence comes from radiation exposure during childhood or adolescence, and

it is not known if it can be extrapolated to adult women that undergo pelvic irradiation [2].

On the other hand, fertility and pregnancy in heart transplant patients raise complex issues, considering the high risk for potential maternal and foetal complications [3]. Since the first successful pregnancy after heart transplantation in 1988, more than 12,000 heart transplants have been performed in women, with a 5-year patient survival of 69%, raising the issue of developing appropriate pregnancy management strategies [4]. For non-Hodgkin lymphoma, the 5-year survival rate is 71%. However, the 5-year survival rate vary widely for different types and stages of lymphoma, being 51,1% for a stage IV large B-cell lymphoma [5].

In this case report, we describe a successful pregnancy and delivery after fertility preservation in a heart transplant woman after pelvic lymphoma radiation. This is a unique case as it combines the challenge of pregnancy in a heart transplant patient under immunosuppression, with fertility preservation and the consequences of

* Correspondence: afpais@ucp.pt

¹Reproductive Medicine Unit, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), Praceta Prof. Mota Pinto, 3000-075 Coimbra, Portugal

²Obstetrics A Unit, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2019 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

oncological treatments, namely pelvic radiotherapy. Informed consent was obtained from the patient for this report and approved by the Hospital Ethics Committee.

Case presentation

In 2006, a 25-year-old woman underwent heart transplanted due to dilated cardiomyopathy of unknown aetiology. She was under regular follow-up and treatment in the Cardiothoracic Surgery Unit, without rejection. The patient was previously healthy and had no family history, with 18,96 Kg/m² of body mass index.

Seven years later, a pelvic tumor of 14 × 10 cm was seen in a computerized tomography scan, involving the uterus and adnexal regions, with another mass of 6 × 5 cm involving the right colon. Laparoscopic biopsies were performed and revealed a stage IV non-Hodgkin's lymphoma, more precisely diffuse large B-cell lymphoma.

As the woman wished to spare her fertility potential, ovarian stimulation was started before oncological treatment. After collection of 12 mature oocytes, 6 were vitrified and another 6 were fertilized and cryopreserved at the 2PN stage (pre-zygotes).

Immediately after oocyte collection, chemotherapy was initiated with 8 cycles of R-CHOP (rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone), with pegylated liposomal doxorubicin (total dose 800 mg) in order to avoid cardiotoxicity. Due to residual mass in a positron emission tomography scan, pelvic radiotherapy was initiated (36 Gy/18 fraction, in abdominal lymph nodes). At the end of therapy (May 2014), a complete remission was achieved without cardiac toxicity.

After oncological treatment, the woman became amenorrhoeic, with genital atrophy. Atrophic ovaries, uterus and endometrium were seen in the ultrasound scan. The hormonal analysis confirmed the diagnosis of premature ovarian failure with an elevated follicle stimulating hormone level, on two occasions more than 1 month apart (122 and 137 mIU/mL), with low oestradiol (< 12 pg/mL) and anti-Müllerian hormone levels (< 0.0004 pg/L).

As the couple wished for a pregnancy, a multidisciplinary discussion, including cardiothoracic surgery and haemato-oncology, was conducted, as well as a pre-conception evaluation. Two years after the end of oncological therapy, endometrial preparation was initiated to allow embryo transfer. Endometrial preparation was started with oral oestradiol 6 mg per day, however endometrial ultrasound evaluation was unsatisfactory. In subsequent endometrium preparation attempts, sildenafil and vitamin E were unsuccessfully associated. After five months of failed attempts, the combination of 6 mg oral oestradiol daily plus 100 mg transdermal weekly achieved an adequate endometrium (7 mm tri-layered endometrium on ultrasound) and then vaginal progesterone (400 mg 3 times daily) was started. Cryopreserved

2PN oocytes were thawed and one resulting embryo was transferred after five days after progesterone onset.

After achieving pregnancy, the patient was followed regularly by a multidisciplinary team including a cardiologist and an obstetrician. She had also regular follow-up by cardiothoracic surgery and haemato-oncology.

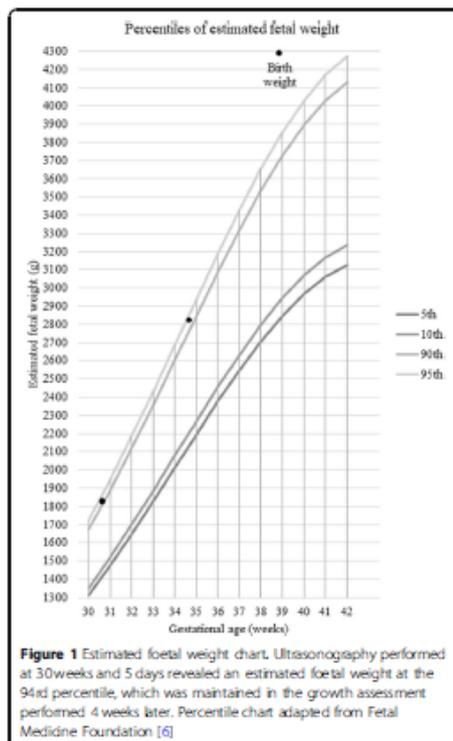
At the first appointment, the therapeutic regimen included immunosuppressive drugs (tacrolimus 3 mg, prednisolone 4 mg), anticoagulant medication (enoxaparin 40 mg), platelet aggregation inhibitor (indobufen 200 mg), calcium antagonist drug (diltiazem 60 mg), diuretic therapy (furosemide 20 mg), proton pump inhibitor (pantoprazole 40 mg) and statin (pravastatin 20 mg), plus pregnancy supplementation with folic acid 5 mg and the endometrial preparation regimen (oestradiol 8 mg oral and 100 mg transdermal and progesterone 1200 mg vaginal). The patient was informed of the teratogenicity of her medication and the risks of suspending it. The medication was progressively reduced so that in the third trimester we achieved the combination of immunosuppressive drugs (tacrolimus 3 mg, prednisolone 4 mg), anticoagulant medication (enoxaparin 40 mg), platelet aggregation inhibitor (acetylsalicylic acid 100 mg, stopped at 35 weeks), calcium antagonist drug (diltiazem 60 mg), diuretic therapy (furosemide SOS), plus pregnancy supplementation with ferrous sulphate 90 mg.

Screening for infections and gestational diabetes were negative with normal renal and hepatic function. Blood pressure was normal and no proteinuria was detected during pregnancy.

Foetal ultrasound examination at 12 weeks was normal, with nuchal translucency below the 95th percentile, and the first trimester combined screening of aneuploidies was negative. Ultrasound at 22 weeks revealed a normal foetal morphology, except left clubfoot, normal heart evaluation, and normal growth (biometry in the 50th percentile). According to Fetal Medicine Foundation charts [6], at 30 weeks foetal biometry was in 94th percentile (1865 g), confirmed at 34 weeks (2827 g), with bilobed fundal placenta, with no signs suggestive of placenta accreta.

The maternal echocardiography performed in third trimester of pregnancy revealed normal left ventricular function (54%).

At 39 weeks of gestation, a caesarean section was performed, due to suspected foetal macrosomia (Fig. 1). She delivered a female infant of 4305 g, Apgar score 9/10/10. Prophylactic antibiotic therapy for caesarean section was administered. Surgery was done under epidural anaesthesia without incidents, except for moderate bleeding, due to difficulty in manual removal of placenta, although no signs of placenta accreta were seen in the histological analysis.



She breastfed the newborn and no neonatal complication were reported. No severe graft dysfunction or infection were observed during the puerperal period and she was discharged 3 days later.

Discussion and conclusions

With improving oncological treatments, quality of life in cancer survivors is of growing significance. Loss of fertility is a key issue for young female cancer survivors, depending on the follicular reserve, the age of the patient and the type and dose of drugs used. As observed in the case reported, a high risk for premature ovarian failure is found after gonadotoxic treatment and pelvic radiation [1].

Ovarian stimulation and oocyte or embryo cryopreservation prior to chemoradiation must be discussed with every young female cancer patient. However, there is scarce experience in the management of women who wish to get pregnant following pelvic radiation [1, 2]. Sex steroid replacement, in a progressively escalating dose regimen, may have a role in the restoration of satisfactory uterine volume,

endometrial thickness, and uterine vascularization in women who have been exposed to lower doses of uterine radiation (<25 Gy) at a post-pubertal age [2].

Preconception evaluation is crucial in heart transplant recipients who wish to become pregnant, including counselling, appropriate evaluation of graft function, and monitoring of immunosuppressive agents [4]. Regarding previous pelvic irradiation, there is minimal data in the literature about fertility and pregnancy outcome of women exposed in adulthood [2]. The threshold radiation dose for uterine damage to occur so that pregnancy is not sustainable is unknown, but Teh et al. (2014) suggest that patients receiving >45 Gy during adulthood should be counselled to avoid attempting pregnancy [2]. Appropriate counselling with regard to the ability of the irradiated uterus for carrying a pregnancy should be provided to these women. A successful pregnancy will require not only a viable embryo but also a uterine cavity that is receptive to embryo implantation and a uterus that has the ability to accommodate normal growth of the foetus to term [2].

Achieving pregnancy after pelvic irradiation in a heart transplant patient needs close monitoring by a multidisciplinary team [4, 7].

Pregnancy and postpartum are periods of increased risk of complications in post-cardiac transplant patients [4]. Risks include pregnancy induced hypertension (hypertension, pre-eclampsia, edamnesia), infection, gestational diabetes and thromboembolic disease (venous thromboembolism, pulmonary embolism), all of which can lead to adverse maternal, foetal, and neonatal outcomes [3, 4]. The most common maternal complication in the pregnant heart transplant patient is hypertension [4, 8]. The incidence of preeclampsia in cardiac recipients is 18%, higher than the 2 to 7% in healthy nulliparous women [8]. Pre-eclampsia increase the risks of foetal growth restriction, low birth weight, and preterm delivery [4]. For pregnant heart transplant patients, the risk of spontaneous abortion is 15 to 20% [4]. Graft rejection is another possible complication, reported in 11% during pregnancy and 6% during the first 3 months after delivery [8].

Pelvic irradiation also increases the risk for pregnancy-related complications, including spontaneous miscarriages, preterm labor and delivery, low birth weight, placental abnormalities and uterine rupture [7]. These findings have been attributed to reduced uterine volume, impaired uterine distensibility due to myometrial fibrosis, uterine vasculature damage, and endometrial injury [2, 7]. Placental attachment disorders, including placenta accreta or percreta, are related to endometrium injury that prevents normal decidualization. It has also been hypothesized that radiation therapy may lead to diffuse thinning of the myometrium, increasing the risk of uterine rupture [7].

First pregnancy after chemo-immuno-radiation therapy for a pelvic lymphoma was described in 2008, Ferreri et al. described a spontaneous pregnancy with a vaginal delivery of a healthy baby 36 months after pelvic radiotherapy [9]. The therapeutic strategy was similar, but in a lower dose (6 versus 8 cycles of R-CHOP and 30-6Gy versus 36Gy of radiotherapy). For fertility preservation, they used ovary transposition. This technique is relatively simple and particularly interesting before pelvic radiotherapy, however it is underused as it does not protect from the gonadotoxic effect of systemic treatment as chemotherapy.

Birth defects may originate through multiple mechanisms and may be caused by a variety of possible exposures, including medications in early pregnancy. The history of chemotherapy and pharmacological treatment at the time of the first consultation could be a concern in this case. However, a recent meta-analysis and systematic review report that the most common and clinically relevant risk factors for club foot are family history, selective serotonin reuptake inhibitors, amniocentesis, maternal/paternal smoking, maternal obesity, gestational diabetes. None of these risk factors were present in the clinical case presented [10]. Vaginal delivery is the recommended method of delivery in heart transplant recipients [4]. A caesarean section should be performed for obstetric indications [3] and is reported in 40% of deliveries in this population [8]. In the reported case, a caesarean section was performed due to suspected foetal macrosomia, under epidural anaesthesia, in order to reduce sympathetic responses induced by pain and acute fluctuations of blood pressure during labour [3].

Prophylactic antibiotic therapy is not routinely recommended, except for high risk condition [3, 4, 11], and in this case it was administered to prevent subacute bacterial endocarditis and post-operative infection. During labour, arrhythmias were closely monitored via continuous electrocardiogram, as recommended [4]. Because of the haemodynamic changes and volume shifts that occur immediately post-delivery, the cardiac transplant patient is at highest risk during the immediate postpartum period [4].

Breastfeeding has typically been discouraged in heart transplant.

women, as all immunosuppressive medications are secreted through breast milk and long-term effects of immunosuppressive drug exposure on infants are unknown [3]. However, recent studies have shown that transplant recipients taking prednisone and tacrolimus should not be discouraged from breastfeeding [12].

All women, including heart transplant patients, should be counselled for fertility preservation in case they developed oncological disease. The strategies of fertility preservation are not different for heart transplant patients.

When choosing the best method for fertility preservation a multidisciplinary team should consider the patients' age, pubertal status and maturity level, cancer type, prognosis, staging and existence/risk of metastasis, time available for fertility preservation intervention before initiating treatment and the indication and limitations for each fertility preservation method applied to each specific patient. Options for fertility preservation in cancer patients include oocyte and embryo cryopreservation as established methods and ovarian tissue cryopreservation, in vitro maturation of oocytes and artificial ovary as experimental methods [13].

For cases such as the reported, pre-pregnancy risk assessment and counselling should be offered. Subsequently, prenatal surveillance should be performed in specialized centres by a multidisciplinary pregnancy heart team, with at least one monthly consultation [14].

In conclusion, achieving a successful pregnancy in a woman with iatrogenic premature ovarian failure due to oncological treatments, including pelvic radiation and a previous heart transplant is a conquest of modern medical management and team work. Additionally, a history of cardiac transplantation is not a contraindication for fertility preservation if those patients developed a curable oncological disease. Proper counselling, careful and close surveillance by a multidisciplinary team is mandatory for successful outcome, due to increased risk of maternal and foetal complications.

Abbreviations

CHUC: Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra; PN: Pre-zygotes; R-CHOP: Rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone

Acknowledgements

We would like to acknowledge Dr. António Marinho from the Cardiology Unit and Dr. Manuel Batista from Cardiothoracic Unit for their support on medical treatment. Finally, we are also grateful to Dr. Brás da Luz from the Haematologic Unit of CHUC.

Authors' contributions

ASP was a major contributor in writing the manuscript. NG analysed and interpreted the patient data regarding the cardiac transplant and pregnancy follow-up. DC, APS and TAS analysed and interpreted the patient data regarding the fertility preservation. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

The authors declare that they have no funding.

Availability of data and materials

The datasets generated and/or analysed during the current study are not publicly available due to individual privacy but are available from the corresponding author on reasonable request.

Ethics approval and consent to participate

All procedures performed were in accordance with the ethical standards of the institution and with the 1964 Helsinki Declaration. Written informed consent was obtained from the participant included in the study. The Ethics Committee – Comissão de Ética para a Saúde do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, nº019/CES – approved the study.

Consent for publication

The patient in this report gave written consent for publication. The Ethics Committee – Comissão de Ética para a Saúde do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, nº019/CEES – approved the study.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Reproductive Medicine Unit, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), Praceta Prof. Mota Pinto, 3000-075 Coimbra, Portugal. ²Obstetrics A Unit, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal.

³Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal. ⁴Center for Neuroscience and Cell Biology, University of Coimbra, Coimbra, Portugal.

Received: 30 March 2019 Accepted: 8 November 2019

Published online: 19 November 2019

References

1. Donnez J, Dolmans MH. Fertility preservation in women. *N Engl J Med*. 2017;377(17):1657–65.
2. Teh WT, Stem C, Chander S, Hickey M. The impact of uterine radiation on subsequent fertility and pregnancy outcomes. *Biom Res Int*. 2014;2014.
3. Cowan SW, Davison JM, Doria C, Moritz MJ, Arment V. Pregnancy after cardiac transplantation pregnancy heart transplantation. *Cardiol Clin*. 2012;30(3):441–52.
4. Abdalla M, Mancini DM. Management of Pregnancy in the post-cardiac transplant patient. *Semin Perinatol*. 2014;38(5):318–25.
5. National Cancer Institute. Cancer Stat Facts: NHL – Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL) [Internet]. 2019 [cited 2019 Jun 12]. Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/dlbc1.html>
6. Nicolaidis KH, Wright D, Syngelaki A, Wright A, Alaklekar R. Fetal Medicine Foundation fetal and neonatal population weight charts. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2018;52(1):44–51.
7. Wu J, Viswanathan A. The impact of radiotherapy on fertility, pregnancy, and neonatal outcomes of female Cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2009;73(3):1304–12.
8. Coscia L, Constantinescu S, Moritz M, Frank A, Ramirez C, Doria C, et al. Report from the National Transplantation Pregnancy Registry (NTPR): outcomes of pregnancy after transplantation. *Clin Transpl*. 2011;65–85.
9. Ferreri A, Verona C, Bolognesi A, Taccagni G, Ponzone M, Ferreri S. Successful pregnancy after chemo-immuno-radiation therapy for aggressive lymphoma of the uterus. *Br J Haematol*. 2008;142(1):141–3.
10. Chen C, Kaushal N, Scher DM, Doyle SM, Bianco JS, Dodwell ER. Clubfoot etiology. *J Pediatr Orthop*. 2018;38(8):e462–9.
11. Nishimura RA, Otto CM, Bonow RO, Il JPE, Fetscher LA, Jneid H, et al. 2017 AHA/ACC focused update of the 2014 AHA/ACC guideline for the Management of Patients with Valvular Heart Disease. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task force on clinical practice guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2017;70(2):252–89.
12. Constantinescu S, Pai A, Coscia L, Davison JM, Moritz M, Arment V. Breast-feeding after transplantation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2014;28:1163–73.
13. Mahajan N. Fertility preservation in female cancer patients: an overview. *J Hum Reprod Sci*. 2015;8(1):3.
14. Task A, Members F, Chairperson VR, Blomstro C, Renata C, France BI, et al. 2018 ESC guidelines for the management of cardiovascular diseases during pregnancy. Vol. 72, rev. Exp Cardiol (English ed). 2019:161.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Resumos publicados em revistas indexadas:

1. Moura-Ramos M, Sousa AP, Couto D, Carvalho A, Pais AS, Almeida-Santos T. *Who and when are the young women returning for using their cryopreserved material after fertility preservation for cancer treatment? A 10-year experience of an oncofertility center. J Assist Reprod Genet.* 2020; 37: 987–1015.

determine their outcomes with these highly extended embryo culture embryos to accurately inform patients of the extremely low probability of a successful cycle. **Support:** None

Disclosures: None

drbarritt@artreproductivecenter.com

WHO AND WHEN ARE THE YOUNG WOMEN RETURNING FOR USING THEIR CRYOPRESERVED MATERIAL AFTER FERTILITY PRESERVATION FOR CANCER TREATMENT? A 10-YEAR EXPERIENCE OF AN ONCOFERTILITY CENTER

Moura-Ramos, Mariana^{1,2}; Sousa, Ana Paula^{1,3}; Couto, Daniela¹; Carvalho, Alexandra^{1,3}; Pais, Ana Sofia¹; Almeida-Santos, Teresa^{1,4,3}

¹Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Serviço de Medicina da Reprodução, Coimbra, Portugal, ²Cognitive and Behaviour Center for Research and Intervention, Faculty of Psychology and Educational Sciences, University of Coimbra, Coimbra, Portugal, ³Centre for Neuroscience and Cell Biology, University of Coimbra, Coimbra, Portugal, ⁴Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

Introduction: Fertility preservation (FP) is increasingly being offered to women facing cancer treatments. However, the use of the cryopreserved material is still scarce. In this study, we present data of a FP center describing who and when are female cancer patients returning to use their cryopreserved material. **Methods:** Patients referred to FP counselling were included. Returning rates and time to return to attempt

pregnancy were examined in a subsample of women in child-bearing age (> 25 years old). **Results:** Between 2009 and 2019, 340 women were counselled for FP (mean age 30.31 ± 6.27, 12–43). Breast (59.1%) and hematological (19%) cancers were the most frequent. Of those, 245 (72.1%) chose to undergo FP, although only 204 (60%) patients had cryopreserved material (69.3%: oocytes; 3.5%: embryos and 27.1%: ovarian tissue). Among the group of patients who survived and had material cryopreserved ($n = 192$), 9.8% returned to use the cryopreserved material. A detailed analysis was performed in a sample of women currently aged > 25 and FP until 2018 ($n = 163$). Nineteen women returned to use the cryopreserved material (returning rate of 11.66%). Mean age at the time of FP was 32.95 ± 3.73 and mean age at the time of the return was 36.47 ± 3.58. Mean time between time of FP and return was 3.5 years. Expectedly, women who returned were significantly older than women who did not (34.48 vs 38.21, $p < 0.001$). No differences were found in the number of MII oocytes between the women who and who did not return (7.91 vs 6.00, $p = 0.159$). Of the total of 19 women who return to attempt pregnancy, 3 achieved pregnancy after treatment (15.7%), and 3 are still in treatment. **Conclusions:** The use of cryopreserved material is still low but increasing with women's ageing. Patients should be assisted in their decision making to attempt pregnancy after FP. **Support:** None **Disclosures:** No conflicts of interest to disclose
marianamramos@gmail.com

2. Almeida-Santos T, Pais AS, Reis S, Laranjo M, Caramelo F, Silva F, Botelho F. *The challenge of ovarian tissue culture: 2D versus 3D. Hum Reprod.* 2021: 36, Suppl, pp. i1–i513.

physiology. The vast majority of patients with RA are treated with methotrexate (MTX) which is a folate antagonist that inhibits DNA synthesis. MTX, which is the anchor drug in RA, targets actively proliferating cells including the oocytes and granulosa cells which may impair the ovarian reserve [Min Tun Kyaw et al. 2020].

