

# ESTIMULAÇÃO *IN VITRO* DA ANGIOGÉNESE DE TECIDO OVÁRICO CRIOPRESERVADO

Ana Sofia Pais<sup>1,2\*</sup>, Maria Carolina Reis<sup>3\*</sup>, Mafalda Laranjo<sup>3,4</sup>, Sandra Reis<sup>3</sup>, Joana Jorge<sup>3,5</sup>, Ana Cristina Gonçalves<sup>3,5</sup>, Ana Paula Sousa<sup>1,3</sup>, João Ramalho-Santos<sup>3,6</sup>, Filomena Botelho<sup>3,5</sup>, Teresa Almeida Santos<sup>1,2,3</sup>

1 – Serviço de Medicina da Reprodução, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra; 2 - Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra (FMUC); 3 – CNC Centro de Neurociências e Biologia Celular, Universidade de Coimbra; 4- Instituto de Biofísica e Instituto de Investigação Clínica e Biomédica de Coimbra (iCIBR), área de Meio Ambiente Genética e Oncobiologia (CIMAGO), Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra 5- Laboratório de Oncobiologia e Hematologia, Clínica Universitária de Hematologia e iCIBR, área de Meio Ambiente Genética e Oncobiologia (CIMAGO), FMUC; 5- Departamento Ciências da Vida, Universidade de Coimbra  
\*contribuíram de igual modo para a realização do trabalho

## INTRODUÇÃO

A criopreservação de tecido ovárico, antes da terapêutica oncológica, e seu ulterior transplante, é uma técnica promissora para preservação da fertilidade.

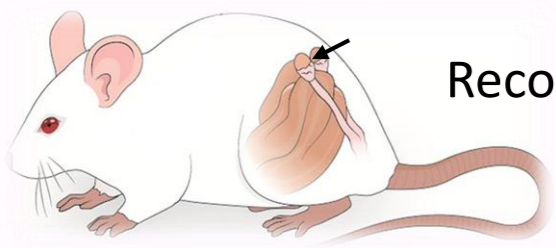
No entanto, uma das suas limitações é a perda de folículos primordiais após o transplante, devido à isquemia que se verifica até ser estabelecida a revascularização do enxerto.

## OBJETIVO

Estudar estratégias para promover a angiogénese precoce do tecido ovárico após criopreservação, otimizando a função e duração do enxerto.

Para tal foi avaliado o tratamento *in vitro* do tecido ovárico com fatores angiogénicos, como VEGF (fator de crescimento vascular endotelial), bFGF (fator de crescimento fibroblástico básico) e gonadotropina menopáusic humana (hMG).

## MATERIAL E MÉTODOS



Recolha de ovários de rato fêmea (Rowet nude)

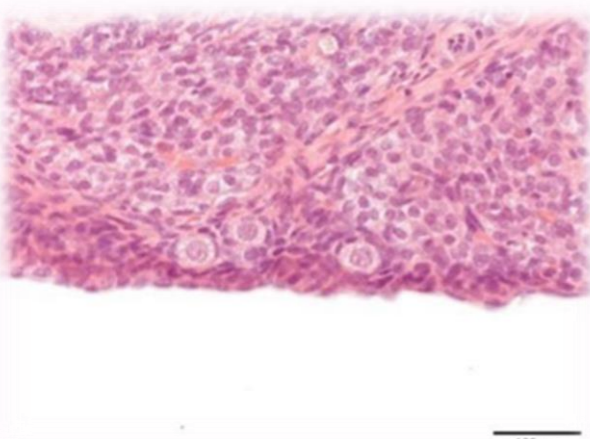
Distribuição pelos grupos:

- 1 Tecido ovárico fresco (TOF 0h)
- 2 Tecido ovárico pós-criopreservação lenta (TOPC 0h)
- 3 TOPC tratado *in vitro* durante 4h com VEGF e bFGF (TOPC 4h,VEGF+bFGF)
- 4 TOPC tratado *in vitro* durante 4h com hMG (TOPC 4h, hMG)
- 5 TOPC tratado *in vitro* durante 4h com todos os fatores (TOPC 4h,VEGF+bFGF+hMG)

