Alexandre Likier Steinberg Lobel

Efeitos da inibição da via PI3K/PTEN/Akt no recrutamento
folicular após transplante de enxerto ovariano
criopreservado

São Paulo
2019

Alexandre Likier Steinberg Lobel

Efeitos da inibição da via PI3K/PTEN/Akt no recrutamento
folicular após transplante de enxerto ovariano
criopreservado

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção de
título de doutor em Ciências

Programa de Pós-Graduação em Obstetrícia e
Ginecologia

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Serafini

Co-orientador: Prof. Dr. Edmund Chada Baracat

São Paulo
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Lobel, Alexandre Likier Steinberg

Efeitos da inibição da via PI3K/PTEN/Akt no
recrutamento folicular após transplante de enxerto
ovariano criopreservado / Alexandre Likier
Steinberg Lobel. -- São Paulo, 2019.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientador: Paulo Cesar Serafini.

Coorientador: Edmund Chada Baracat.

Descritores: 1.Preservação da fertilidade
2.Transplante de tecidos 3.Reserva ovariana
4.Neoplasias 5.Isquemia 6.PTEN fosfo-hidrolase

USP/FM/DBD-432/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

A todas as pacientes, que nos momentos de fragilidade depositam sua confiança em nossas mãos, em nossa sabedoria. Num salto de fé, esperam que façamos o nosso melhor. Que este trabalho possa ser uma contribuição para o caminho tão árduo que elas enfrentam.

À minha família, minha mãe, meu pai, minhas irmãs, avós e sogros, sem vocês não chegaria até aqui.

Dedico à Renata, minha esposa, que me faz ser uma pessoa melhor todos os dias de nossas vidas. Seu apoio e compreensão foram fundamentais para a realização desse sonho.

Agradecimentos

Agradeço aos professores Edmund Chada Baracat, Paulo Cesar Serafini e Dr. Pedro Monteleone por acreditarem e apostarem nos meus sonhos e me apoiarem durante toda esta jornada. Ao Prof. José Maria Soares Junior, na orientação e incentivo para a elaboração desta tese.

Agradeço aos Drs. Eduardo Zlotnik, Pablo Roberto Novik e Carlos Izzo e Prof. Sergio Podgaec por todas as oportunidades que me ofereceram em minha carreira profissional e me incentivaram a obter esta titulação.

Por fim, ao casal Mara e Charles Ghelfond, sem seu apoio esta tese seria apenas uma ideia no papel. Meus sinceros e emocionados agradecimentos.

Sumário	
Resumo	I
Abstract	III
Lista de Abreviaturas	V
Lista de Tabelas	VI
Lista de Figuras	VII
Introdução	1
Objetivos	15
Métodos	16
Resultados	34
Discussão	55
Conclusões	66
Referências bibliográficas	68
Anexos	81

Resumo

Lobel, ALS. *Efeitos da inibição da via PI3K/PTEN/Akt no recrutamento folicular após transplante de enxerto ovariano criopreservado*. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo; 2019.

Introdução: A sinalização PI3K/PTEN/Akt é associada à ativação prematura e depleção da coorte folicular após quimioterapia e na isquemia após o transplante de tecido ovariano criopreservado. Este estudo tem como objetivo avaliar a ativação e a inibição da via PI3K/PTEN/Akt após o transplante de enxerto ovariano criopreservado, empregando a substância AS101, que reduziria a taxa de recrutamento folicular, e poderia diminuir o dano tecidual. **Métodos:** Estudo experimental com enxerto ovariano bovino em camundongas imunossuprimidas, dividido em cinco etapas: 1) análise da via PI3k/PTEN/Akt na ativação de folicular em tecido fresco, utilizando imunofluorescência; 2) comparação da atividade da via PI3K/PTEN/Akt entre tecido ovariano fresco não transplantado e tecido ovariano congelado, descongelado e transplantado, com retirada após cinco dias pela técnica de *Western Blot*; 3) incubação de tecido descongelado em duas horas com e sem AS101 e comparação por *Western Blot*; 4) comparação de tecidos fresco e descongelado, com e sem AS101, recuperados em dois e cinco dias após o transplante, por *Western Blot* e imunofluorescência; 5) avaliar a quantidade e os tipos de folículos no tecido ovariano descongelado, com e sem tratamento com AS101, em amostras recuperadas após 14 dias do transplante, por histomorfometria. Para tais experimentos foi utilizado tecido ovariano bovino obtido de animais pré-púberes (14 dias de vida), isolado e criopreservado por congelamento lento; tecido descongelado avaliado *in vitro* e *in vivo*, com e sem exposição ao AS101, em cultivo tecidual por duas horas antes do transplante. Os enxertos foram