Study design, size, duration: A prospective case-control study that enrolled 72 female patients with infertility and RA; the control group consisted of 40 women with infertility only. Patients with RA were stratified into subgroups based on whether or not they received MTX.

Participants/materials, setting, methods: The main group comprised 32 patients with infertility and RA; the control group consisted of 40 women with infertility only. Patients with RA were stratified into subgroups based on whether or not they received MTX. To investigate ovarian reserve measurement of serum anti-Müllerian hormone (AMH) was used. The level of AMH was evaluated concerning RA duration and activity, as well as the age at initiation of MTX therapy, dosage, and treatment duration.

Main results and the role of chance: The mean age of the study population was 36±3 years. The duration of RA was 4 [3; 11] years. The low disease activity based on DAS28-ESR (disease activity score based on 28 joints using the erythrocyte sedimentation rate) prevailed (56.2%).

In the main group 19 (59.4%) women received MTX therapy. The MTX dosage was 15 [15;20]mg /wk, the duration of MTX therapy by the day of inclusion in the study was 18.7[1; 15]months.

The AMH level was significantly lower in the main group (2.1 n /ml vs 2.73ng /ml, p=0.043). The number of patients with decreased ovarian reserve (AMH level<1.0ng/ml) significantly prevailed in the group of patients with RA (25% vs 5%, p=0.015).

When assessing the AMH level in patients with RA who received MTX (n=19) and patients in the control group, there was a tendency towards a decrease in the indicator in the first subgroup, but no statistically difference was found (p=0.074).

Correlation analysis of the dependence of AMH level on the patient age showed the most significant decrease in AMH in the patients with RA receiving MTX compared to the patients with RA who did not, and compared to all patients with RA regardless of the therapy received (rs=-0.563) (p <0.05).

Limitations, reasons for caution: The lack of statistically significant data in certain cases may be due to the small sample size.

Wider implications of the findings: RA and MTX administration are associated with a significant decrease in AMH levels. The age of initiation of the therapy is negatively correlated with the AMH level. In this regard, patients with already compromised reproductive function who are planning to receive MTX should be advised to preserve the genetic material.

Trial registration number: 567890

P-451 Improving neovascularization and follicle viability in cryopreserved bovine ovarian tissue transplants

A. Müller¹, J. Lehner¹, K. Hancke¹, W. Janni¹, K. Budschu¹
¹University Hospital Ulm, Gynaecology and obstetrics, Ulm, Germany

Study question: Does cryopreservation and transplantation of bovine ovarian medulla-containing cortex tissue improve the viability and vascularization of the graft? Summary answer: Transplantation of bovine ovarian cortex containing medulla has a positive effect on follicular viability and neovascularization of the graft compared to cortex transplantation alone.

What is known already: For female fertility protection, cryopreservation and retransplantation of ovarian tissue is a widely used method. During cryopreservation, ovarian tissue is exposed to mechanical and hypoxic stress resulting in follicular loss. Moreover, after retransplantation tissue vitality and follicle survival is limited due to ischemia. As follicular viability is of major importance for fertility and hormonal activity, the main focus is on improving vitality and viability of the grafts. In current protocols, ovarian medulla is discarded and merely cortex tissue is preserved. However, medulla tissue predominantly contains blood vessels, thereby obtaining high potential for revascularization processes and thereby supporting tissue vitality.

Study design, size, duration: This experimental laboratory work was performed during a period of ten months. The rapidly vascularized chorioallantoic-membrane (CAM) of fertilized chicken eggs was used as model system to

investigate neovascularization, follicle survival and tissue vitality of different bovine ovarian grafts. In four independent experimental rows four different tissue types (isolated cortex, thick medulla-containing cortex (8 x 10 x 3 mm), thin medulla-containing cortex (5 x 10 x 3 mm) and sole medulla tissue were compared.

Participants/materials, setting, methods: Out of four bovine ovaries preserved from the slaughterhouse, in total 117 samples of the four different tissue types were primed and cryopreserved by the common slow-freezing protocol. After thawing, grafts were transplanted on separate CAMs at day four of fertilized eggs. After four days of incubation, blood vessels growing towards the grafts were counted. Subsequently, grafts were harvested, digested with collagenase and stained with Neutral Red® to determine the total amount of vital follicles.

Main results and the role of chance: To investigate the neovascularization, all graft-supplying blood vessels were determined and distinguished between small and thick vessels. Compared to sole cortex, there were more small vessels in the medulla-containing grafts (9.72 vs. 8.65). Especially thin medulla-containing cortex pieces exhibited the highest number of small vessels (9.90). Also in isolated medulla tissue an increased amount of small vessels was observed (9.79). However, the average number of big vessels was not significantly different in all four test groups (Cortex: 2.12; thin medulla-containing cortex: 1.69; thick medulla-containing cortex: 1.5; medulla: 2). The total number of all vessels differed from 10.76 (sole cortex) to 11.75 (medulla-containing grafts), indicating a support of neoangiogenesis by medulla tissue. To further examine whether medulla tissue also alters the amount of vital follicles, Neutral Red® stained vital follicles were determined in all different sample groups. Indeed, in medulla-containing cortex samples was an augmented average number of vital follicles (342.4) compared to sole cortex tissue (256.11). Most vital follicles were detectable in the thick medulla-containing cortex tissue (346.61), closely followed by the thin medulla-containing cortex grafts (338.19). As expected, there was just a rare amount of vital follicles in sole medulla grafts (8,13).

Limitations, reasons for caution: As the ovarian reserve in cattle is very individual, the prepared ovaries are different in their follicle amount. These individual differences may influence the number of counted follicles. Furthermore, the CAM model is only a short term experimental approach to investigate neovascularization and follicle survival.

Wider implications of the findings: According to our results, transplantation of human medulla-containing cortex appears promising. Keeping medulla tissue on the graft seems to improve both follicle viability and revascularization. Our findings need to be proven with human tissue, but might change the preparation of human ovarian tissue for fertility preservation in future.

Trial registration number: not applicable

P-452 The challenge of ovarian tissue culture: 2D versus 3D

A.T. Almeida Santos^{1,2,3,4}, A.S. Pais^{2,3,5}, S. Reis⁶, M. Laranjo^{3,7,8}, F. Caramelo^{2,9}, F. Silva⁹, F. Botelho^{3,7,10}

¹CNC - Center for Neuroscience and Cell Biology, University of Coimbra, Coimbra, Portugal;

²Faculty of Medicine-University of Coimbra, Coimbra, Coimbra, Portugal;

³Clinical Academic Center of Coimbra CACC, CACC, Coimbra, Portugal;

⁴Reproductive Medicine Unit, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

CHUC-E.P.E. - Coimbra-Portugal, Coimbra, Portugal;

⁵Institute of Biophysics and Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research

ICBR- Faculty of Medicine- Coimbra- Portugal, University of Coimbra, Coimbra,

Portugal;

⁶CNC - Center for Neuroscience and Cell Biology-University of Coimbra- Coimbra-

Portugal, CNC - Center for Neuroscience and Cell Biology- University of Coimbra-

Coimbra- Portugal, Coimbra, Portugal;

⁷University of Coimbra- Center for Innovative Biomedicine and Biotechnology

CIBB- Coimbra- Portugal, University of Coimbra, Coimbra, Portugal;

⁸University of Coimbra- Institute of Biophysics and Coimbra Institute for Clinical

and Biomedical Research ICBR, Faculty of Medicine- Coimbra- Portugal, Coimbra,

Portugal;

⁹Pathology Unit, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra CHUC- E.P.E.-

Coimbra- Portugal, Coimbra, Portugal;

¹⁰Institute of Biophysics and Coimbra Institute for Clinical and Biomedical

Research ICBR- Faculty of Medicine- Coimbra- Portugal, University of Coimbra,

Coimbra, Portugal

Study question: Does an alginate matrix scaffold improve ovarian tissue culture?

Summary answer: Ovarian tissue culture within an alginate scaffold has no advantage over conventional culture, being more time consuming and less reproducible

What is known already: Cryopreservation of ovarian tissue is a powerful technique for preserving female fertility, as it can restore fertility and endocrine function. Several studies have been carried out aiming to increase the longevity of the transplant and decrease the risk of reimplantation of neoplastic cells. For *in vitro* follicle culture, recent research has shifted from two dimensional (2D) toward the use of three-dimensional (3D) structures. The use of a matrix maintains the architecture and mimics *in vivo* conditions, with a variable access to oxygen and nutrients. This bridges the gap between conventional cell culture and animal models.

Study design, size, duration: Ovarian tissue fragments were divided into 2 groups: conventional culture (2D culture) and culture using an alginate matrix scaffold (3D culture). Tissue was evaluated at four time-points: immediately after thawing and after 24, 48 and 72 hours of culture.

Participants/materials, setting, methods: Rat ovarian tissue was cryopreserved and thawed with validated protocols. Follicular analysis was conducted after haematoxylin and eosin staining, regarding density, classification and degeneration. Tissue viability was assessed using lactate dehydrogenase (LDH) levels in supernatants and histological score. Three parameters were considered, namely, interstitial oedema, follicular cell degeneration and percentage of tissue in necrosis. Apoptosis was assessed by caspase 3 immunostaining. Proliferating cells were identified using Ki67 immunohistochemical labelling.

Main results and the role of chance: Follicular density, cell proliferation and apoptosis both in follicles and stroma was similar in both culture conditions. Stromal cells proliferation was stable in conventional culture but decreased in 3D culture ($p=0.001$), which can be explained by the rigidity of alginate matrix. At 24 hours of culture, cytotoxicity was lower in the 3D model ($p=0.006$), due to low levels of LDH in the supernatant, that may be related to retention within the matrix. As culture time increased cytotoxicity seemed to be similar. Degradation of the tissue was suggested by the histological score analysis of tissue during 72 hours of culture. Tissue injury was greater ($p=0.01$) in 3D culture due to higher interstitial oedema ($p=0.017$) and tissue necrosis ($p=0.035$). In the interior of the alginate scaffold, the bioavailability of oxygen and nutrients may be limited, affecting cell survival over time and conditioning higher level of necrosis and release of intracellular content.

Limitations, reasons for caution: There are two major limitations that should be addressed in future research, namely the study of the tissue-matrix interactions and culture medium supplementation to decrease follicular atresia.

Wider implications of the findings: There is no advantage in the use of an alginate matrix scaffold for ovarian tissue culture, as it is more time consuming, difficult to perform and less reproducible.

Trial registration number: Not applicable

P-453 Fertility preservation in endometriosis: Impact of the ovarian endometriosis and its surgical treatment on oocyte yield

A.S. Maget¹, M. Bourdon², B. Salle³, C. Patrat⁴, C. Maignien⁵, L. Marcellin², C. Chapron², P. Santulli⁶

¹Hôpital Cochin, maternité Port Royal service de gynécologie obstétrique II, Paris, France ;

²Hôpital Cochin, Maternité Port Royal service de gynécologie obstétrique II, Paris, France ;

³Hôpital mère enfant- Bron, Service de médecine de la reproduction, Lyon, France ;

⁴Hôpital Cochin, Service de biologie de la reproduction, Paris, France ;

⁵Hôpital Cochin, Maternité Port Royal- service de gynécologie obstétrique II, Paris, France

Study question: Does a previous history of surgery for ovarian endometriosis (OMA) has an impact on controlled ovarian stimulation (COS) response in case of fertility preservation (FP) for endometriosis?

Summary answer: After COS, a prior history for OMA surgery was associated with poorer ovarian responsiveness compared to non-previously operated women.

What is known already: Endometriosis is a chronic disorder that affects 10% of women, which can be responsible for infertility. The presence of OMA and/or its excision could induce a reduction of the ovarian reserve (ROR), and for some women, an increased risk of premature ovarian failure. Therefore, FP with oocyte/embryo vitrification can be proposed for OMA-affected women, considering the relationship between endometriosis, infertility and ROR. Although a complete surgery excision of endometriosis lesions may be appropriate for some patients to relieve them from pain, the more efficient time to preserve fertility is still unknown in the management of women presenting OMA lesions.

Study design, size, duration: We conducted an observational multicentric study from April 2015 to December 2019, in two tertiary care university hospitals. Women presenting OMA or having a previous history of surgery for OMA that had performed a FP with COS for oocytes/embryo vitrification during the study period were included. Diagnosis of endometriosis was based on published imaging criteria using transvaginal sonography and magnetic resonance imaging or histologically proven in women who had past surgery.

Participants/materials, setting, methods: A total of 165 women were allocated to two groups, according to the presence of a previous history of surgery for endometrioma(s). Main outcome measure was the total number of oocytes retrieved.

Main results and the role of chance: Fifty-one (30.9%) women were included in the group 'previous history of surgery' and 115 (69.1%) in the group 'no history of surgery'. Mean age was 31.6 ± 4.4 years and was not significantly different between groups ($p=0.09$). However, women in 'No previous surgery' group had higher AMH levels than women in 'previous surgery' group (2.27 ± 1.70 ng/ml versus 1.56 ± 1.89 ng/ml; $p<0.001$). In the group 'previous history of surgery', 21 (41.2%) women had a recurrence of OMA(s) and 31 (60.8%) had at least one deep infiltrating endometriosis (DIE) lesion at FP. In the group 'no history of surgery', 92 (80.7%) of the women had DIE. In addition, women in 'No previous surgery group' had larger OMA than women in 'previous surgery' group (mean diameter size: 5.56 ± 4.34 cm versus 3.25 ± 2.16 cm, respectively; $p=0.03$).

The mean number of COS with oocyte-retrieval was significantly higher in the group 'previous history of surgery' (2.0 ± 1.02 versus 1.65 ± 0.82 in the group 'no surgery', $p=0.03$), however, the total number of oocytes retrieved per women was significantly higher in women 'history of surgery', compared to women 'no previous surgery' (13.7 ± 8.4 versus 10.3 ± 7.5 , $p=0.02$). In addition, the cancellation rate per cycle was significantly lower in 'No previous surgery' group compared to the 'previous surgery' group (0.09 ± 0.31 versus 0.28 ± 0.53 ; $p<0.001$).

Limitations, reasons for caution: No data concerning the thawing of oocytes/embryo are available for now.

Wider implications of the findings: FP is an essential component to integrate in ovarian endometriosis-management and should be proposed before surgery to optimize oocyte yield.

Trial registration number: not applicable

P-454 Oocyte vitrification for fertility preservation in women with benign gynecological disease: French national clinical guidelines with a modified Delphi consensus process

B. Courbière¹, E. L. Roux², E. Mathie³, D'Argent⁴, A. Torre⁴, C. Patrat⁵, C. Poncelet⁶, J. Montagut⁷, A.S. Gremeau⁸, H. Creux⁹, M. Peigne¹⁰, I. Chavanaz-Lacheray¹¹, L. Dirian¹², X. Fritel¹³, J.L. Pouly¹⁴, A. Fauconnier¹⁵

¹APHM Hôpital de la Conception / Aix Marseille Univ, Gynecology- Obstetrics and reproductive Medicine, Marseille, France ;

²Hôpital Universitaire Robert Debré- AP-HP / Inserm- Université de Paris, Unité d'épidémiologie clinique Inserm- CIC 1426 / ECEVE UMR 1123, Paris, France ;

³APH-HP Hôpital Tenon / Université Pierre-et-Marie-Curie Paris 6, Department of Gynecology-Obstetric and Reproductive Medicine- Centre expert en endométriose C3E, Paris, France ;

⁴CHU Rouen, Department of Gynecology - Obstetric and Reproductive Medicine, Rouen, France ;

⁵APH-HP centre - Université de Paris- site Cochin- Inserm U1016, Service de Biologie de la Reproduction - CECOS, Paris, France ;

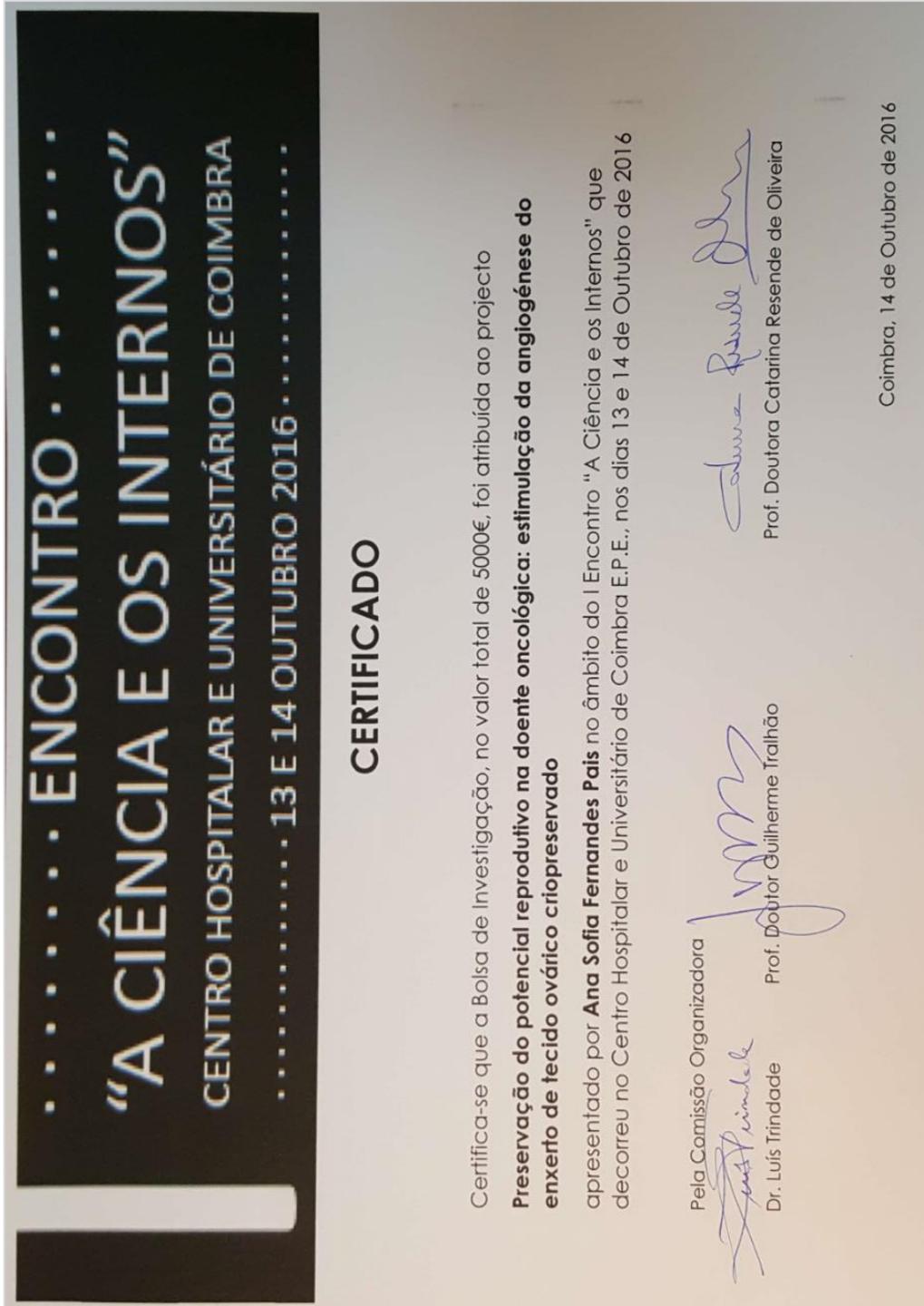
⁶CH René Dubos / Université Sorbonne Paris Nord - Université Paris 13, Gynecology - Obstetrics / UFR SMBH Leonard de Vinci, Cergy-Pontoise, France ;

Prémios e Bolsas:

1. Prémio de investigação 2015 da SPG - Promoção da angiogénese precoce do enxerto de tecido ovárico humano após criopreservação em contexto de preservação da fertilidade de doentes oncológicas. Almeida Santos T, Pais AS. 185ª Reunião da SPG, Braga, 3 e 4/06/2016.