Avaliação do efeito do tratamento

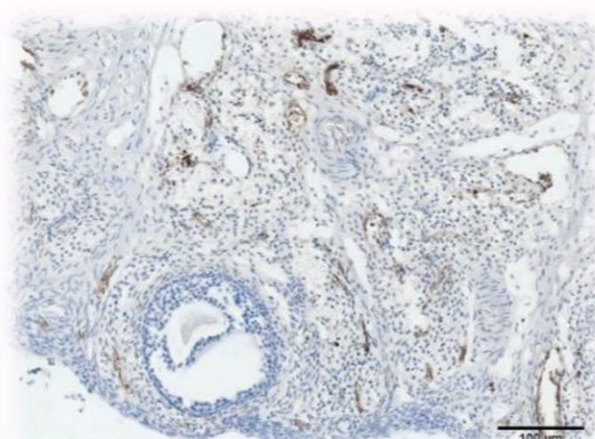
### HISTOLOGIA

Morfologia do tecido  
Contagem folicular



### IMUNOHISTOQUÍMICA

Proliferação (Ki-67), Apoptose (AC-3),  
Densidade vascular (Fator VIII)



### MICROARRAYS DE DNA

Perfil de expressão génica do tecido

### ELISA

Expressão proteica no sobrenadante do meio de cultura

## RESULTADOS E CONCLUSÕES

✓ A **criopreservação** não afetou nenhum dos parâmetros em estudo, validando os procedimentos utilizados atualmente na clínica.

Nos grupos com **tratamento**, a maioria dos folículos era viável, com marcação positiva para o Ki-67 (Fig 1) e a apoptose do tecido foi residual (Fig 2).