transplantados para os músculos glúteos de camundongas imunodeprimidas ooforectomizadas; a ativação da sinalização de Akt foi medida no tecido antes do transplante e em vários intervalos após o transplante. Após o procedimento, efetuou-se a contagem de folículos primordiais e em crescimento, bem como o cálculo da taxa de recrutamento folicular. As variáveis quantitativas foram estatisticamente analisadas com uso de testes de *Mann-Whitney* ou teste *t-Student* dados. A existência de associação das características qualitativas entre os grupos foi analisada com os testes de qui-quadrado ou exato de Fisher. O nível de significância foi fixado com alfa de 5%. **Resultados:** Os folículos primordiais, em estágio de quiescência apresentam baixa ativação da via PI3K/PTEN/Akt enquanto os folículos em crescimento, tinham maior taxa de atividade. Houve hiperatividade da via PI3K/PTEN/Akt, após o congelamento e o descongelamento do enxerto. A ministração de AS101 durante o cultivo *in vitro* reduziu o grau de ativação de PI3K/PTEN/Akt pelas técnicas de *Western blot* e imunofluorescência antes e após o transplante. Concomitantemente, houve aumento da reserva folicular após duas semanas do transplante e queda da taxa de recrutamento folicular. **Conclusões:** Nossos achados sugerem que o AS101 foi eficaz em preservar a reserva folicular, pelo recrutamento de folículos primordiais e inibição da via PI3K/PTEN/Akt. Contudo, há a necessidade de mais estudos clínicos para comprovar sua eficácia no tecido ovariano de mulheres.

Descritores: preservação de fertilidade; transplante de tecido ovariano; Sinalização PI3K/PTEN/Akt; reserva folicular; ativação folicular; AS101

Abstract

Lobel ALS. *Effects of PI3K/PTEN/Akt inhibition on follicular recruitment after cryopreserved ovarian graft transplantation* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo”; 2019.

Introduction: PI3K/PTEN/Akt signaling has been associated with premature activation and follicular cohort depletion in the context of chemotherapy and ischemia after cryopreserved ovarian tissue transplantation. This study aims to demonstrate that the PI3K/PTEN/Akt pathway is activated after retransplantation and that its inhibition, using substance AS101, may reduce the follicular recruitment rate. **Methods:** The study was divided into five experiments: Experiment 1 - Analysis of PI3K/PTEN/Akt pathway in follicular activation in fresh tissue, using immunofluorescence; Experiment 2 - Comparison of PI3K/PTEN/Akt pathway activity between fresh untransplanted ovarian tissue and frozen, thawed and transplanted ovarian tissue with removal after five days, using Western Blot; Experiment 3 - Two hour thawed tissue incubation with and without AS101, using Western blot comparison; Experiment 4 - Comparison of fresh and thawed tissues, with and without AS101, recovered two and five days after transplantation, using Western blot and immunofluorescence; Experiment 5 - Comparison of the number and type of follicles between thawed ovarian tissue, with and without AS101 treatment, in samples recovered 14 days after transplantation by histomorphometry. For these experiments, bovine ovarian tissue obtained from pre-pubertal animals (14 days old), isolated and slow frozen cryopreserved; thawed tissue evaluated *in vitro* and *in vivo*, with and without exposure to AS101, in tissue culture for two hours before transplantation; the