2. Bolsa investigação do CHUC - Preservação do potencial reprodutivo na doente oncológica: estimulação da angiogénese do enxerto de tecido ovárico criopreservado. I Encontro “A Ciência e os Internos”, CHUC, Coimbra, 13 e 14/10/2016.



3. Melhor póster - Estimulação in vitro da angiogénese de tecido ovárico. Pais AS, Reis MC, Laranjo M, Reis S, Jorge J, Gonçalves AC, Botelho F, Almeida Santos T. 7º Congresso Português de Medicina da Reprodução, Porto, 9 a 11/05/2019.

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado "*ESTIMULAÇÃO IN VITRO DA ANGIOGÉNESE DE TECIDO OVÁRICO CRIOPRESERVADO*" da autoria de **Ana Sofia Pais, Maria Carolina Reis, Mafalda Laranjo, Sandra Reis, Joana Jorge, Ana Cristina Gonçalves, Ana Paula Sousa, João Ramalho-Santos, Filomena Botelho e Teresa Almeida Santos**, recebeu o **Prémio Melhor Poster**, no **7º Congresso Português de Medicina da Reprodução**, que decorreu de 09 a 11 de maio de 2019, no Palácio da Bolsa.

Porto, 11 de maio de 2019



Prof. Doutor Pedro Xavier
Presidente do Congresso

7º CONGRESSO PORTUGUÊS DE MEDICINA DA REPRODUÇÃO

2019 | Palácio da Bolsa - Porto -



Comunicações realizadas como palestrante convidada:

1. Apresentação de casos clínicos. Curso prático avançado em Medicina da Reprodução – GENUS. XXXVI Jornadas Internacionais de Estudos da Reprodução, Figueira da Foz, 03/05/2018.



2. FERTILIDADE, avaliação da reserva ovária e critérios PMA. Workshop Gravidez após os 40 anos, Cascais, 11/04/2019.



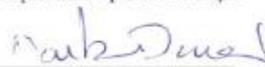
DECLARAÇÃO DE PALESTRANTE

Workshop Gravidez acima dos 40 anos

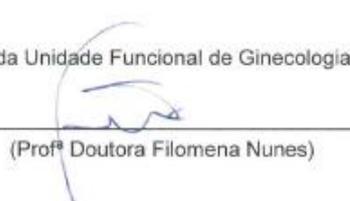
Certifica-se para os devidos efeitos que a **Dr.^a Ana Sofia Pais** esteve presente no **Workshop Gravidez acima dos 40 anos** como Palestrante, que decorreu no dia 11 de Abril de 2019 no Auditório do Hospital de Cascais Doutor José de Almeida.

Cascais, 11 de Abril de 2019

O Responsável pela Formação


Dr.ª Marta Durão

Coordenadora da Unidade Funcional de Ginecologia / Obstetria


(Prof.ª Doutora Filomena Nunes)

Hospital de Cascais - Dr. José de Almeida
Av. Brigadeiro Victor Novais Gonçalves • 2755-009 Alcabideche
Tel.: 214 653 000 • Fax: 214 653 196

LISBOA - Pólo de Cascais, S.A. (Mat.Leuro.Fisio. 12-21, 1050-123 Lisboa)
Capital Social 6.130.620,00 | NIPC 502 436 886



Faculdade de Medicina
Universidade Nova de Lisboa



Instituto de Saúde Pública
Universidade Nova de Lisboa



Centro de Estudos de Saúde
Universidade Nova de Lisboa

3. Infertilidade e disfunção sexual na mulher. 16º Congresso Nacional Cancro Digestivo, online, 16/10/2020.



4. *Preservation of reproductive potential in oncological patients - Angiogenesis stimulation of cryopreserved ovarian tissue.* iCBR (Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research) *Scientific Meetings* 2021, 20/01/2021.

The poster features the iCBR logo in the top left corner. In the top right, there are decorative elements including a magnifying glass, the equation $E=mc^2$, and a molecular structure diagram. The main title is "Scientific Meetings 2021" in large black font, with the date and time "January 20 | 12h" below it. The topic is "Preservation of Reproductive Potential in Oncological Patients: Angiogenesis Stimulation of Cryopreserved Ovarian Tissue". A circular portrait of a woman is on the right. Below the title, there is an anatomical illustration of a female reproductive system, a histological section of ovarian tissue stained with HE (Hematoxylin and Eosin), and a micrograph of a cryopreserved ovarian tissue section labeled "F VIII". Logos for various institutions are visible at the bottom left.

iCBR

Scientific Meetings 2021

January 20 | 12h

**Preservation of Reproductive Potential in
Oncological Patients: Angiogenesis Stimulation
of Cryopreserved Ovarian Tissue**

Ana Sofia Pais
FMUC, iCBR, CIMAGO

HE

F VIII

5. Infertilidade e preservação da fertilidade em doentes oncológicos. Curso de Formação para Farmacêuticos, Núcleo Regional do Centro da LPCC, *online*, 27/01/2021.



Secção Regional do Centro

Certificado

Certifica-se, para os efeitos tidos por convenientes, que **Ana Sofia Pais**, médica, ministrou no dia 27 de Janeiro, o módulo **Infertilidade e Preservação da Fertilidade em Doentes Oncológicos**, com uma carga horária total de 1h30, entre as 18h30 e as 20h, integrado no Curso de Formação para Farmacêuticos: **Cancro – A Intervenção do Farmacêutico**, que decorreu nos dias **25, 27 e 28 de janeiro de 2021**, em formato e-learning, organizado pelo Núcleo Regional do Centro da Liga Portuguesa Contra o Cancro, em parceria com a Secção Regional do Centro da Ordem dos Farmacêuticos.

Por ser verdade e me ter sido pedido, emito o presente certificado, que vai por mim assinado e autenticado com o carimbo em uso nesta instituição.

Coimbra, 8 de fevereiro de 2021

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Vitor Rodrigues', written over a faint grey grid background.

LIGA PORTUGUESA
CONTRA O CANCRO
NÚCLEO REGIONAL DO CENTRO
Professor Doutor Vítor Rodrigues
Presidente da Direção Regional

[Certificado gerado por via informática]

6. Fertilidade após o Cancro. Curso de Formação para Profissionais de Saúde, Núcleo Regional do Centro da LPCC, *online*, 07/05/2021.



Certificado

Certifica-se, para os efeitos tidos por convenientes, que **ANA SOFIA PAIS**, médica, ministrou no dia 7 de Maio, o módulo **Fertilidade após o Cancro**, com uma carga horária total de 1h30, entre as 11h e as 12h30, integrado no Curso de Formação para Profissionais de Saúde, Sexualidade, Fertilidade e Cancro, que decorreu nos dias 30 de Abril, 5 e 7 de Maio de 2021, em formato e-learning, organizado pelo Núcleo Regional do Centro da Liga Portuguesa Contra o Cancro, e com o Patrocínio Científico do Centro de Preservação da Fertilidade, Sociedade Portuguesa de Medicina da Reprodução e Sociedade Portuguesa de Oncologia.

Por ser verdade e me ter sido pedido, emito o presente certificado, que vai por mim assinado e autenticado com o carimbo em uso nesta Instituição.

Coimbra, 11 de maio de 2021

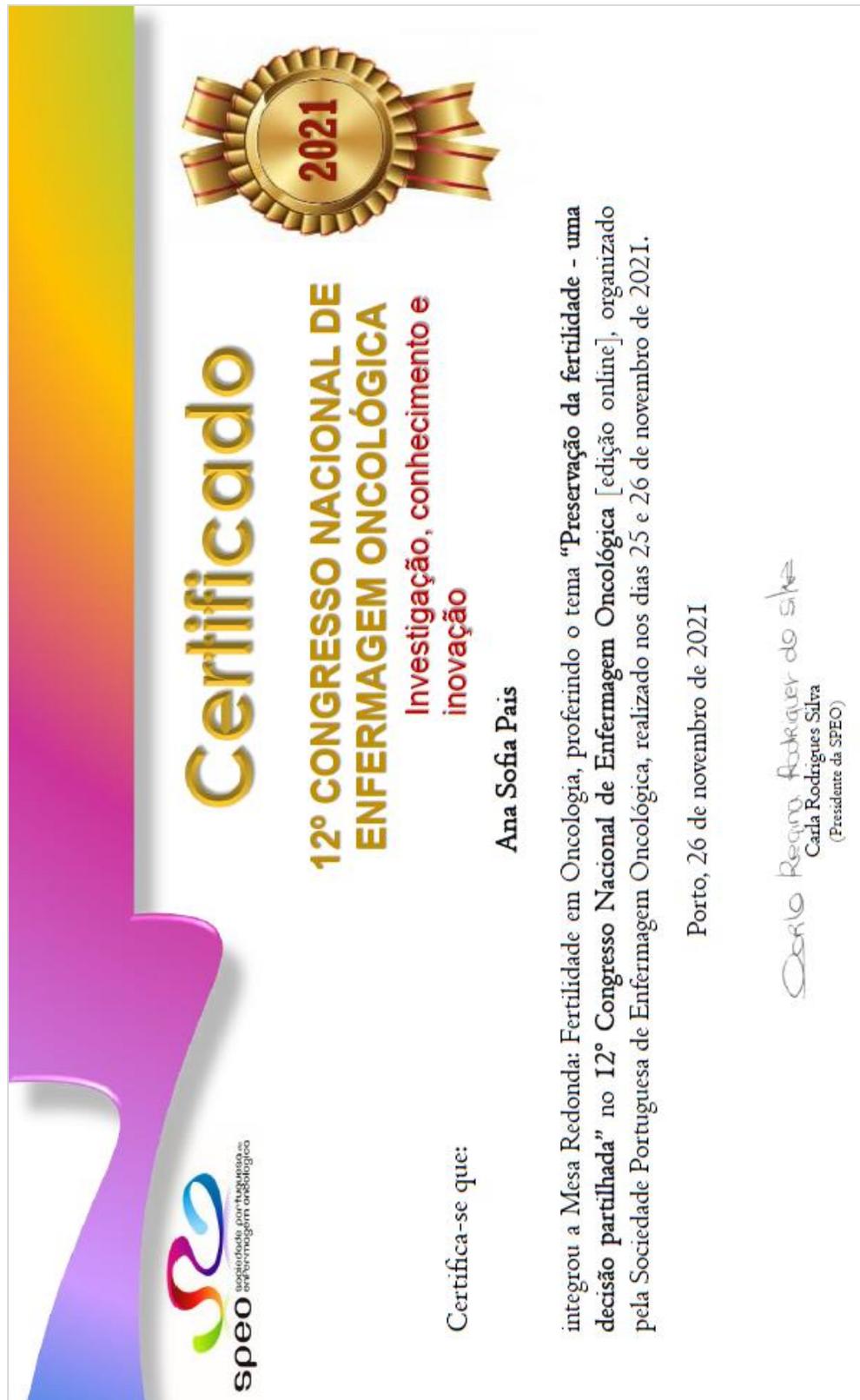
LIGA PORTUGUESA
CONTRA O CANCRO
NÚCLEO REGIONAL DO CENTRO

Professor Doutor Vítor Rodrigues
Presidente da Direção Regional



[Certificado gerado por via informática]

7. Preservação da fertilidade - uma decisão partilhada. 12º Congresso Nacional de Enfermagem Oncológica, *online*, 25/11/2021.



 **speo** sociedade portuguesa de enfermagem oncológica

Certificado

12º CONGRESSO NACIONAL DE ENFERMAGEM ONCOLÓGICA
Investigação, conhecimento e inovação

2021

Certifica-se que:

Ana Sofia Pais

integrou a Mesa Redonda: Fertilidade em Oncologia, proferindo o tema “Preservação da fertilidade - uma decisão partilhada” no 12º Congresso Nacional de Enfermagem Oncológica [edição online], organizado pela Sociedade Portuguesa de Enfermagem Oncológica, realizado nos dias 25 e 26 de novembro de 2021.

Porto, 26 de novembro de 2021

Carla Rodrigues Silva
Carla Rodrigues Silva
(Presidente da SPEO)

8. Estimulação da angiogénese do enxerto de tecido ovárico criopreservado.
Generating Meetings, Porto, 30/04/2022.



Comunicações originais em reuniões nacionais:

- Comunicação oral:
 1. Preservação do potencial reprodutivo na doente oncológica: estimulação da angiogénese do enxerto de tecido ovárico criopreservado. I Encontro “A Ciência e os Internos”, CHUC, Coimbra, 13 e 14/10/2016.



2. Preservação da fertilidade em doentes com neoplasias hematológicas. Ferro R, Pais AS, Sousa AP, Almeida Santos T. Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Hematologia, Braga, 14 a 16/11/19.

Certificado não disponível.

- Poster:

- I. Xenotransplante de tecido ovárico bovino na preservação da fertilidade. Azevedo AR, Pais AS, Pereira RMLN, Almeida Santos T, Pires VMR, Pessa P, Marques CC, Laranjo M, Nolasco S, Castelo-Branco P, Botelho F, Prates JA, Lopes-da-Costa L, Pimenta J. 9º Encontro de Formação da Ordem dos Médicos Veterinários (EFOMV), Lisboa, 6 e 7/04/2019.



Encontro de Formação
da Ordem dos
Médicos Veterinários

A Ordem dos Médicos Veterinários certifica que

Ana Rita Azevedo

apresentou o poster

Xenotransplante de tecido ovárico bovino na preservação da fertilidade

no 9º EFOMV, que decorreu nos dias 6 e 7 de abril
de 2019, no Centro de Congressos de Lisboa

O Bastonário da OMV



Jorge Cid



www.omv.pt
www.efomv.pt

2. Estimulação in vitro da angiogénese de tecido ovárico. Pais AS, Reis MC, Laranjo M, Reis S, Jorge J, Gonçalves AC, Botelho F, Almeida Santos T. 7º Congresso Português de Medicina da Reprodução, Porto, 9 a 11/05/2019.



CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado "**ESTIMULAÇÃO IN VITRO DA ANGIOGÉNESE DE TECIDO OVÁRIO CRIOPRESERVADO**" da autoria de **Ana Sofia Pais, Maria Carolina Reis, Mafalda Laranjo, Sandra Reis, Joana Jorge, Ana Cristina Gonçalves, Ana Paula Sousa, João Ramalho-Santos, Filomena Botelho e Teresa Almeida Santos**, recebeu o **Prémio Melhor Poster, no 7º Congresso Português de Medicina da Reprodução**, que decorreu de 09 a 11 de maio de 2019, no Palácio da Bolsa.

Porto, 11 de maio de 2019



Prof. Doutor Pedro Xavier
Presidente do Congresso

7º CONGRESSO PORTUGUÊS DE MEDICINA DA REPRODUÇÃO

Palácio da Bolsa - Porto - 2019

OSPMR
SOCIETATE PORTUGUESA DE MEDICINA DA REPRODUÇÃO

3. 3D na cultura de tecido ovárico, uma tecnologia acessível? Reis S, Sousa AP, Pais AS, Ramalho-Santos J, Almeida-Santos T. 7º Congresso Português de Medicina da Reprodução, Porto, 9 a 11/05/2019.



CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado "*3D na cultura de tecido ovárico, uma tecnologia acessível?*" da autoria de **Sandra de Almeida Reis, Ana Paula Sousa, Ana Sofia Pais, João Ramalho-Santos e Teresa Almeida-Santos**, foi apresentado no **7º Congresso Português de Medicina da Reprodução**, que decorreu de 09 a 11 de maio de 2019, no Palácio da Bolsa.

Porto, 11 de maio de 2019



Prof. Doutor Pedro Xavier
Presidente do Congresso

7º CONGRESSO PORTUGUÊS DE MEDICINA DA REPRODUÇÃO

Palácio da Bolsa
- Porto -
2019

OSPMR
SOCIETATE PORTUGUEZA DE MEDICINA DA REPRODUÇÃO

Comunicações originais em reuniões internacionais:

- Comunicação oral:
 - I. Criopreservação de tecido ovárico para preservação da fertilidade. Pais AS, Carvalho A, Sousa AP, Brito R, Cortesão P, Almeida Santos T. XXXIV Jornadas Internacionais de Estudos da Reprodução, Tróia, 7 a 8/10/2016.



2. *Who and when are the young women returning for using their cryopreserved material after fertility preservation for cancer treatment? A 10-year experience of an oncofertility center.* Moura-Ramos M, Sousa AP, Couto D, Carvalho A, Pais AS, Almeida-Santos T. *6th World Congress of the International Society for Fertility Preservation (ISFP), Nova Iorque, 14 a 16/11/2019.*



The 6th World Congress of the International Society for Fertility Preservation (ISFP)
New York, NY, USA, November 14-16, 2019
www.isfp2019.cme-congresses.com

November 28, 2019

To Whom It May Concern,

Mariana Moura-Ramos attended the 6th World Congress of the International Society for Fertility Preservation (ISFP), New York, NY, USA, November 14-16, 2019.

Mariana Moura-Ramos presented the following oral abstracts during the congress:

DECISION MAKING AND MOTIVATIONS FOR FERTILITY PRESERVATION AMONG TRANSGENDER MEN AND WOMEN
Moura-Ramos, Mariana^{1,2}; Lopes, Helena^{1,3}; Sousa, Ana Paula^{1,4}; Almeida-Santos, Teresa^{1,3,4}
¹Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Serviço de Medicina da Reprodução, Coimbra, Portugal, ²Cognitive and Behaviour Center for Research and Intervention, Faculty of Psychology and Educational Sciences, University of Coimbra, Coimbra, Portugal, ³Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal, ⁴Centre for Neuroscience and Cell Biology, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

WHO AND WHEN ARE THE YOUNG WOMEN RETURNING FOR USING THEIR CRYOPRESERVED MATERIAL AFTER FERTILITY PRESERVATION FOR CANCER TREATMENT? A 10-YEAR EXPERIENCE OF AN ONCOFERTILITY CENTER
Moura-Ramos, Mariana^{1,2}; Sousa, Ana Paula^{1,3}; Couto, Daniela¹; Carvalho, Alexandra^{1,3}; Pais, Ana Sofia¹; Almeida-Santos, Teresa^{1,4,3}
¹Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Serviço de Medicina da Reprodução, Coimbra, Portugal, ²Cognitive and Behaviour Center for Research and Intervention, Faculty of Psychology and Educational Sciences, University of Coimbra, Coimbra, Portugal, ³Centre for Neuroscience and Cell Biology, University of Coimbra, Coimbra, Portugal, ⁴Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

These abstract presentations were well received by the ISFP Scientific Committee. The Committee thanks Mariana Moura-Ramos for an active participation in the 6th ISFP Congress.