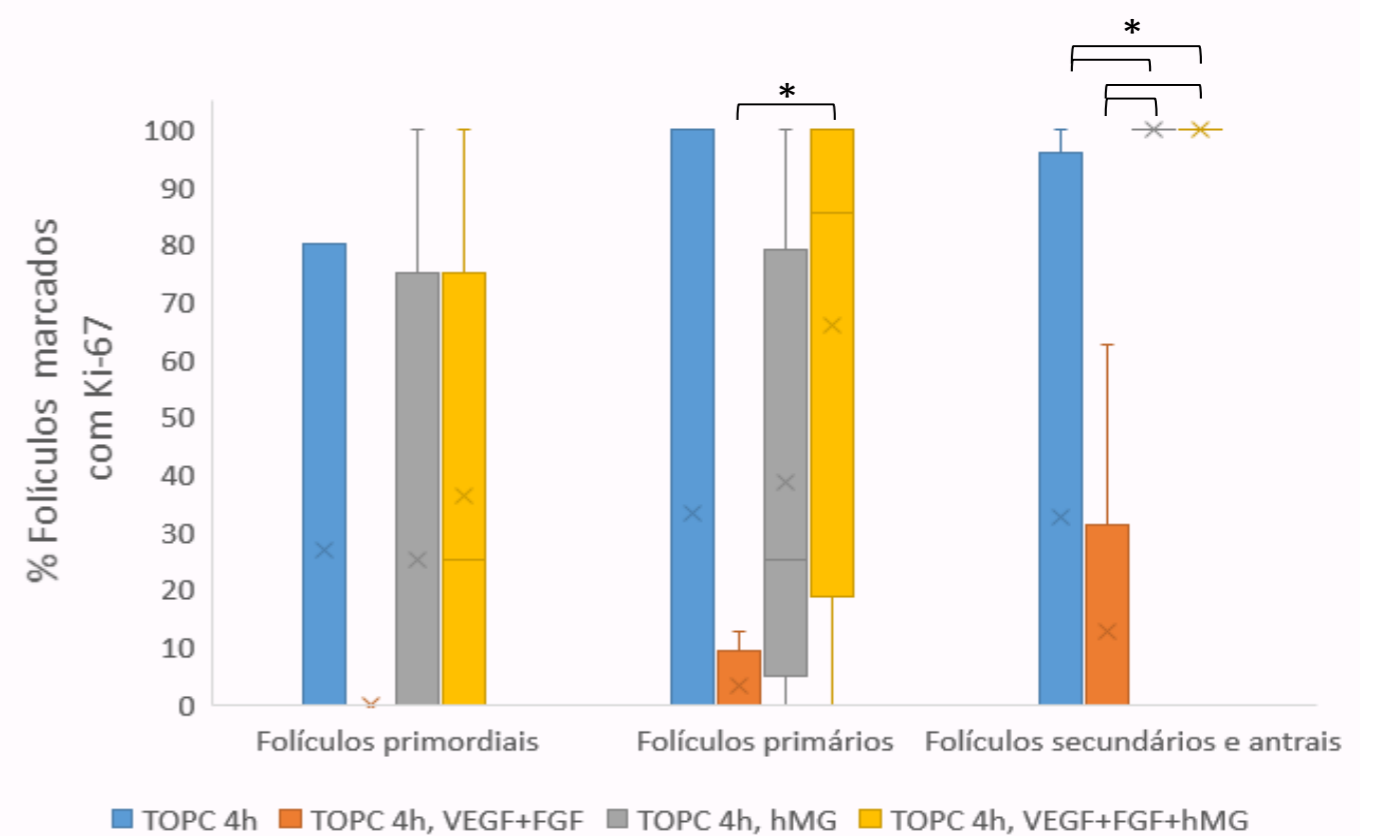


Fig 1. Percentagem de marcação de cada classe folicular com Ki-67.