grafts were transplanted to the gluteal muscles of oophorectomized immunosuppressed mice; Akt signaling activation was measured in tissue before transplantation and at various intervals after transplantation; After transplantation, primordial and growing follicle counts were performed, as well as calculation of follicular recruitment rate. Statistical analyzes were performed for quantitative variables using Mann-Whitney tests or Student t-tests, and the existence of an association of qualitative characteristics between the groups using chi-square or Fisher exact tests was verified. The tests were performed with a significance level of 5%. **Results:** It was initially demonstrated that primordial, quiescent stage follicles have low PI3K/PTEN/Akt pathway activation, while in growing follicles, the pathway is activated. The Akt pathway is overactivated after freezing, thawing and transplantation. Application of AS101 during *in vitro* culture reduced the degree of Akt activation demonstrated by Western blot and immunofluorescence, and increased follicular reserve after two weeks of transplantation, as well as reduced follicular recruitment rate. **Conclusions:** These findings showed that AS101 was capable of increasing follicular cohort as well as reducing activation and recruitment of primordial follicles. To determine relevance to a clinical setting, experiments should be reproduced using human ovarian tissue and long-term grafts should be followed to measure the functional output of the tissue in which Akt is inhibited.

Keywords: fertility preservation; ovarian tissue transplantation; PI3K / PTEN / Akt Signaling; follicular reserve; follicular activation; AS101

Lista de Abreviaturas

Akt	Proteína quinase B
AS 101	Telurato de amônio tricloro-dioxoetileno O,O'
ASCO	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
ASRM	<i>American Society for Reproductive Medicine</i>
DAPI	4 ',6-diamino-2-fenilindol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
HAM	Hormônio Anti-Muleriano
HAS	<i>Human serum albumin</i> (Albumina sérica humana)
IF	Imunofluorescência
OCT	Criostato
pAkt	Proteína quinase B fosforilada
PI3K	Fosfoinosítídeo 3-quinase
PTEN	Fosfatase e tensina homóloga
WB	<i>Western Blot</i>
α-MEM	Alfa minimum essential medium

Lista de Tabelas

Tabela 1	Diluições utilizadas dos anticorpos primários para técnica de imunofluorescência	30
Tabela 2	Diluições utilizadas dos anticorpos primários para quantificação proteica pela técnica de <i>Western Blot</i>	32
Tabela 3	Resultado de <i>Western Blot</i> obtido de comparando D5, utilizando padrão a amostra a fresco	39
Tabela 4	Resultado de <i>Western Blot</i> comparando amostra descongelada após duas horas em AS101	42
Tabela 5	Resultado de <i>Western Blot</i> comparando enxerto tratado com AS101, após dois dias de transplante, utilizando como base o tecido mantido em meio de cultivo	46
Tabela 6	Resultado de <i>Western Blot</i> comparando enxerto tratado com AS101, após cinco dias de transplante, utilizando como base o tecido mantido em meio de cultivo	47

Lista de figuras

Figura 1	Via de sinalização do Akt	10
Figura 2	Via do Akt, com diferentes agentes relacionados à sinalização celular	11
Figura 3	Desenho do experimento I	19
Figura 4	Desenho do experimento II	20
Figura 5	Desenho do experimento III	21
Figura 6	Desenho do experimento IV	22
Figura 7	Desenho do experimento V	23
Figura 8	Imagem após o transplante, de um lado o tecido tratado com AS101, do outro o controle.	28
Figura 9	Fotomicrografia da reação de imunofluorescência em tecido ovariano bovino fresco	36
Figura 10	<i>Western blot</i> de tecido ovariano bovino fresco e descongelado após 5 dias do transplante	40
Figura 11	<i>Western Blot</i> de tecido ovariano bovino descongelado, em cultivo com e sem AS101	43
Figura 12	<i>Western Blot</i> de tecido ovariano bovino descongelado, em cultivo com e sem AS101 após dois dias de transplante	48
Figura 13	<i>Western Blot</i> de tecido ovariano bovino descongelado, em cultivo com e sem AS101 após cinco dias de transplante	49
Figura 14	Fotomicrografia da reação de imunofluorescência para pAkt em enxertos após cinco dias do transplante, com e sem AS101	51