Best regards,

Dr. Tommaso Falcone ISFP President	Dr. Zev Rosenwaks Congress Co-Chair	Dr. Pasquale Patrizio Congress Co-Chair	Dr. Zsolt Peter Nagy Congress Co-Chair	Dr. S. Samuel Kim Congress Co-Chair	Dr. Glenn Schattman Congress Co-Chair
---------------------------------------	--	--	---	--	--



CME Congresses Ltd.
isfp@cme-congresses.com
www.isfp2019.cme-congresses.com

Contact:
Tel: +44 20 3289 9552
Fax: 972-3-5401566

- Poster:

1. *Angiogenesis stimulation of cryopreserved ovarian tissue.* Pais AS, Laranjo M, Reis C, Reis S, Sousa AP, Silva F, Jorge J, Gonçalves C, Botelho F, Almeida-Santos T. *27th European Congress of Obstetrics and Gynaecology, online/Atenas, 2 a 4/09/2021.*

Certificado não disponível.

2. *Fertility preservation in patients with hematologic malignancies.* Ferro R, Pais AS, Sousa AP, Almeida Santos T. *2019 Oncofertility Conference, Chicago, Illinois, 11 a 13/11/2019.*

Certificado não disponível.

3. *The challenge of ovarian tissue culture: 2D versus 3D*. Almeida-Santos T, Pais AS, Reis S, Laranjo M, Caramelo F, Silva F, Botelho F. ESHRE's *virtual 37th Annual Meeting, Online*, 26/06 a 01/07/2021.



37th Virtual Annual Meeting of ESHRE
26 June - 1 July 2021

This is to certify that

Almeida Santos, Ana Teresa - Portugal

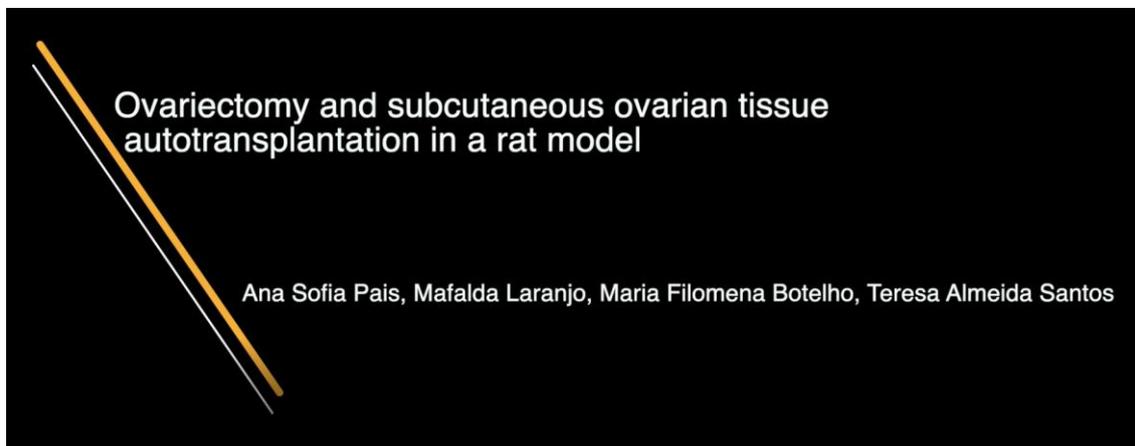
gave a poster presentation with title:

" The challenge of ovarian tissue culture: 2D versus 3D"

during the 37th virtual Annual Meeting of
the European Society of Human Reproduction and Embryology from 26 June to 1 July 2021.

Cristina Magli
Chairman of ESHRE

Anexo II – Procedimentos cirúrgicos



Anexo digital disponível através do *link*: <https://youtu.be/HJ9zquejahg>

O vídeo disponível no *link* supracitado apresenta os procedimentos anestésicos e cirúrgicos realizados nos animais. As cirurgias foram realizadas de forma idêntica em todos os animais sob anestesia inalatória com sevoflurano através do sistema de anestesia *EZ-7000 Classic Anesthesia System*, com desinfeção com solução de iodopovidona no início do procedimento e com analgesia subcutânea no final do mesmo. A ovariectomia foi realizada através de laparotomia mediana longitudinal na região inferior do abdómen. Depois de se assegurar a adequada hemóstase, a cavidade abdominal foi fechada por planos com fios reabsorvíveis. Após a ovariectomia, cada ovário foi cortado em dois hemiovários. O transplante de tecido ovárico foi realizado a nível subcutâneo através de uma única incisão na parede abdominal, seguida de dissecação romba de quatro bolsas subcutâneas. Os hemiovários foram inseridos subcutaneamente ao longo da fáscia muscular abdominal. Por fim, a pele foi encerrada com fio absorvível. As citologias vaginais foram realizadas diariamente, sensivelmente à mesma hora. As amostras foram recolhidas por lavagem vaginal com 200 μ L de cloreto de sódio e posteriormente a amostra foi colocada uniformemente na lâmina e deixou-se secar ao ar.

Anexo III – Aprovação da DGAV

Documentação relacionada com a aprovação da Direção-Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) relativamente ao projeto de investigação “Preservação do Potencial Reprodutivo na Doente Oncológica: Estimulação da Angiogénese do Enxerto de Tecido Ovário Criopreservado”:

- Formulário para pedido de autorização de projeto de utilização de animais para fins científicos submetido ao Órgão Responsável pelo Bem-Estar dos Animais (ORBEA) do Instituto de Investigação Clínica e Biomédica de Coimbra (iCBR) da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC)
- Parecer da ORBEA (ORBEA 2-2016)
- Parecer da DGAV (11060495/23-11-2016)

DOCUMENTOS

- Formulário para pedido de autorização de projeto de utilização de animais para fins científicos submetido ao Órgão Responsável pelo Bem-Estar dos Animais (ORBEA) do Instituto de Investigação Clínica e Biomédica de Coimbra (iCBR) da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC)

FORMULÁRIO PARA PEDIDO DE AUTORIZAÇÃO DE PROJETO DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA FINS CIENTÍFICOS

Este formulário inclui sete secções:

- **Secção 1:** Detalhes administrativos sobre o projeto, pessoas e estabelecimentos envolvidos
- **Secção 2:** Informações sobre o projeto
- **Secção 3:** Objetivos e benefícios potenciais do projeto
- **Secção 4:** Informações sobre os animais
- **Secção 5:** Informações sobre os procedimentos e o desenho experimental
- **Secção 6:** Resumo não técnico do projeto
- **Secção 7:** Declaração de responsabilidades

Todas as questões têm que ser respondidas, mesmo que a sua resposta seja "Não Aplicável" ou os campos do formulário que não serão utilizados para resposta, são devidamente rasurados. As respostas têm que ser redigidas com texto bem legível e em português.

SECÇÃO 1: DETALHES ADMINISTRATIVOS SOBRE O PROJETO, PESSOAS E ESTABELECIMENTOS ENVOLVIDOS

REFERÊNCIA DO PROJETO

1.1. Título do projeto de utilização de animais:

Preservação do Potencial Reprodutivo na Doente Oncológica: Estimulação da Angiogénese do Enxerto de Tecido Ovárico Criopreservado

1.2. Nome do investigador responsável pela realização do projeto:

Maria Filomena Rabaça Roque Botelho

ENTIDADE E ESTABELECIMENTO/LOCAL

1.3. Entidade. Indicar a entidade que levará a cabo o projeto de utilização de animais:

IBILI – Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

1.4. Este projeto envolve a colaboração com outras entidades? Se sim, forneça o nome das entidades envolvidas e detalhes da colaboração.

Não

1.5. Utilizador. Indicar o nome do utilizador que levará a cabo o projeto de utilização de animais:

Ana Margarida Coelho Abrantes

1.6. Estabelecimento(s) onde os animais serão alojados e onde serão realizados procedimentos:

Biotério IBILI-Sub-Unidade 1 – Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

1.7. No caso de a realização dos procedimentos se pretender fazer num local diferente de um estabelecimento de um utilizador, indique qual e forneça uma justificação científica para isso acontecer.

Não

PESSOAS

1.8. Investigador responsável:

Nome:	Maria Filomena Rabaça Roque Botelho
Qualificações académicas:	Agregação
Funções desempenhadas na entidade referida em 1.3.:	Professora Catedrática
Entidade/Departamento onde trabalha:	IBILI- Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
Morada:	Azinhaga Santa Comba, Celas 3000-548 Coimbra
Telefone:	239 480 240
Telefax:	239 480 258
Endereço email:	mfbotelho@fmed.uc.pt
Tem/teve algum projeto autorizado nos últimos 5 anos? Se sim, qual a designação e data de autorização:	Não
Refira se tem formação em "ciência de animais de laboratório" e, se sim, liste os cursos que frequentou (com referência à data e local de realização):	Experiência de 30 anos no desenvolvimento de modelos animais de doenças humanas (artrite, shunts arteriovenosos pulmonares e vários tipos de cancro) e de processo funcionais (alterações do aporte sanguíneo hepático); manipulação, contenção e marcação temporária e permanente de animais de laboratório; colheitas de fezes e urinas em animais de laboratório; colheitas de sangue, terminais e não terminais, em animais de laboratório; administração (diferentes vias) de substâncias várias em animais de laboratório; estudos de biobistribuição de fármacos por métodos de imagem funcional.
Refira a data de autorização emitida pela DGAV como pessoa para executar determinadas funções (por exemplo, conceção de procedimentos e projetos, realização de	Creditada como Investigador Coordenador Competente para a Prática de Experimentação Animal pela Direcção Geral de Veterinária, em 10 de Outubro de 2004.

2

procedimentos em animais, etc):	
---------------------------------	--

1.9. Pessoa responsável pela realização de procedimentos nos animais:

Nome:	Ana Margarida Coelho Abrantes
Qualificações académicas:	Doutoramento
Funções desempenhadas no projeto de utilização de animais (por exemplo, realização de procedimentos em animais, prestação de cuidados a animais):	Realização dos procedimentos respeitantes ao desenvolvimento do modelo animal, estudos de biodistribuição e de terapêutica.
Se fôr estudante, indicar o estatuto: (ex, sem licenciatura/mestrado/PhD/outros)	Não aplicável
Entidade/Departamento onde trabalha/estuda:	Unidade de Biofísica/CIMAGO/IBILI, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
Morada:	Azinhaga Santa Comba, Celas 3000-548 Coimbra
Telefone:	239 480 240
Telefax:	239 480 258
Endereço email:	mabrantes@gmail.com
Descreva a sua experiência e competência na manipulação e/ou envolvimento na utilização de animais:	O investigador tem 9 anos de experiência em experimentação animal com ratos e murganhos.
Refira se tem formação em "ciência de animais de laboratório" e, se sim, liste os cursos que frequentou (com referência à data e local de realização):	Course in Laboratory Science, categoria C, 80 horas, Centro de Neurociências de Coimbra, Setembro de 2009.
Refira a data de autorização emitida pela DGAV como pessoa para executar determinadas funções (por exemplo, conceção de procedimentos e projetos, realização de procedimentos em animais, etc):	Creditado como investigador pela DGAV em 14 de Dezembro de 2009.

1.10. Outras pessoas envolvidas:

Nome:	Ana Sofia Fernandes Pais
Qualificações académicas:	Mestrado
Funções desempenhadas na entidade referida em 1.3.:	Aluna do programa de Doutoramento em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
Entidade/Departamento onde trabalha:	IBILI - Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
Morada:	Azinhaga Santa Comba, Celas 3000-548 Coimbra

Telefone:	239 480 240
Telefax:	239 480 258
Endereço email:	asfpais@uc.pt
Tem/teve algum projeto autorizado nos últimos 5 anos? Se sim, qual a designação e data de autorização:	Não
Refira se tem formação em "ciência de animais de laboratório" e, se sim, liste os cursos que frequentou (com referência à data e local de realização):	Não tem
Refira a data de autorização emitida pela DGAV como pessoa para executar determinadas funções (por exemplo, conceção de procedimentos e projetos, realização de procedimentos em animais, etc):	Não tem

Para cada pessoa adicional, copiar a tabela 1.10. e preencher em conformidade

SECÇÃO 2: INFORMAÇÕES SOBRE O PROJETO

CONTINUAÇÃO DE PROJETO/UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

2.1. Continuação de projeto/utilização de animais. Se pretende obter uma autorização para continuar o trabalho desenvolvido noutra projeto/utilização de animais previamente autorizado, refira a designação do mesmo(a), a data de autorização e a data de término.

Não.

DATAS DO PROJETO

2.2. Datas do projeto:

Especifique a duração requerida para a autorização do projeto/utilização de animais ⁽¹⁾ :	5 anos
Data proposta para o início:	Setembro de 2016
Data prevista para o término:	Setembro de 2021

⁽¹⁾ De notar que, de acordo com o n.º 3, do artigo 46º do Decreto-Lei, a duração máxima permitida para a realização de um projeto é de cinco anos.

SUBMISSÃO DO PROJETO AO ÓRGÃO RESPONSÁVEL PELO BEM-ESTAR DOS ANIMAIS

2.3. O projeto foi previamente submetido ao Órgão responsável pelo bem-estar dos animais (ORBEA) do estabelecimento onde os animais vão estar alojados? Se sim, anexe, ao presente pedido de autorização, o parecer não vinculativo emitido pelo ORBEA sobre o projeto em apreço.

Sim.

FINANCIAMENTO E RECURSOS PARA A REALIZAÇÃO DO PROJETO

2.4. Financiamento e recursos para realização do projeto. Indique se dispõe de financiamento e de recursos adequados (por ex., instalações, equipamento, staff, conhecimento adequado, etc) para realização deste projeto e descreva sumariamente. Se dispõe de financiamento, indique qual a entidade financiadora.

Sim. O projeto será financiado pelo prémio de investigação em Ginecologia de 2015 e será submetida candidatura para financiamento da Fundação para a Ciência e Tecnologia.

RISCOS DE SAÚDE E/OU SEGURANÇA PARA OUTROS ANIMAIS, PESSOAS OU PARA A COMUNIDADE

2.5. O projeto envolve riscos de saúde e/ou de segurança para outros animais alojados nas instalações, pessoas ou para a comunidade?

Se sim, indique quais dos seguintes riscos de saúde e/ou de segurança estão envolvidos com o projeto, forneça detalhes e refira que medidas foram tomadas para minimizar esses riscos.

Gases anestésicos	Não aplicável
Carcinogénios ou teratogénios	Não aplicável
Material químico perigoso ou substâncias citotóxicas (não incluindo os gases anestésicos)	Não aplicável
Organismos ou materiais biologicamente perigosos (por exemplo, vírus, bactérias, fungos, etc). Especifique que grau de risco biológico está associado ao organismo.	Não aplicável
Risco de radiação	Não aplicável
Potenciais zoonoses	Não aplicável
Outros	Não aplicável

SECÇÃO 3: OBJECTIVOS E BENEFÍCIOS POTENCIAIS DO PROJETO

3.1. O artigo 5º do Decreto-Lei requer que um programa de trabalho utilizando animais seja realizado para os seguintes fins. Para o efeito, deverá seleccionar o que se aplicar ao projeto proposto:

	a) Investigação fundamental
	b) Investigação translacional ou aplicada, tendo em vista um dos seguintes fins:
	i. A prevenção, a profilaxia, o diagnóstico ou o tratamento de doenças, de problemas de saúde ou de outras situações anormais ou dos seus efeitos nos seres humanos, nos animais ou nas plantas;
X	ii. A avaliação, a deteção, a regulação ou a alteração das condições fisiológicas nos seres humanos, nos animais ou nas plantas;
	iii. O bem-estar dos animais e a melhoria das condições de produção dos animais criados para fins agrícolas;
	c) Desenvolvimento, produção ou controlo da qualidade, da eficácia e da segurança de medicamentos, géneros alimentícios, alimentos para animais e outras substâncias ou produtos, para um dos objetivos mencionados na alínea b);
	d) Protecção do ambiente natural no interesse da saúde ou do bem-estar do homem ou dos animais;
	e) Investigação destinada à conservação das espécies;
	f) Ensino superior ou formação para aquisição, manutenção ou melhoria das qualificações profissionais;
	g) Inquéritos no domínio da medicina legal.

3.2. Faça uma **descrição do contexto global** do projeto seleccionando uma de entre as seguintes hipóteses e respondendo às questões:

X	<p><u>Para investigação:</u> Qual é a posição atual do projeto na área de trabalho e de que modo o mesmo irá ajudar a acrescentar conhecimento, progresso ou colmatar uma necessidade clínica, por exemplo, relativamente ao estado atualmente existente? O adiamento da maternidade para a quarta década de vida leva a que um número crescente de mulheres jovens seja surpreendida por um diagnóstico oncológico antes de iniciar ou terminar o seu projeto reprodutivo. Este projeto pretende contribuir para a preservação da fertilidade de doentes oncológicas, através da otimização da criopreservação de tecido ovárico e ulterior transplante.</p>
	<p><u>Para satisfazer requisitos regulamentares:</u> Quais são os requisitos ou as <i>guidelines</i> regulamentares relevantes?</p>
	<p><u>Para fins de produção ou diagnóstico:</u> Quais são os prováveis pedidos que justifiquem a necessidade do produto ou do serviço durante o tempo da autorização do projeto?</p>
	<p><u>Para ensino:</u> Quais são as necessidades de formação subjacentes ao pedido de utilização de animais?</p>

3.3. Faça uma **descrição dos objetivos** do projeto. O que é proposto alcançar, descobrir ou produzir com a realização deste projeto? Os objetivos devem ser específicos para o projeto em apreço, realistas e alcançáveis.

O objetivo deste trabalho é estudar estratégias para promover a angiogénese precoce do enxerto de tecido ovárico humano após criopreservação, diminuindo a perda de folículos e otimizando assim a função e duração do enxerto.

3.4. Refira quais são os **benefícios** prováveis deste projeto e a razão por que valerão a pena para contrabalançar o sofrimento e efeitos adversos infligidos aos animais a envolver no projeto?

Tal como referido, este projeto pretende contribuir para a preservação da fertilidade de doentes oncológicas. A criopreservação de tecido ovárico, antes da terapêutica oncológica e o seu ulterior transplante, tem-se revelado uma técnica promissora para estas doentes já que após o transplante do tecido ovárico é possível repor a função endócrina e a fertilidade, possibilitando a conceção natural. No entanto, uma das limitações desta técnica é a perda de mais de 50% dos folículos primordiais, que ocorre predominantemente nos primeiros 5 dias após o transplante, devido à isquemia que se verifica até ser estabelecida a revascularização do enxerto. A estratégia que se propõe é estimular a angiogénese, reduzindo o tempo de isquemia, com consequente melhoria da sobrevivência dos folículos ováricos e da função endócrina, através da utilização de fatores angiogénicos, VEGF, bFGF, hMG e sinvastatina, em diferentes associações, bem como em diferentes fases do processo de criopreservação e posterior transplante. O estudo com animais, no desenvolvimento destas estratégias, é fundamental para avaliar a eficácia da terapêutica *in vivo* e definir o protocolo de tratamento.

3.5. Liste algumas **referências bibliográficas** e/ou **guidelines regulamentares** que suportem a necessidade do projeto e/ou os benefícios prováveis indicados para o mesmo, assim como de quaisquer modelos específicos propostos para serem utilizados nos procedimentos a realizar.