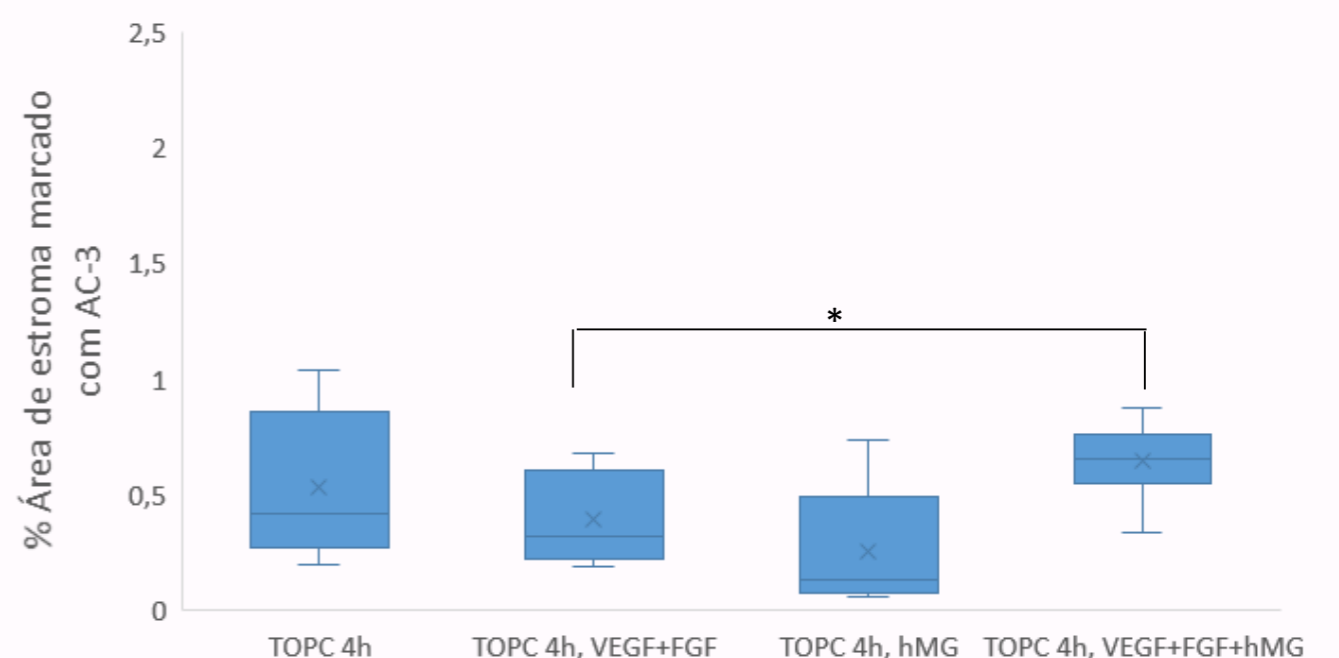


Fig 2. Percentagem de área de estroma marcado com AC-3.

O **tratamento com todos os fatores** (TOPC 4h,VEGF+bFGF+hMG) evidenciou maior proliferação nos folículos (Fig 1) e estroma (Fig 3) sugerindo que será neste grupo que o estroma terá maior competência para suportar o desenvolvimento folicular.

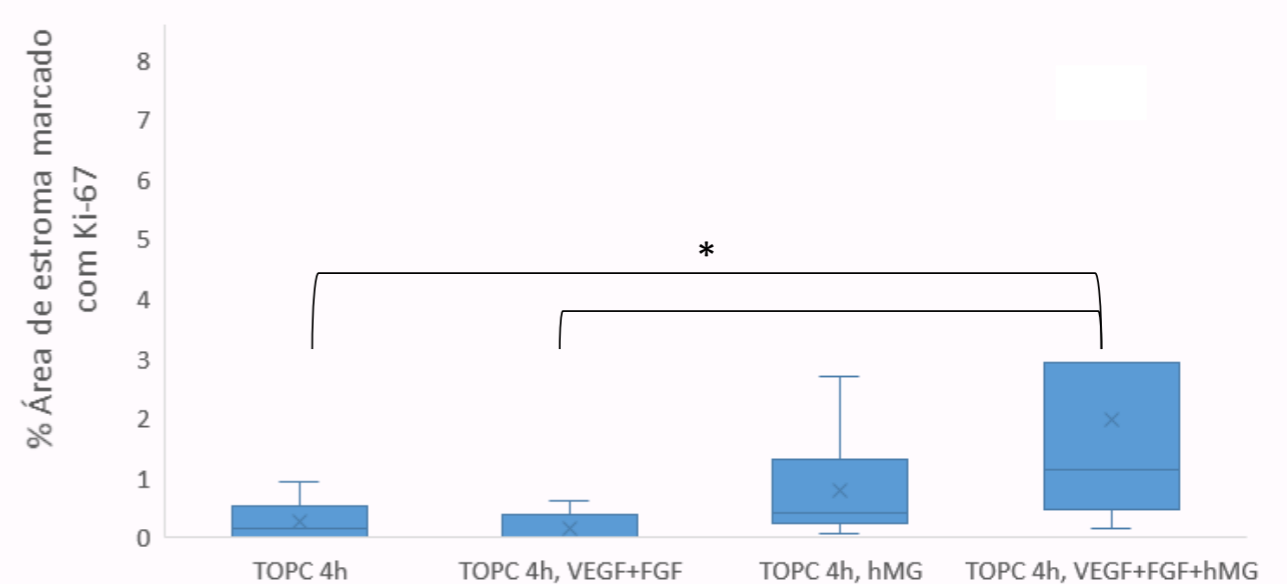


Fig 3. Percentagem de área de estroma marcado com Ki-67.

Não se verificaram alterações na densidade vascular, no entanto, identificaram-se alguns **marcadores moleculares**:

Tratamento com VEGF+bFGF

↑ expressão gene *col18a1*  
↓ expressão gene *figf*  
↑ proteína ang-2

Tratamento com hMG

↑ expressão genes *fgfr3* e *egf*

Tratamento com VEGF+bFGF+hMG

↑ expressão gene *egf*



A suplementação em cultura com fatores angiogénicos **permite iniciar o processo de angiogénese** sem afetar a viabilidade do tecido, o que poderá permitir melhorar a função e duração do transplante de tecido ovárico.