Figura 15 Fotomicrografia da reação de imunofluorescência para pAkt em enxertos após cinco dias do transplante, com captação de intensidade do sinal padronizada

52

1. INTRODUÇÃO

Câncer e Fertilidade

O câncer, em geral, é uma doença que se manifesta mais comumente na população idosa, porém, pode acometer as mulheres mais jovens, inclusive durante o período reprodutivo, dependendo do tipo e órgão. Assim, o tratamento desta neoplasia pode influenciar negativamente com a fertilidade (ALVAREZ et al., 2018), o que leva a busca de alternativas para conservá-la.

Estudos afirmam que, do nascimento até os 49 anos, uma a cada dezenove mulheres é diagnosticada com algum tipo de câncer (American Cancer Society, 2014). Dentre os tipos de câncer mais frequentes nesta população, estão listados os hematológicos, de mama, de sistema nervoso central e genital (SIEGEL et al., 2012). A mortalidade varia de acordo com faixa etária e tipo de tumor. A sobrevida global em cinco anos para crianças de zero a 14 anos é de 83% (SIEGEL et al., 2012; ALVAREZ et al., 2018). No entanto, essa população que sobrevive ao câncer pode ter, como consequência da quimioterapia e/ou radioterapia, danos nos ovários, o que comprometeria o futuro reprodutivo, pois, os tratamentos podem ter feito potencial gonadotóxico com redução da reserva e possível insuficiência ovariana (ALVAREZ et al., 2018).

O desenvolvimento tecnológico proporcionou grandes avanços no tratamento de pacientes com câncer em geral, resultando em melhora nas taxas de sobrevida; entretanto, a infertilidade e a insuficiência ovariana prematura podem ter grande impacto na qualidade de vida dessas mulheres. Para abordar este assunto, a *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) publicou inicialmente em 2006 e após em 2013 diretriz afirmando que as orientações sobre preservação de fertilidade deveriam ser oferecidas para todas as pacientes em

idade reprodutiva com diagnóstico de câncer (LEE et al., 2006; LOREN et al., 2013).

A demanda para o congelamento de óvulos e embriões para preservação da fertilidade cresce em todo o mundo (COBO et al., 2018). A técnica mais clássica para a preservação de gametas é o congelamento lento, porém a taxa de sucesso com vitrificação de óvulos se mostrou superior. Em estudo randomizado, a taxa de gravidez com congelamento lento foi 13% versus 38% com óvulos vitrificados (SMITH et al., 2010). Assim, com a incorporação da vitrificação, a *American Society for Reproductive Medicine* (ASRM) validou o congelamento de óvulos, retirando o rótulo de experimental em 2013 (ASRM, 2013).

Congelamento de óvulos

O congelamento de óvulos é realizado após estímulo ovariano controlado pela injeção de gonadotrofinas e captação oocitária (ASRM, 2013). Para realização do procedimento, a paciente necessita de nove a 14 dias (em média) para conseguir extrair óvulos maduros (LOREN et al., 2013). Não deve ser oferecido para pacientes que não entraram na menarca, para as que necessitam iniciar o tratamento oncológico imediatamente (KIM et al., 2012).

O congelamento de embriões possui dilemas éticos e legais, como a obrigatoriedade de manter o embrião congelado por 3 anos (Resolução CFM, 2017), além da necessidade, nas mulheres solteiras ou sem parceiro, a recorrerem ao uso de doação de sêmen. Outro fator importante a ser considerado é que pacientes oncológicas podem apresentar piores marcadores de reserva ovariana, como em estudo com mulheres com linfoma, que

apresentavam, em média, redução de 53% nos valores de hormônio anti-mulleriano, o que refletiu em um menor número de oócitos captados para preservação da fertilidade (LEKOVICH et al., 2016). Este fato pode comprometer o congelamento de óvulo de uma parcela das mulheres submetidas ao tratamento oncológico.