<https://www.nc3rs.org.uk/welfare-assessment#identifying>
<http://vetmed.duhs.duke.edu/GuidelinesforRodentAnalgesia.html>

1. Barrett, S. L., & Woodruff, T. K. (2010). Gamete Preservation. *Cancer Treat Res*, 156, 25–39.
2. Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2011). Molecular Mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 473(7347), 298–307.
3. Cohen, Y., Dafni, H., Avni, R., Fellus, L., Bochner, F., Rotkopf, R., Neeman, M. (2015). Genetic and Pharmacological Modulation of Akt1 for Improving Ovarian Graft Revascularization in a Mouse Model. *Biology of Reproduction*, 94(October 2015), 1–11.
4. Cohen, Y., Dafni, H., Avni, R., Raz, T., Biton, I., Hemmings, B., & Neeman, M. (2014). In search of signaling pathways critical for ovarian graft reception: Akt1 is essential for long-term survival of ovarian grafts. *Fertility and Sterility*, 101(2), 536–544.e2.
5. Dath, C., Van Eyck, A. S., Dolmans, M. M., Romeu, L., Delle Vigne, L., Donnez, J., & Van Langendonck, A. (2010). Xenotransplantation of human ovarian tissue to nude mice: Comparison between four grafting sites. *Human Reproduction*, 25(7), 1734–1743.
6. Gao, J.-M., Huang, Y., Li, M., Zhao, H., Zhao, Y., Li, R., ... Qiao, J. (2015). Effect of local basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor on subcutaneously allotransplanted ovarian tissue in ovariectomized mice. *PLoS ONE*, 10(7), 1–11.
7. Gao, J.-M., Yan, J., Li, R., Li, M., Yan, L. Y., Wang, T. R., ... Qiao, J. (2013). Improvement in the quality of heterotopic allotransplanted mouse ovarian tissues with basic fibroblast growth factor and

8

- fibrin hydrogel. *Human Reproduction*, 28(10), 2784–2793.
8. Gardino, S. L., & Emanuel, L. L. (2010). Choosing Life When Facing Death: Understanding Fertility Preservation Decision-Making for Cancer Patients. *Cancer Treat Res*, 156, 1–11.
 9. Mahmoodi, M., Mehranjani, M. S., Shariatzade, S. M. A., Eimani, H., & Shahverdi, A. (2014). Effects of erythropoietin on ischemia, follicular survival, and ovarian function in ovarian grafts. *Reproduction*, 147(5), 733–741.
 10. Olsson, A.-K., Dimberg, A., Kreuger, J., & Claesson-Welsh, L. (2006). VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 7(5), 359–71.
 11. Ronn, R., & Holzer, H. E. G. (2013). Oncofertility in Canada : an overview of Canadian practice and suggested action plan. *Curr Oncol*, 20, 465–474.
 12. Silva, C., & Almeida-Santos, T. (2015). *Preservação da fertilidade em doentes oncológicos*. (SPMR, Ed.) (1a edição).
 13. Soleimani, R., Heytens, E., & Oktay, K. (2011). Enhancement of neoangiogenesis and follicle survival by sphingosine-1-phosphate in human ovarian tissue xenotransplants. *PLoS ONE*, 6(4).
 14. Tahergorabi, Z., & Khazaei, M. (2012). A review on angiogenesis and its assays. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 15(6), 1110–1126.
 15. Talevi, R., Barbato, V., Mollo, V., Fiorentino, I., De Stefano, C., Guarino, F. M., & Gualtieri, R. (2013). Replacement of sodium with choline in slow-cooling media improves human ovarian tissue cryopreservation. *Reproductive BioMedicine Online*, 27(4), 381–389.
 16. Waimey, K. E., Duncan, F. E., Su, H. I., Smith, K., Wallach, H., Jona, K., ... Woodruff, T. K. (2013). Future Directions in Oncofertility and Fertility Preservation: A Report from the 2011 Oncofertility Consortium Conference. *Journal of Adolescent and Young Adult Oncology*, 2(1), 25–30.
 17. Wang, L., Ying, Y. F., Ouyang, Y. L., Wang, J. F., & Xu, J. (2013). VEGF and bFGF increase survival of xenografted human ovarian tissue in an experimental rabbit model. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 30(10), 1301–1311.
 18. Wang, Y., Chang, Q., Sun, J., Dang, L., Ma, W., Hei, C. Jiang, X. (2012). Effects of HMG on revascularization and follicular survival in heterotopic autotransplants of mouse ovarian tissue. *Reproductive BioMedicine Online*, 24(6), 646–653.
 19. Wu, D., Lei, Y., Tong, Y., Tang, F., Qian, Y., & Zhou, Y. (2010). Angiogenesis of the frozen-thawed human fetal ovarian tissue at the early stage after xenotransplantation and the positive effect of *Salviae miltiorrhizae*. *Anatomical Record*, 293(12), 2154–2162.
 20. Yoo, S. Y., & Kwon, S. M. (2013). Angiogenesis and its therapeutic opportunities. *Mediators of Inflammation*, 2013(1).

SECÇÃO 4: INFORMAÇÕES SOBRE OS ANIMAIS

APLICAÇÃO DOS 3Rs

REPLACEMENT (SUBSTITUIÇÃO)

4.1. Explique por que não é possível alcançar os objetivos do projeto através da utilização de métodos alternativos que não utilizem animais e indique que fontes e referências bibliográficas consultou para encontrar possíveis alternativas:

Os estudos em animais são fundamentais para conhecer o efeito da estimulação da angiogénese com os fatores pró-angiogénicos e também para atestar a sua eficácia terapêutica em ambiente vivo.

4.2. Que alternativas (totais ou parciais) considerou e irão ser utilizadas para alcançar os objetivos do projeto? Indique as fontes consultadas.

O projeto em causa recorre a outros métodos de avaliação das formulações produzidas, nomeadamente, estudos *in vitro*, que serão úteis, numa primeira aproximação, para a avaliação da eficácia terapêutica. É com base nestes estudos que serão obtidos os tempos e as doses a serem usados nos animais.

REDUCTION (REDUÇÃO)

4.3. Número de animais a serem utilizados.

Serão utilizados cerca de 65 ratos adultos da estirpe RNU.

4.4. Forneça justificação sobre o número de animais a ser utilizado, especificando os princípios do desenho experimental usados para calcular o número de animais a incluir em cada grupo experimental ou de tratamento, incluindo grupos controlo, de cada um dos procedimentos que farão parte do projeto. Indique quais as fontes de aconselhamento consultadas para esse efeito.

Para os estudos de *in vitro* considerou-se uma comparação de resultados entre os 5 grupos descritos, com um erro tipo I de 0,05 e um poder estatístico de 0,80, para uma dimensão de efeito de 0,70. Deste modo foi estimada uma dimensão total da amostra de 30 ovários (15 animais, 3 por grupo), com um poder efetivo de 0,809.

Para os estudos *in vivo* com tecido ovárico de rato considerou-se uma comparação de resultados entre os 5 grupos descritos, com um erro tipo I de 0,05 e um poder estatístico de 0,80, para uma dimensão de efeito de 0,70. Deste modo foi estimada uma dimensão total máxima da amostra de 30 animais (6 animais por grupo), com um poder efetivo de 0,809.

Para os estudos *in vivo* com tecido ovárico humano considerou-se uma comparação de resultados entre os 2 grupos descritos, com um erro tipo I de 0,05 e um poder estatístico de 0,80, para uma dimensão de efeito de 0,70. Deste modo foi estimada uma dimensão total máxima da amostra de 20 animais (10 animais por grupo), com um poder efetivo de 0,841.

Portanto, estima-se a utilização de 65 animais no projeto.

O número de animais a utilizar foi estimado com recurso ao software G*Power 3.1.

4.5. Foi considerada alguma colaboração com outro estabelecimento (interno ou externo) para reduzir o número de animais utilizados (utilização conjunta dos animais) (por exemplo, diferentes órgãos do mesmo animal são usados em mais de um laboratório)?

Não.

REFINEMENT (REFINAMENTO)

4.6. Forneça informações sobre a escolha da espécie animal, procedimento(s) e limites críticos e explique por que razão são os mais refinados para o objetivo requerido.

Sim. Os procedimentos serão efetuados sob anestesia profunda por investigador experiente. Após estes, o peso dos animais será avaliado a cada 72 horas, no mínimo, e observados os sinais de bem-estar. Se os animais demonstrarem uma perda de peso superior a 15% ou sinais de desconforto, dor, dificuldades respiratórias, alterações de postura e atividade motora serão occisados por sobredose anestésica seguida de deslocação cervical.

4.7. Para cada procedimento do projeto, forneça detalhes sobre como minimizar o sofrimento dos animais a envolver.

Todos os procedimentos serão realizados sob o efeito de anestesia profunda. Será fornecida aos animais analgesia após os procedimentos cirúrgicos.

4.8. Para cada um dos procedimentos em que se preveja infligir uma severidade de grau Moderado ou Severo aos animais, justifique a razão para que a realização dos mesmos seja necessária.

Todos os procedimentos classificados como moderados, nomeadamente a ovariectomia bilateral e o transplante de tecido ovárico, serão seguidos de analgesia. Estes procedimentos são absolutamente necessários e fundamentais para atingir os objetivos estabelecidos no projeto, devido ao microambiente *in vivo* do tecido ovárico que influencia o processo de angiogénese. Não serão realizados procedimentos com severidade de grau severo.

4.9. Uma vez iniciado o projeto, os animais vivos serão removidos da instalação onde estão alojados? Se sim, explique qual a razão, indique como será feito o transporte, para que local serão levados, por quanto tempo e se retomam para a instalação de origem ou para outra.

Não.

ANIMAIS

4.10. Espécie animal a utilizar no projeto.

Ratos adultos

4.11. Irão ser utilizadas formas fetais de mamíferos ou formas larvares de alimentação autónoma? Se sim, especifique.

Não

--

4.12. Estirpe(s) a utilizar.

Rowett nude RNU

4.13. Estatuto genético dos animais a utilizar:

	Tipo selvagem
X	Geneticamente alterados sem fenótipo nocivo
	Geneticamente alterados com fenótipo nocivo.

4.14. Animais geneticamente alterados. Especifique se o projeto em apreço envolve:

	<p>A utilização de animais geneticamente alterados de linhagens existentes e sem problemas de bem-estar (sem fenótipo nocivo).</p> <ul style="list-style-type: none"> - Descreva brevemente o(s) gene(s) e a função do gene(s) que foi alterado(s) e qual a razão porque este mapa genético é essencial para o seu projeto. - Quais os efeitos adversos esperados e não esperados para os animais que serão submetidos aos procedimentos do projeto. - Que cuidados especiais (médico-veterinários, de manejo, alojamento, etc) poderão ser considerados utilizar tendo em conta a ocorrência desses efeitos adversos. <p>Os ratos da estirpe RNU são frequentemente usados em estudos de biologia tumoral, imunologia e desenvolvimento de tumores. Esta estirpe foi desenvolvida através de uma serie de acasalamentos em que o gene <i>Rowett nude</i> foi adicionado. Estes ratos são atímicos, deficientes em células T e apresentam um timo empobrecido nas áreas dependentes dos órgãos linfóides periféricos. Neste projeto, esta estirpe foi selecionada porque aceita com facilidade tecido humano. Não são esperados efeitos adversos nos animais submetidos aos procedimentos e, portanto, os animais não necessitam de condições especiais de alojamento.</p>
	<p>A utilização de animais geneticamente alterados de linhagens existentes e com problemas de bem-estar (com fenótipo nocivo).</p> <ul style="list-style-type: none"> - Descreva brevemente o(s) gene(s) e a função do gene(s) que foi alterado(s) e qual a razão porque este mapa genético é essencial para o seu projeto. - Descreva o impacto da alteração do genótipo no bem-estar do animal. - Quais os efeitos adversos esperados e não esperados para os animais que serão submetidos aos procedimentos do projeto. - Que cuidados especiais (médico-veterinários, de manejo, alojamento, etc) poderão ser considerados utilizar tendo em conta o fenótipo dos animais e/ou a ocorrência de efeitos adversos. <p>Não aplicável.</p>
	<p>Criação de uma nova linhagem de animais geneticamente alterados.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Descreva brevemente o(s) gene(s) e a função do gene(s) que foi alterado(s) e qual a razão porque este mapa genético é essencial para o seu projeto. - Descreva o impacto esperado da alteração do genótipo no bem-estar do animal. - Que cuidados especiais (médico-veterinários, de manejo, alojamento, etc) poderão ser considerados utilizar tendo em conta o fenótipo esperado dos animais.

Não aplicável.

4.15. Origem dos animais (estabelecimento, país, etc)

Biotério IBILI- Sub-Unidade 1- FMUC

4.16. Os animais a serem utilizados neste projeto foram especificamente criados para serem utilizados para fins científicos? Se não, forneça uma justificação científica sobre as razões pelas quais os animais a utilizar neste projeto não foram especificamente criados para fins científicos.

Sim.

4.17. Os animais a serem utilizados neste projeto foram capturados no meio selvagem? Se sim, forneça uma justificação científica sobre as razões pelas quais os animais precisam de ser capturados no meio selvagem.

Não.

Se sim, tem um parecer favorável emitido pelo Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas para a captura dos animais? Em caso afirmativo, anexe a este pedido de autorização de projeto, cópia desse mesmo parecer.

Não aplicável.

4.18. Os animais a serem utilizados neste projeto são errantes ou assilvestrados de alguma espécie animal doméstica? Se sim, forneça uma justificação científica sobre as razões pelas quais um animal errante ou assilvestrado de uma espécie doméstica precisa de ser utilizado neste projeto.

Não.

4.19. Os animais a serem utilizados neste projeto pertencem a alguma espécie ameaçada de extinção? Se sim, forneça uma justificação científica sobre as razões pelas quais é necessário utilizar uma espécie ameaçada de extinção neste projeto.

Não.

CARACTERÍSTICAS DO MANEIO A PRESTAR AOS ANIMAIS

4.20. No caso de ser feito enriquecimento ambiental ao alojamento dos animais, descreva-o.

O alojamento é enriquecido com rolos de papel e material de papel para nidificação.

4.21. Os animais a utilizar no projeto necessitam de condições de alojamento especiais? Se sim, especifique que condições e justifique a necessidade das mesmas terem que ser utilizadas.

Todos os animais vivem em sistema fechado com utilização de IVC (caixas ventiladas individualmente).

4.22. Os animais a utilizar no projeto necessitam de dieta alimentar ou de abeberamento especiais? Se sim, especifique.

Todos os animais receberão alimentos, água e cama esterilizados.

4.23. Os animais a utilizar no projeto necessitam de prestação de cuidados ou de atenção especiais? Se sim, especifique.

Não.

4.24. Os animais serão alojados individualmente? Se sim, forneça detalhes das circunstâncias, período de tempo e justificação para que se faça o alojamento individual.

Não.

REUTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

4.25. Algum dos animais a utilizar neste projeto foi previamente usado num outro estudo/utilização para fins científicos? Se sim, em que condições? Justifique a necessidade de envolvimento do mesmo neste projeto.

De notar que para um animal poder ser reutilizado, têm que estar satisfeitas as condições referidas nas alíneas a) a d), do ponto 1, do artigo 16º, do Decreto-Lei nº 113/2013. Assim, forneça informações sobre: o título do projeto prévio em que foi utilizado, a severidade efetiva do procedimento a que ficou sujeito, estado geral de saúde e de bem-estar do animal, parecer médico-veterinário sobre o envolvimento do animal num novo procedimento, tendo em conta a duração de vida do animal.

Não.

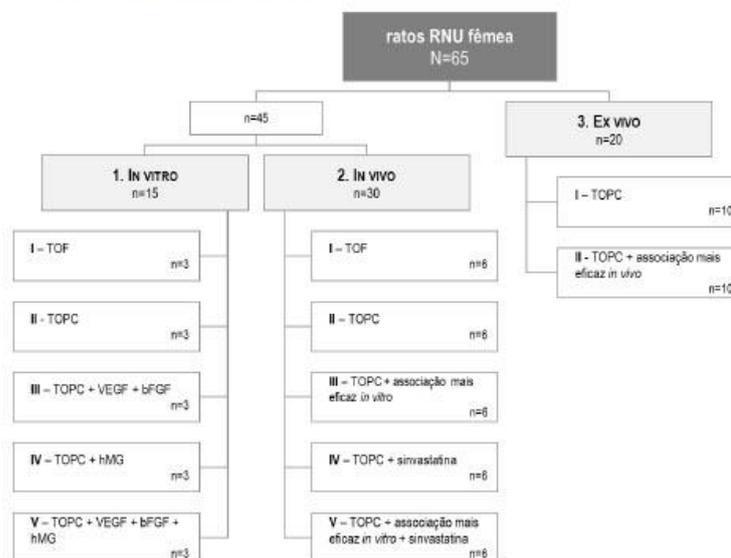
SESSÃO 5: INFORMAÇÕES SOBRE OS PROCEDIMENTOS E O DESENHO EXPERIMENTAL

SEQUÊNCIA DE ACONTECIMENTOS

5.1. Faça uma descrição completa e exata, acompanhada por uma linha temporal, de todos os eventos e procedimentos (devidamente identificados e numerados) que irão acontecer a cada animal (ou grupo de animais), desde a altura em que são obtidos até à altura em que o projeto é finalizado.

No caso de melhorar a clareza da descrição do plano do projeto, ilustre as diferentes etapas acima mencionadas com um fluxograma ou um esquema.

Neste projeto serão utilizados 65 ratos Rowet nude (RNU), fêmea, de 4 a 6 semanas.



1. Avaliação *in vitro* da angiogénese e viabilidade celular após exposição do tecido ovárico a fatores pró-angiogénicos.

A ovariectomia bilateral será realizada entre as 4 e as 6 semanas. Os ovários serão divididos em 5 grupos: I – tecido ovárico a fresco (TOF), II – tecido ovárico pós-criopreservação (TOPC), III – TOPC tratado com VEGF e bFGF, IV – TOPC tratado com hMG, V – TOPC tratado com VEGF, bFGF e hMG.

A técnica de criopreservação será realizada de acordo com o protocolo do Serviço de Medicina da Reprodução do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), adotado para criopreservação do tecido ovárico de doentes oncológicas com intuito de preservação da fertilidade (Barrett & Woodruff, 2010).

Nos grupos controlo (I e II), os ovários imediatamente após colheita e após congelação-descongelação serão mantidos em cultura sem adição de qualquer fator. Nos grupos de estudo (III, IV e V), o tecido ovárico descongelado será mantido em cultura com o fator pró-angiogénico, durante 2 a 4 horas (Gao

et al., 2015; L. Wang et al., 2013; Y. Wang et al., 2012). Posteriormente, será realizado o estudo histológico e imunohistoquímico (VEGFR, CD31, Ki67, P53, Caspase-3 e BCL-2) do tecido ovárico em colaboração com o Serviço de Anatomia Patológica do CHUC, bem como a avaliação da expressão de VEGFR-2 por RT-PCR e de angiopoietina, PDGF, TIMP-1, MMP-2 e -9 por ELISA.

2. Avaliação *in vivo* da angiogénese e função endócrina após exposição do tecido ovárico de rato a fatores angiogénicos e tratamento sistémico com sinvastatina

Os ratos (RNU) com cerca de 4 a 6 semanas serão submetidos a ovariectomia bilateral. De acordo com os resultados da tarefa *in vitro*, serão constituídos 5 grupos: I – transplante de tecido ovárico a fresco, II- transplante de TOPC, III – transplante de TOPC tratado com a associação mais eficaz verificada na tarefa 1, IV – transplante de TOPC e posterior tratamento sistémico com sinvastatina, V - transplante de TOPC tratado com a associação mais eficaz verificada na tarefa 1 e posterior tratamento sistémico com sinvastatina.

Cerca de 1 a 2 semanas após a ovariectomia bilateral, será realizado autotransplante heterotópico no dorso do ratinho fêmea com dois enxertos de tecido ovárico (Dath et al., 2010). Nos primeiros 7 dias pós-transplante, nos grupos IV e V será administrada sinvastatina 1mg/kg/dia oral (Cohen et al., 2015). No 7º dia pós-transplante, um dos enxertos será recolhido para ser analisado como descrito na tarefa *in vivo*, através da análise histológica, avaliação imunohistoquímica e RT-PCR.

A neovascularização será avaliada *in vivo* por RMN, no 7º e 30º dias pós-transplante, através da utilização do contraste biotin-BSAdDTPA (Cohen et al., 2014, 2015). A função endócrina será avaliada através da realização de citologia vaginal (CV) semanal e doseamento hormonal (DH) de estradiol sérico por ELISA ao 28º dia pós-transplante (Mahmoodi, Mehranjani, Shariatzade, Eimani, & Shahverdi, 2014). Ao 30º dia pós-transplante, o enxerto será removido, para avaliação da angiogénese, função endócrina, proliferação e morte celular, pelos métodos descritos nas tarefas anteriores.

3. Avaliação *ex vivo* da angiogénese e função endócrina após exposição do tecido ovárico de humano a fatores angiogénicos e tratamento sistémico com sinvastatina

Trata-se de uma prova de conceito em tecido ovárico humano. Assim, de acordo com os resultados obtidos com o tecido ovárico de rato, serão constituídos 2 grupos: I – TOPC e II – TOPC com o tratamento pró-angiogénico mais eficaz.

A metodologia será igual à realizada na tarefa *in vivo* com tecido ovárico de rato.

TEMPO (dias)	-7	0	7	14	21	28	30
Nº RATOS	65	50	50	50	50	50	50
PROCEDIMENTOS	① Ovariectomia bilateral	② Transplante de tecido ovárico ③ Administração sinvastatina	④ RMN ⑤ CV ⑦ Colheita de tecido ovárico	⑤ CV	⑤ CV	⑤ CV	④ RMN ⑥ DH ⑦ Colheita de tecido ovárico

DESENHO EXPERIMENTAL

5.2. Para cada um dos procedimentos que irão ser realizados a cada animal (ou grupo de animais), preencher a tabela em baixo, indicando e descrevendo cada item contido na mesma:

Título do procedimento:	Ovariectomia bilateral
Nº do procedimento:	Procedimento 1
Justificação/relevância para a realização do procedimento:	Para recolher o tecido ovárico para estudo.
Espécie animal:	45 <i>Rattus norvegicus</i> – estirpe Rowett (RNU) (heterozigóticos) 20 <i>Rattus norvegicus</i> – estirpe Rowett nude (RNU) (homozigóticos)
Nº de animais a utilizar:	65
Técnica utilizada:	Ovariectomia bilateral
Duração do procedimento:	15 min
Frequência do procedimento:	Procedimento único
Anestesia associada?:	Que princípio ativo? Dose? Via de administração? Frequência? 2µl/g de uma solução de quetamina e de clorpromazina à razão de 3:1. i.p., administração única.
Analgesia associada?:	Que princípio ativo? Dose? Via de administração? Frequência? Ibuprofeno suspensão oral, 10mg/kg, oral, 8 em 8 horas.
Estabelecimento de limites críticos:	Sim. Será avaliado o peso dos animais a cada 72 horas, no mínimo, e observados os sinais de bem-estar. Se os animais demonstrarem uma perda de peso superior a 15% ou sinais de que o bem-estar está comprometido serão occidados por sobredose anestésica.
Efeitos adversos do procedimento no bem-estar animal:	Não são previstos efeitos adversos.
Classificação de severidade do procedimento proposta (1):	1) In vitro – não recuperação 2) In vivo – Moderado 3) Ex vivo – Moderado
Destino dos animais no final do procedimento:	In vitro – nº 15 – occisão In vivo e ex vivo – nº 50 – seguem para o procedimento 2
Se o destino dos animais for a occisão, refira qual o método de occisão a utilizar (2):	No caso de ser utilizado um método utilizando um agente químico, especifique qual o princípio ativo, dosagem e via de administração do mesmo: Sobredose anestésica com quetamina seguida de deslocação cervical.

(1) A classificação de severidade deverá ter em conta as categorias (Não recuperação, Ligeiro, Moderado e Severo) e os critérios de atribuição dispostos no Anexo IV, do Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto.

- (2) A occisão dos animais deverá ser feita utilizando um método adequado referido no Anexo II do Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto. No caso de ser previsto outro método de occisão diferente, qual a justificação científica para isso ocorrer e que provas científicas tem que permitam concluir que o método proposto é, pelo menos, tão humano quanto os contidos no referido anexo.

Título do procedimento:	Transplante de tecido ovárico
Nº do procedimento:	Procedimento 2
Justificação/relevância para a realização do procedimento:	Para avaliação in vivo da angiogénese e função endócrina
Espécie animal:	30 <i>Rattus norvegicus</i> – estirpe <i>Rowett</i> (RNU) (heterozigóticos) 20 <i>Rattus norvegicus</i> – estirpe <i>Rowett nude</i> (RNU) (homozigóticos)
Nº de animais a utilizar:	50
Técnica utilizada:	Transplante heterotópico no dorso de rato fêmea
Duração do procedimento:	10 min
Frequência do procedimento:	Procedimento único
Anestesia associada?:	Que princípio ativo? Dose? Via de administração? Frequência? 2µl/g de uma solução de quetamina e de clorpromazina à razão de 3:1. i.p., administração única.
Analgesia associada?:	Que princípio ativo? Dose? Via de administração? Frequência? Ibuprofeno suspensão oral, 10mg/kg, oral, 8 em 8 horas.
Estabelecimento de limites críticos:	Sim. Será avaliado o peso dos animais a cada 72 horas, no mínimo, e observados os sinais de bem-estar. Se os animais demonstrarem uma perda de peso superior a 15% ou sinais de que o bem-estar está comprometido serão occidados por sobredose anestésica.
Efeitos adversos do procedimento no bem-estar animal:	Não são previstos efeitos adversos.
Classificação de severidade do procedimento proposta (1):	Moderado
Destino dos animais no final do procedimento:	12 – seguem para procedimento 3 + 10 – se for a melhor associação terapêutica 28 – seguem para procedimento 4 + 10 – se não for a melhor associação terapêutica
Se o destino dos animais for a occisão, refira qual o método de occisão a utilizar (2):	No caso de ser utilizado um método utilizando um agente químico, especifique qual o princípio ativo, dosagem e via de administração do mesmo: Não aplicável

- | | |
|--|--|
| | |
|--|--|
- (3) A classificação de severidade deverá ter em conta as categorias (Não recuperação, Ligeiro, Moderado e Severo) e os critérios de atribuição dispostos no Anexo IV, do Decreto-Lei n.º 113/2013, de 7 de Agosto.
- (4) A occisão dos animais deverá ser feita utilizando um método adequado referido no Anexo II do Decreto-Lei n.º 113/2013, de 7 de Agosto. No caso de ser previsto outro método de occisão diferente, qual a justificação científica para isso ocorrer e que provas científicas tem que permitam concluir que o método proposto é, pelo menos, tão humano quanto os contidos no referido anexo.

Título do procedimento:	Administração sinvastatina
N.º do procedimento:	Procedimento 3
Justificação/relevância para a realização do procedimento:	Potenciar a angiogénese
Espécie animal:	12 <i>Rattus norvegicus</i> – estirpe <i>Rowett</i> (RNU) (heterozigóticos) 10 <i>Rattus norvegicus</i> – estirpe <i>Rowett nude</i> (RNU) (homozigóticos) – se a melhor associação terapêutica
N.º de animais a utilizar:	12 + 10 – se for o melhor tratamento
Técnica utilizada:	Administração oral de 1mg/kg/dia de sinvastatina por gavagem.
Duração do procedimento:	5 min
Frequência do procedimento:	1 vez por dia durante 7 dias
Anestesia associada?:	Que princípio ativo? Dose? Via de administração? Frequência? Não aplicável
Analgesia associada?:	Que princípio ativo? Dose? Via de administração? Frequência? Não aplicável
Estabelecimento de limites críticos:	Sim. Será avaliado o peso dos animais a cada 72 horas, no mínimo, e observados os sinais de bem-estar. Se os animais demonstrarem uma perda de peso superior a 15% ou sinais de que o bem-estar está comprometido serão occidados por sobredose anestésica.
Efeitos adversos do procedimento no bem-estar animal:	Não são previstos efeitos adversos.
Classificação de severidade do procedimento proposta (1):	Ligeiro
Destino dos animais no final do procedimento:	12 +/- 10 seguem para procedimento 4
Se o destino dos animais for a occisão, refira qual o método de occisão a utilizar	No caso de ser utilizado um método utilizando um agente químico, especifique qual o princípio ativo, dosagem e via de administração do mesmo.

(2):	Não aplicável
------	---------------

- (5) A classificação de severidade deverá ter em conta as categorias (Não recuperação, Ligeiro, Moderado e Severo) e os critérios de atribuição dispostos no Anexo IV, do Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto.
- (6) A occisão dos animais deverá ser feita utilizando um método adequado referido no Anexo II do Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto. No caso de ser previsto outro método de occisão diferente, qual a justificação científica para isso ocorrer e que provas científicas tem que permitam concluir que o método proposto é, pelo menos, tão humano quanto os contidos no referido anexo.

Título do procedimento:	Ressonância Magnética Nuclear (RMN)
Nº do procedimento:	Procedimento 4
Justificação/relevância para a realização do procedimento:	Para avaliação in vivo da angiogénese.
Espécie animal:	30 <i>Rattus norvegicus</i> – estirpe <i>Rowett</i> (RNU) (heterozigóticos) 20 <i>Rattus norvegicus</i> – estirpe <i>Rowett nude</i> (RNU) (homozigóticos)
Nº de animais a utilizar:	50
Técnica utilizada:	Aquisição de imagem por ressonância magnética nuclear.
Duração do procedimento:	5 min
Frequência do procedimento:	2 vezes - 7º e 30º dias pós-transplante
Anestesia associada?:	Que princípio ativo? Dose? Via de administração? Frequência? 2µl/g de uma solução de quetamina e de clorpromazina à razão de 3:1. i.p., administração única.
Analgesia associada?:	Que princípio ativo? Dose? Via de administração? Frequência? Não aplicável.
Estabelecimento de limites críticos:	Sim. Será avaliado o peso dos animais a cada 72 horas, no mínimo, e observados os sinais de bem-estar. Se os animais demonstrarem uma perda de peso superior a 15% ou sinais de que o bem-estar está comprometido serão occidados por sobredose anestésica.
Efeitos adversos do procedimento no bem-estar animal:	Não são previstos efeitos adversos.
Classificação de severidade do procedimento proposta ⁽¹⁾ :	Ligeiro
Destino dos animais no final do procedimento:	50 – após 1ª vez (D7) – seguem para procedimento 5 50 – após 2ª vez (D30) – seguem para procedimento 6
Se o destino dos animais for	No caso de ser utilizado um método utilizando um agente químico,

a occisão, refira qual o método de occisão a utilizar (2):	especifique qual o princípio ativo, dosagem e via de administração do mesmo: Não aplicável
--	---

- (7) A classificação de severidade deverá ter em conta as categorias (Não recuperação, Ligeiro, Moderado e Severo) e os critérios de atribuição dispostos no Anexo IV, do Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto.
- (8) A occisão dos animais deverá ser feita utilizando um método adequado referido no Anexo II do Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto. No caso de ser previsto outro método de occisão diferente, qual a justificação científica para isso ocorrer e que provas científicas tem que permitam concluir que o método proposto é, pelo menos, tão humano quanto os contidos no referido anexo.

Título do procedimento:	Citologia vaginal (CV)
Nº do procedimento:	Procedimento 5
Justificação/relevância para a realização do procedimento:	Para avaliação in vivo da função endócrina
Espécie animal:	30 <i>Rattus norvegicus</i> – estirpe <i>Rowett</i> (RNU) (heterozigóticos) 20 <i>Rattus norvegicus</i> – estirpe <i>Rowett nude</i> (RNU) (homozigóticos)
Nº de animais a utilizar:	50
Técnica utilizada:	Citologia vaginal – será realizada colheita de exsudato vaginal com cotonete
Duração do procedimento:	3 min
Frequência do procedimento:	4 vezes – dia 7, 14, 21 e 28 após-transplante.
Anestesia associada?:	Que princípio ativo? Dose? Via de administração? Frequência? Não aplicável
Analgesia associada?:	Que princípio ativo? Dose? Via de administração? Frequência? Não aplicável
Estabelecimento de limites críticos:	Sim. Será avaliado o peso dos animais a cada 72 horas, no mínimo, e observados os sinais de bem-estar. Se os animais demonstrarem uma perda de peso superior a 15% ou sinais de que o bem-estar está comprometido serão occidados por sobredose anestésica.
Efeitos adversos do procedimento no bem-estar animal:	Não são previstos efeitos adversos.
Classificação de severidade do procedimento proposta (1):	Ligeiro

Destino dos animais no final do procedimento:	50 – após 1ª vez (D7) – seguem para procedimento 7 50 – após 4ª vez (D28) – seguem para procedimento 4
Se o destino dos animais for a occisão, refira qual o método de occisão a utilizar (2):	No caso de ser utilizado um método utilizando um agente químico, especifique qual o princípio ativo, dosagem e via de administração do mesmo: Não aplicável

(9) A classificação de severidade deverá ter em conta as categorias (Não recuperação, Ligeiro, Moderado e Severo) e os critérios de atribuição dispostos no Anexo IV, do Decreto-Lei n.º 113/2013, de 7 de Agosto.

(10) A occisão dos animais deverá ser feita utilizando um método adequado referido no Anexo II do Decreto-Lei n.º 113/2013, de 7 de Agosto. No caso de ser previsto outro método de occisão diferente, qual a justificação científica para isso ocorrer e que provas científicas tem que permitam concluir que o método proposto é, pelo menos, tão humano quanto os contidos no referido anexo.

Título do procedimento:	Doseamentos Hormonais (DH) séricos
N.º do procedimento:	Procedimento 6
Justificação/relevância para a realização do procedimento:	Para avaliação in vivo da função endócrina
Espécie animal:	30 <i>Rattus norvegicus</i> – estirpe Rowett (RNU) (heterozigóticos) 20 <i>Rattus norvegicus</i> – estirpe Rowett nude (RNU) (homozigóticos)
N.º de animais a utilizar:	50
Técnica utilizada:	Colheita de sangue da veia da cauda para doseamento de 17-beta estradiol.
Duração do procedimento:	3 min
Frequência do procedimento:	Procedimento único
Anestesia associada?:	Que princípio ativo? Dose? Via de administração? Frequência? Não aplicável
Analgesia associada?:	Que princípio ativo? Dose? Via de administração? Frequência? Não aplicável
Estabelecimento de limites críticos:	Sim. Será avaliado o peso dos animais a cada 72 horas, no mínimo, e observados os sinais de bem-estar. Se os animais demonstrarem uma perda de peso superior a 15% ou sinais de que o bem-estar está comprometido serão occidados por sobredose anestésica.
Efeitos adversos do procedimento no bem-estar animal:	Não são previstos efeitos adversos.

Classificação de severidade do procedimento proposta (1):	Ligeiro
Destino dos animais no final do procedimento:	50 – seguem para procedimento 7
Se o destino dos animais for a occisão, refira qual o método de occisão a utilizar (2):	No caso de ser utilizado um método utilizando um agente químico, especifique qual o princípio ativo, dosagem e via de administração do mesmo: Não aplicável

(11) A classificação de severidade deverá ter em conta as categorias (Não recuperação, Ligeiro, Moderado e Severo) e os critérios de atribuição dispostos no Anexo IV, do Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto.

(12) A occisão dos animais deverá ser feita utilizando um método adequado referido no Anexo II do Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto. No caso de ser previsto outro método de occisão diferente, qual a justificação científica para isso ocorrer e que provas científicas tem que permitam concluir que o método proposto é, pelo menos, tão humano quanto os contidos no referido anexo.

Título do procedimento:	Colheita de tecido ovárico
Nº do procedimento:	Procedimento 7
Justificação/relevância para a realização do procedimento:	Para avaliação histológica e molecular da angiogénese e função endócrina
Espécie animal:	30 <i>Rattus norvegicus</i> – estirpe Rowett (RNU) (heterozigóticos) 20 <i>Rattus norvegicus</i> – estirpe Rowett nude (RNU) (homozigóticos)
Nº de animais a utilizar:	50
Técnica utilizada:	Remoção de um enxerto de tecido ovárico transplantado no dorso de rato fêmea.
Duração do procedimento:	7 min
Frequência do procedimento:	2 vezes – no dia 7 pós transplante é removido um ovário e no dia 30 é removido o outro ovário.
Anestesia associada?:	Que princípio ativo? Dose? Via de administração? Frequência? 2µl/g de uma solução de ketamina e de clorpromazina à razão de 3:1. i.p., administração única.
Analgesia associada?:	Que princípio ativo? Dose? Via de administração? Frequência? Ibuprofeno suspensão oral, 10mg/kg, oral, 8 em 8 horas.
Estabelecimento de limites críticos:	Sim. Será avaliado o peso dos animais a cada 72 horas, no mínimo, e observados os sinais de bem-estar. Se os animais demonstrarem uma perda de peso superior a 15% ou sinais de que o bem-estar está comprometido serão occidados por sobredose anestésica.
Efeitos adversos do procedimento no bem-estar	Não são previstos efeitos adversos.

animal:	
Classificação de severidade do procedimento proposta (1):	Moderado
Destino dos animais no final do procedimento:	50 - Após a 1ª colheita (D7) - seguem para procedimento 5 50 - Após a 2ª colheita (D30) - seguem para occisão
Se o destino dos animais for a occisão, refira qual o método de occisão a utilizar (2):	No caso de ser utilizado um método utilizando um agente químico, especifique qual o princípio ativo, dosagem e via de administração do mesmo: Sobredose anestésica com quetamina seguida de deslocação cervical.

(1) A classificação de severidade deverá ter em conta as categorias (Não recuperação, Ligeiro, Moderado e Severo) e os critérios de atribuição dispostos no Anexo IV, do Decreto-Lei n.º 113/2013, de 7 de Agosto.

(2) A occisão dos animais deverá ser feita utilizando um método adequado referido no Anexo II do Decreto-Lei n.º 113/2013, de 7 de Agosto. No caso de ser previsto outro método de occisão diferente, qual a justificação científica para isso ocorrer e que provas científicas tem que permitam concluir que o método proposto é, pelo menos, tão humano quanto os contidos no referido anexo.

Procedimentos cirúrgicos. Quando forem realizados procedimentos cirúrgicos deverão também ser incluídas informações sobre os seguintes assuntos:

- Se a cirurgia implicará recobro dos animais ou não;
- Cuidados/procedimentos pré-cirúrgicos a realizar aos animais;
- Descrição dos procedimentos cirúrgicos, incluindo uma descrição sobre o local anatómico de acesso;
- Cuidados pós-cirúrgicos a realizar aos animais;
- Medicação intra-operatória (que substância, dose, frequência e via de administração)

OVARIECTOMIA BILATERAL - O rato será anestesiado, com 2µl/g de uma solução de quetamina e de clorpromazina à razão de 3:1. i.p., administração única, e colocado em posição supina. Posteriormente será realizada laparotomia com uma incisão mediana de 2 a 3 cm. Após localizados os ovários, serão laqueados os pedículos vasculares. Por último será realizada rafia da parede abdominal. No pós-operatório será dada analgesia com ibuprofeno em suspensão oral, 10mg/kg, oral, 8 em 8 horas.

TRANSPLANTE DE TECIDO OVÁRICO - O rato será anestesiado, com 2µl/g de uma solução de quetamina e de clorpromazina à razão de 3:1. i.p., administração única, e posteriormente os ovários serão autotransplantados no dorso, através de duas incisões, de 1 cm cada, na coxa direita e esquerda. Por último será realizada rafia. No pós-operatório será dada analgesia com ibuprofeno em suspensão oral, 10mg/kg, oral, 8 em 8 horas.

COLHEITA DE TECIDO OVÁRICO - O rato será anestesiado, com 2µl/g de uma solução de quetamina e de clorpromazina à razão de 3:1. i.p., administração única, e realizada uma incisão na coxa, sobre o tecido previamente transplantado. Por último será realizada rafia. No pós-operatório será dada analgesia com ibuprofeno em suspensão oral, 10mg/kg, oral, 8 em 8 horas.

Quando o procedimento for a administração de uma substância, refira de que substância se trata, veículo (se necessário) e em que dose (mg/kg de peso vivo), volume, frequência e via será feita a sua administração.

Administração oral de 1mg/kg7dia de sinvastatina durante 7 dias.

Quando o **procedimento for a administração de um produto biológico/agente infeccioso**, refira de que produto/espécie/estirpe se trata e em que dose, frequência e local e via será feita a sua administração.

Não aplicável.

Quando o **procedimento for a colheita de uma amostra biológica** (incluindo para genotipagem), refira de que tecido ou fluido se trata e o volume, frequência, local e via de colheita que serão realizadas.

Uma colheita única de sangue ao 28º dia pós-transplante

SECÇÃO 6: RESUMO NÃO TÉCNICO DO PROJETO

De notar que, de acordo com a alínea b), do artigo 43º do Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto, no pedido de autorização de um projeto deverá ser incluído um **resumo não técnico do projeto**, e considerou-se de utilidade que o mesmo faça parte da presente secção.

O resumo deverá ser redigido claramente usando termos não técnicos, sempre que possível, por forma a poder ser facilmente entendido por um leigo. Para além disso, de acordo com o artigo 49º do Decreto-Lei, o projeto deverá ser explicado salvaguardando sempre a propriedade intelectual e as informações confidenciais que identifiquem quer as pessoas envolvidas no projeto quer o estabelecimento onde os animais serão alojados.

O resumo não técnico será posteriormente publicitado no sítio da Internet da DGAV.

Modelo de Resumo não técnico de projeto experimental

Título do projeto	Preservação do Potencial Reprodutivo na Doente Oncológica: Estimulação da Angiogénese do Enxerto de Tecido Ovárico Criopreservado		
Duração do projeto	5 anos		
Palavras-chave (máx. 5)	Fertilidade, tecido ovárico criopreservado, xenotransplante, angiogénese, VEGF		
Fim/objetivo do projeto (de acordo com Artº 5º) (1)	Investigação fundamental		Não
	Investigação translacional ou aplicada	Sim	
	Uso regulamentar e produção de rotina		Não
	Proteção do ambiente natural no interesse da saúde ou do bem-estar do homem ou dos animais		Não
	Investigação destinada à conservação das espécies;		Não
	Ensino superior ou formação para aquisição, manutenção ou melhoria das qualificações profissionais		Não
	Inquéritos no domínio da medicina legal		Não
	Manutenção de colónias de animais geneticamente alterados (2)		Não
Descreva os Objetivos do Projeto (ex., incógnitas científicas ou necessidades científicas/clínicas a serem abordadas, etc)	O objetivo deste trabalho é estudar estratégias para promover a angiogénese precoce do enxerto de tecido ovárico após criopreservação, diminuindo a perda de		

	<p>foliculos e otimizando a função e a duração do enxerto.</p> <p>Pretendemos avaliar a ação de fatores angiogénicos, como VEGF, bFGF, hMG e sinvastatina, em diferentes associações, bem como em diferentes fases do processo de criopreservação e transplante.</p>
Quais são os potenciais benefícios que possam derivar deste projeto (como poderia a ciência avançar ou os seres humanos ou outros animais poderiam beneficiar com o projeto)?	A nossa hipótese baseia-se na possibilidade de estimular a angiogénese, reduzindo o tempo de isquemia, com consequente melhoria da sobrevivência dos foliculos ováricos e da função endócrina.
Que espécies animais e números aproximados de animais serão utilizados?	Serão utilizados cerca de 65 ratos adultos da estirpe RNU.
No contexto do que é proposto fazer-se aos animais, quais são os efeitos adversos esperados e o grau provável/esperado de severidade? O que acontecerá aos animais no final da realização do projeto?	<p>Procedimentos:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Ovariectomia bilateral – <i>in vitro</i>: não recuperação; <i>in vivo</i> e <i>ex vivo</i>: moderado 2. Transplante de tecido ovárico – moderado 3. Administração de sinvastatina – ligeiro 4. RMN – ligeiro 5. Citologia vaginal – ligeiro 6. Doseamentos hormonais séricos – ligeiro 7. Colheita de tecido ovárico – moderado <p>Todos os animais serão occisados com sobredose de anestésico.</p>
Aplicação dos 3Rs	
1.Replacement (Substituição) Refira a razão por que precisa utilizar animais e por que não pode usar alternativas não-animais	A utilização de animais é absolutamente necessária e fundamental para atingir os objetivos estabelecidos no projeto, devido ao microambiente <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> do tecido ovárico que influencia os processos.
2.Reduction (Redução) Explique como garantirá que serão utilizados os números mínimos de animais	O número de animais previsto é estritamente necessário à realização do projeto, de modo a obter significância científica.
3.Refinement (Refinamento) Explique a escolha da(s) espécie e a razão porque o modelo(s) animal que serão usados são os mais refinados, tendo em conta os objetivos. Explique as medidas gerais que serão tomadas para minimizar os custos de bem-estar	<p>Todos os procedimentos classificados como moderados serão seguidos de analgesia.</p> <p>Os animais serão mantidos em gaiolas individualmente ventiladas com as dimensões apropriadas e com comida e água <i>ad libitum</i>. As gaiolas estarão numa sala com controlo automático dos ciclos luz/escuro (12/12h) e também da temperatura (22°C). O ruído dentro da sala será evitado ao máximo e será feita uma monitorização diária do bem-estar</p>

(danos) aos animais.	dos animais.		
Para uso oficial			
O projeto será submetido a avaliação retrospectiva?	Sim	Não	Observações

Notas: ⁽¹⁾ Elimine Sim ou Não, conforme apropriado.

⁽²⁾ Com esta opção deverá ser escolhido, pelo menos, um fim/objetivo adicional.

SECÇÃO 7: DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADES

DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADES

DO INVESTIGADOR RESPONSÁVEL

1. Li o Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto, relativo à "proteção dos animais utilizados para fins científicos".
2. Confirmando que o uso de animais neste projecto estará de acordo com o diploma supracitado e com outras orientações dadas pela entidade competente.
3. Eu aceito a responsabilidade pela condução do projecto tal como delineado nesta aplicação, de acordo com a legislação.
4. Eu declaro que tenho as qualificações e a experiência apropriadas para realizar os procedimentos descritos neste projecto ou para assegurar que eles são feitos corretamente.
5. Eu declaro que cada pessoa envolvida neste projeto foi adequadamente instruída e é competente para levar a cabo os procedimentos por que são responsáveis.
6. Eu declaro que estão disponíveis os meios adequados para levar a cabo este projeto.
7. Confirmando que o Órgão responsável pelo bem-estar dos animais (ORBEA) do estabelecimento onde irá decorrer o projeto, emitiu um parecer não vinculativo sobre o mesmo, o qual anexo a este pedido.

Nome	Assinatura	Data
Maria Filomena Rabaça Roque Botelho		29/07/2016

DO RESPONSÁVEL PELO ESTABELECIMENTO ONDE OS ANIMAIS SERÃO ALOJADOS

- Eu declaro que, uma vez que o projeto esteja autorizado pela DGAV, eu assumo a responsabilidade por assegurar que irão ser prestadas aos animais as condições adequadas, de acordo com o Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto.

Nome	Assinatura	Data

DA PESSOA PERTENCENTE AO ÓRGÃO RESPONSÁVEL PELO BEM-ESTAR DOS ANIMAIS (ORBEA) EM QUEM O RESPONSÁVEL PELO ESTABELECIMENTO ONDE OS ANIMAIS SERÃO ALOJADOS DELEGUE COMPETÊNCIA

- Eu declaro que, uma vez que o projeto esteja autorizado pela DGAV, eu assumo a responsabilidade por assegurar que irão ser prestadas aos animais as condições adequadas, de acordo com o Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto.

Nome	Assinatura	Função assumida no ORBEA	Data

Antes da submissão do formulário verifique se:

1. Respondeu a todas as questões (mesmo que a sua resposta seja "Não aplicável" ou que tenha rasurado os campos não aplicáveis);
2. Todas as pessoas envolvidas no projeto foram identificadas na Secção 1;
3. O utilizador que levará a cabo o projeto de utilização de animais fica claramente identificado;
4. O estabelecimento(s)/local onde irão ficar alojados os animais e decorrer os procedimentos fica(m) identificado(s);
5. O investigador responsável leu e assinou o formulário depois de preenchido, na Secção 7;
6. O responsável pelo estabelecimento onde os animais serão alojados (ou o membro do Órgão responsável pelo bem-estar dos animais (ORBEA, artigo 34º do Decreto-Lei) a quem este delegue essa competência) leu e assinou o formulário depois de preenchido, na Secção 7;
7. O resumo não técnico do projeto está redigido em português e de acordo com os requisitos estipulados no artigo 49º do Decreto-Lei;
8. Anexou, ao pedido de autorização do projeto a submeter à DGAV, o **parecer não vinculativo** emitido pelo **Órgão responsável pelo bem-estar dos animais** do estabelecimento onde os animais irão ser alojados, de acordo com o ponto 2, do artigo 43º do Decreto-Lei;
9. Anexou, ao pedido de autorização do projeto a submeter à DGAV, se aplicável para o projeto em apreço, o **parecer favorável** emitido pelo **Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas**, no que diz respeito à utilização de animais capturados no meio selvagem, de acordo com o ponto 2, do artigo 9º do Decreto-Lei.

- Parecer da ORBEA (ORBEA 2-2016)

 **Biotério IBILI – Sub-Unidade I – FMUC**
ORBEA

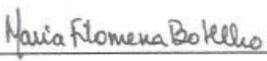
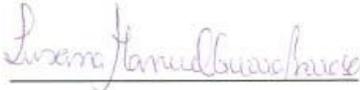
PARECER 2/2016

Título do projeto: Preservação do Potencial Reprodutivo na Doente Oncológica: Estimulação da Angiogénese do Exerto de Tecido Ovárico Criopreservado

Investigador Responsável: Ana Sofia Fernandes Pais

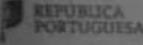
O Órgão para o Bem Estar Animal – ORBEA, do Biotério IBILI – Sub-Unidade I da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, após análise do projeto acima mencionado, deu o seu parecer favorável.

Coimbra, 29 de Julho de 2016

A Diretora do Estabelecimento	A Veterinária Designada
	

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra:
Pólo III da Universidade de Coimbra | Azinhaga de Santa Comba, Leiria:
3000-548 Coimbra, Portugal
Telefone: 239480240 | Fax: 239480258

- Parecer da DGAV (11060495/23-11-2016)





FT 2016DGV/058569 de 2016-11-23
 ORIGINAL
(Procedente por importação)

DGAV - Direcção-Geral de Alimentação e Veterinária
 Campo Grande, n.º 50
 1700-093 Lisboa
 NIF: 600 045 234
 Telefone: 351 213 239 500
 Fax: 351 213 239 501

Exm.º Sr.ª Ana Sofia Pais
 Rua dos Loureiros, n.º 29 - 2.º Dto.
 3045-084 - COIMBRA
 NIF: PT244399530

175716
 NCV:
 NE

Artigos com IVA a 0,00%			
Quantidade	Item	Preço unitário	Valor sem IVA
1	Autorização do projeto experimental ou científico com animais - Preservação do potencial reprodutivo na doente oncológica: Estimulação da Angiogénese do enxerto de tecido ovárico criopreservado (11060495/23-11-2016)	300,00	300,00
			0 €
Total IVA:			0,00 €
Total artigos:			300,00 €
Total factura:			300,00 €

(trezentos euros)


 After the payment has been effected, you must send a proof of it in a document to the DGAV, indicating the number of the invoice.


 Deve proceder ao pagamento desta factura até ao dia 03-12-2016. Caso proceda ao pagamento por uma das modalidades abaixo indicadas, deve enviar à DGAV o comprovativo de pagamento e a indicação do n.º da presente factura.

Modalidades de pagamento:
 - Pagamento por multibanco;
 - Pagamento através de cheque a ordem do Instituto de Gestão da Tesouraria e do Crédito Público, IP (IGTCP) e remetê-lo a esta Direcção-Geral;
 - Pagamento em qualquer serviço regional de DGAV.

A falta de pagamento ou o pagamento efectuado para além do prazo indicado, implica a suspensão do serviço, devida de juros de mora, processo de contra-ordenação e execução fiscal.

V.ª Ig. - Procedente por progressão verticada
 n.º 20493/T

Os valores indicados à taxa 0 estão isentos de IVA ao abrigo do n.º 2 do art. 2 do CIVA.

MAM/DGAV - Docipref ref. 0-Factura
 Impresso a 23-11-2016, às 14:02:31

Anexo IV – Aprovação da Comissão de Ética

Documentação relacionada com a aprovação da Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra relativamente ao projeto de investigação “Preservação do Potencial Reprodutivo na Doente Oncológica: Estimulação da Angiogénese do Enxerto de Tecido Ovárico Criopreservado”:

- Projeto de investigação
- Consentimento Informado
- Parecer da Comissão de Ética

DOCUMENTOS

- Projeto de investigação

	FMUC FACULDADE DE MEDICINA UNIVERSIDADE DE COIMBRA		
COMISSÃO DE ÉTICA			
PROJECTO DE INVESTIGAÇÃO			
Instruções: o(a) aluno(a)/investigador(a) deve preencher os campos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13 em computador. Posteriormente, assina o formulário e entrega-o nos Serviços de Gestão Académica da FMUC (em caso de se tratar de um projecto de investigação inserido num curso de mestrado e/ou doutoramento) OU no Secretariado Executivo - CE (em caso de se tratar de um projecto de investigação autónomo). O processo deve ser entregue em PAPEL e EM SUPORTE DIGITAL , juntamente com os anexos constantes dos pontos 3 e 4 (se aplicável) e COM OS CONSENTIMENTOS DESCRITOS NO PONTO 11.			
NOTAS IMPORTANTES:			
1. A Comissão de Ética da Faculdade de Medicina analisa apenas o presente formulário e anexos, pelo que importa que o mesmo seja preenchido de forma a descrever todo o projecto (objectivos, justificação científica, plano da investigação, etc.)			
2. NÃO deverá DEIXAR CAMPOS EM BRANCO . Em caso de algum dos itens não se aplicar, colocar o texto " <i>Não se aplica</i> ".			
3. Todas as comunicações serão efectuadas via e-mail.			
1. IDENTIFICAÇÃO DO(A) ALUNO(A)/INVESTIGADOR(A) PRINCIPAL			
Nome (completo):	Ana Sofia Fernandes Pais		
Morada:	Rua dos Loureiros nº 29, 2º Dto		
C. Postal:	3045 - 084	Localidade:	Coimbra
Telemóvel:	913829190	Endereço de e-mail:	asfpais@uc.pt
1.1. IDENTIFICAÇÃO DO(S) CO-INVESTIGADOR(ES) (se aplicável)			
Nome (completo):	Ana Teresa Moreira de Almeida Santos		
Telemóvel:	962986544	Endereço de e-mail:	atsantos@fmed.uc.pt
Nome (completo):	Maria Filomena Rabaça Roque Botelho		
Telemóvel:	962680808	Endereço de e-mail:	mfbotelho@fmed.uc.pt
Nome (completo):			
Telemóvel:		Endereço de e-mail:	
Nome (completo):			
Telemóvel:		Endereço de e-mail:	
Nome (completo):			
Telemóvel:		Endereço de e-mail:	
2. IDENTIFICAÇÃO DO PROJECTO			
Modalidade do projecto:	Tese de Doutoramento - Estudo experimental		
Título do projecto:	Preservação do Potencial Reprodutivo na Doente Oncológica: Estimulação da Angiogénese do Enxerto de Tecido Ovárico Criopreservado		
Serviço(s) onde o projecto será executado:			
Serviço de Reprodução Humana - Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra Instituto de Biofísica - IBILI - Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra			
Existem outros centros, nacionais ou não, onde a mesma investigação será feita? <input type="text" value="não"/>			
Em caso afirmativo indique-os:			
<input type="text"/>			
Mod.CE_01/10 - FormulárioCE_V.10.14		CE-FMUC	
		1/5	



Descreva sucintamente os objectivos da investigação:

Várias hipóteses são colocadas para preservar a fertilidade e proporcionar às mulheres portadoras de uma doença oncológica a possibilidade de terem filhos, incluindo a criopreservação de oócitos, embriões e tecido ovário (Suzuki et al. 2014). A criopreservação de tecido ovário, antes da terapêutica oncológica e o seu ulterior transplante, tem-se revelado uma técnica promissora para estas doentes já que após o transplante do tecido ovário é possível repor a função endócrina e a fertilidade, possibilitando a conceção natural (Silva et al. 2015, Matos et al. 2012, Ronn et al. 2014). Uma das limitações desta técnica é a perda de mais de 50% dos folículos primordiais, que ocorre predominantemente nos primeiros 5 dias após o transplante, devido à isquémia que se verifica até ser estabelecida a revascularização do enxerto (Wang et al. 2013). O objetivo deste trabalho é estudar estratégias para promover a angiogénese precoce do enxerto de tecido ovário humano após criopreservação, diminuindo a perda de folículos e otimizando assim a função e duração do enxerto. A nossa hipótese baseia-se na possibilidade de estimular a angiogénese, reduzindo o tempo de isquémia, com consequente melhoria da sobrevivência dos folículos ovários e da função endócrina. Pretendemos avaliar a ação de fatores angiogénicos, VEGF, bFGF, hMG e simvastatina, em diferentes associações, bem como em diferentes fases do processo de criopreservação e posterior transplante.

3. OUTROS DADOS SOBRE O PROJECTO

A Investigação proposta envolve Exames Complementares

Em caso afirmativo, por favor, indique:

Tipo: _____
Frequência: _____
Natureza da amostra: _____

(NOTA: Especifique se estes exames são feitos especialmente para esta investigação ou se serão executados no âmbito dos cuidados médicos habituais a prestar aos doentes).

A Investigação proposta envolve Questionários?

Em caso afirmativo, por favor, indique:

A quem são feitos? _____
Como será mantida a confidencialidade? _____

(NOTA: **Junte 1 exemplar** do questionário que será utilizado).

4. ENSAIOS CLÍNICOS DE NOVOS FÁRMACOS

Tipo de ensaio:

Tipo de Fármaco:

Nome(s) Genérico(s): _____
Grupo farmacológico ou terapêutico: _____
Aprovação noutros países: _____
Aprovação pelo INFARMED: _____
Fármaco:
Forma Medicamentosa:
Indicação terapêutica contemplada na investigação:
Posologia contemplada na investigação:
Via de administração contemplada na investigação:
Tipo de Ensaio:
Comparação com placebo:
Comparação com fármaco padrão:
Ensaio com dupla ocultação randomizado:
Ensaio aberto:
Outro tipo (especifique) _____

(NOTA: 1 - No caso de medicamentos já aprovados oficialmente junte a bula oficial do produto comercializado.

2 - No caso de medicamentos ainda não aprovados, junte documento do fabricante, certificando a segurança do produto no qual conste a posologia e vias de administração recomendadas, bem como as indicações terapêuticas.)

5. JUSTIFICAÇÃO CIENTÍFICA DA INVESTIGAÇÃO

(descreva sucintamente os fundamentos científicos da investigação. Indique, em particular, se a investigação já foi feita anteriormente com seres humanos, se o problema foi devidamente estudado a nível experimental de modo a otimizar os aspectos analíticos e técnicos e a avaliar os possíveis efeitos adversos).



A angiogénese pode ser estimulada através da utilização de fatores angiogénicos, designadamente o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF). Estudos recentes mostram que o tratamento do tecido ovárico humano com bFGF em associação com VEGF melhora a sobrevivência dos folículos primordiais e a angiogénese e diminui a apoptose dos folículos e das células do estroma, face ao tratamento com cada fator isoladamente (Kang et al. 2015, Wang et al. 2013). A exposição in vitro à menopina (hMG) em tecido ovárico de murganho, seguida do autotransplante a fresco, mostrou melhorar a angiogénese e o tempo de reperfusão vascular, reduzindo-o para 24 horas e deste modo melhorar a sobrevivência dos folículos (Wang et al. 2012). Cohen et al. demonstraram recentemente que, após o alotransplante de tecido ovárico de murganho, a intervenção farmacológica com a administração diária de sinvastatina ativa a Akt1 e promove a angiogénese no período hipóxico pós-transplante (Cohen et al. 2015). Contudo, a maioria dos estudos são realizados após transplante de tecido ovárico fresco e com tecido de roedores.

6. DOENTES ABRANGIDOS NA INVESTIGAÇÃO

Número: As mulheres grávidas são excluídas?

Indique como se processará o recrutamento dos doentes:

O estudo abrange todas as doentes que se dirijam ao Serviço de Reprodução Humana do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra no âmbito da preservação da fertilidade através da criopreservação de tecido ovárico.

7. CONTROLOS

Número:

Indique, por favor, como serão escolhidos:

NÃO APLICÁVEL AO ESTUDO EM CAUSA.

8. DESCRIÇÃO RESUMIDA DO PLANO DA INVESTIGAÇÃO

Numa fase inicial do projecto serão testados os diversos fatores pró-angiogénicos em tecido ovárico de rato. Posteriormente como prova de conceito será utilizado o tecido humano. Nesta fase e após consentimento informado, utilizar-se-á menos de 10% do tecido ovárico de doentes oncológicas que realizaram criopreservação de tecido ovárico no Serviço de Medicina da Reprodução do CHUC para preservação da fertilidade. Este tecido será mantido em cultura sem qualquer fator e com o fator ou a associação mais eficaz. Posteriormente, proceder-se-á à análise do tecido, nomeadamente avaliação da angiogénese, viabilidade e morte celular, através da histologia, imunohistoquímica e técnicas de biologia molecular. Após um período de cerca de 2 a 4 horas de cultura, 2 fragmentos serão xenotransplantados em ratos imunodeprimidos, para a avaliação in vivo da angiogénese e função endócrina.

9. ENUMERAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS, EXAMES OU SUBSTÂNCIAS QUE IRÃO SER ADMINISTRADAS AOS DOENTES (dietas especiais, medicamentos, radioisótopos, contrastes radiológicos, etc.)

Não aplicável ao estudo em causa.

10. RISCO/BENEFÍCIO

Que riscos ou incómodos podem ser causados aos doentes pelo estudo?

Nenhuns.

Que benefícios imediatos poderão advir para os doentes pela sua anuência em participar no estudo?

Nenhuns.

Considera que os meios utilizados no estudo podem violar a privacidade do doente?

Em caso afirmativo, por favor, indique as medidas que serão tomadas para assegurar a confidencialidade:



Os doentes que não aceitarem participar no estudo ficarão, por esse facto, prejudicados em termos de assistência médica, relativamente aos participantes:

Não

11. CONSENTIMENTO

A expressão do consentimento informado terá forma escrita, conforme a Lei.

(Nota: Deverá juntar um exemplar do Texto de Consentimento Informado a assinar pelo doente/voluntário ou representante legal. No Secretariado da Comissão de Ética da FMUC encontra-se disponível um texto de consentimento informado padrão, validado pela Comissão, que será disponibilizado aos interessados, quando requerido.)

Descreva resumidamente o conteúdo da informação a transmitir ao doente:

A informação transmitida ao doente é que o primeiro objectivo da criopreservação é preservar a fertilidade da doente, sendo lhe dada a opção de consentir a utilização de 20% do tecido ovárico para investigação científica.

A investigação ou estudo envolve:

Menores de 14 anos: Não

Inimputáveis: Não

Em caso afirmativo, por favor, indique as medidas que serão tomadas para respeitar os seus direitos e obter o seu consentimento esclarecido ou dos seus representantes legais:

12. RELATIVAMENTE AO ESTUDO

Data prevista de início: 1/9/2016

Data prevista de conclusão: 1/9/2020

Pagamento aos doentes:

Pelas deslocações: Não se aplica

Pelas faltas ao serviço: Não se aplica

Por danos resultantes da sua participação no estudo: Não se aplica

Em caso afirmativo, por favor, especifique a entidade que assume a responsabilidade das indemnizações:

Outro tipo de pagamentos (especifique):

Do estudo, resulta alguma espécie de benefício financeiro ou outro para o investigador e/ou instituição?

Não

Em caso afirmativo, por favor, especifique:

Os dados obtidos constituirão propriedade exclusiva de companhia farmacêutica ou outra entidade?

Não se aplica

Em caso afirmativo, por favor, especifique a entidade:

Qual a forma de atribuição dos eventuais direitos de propriedade intelectual constituídos ou reconhecidos?

Patentes:

Certificados complementares de protecção para medicamentos de uso humano:

Pertencentes em exclusivo ao Investigador:

Pertencentes em exclusivo à Universidade ou a outra entidade:

Pertencentes em regime de contitularidade ao Investigador, Universidade ou a outra entidade:

Não se aplica:



13. TERMO DE RESPONSABILIDADE

Eu, abaixo assinado(a), declaro por minha honra, na qualidade de investigador(a) principal, que as informações prestadas neste questionário são verdadeiras. Mais declaro que durante o estudo serão respeitadas todas as disposições legais em vigor e as recomendações constantes da Declaração de Helsínquia (1964 e subsequentes revisões) e da Organização Mundial de Saúde.
Data do pedido de aprovação: 09/09/2016

(assinatura)

14. PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA

Reunião de ___/___/___ A Comissão, _____

- Consentimento Informado

SERVIÇO DE MEDICINA DA REPRODUÇÃO



**FORMULÁRIO DE INFORMAÇÃO E
CONSENTIMENTO INFORMADO**

TÍTULO DO PROJECTO DE INVESTIGAÇÃO: Preservação do Potencial Reprodutivo na Doente Oncológica: Estimulação da Angiogénese do Enxerto de Tecido Ovárico Criopreservado

PROTOCOLO N°

PROMOTOR (Entidade ou pessoa(s) que propõe o estudo) Ana Sofia Fernandes Pais

INVESTIGADOR Professora Doutora Ana Teresa Moreira de Almeida Santos

COORDENADOR Professora Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho

CENTRO DE ESTUDO

Investigador principal Professora Doutora Ana Teresa Moreira de Almeida Santos

Morada Serviço de Medicina da Reprodução – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, E.P.E.

Edifício de São Jerónimo, Piso 2, Praceta Professor Mota Pinto,
3000- 456 - Coimbra

Contacto telefónico 239400698

NOME DO DOENTE

(Letra de imprensa) _____

Contacto:

Secretariado da Direção: 239 400698

E-mail: dircservicoreproducao@huc.min-saude.pt



Pág.1

Hospitais da Universidade de Coimbra Praceta Prof. Mota Pinto, 3000-075 Coimbra - Portugal • Telefone: +351 239 400 400

É convidada a participar voluntariamente neste estudo porque, e embora o primeiro objetivo da criopreservação seja preservar a fertilidade da doente, é-lhe dada a opção de consentir com a utilização de uma pequena parte (cerca de 10%) do tecido ovárico para investigação científica.

Este procedimento é chamado consentimento informado e descreve a finalidade do estudo, os procedimentos, os possíveis benefícios e riscos. A sua participação poderá contribuir para melhorar o conhecimento sobre a criopreservação de tecido ovárico e ulterior transplante com o intuito de preservar a fertilidade feminina.

Receberá uma cópia deste Consentimento Informado para rever e solicitar aconselhamento de familiares e amigos. O Investigador ou outro membro da sua equipa irá esclarecer qualquer dúvida que tenha sobre o termo de consentimento e também alguma palavra ou informação que possa não entender.

Depois de compreender o estudo e de não ter qualquer dúvida acerca do mesmo, deverá tomar a decisão de participar ou não. Caso queira participar, ser-lhe-á solicitado que assine e date este formulário. Após a sua assinatura e a do Investigador, ser-lhe-á entregue uma cópia. Caso não queira participar, não haverá qualquer penalização nos cuidados que irá receber.

1. INFORMAÇÃO GERAL E OBJECTIVOS DO ESTUDO

Este estudo irá decorrer no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC) em colaboração com o Instituto de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC) e o serviço de Anatomia Patológica do CHUC, com o objetivo de promover a angiogénese do enxerto de tecido ovárico, de modo a diminuir a perda folicular e aumentar a longevidade do transplante.

Trata-se de um estudo histológico e molecular de uma pequena parte do tecido ovárico recolhido para criopreservação (cerca de 10%), após cultura do mesmo com ou sem fatores

pró-angiogénicos, pelo que não será feita nenhuma alteração na sua medicação ou tratamentos habituais.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC) de modo a garantir a proteção dos direitos, segurança e bem-estar de todos os doentes ou outros participantes incluídos e garantir prova pública dessa proteção.

Como participante neste estudo beneficiará da vigilância e apoio do seu médico, garantindo assim a sua segurança.

Este estudo tem por objetivos avaliar a angiogénese, a histologia e a qualidade do tecido, bem como o desenvolvimento folicular.

Serão incluídos 10 doentes e nenhum participante saudável.

2. PROCEDIMENTOS E CONDUÇÃO DO ESTUDO

2.1. Procedimentos

Para a participação no estudo não é necessário realizar nenhum procedimento, além do necessário para a criopreservação do tecido ovárico, com o intuito de preservação da fertilidade.

2.2. Calendário das visitas/ Duração (exemplo)

Este estudo não exige visitas médicas, além das incluídas na avaliação no Serviço de Reprodução Humana do CHUC, para criopreservação do tecido ovárico, com o intuito de preservação da fertilidade.

Contacto:

Secretariado da Direção: 239 400698

E-mail: direvicio reproducao@huc.min-saude.pt

2.3. Tratamento de dados/ Randomização

As amostras serão tratadas de forma aleatória de acordo com o consentimento das dadoras de tecido ovárico, assegurando o anonimato e confidencialidade de todo o processo.

3. RISCOS E POTENCIAIS INCONVENIENTES PARA O DOENTE

Não há riscos, nem inconvenientes para o doente.

4. POTENCIAIS BENEFÍCIOS

A análise do tecido ovárico humano tem sido requerida para avaliar o desenvolvimento folicular, a histologia e função ovárica, após criopreservação e cultura do tecido com ou sem fatores pró-angiogénicos, assumindo-se como uma importante ferramenta de otimização do autotransplante de tecido ovárico criopreservado.

Um melhor conhecimento destes processos poderá permitir melhorar os cuidados clínicos a prestar às doentes com situações idênticas à sua.

5. NOVAS INFORMAÇÕES

Ser-lhe-á dado conhecimento de qualquer nova informação que possa ser relevante para a sua condição ou que possa influenciar a sua vontade de continuar a participar no estudo.

6. TRATAMENTOS ALTERNATIVOS

Não existirão tratamentos alternativos.

Contacto:

Secretariado da Direção: 239 400698

E-mail: dirservicoreproducao@huc.min-saude.pt

7. SEGURANÇA

Devido à sua participação não virá a sofrer problemas de saúde ou alguma lesão física como resultado de quaisquer procedimentos do estudo.

8. PARTICIPAÇÃO/ ABANDONO VOLUNTÁRIO

É inteiramente livre de aceitar ou recusar participar neste estudo. Pode retirar o seu consentimento em qualquer altura sem qualquer consequência para si, sem precisar de explicar as razões, sem qualquer penalidade ou perda de benefícios e sem comprometer a sua relação com o Investigador que lhe propõe a participação neste estudo. Ser-lhe-á pedido para informar o Investigador se decidir retirar o seu consentimento.

9. CONFIDENCIALIDADE

Assegura-se que será mantida a confidencialidade e o anonimato durante todo o processo, seguindo assim as leis e regulamentos estipulados. Salienta-se que mesmo que os resultados deste estudo sejam publicados as condições acima referidas serão mantidas.

Ao assinar este Consentimento Informado autoriza este acesso condicionado e restrito.

Pode ainda em qualquer altura exercer o seu direito de acesso à informação. Pode ter também acesso à sua informação médica diretamente ou através do seu médico neste estudo. Tem também o direito de se opor à transmissão de dados que sejam cobertos pela confidencialidade profissional.

Os registos médicos que o identificarem e o formulário de consentimento informado que assinar serão verificados para fins do estudo pelo promotor e/ou por representantes do promotor, e para fins regulamentares pelo promotor e/ou pelos representantes do promotor e agências reguladoras noutros países. A Comissão de Ética responsável pelo estudo pode solicitar o acesso aos seus

Contacto:

Secretariado da Direção: 239 400698

E-mail: direvcoreproducao@huc.min-saude.pt

registos médicos para se assegurar que o estudo está a ser realizado de acordo com o protocolo. Não pode ser garantida confidencialidade absoluta devido à necessidade de passar a informação a essas partes.

Confidencialidade e tratamento de dados pessoais

Os dados pessoais dos participantes no estudo não serão utilizados para condução do estudo, designadamente para fins de investigação científica.

Ao dar o seu consentimento, a informação a si respeitante, designadamente a informação clínica, será utilizada da seguinte forma:

1. O promotor, os investigadores e as outras pessoas envolvidas no estudo recolherão e utilizarão os seus dados pessoais para as finalidades acima descritas.
2. Os dados do estudo, associados às suas iniciais ou a outro código que não a identifica diretamente (e não ao seu nome) serão comunicados pelos investigadores e outras pessoas envolvidas no estudo ao promotor do estudo, que os utilizará para as finalidades acima descritas.
3. Os dados do estudo, associados às suas iniciais ou a outro código que não permita identificá-la diretamente, poderão ser comunicados a autoridades de saúde nacionais e internacionais.
4. A sua identidade não será revelada em quaisquer relatórios ou publicações resultantes deste estudo.
5. Todas as pessoas ou entidades com acesso aos seus dados pessoais estão sujeitas a sigilo profissional.
7. Nos termos da lei, tem o direito de, através de um dos médicos envolvidos no estudo/estudo, solicitar o acesso aos dados que lhe digam respeito, bem como de solicitar a retificação dos seus dados de identificação.
8. Tem ainda o direito de retirar este consentimento em qualquer altura através da notificação ao investigador, o que implicará que deixe de participar no estudo. No

Contacto:

Secretariado da Direção: 239 400698

E-mail: direvcoreproducao@huc.min-saude.pt

entanto, os dados recolhidos ou criados como parte do estudo até essa altura que não a identifiquem poderão continuar a ser utilizados para o propósito de estudo, nomeadamente para manter a integridade científica do estudo.

9. Se não der o seu consentimento, assinando este documento, não poderá participar neste estudo. Se o consentimento agora prestado não for retirado e até que o faça, este será válido e manter-se-á em vigor.

10. COMPENSAÇÃO

Não existem compensações associadas a este estudo.

11. CONTACTOS

Se tiver perguntas relativas aos seus direitos como participante deste estudo, deve contactar:

Presidente da Comissão de Ética da FMUC,
Azinhaga de Santa Comba, Celas – 3000-548 Coimbra
Telefone: 239 857 707
e-mail: comissaoetica@fmed.uc.pt

Se tiver questões sobre este estudo deve contactar:

Professora Doutora Ana Teresa Moreira Almeida Santos, atsantos@fmed.uc.pt, 239 400 698
Professora Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho, mfbotelho@fmed.uc.pt,
962680808
Ana Sofia Fernandes Pais, asfpais@uc.pt, 913829190

Contacto:

Secretariado da Direção: 239 400698

E-mail: dircservicoreproducao@huc.min-saude.pt

NÃO ASSINE ESTE FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO INFORMADO A MENOS
QUE TENHA TIDO A OPORTUNIDADE DE PERGUNTAR E TER RECEBIDO
RESPOSTAS SATISFATÓRIAS A TODAS AS SUAS PERGUNTAS.

CONSENTIMENTO INFORMADO

De acordo com a Declaração de Helsínquia da Associação Médica Mundial e suas
actualizações:

1. Declaro ter lido este formulário e aceito de forma voluntária participar neste estudo.
2. Fui devidamente informado(a) da natureza, objectivos, riscos, duração provável do estudo, bem como do que é esperado da minha parte.
3. Tive a oportunidade de fazer perguntas sobre o estudo e percebi as respostas e as informações que me foram dadas.
A qualquer momento posso fazer mais perguntas ao médico responsável do estudo. Durante o estudo e sempre que quiser, posso receber informação sobre o seu desenvolvimento. O médico responsável dará toda a informação importante que surja durante o estudo que possa alterar a minha vontade de continuar a participar.
4. Aceito que utilizem a informação relativa à minha história clínica e os meus tratamentos no estrito respeito do segredo médico e anonimato. Os meus dados serão mantidos estritamente confidenciais. Autorizo a consulta dos meus dados apenas por pessoas designadas pelo promotor e por representantes das autoridades reguladoras.
5. Aceito seguir todas as instruções que me forem dadas durante o estudo. Aceito em colaborar com o médico e informá-lo(a) imediatamente das alterações do meu estado de

saúde e bem-estar e de todos os sintomas inesperados e não usuais que ocorram.

6. Autorizo o uso dos resultados do estudo para fins exclusivamente científicos e, em particular, aceito que esses resultados sejam divulgados às autoridades sanitárias competentes.
7. Aceito que os dados gerados durante o estudo sejam informatizados pelo promotor ou outrem por si designado.
Eu posso exercer o meu direito de rectificação e/ ou oposição.
8. Tenho conhecimento que sou livre de desistir do estudo a qualquer momento, sem ter de justificar a minha decisão e sem comprometer a qualidade dos meus cuidados médicos.
Eu tenho conhecimento que o médico tem o direito de decidir sobre a minha saída prematura do estudo e que me informará da causa da mesma.
9. Fui informado que o estudo pode ser interrompido por decisão do investigador, do promotor ou das autoridades reguladoras.

Nome do

Participante _____

Assinatura : _____

Data: ____/____/____

Nome de Testemunha / Representante

Legal: _____

Assinatura: _____

Data: ____/____/____

Contacto:

Secretariado da Direção: 239 400698

E-mail: direvcoreproducao@huc.min-saude.pt

SERVIÇO DE MEDICINA DA REPRODUÇÃO



Confirmando que expliquei ao participante acima mencionado a natureza, os objectivos e os potenciais riscos do Estudo acima mencionado.

Nome do

Investigador: _____

Assinatura: _____

Data: ____ / ____ / ____

Contacto:

Secretariado da Direção: 239 400698

E-mail: direvicio reproducao@huc.min-saude.pt



Pág.10

Hospitais da Universidade de Coimbra Praca Prof. Mota Pinto, 3000-075 Coimbra - Portugal • Telefone: +351 239 400 400

- Parecer da Comissão de Ética



FMUC FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

COMISSÃO DE ÉTICA DA FMUC

Of. Ref^o **143-CE-2016**
Data 19/12/2016

C/conhecimento ao aluno

Exmo Senhor
Presidente do Conselho Científico da FMUC

Assunto: Projecto de Investigação no âmbito do Programa de Doutoramento em Ciências da Saúde (ref^o CE-143/2016)

Candidato(a): Ana Sofia Fernandes Pais

Título do Projecto: "Preservação do potencial reprodutivo na doente oncológica: estimulação da angiogénese do enxerto de tecido ovário criopreservado".

A Comissão de Ética da Faculdade de Medicina, após análise do projecto de investigação supra identificado, decidiu emitir o parecer que a seguir se transcreve:

"Parecer favorável, limitado à componente do Projecto que não envolve experimentação animal".

Queira aceitar os meus melhores cumprimentos,


O Presidente,


Prof. Doutor João Manuel Pedroso de Lima

HC

SERVIÇOS TÉCNICOS DE APOIO À GESTÃO - STAG - COMISSÃO DE ÉTICA
Pólo das Ciências da Saúde • Unidade Central
Azinhaga de Santa Comba, Celos, 3000-354 COIMBRA • PORTUGAL
Tels: +351 239 657 707 (Ext. 542707) | Fax: +351 239 823 236
E-mail: comissaoetica@fmed.ucp | www.fmed.ucp