Congelamento de tecido ovariano

Uma alternativa para um grupo de pacientes, como meninas pré-púberes ou que necessitam iniciar a quimioterapia rapidamente e, conseqüentemente, não podem recorrer às técnicas tradicionais, é o congelamento de tecido ovariano e posterior autotransplante após a remissão do câncer, de modo que a paciente poderia engravidar tanto espontaneamente quanto com o uso das técnicas da reprodução assistida (JADOUL, et al., 2017). Dados recentes referem mais de 100 transplantes realizados, com mais de 60 nascidos vivos utilizando esta técnica (DONNEZ et al., 2013), que ainda é considerada experimental pela ASRM (2014).

A realização do procedimento segue as seguintes etapas (KIM, 2012): a) extração cirúrgica do córtex ovariano por ooforectomia unilateral ou ooforoplastia (laparoscopia ou laparotomia); b) exérese da medula e isolamento do córtex, com espessura de 1 a 2 mm; c) corte do tecido em pequenos fragmentos (1 a 10 mm³); d) congelamento do tecido ovariano.

Existem duas técnicas aceitas para o congelamento do tecido ovariano: congelamento lento e vitrificação, sendo a mais realizada o congelamento lento, no qual o tecido exposto a baixas concentrações de crioprotetores é submetido

à redução gradual de temperatura - a maioria das séries de casos e gestações relatadas foram obtidas utilizando esta técnica (JADOUL et al., 2017). Outra possibilidade é a vitrificação: com altas concentrações de crioprotetores, o tecido é submerso em nitrogênio líquido, reduzindo rapidamente a temperatura. É uma técnica que não necessita de aparelhagem para redução gradual de temperatura e de execução mais rápida, porém nas series de caso identificadas, não foram obtidas gestações desta forma (DONNEZ et al., 2013). Em suma, o congelamento lento é a técnica mais aceita, uma vez que os dados são mais consistentes, apesar da vitrificação ser uma técnica promissora (DOLMANS et al., 2015). É importante salientar que a vitrificação em tecido é uma técnica mais recente e ainda faltam dados para comprovar sua superioridade em relação a técnica de congelamento lento.

No momento em que for constatado a remissão do câncer, a paciente desejar engravidar, o tecido é descongelado e transplantado. O enxerto pode ser feito por técnica intrapélvica (ortotópica), que pode ser no ovário remanescente ou no peritônio, ou fora da pelve (heterotópica) (DAMÁSIO et al., 2016; DONNEZ et al., 2013; ROSENDAHL et al., 2011).

Dificuldades relacionadas à técnica

Existem alguns obstáculos a serem superados para otimização dos resultados no congelamento do tecido ovariano:

- 1) A cristalização e uso de crioprotetores podem ter efeito citotóxico no tecido. O processo de congelamento lento pode resultar em formações de cristais de água no tecido, prejudicando a viabilidade. O uso de crioprotetores, também fundamentais, tanto para o congelamento lento, quanto para a

vitrificação, pode ter efeito citotóxico e reduzir a eficácia do procedimento (NISOLLE et al., 2000);

2) A isquemia e o processo inflamatório causado pela reperfusão podem diminuir a viabilidade o enxerto. O procedimento preconiza o congelamento de córtex ovariano, de forma que a medula e o pedículo vascular são descartados. No retransplante, o tecido é enxertado então não existe ligadura vascular direta. Portanto, o tecido fica alguns dias sem perfusão sanguínea e a privação de oxigênio e outras substâncias reduz a viabilidade do tecido (BAIRD et al., 1999; VAN EYCK et al., 2009; MAN et al., 2018);

3) O processamento do córtex ovariano e o autotransplante podem alterar a sinalização celular, interrompendo ou ativando vias relacionadas com o estado de dormência e ativação folicular. O preparo do córtex ovariano envolve reduzir a espessura, retirar a medula e cortar em pequenas partes. Todas estas etapas alteram os mecanismos celulares e o balanço entre fatores estimulantes e inibitórios que coordenam o crescimento de folículos primordiais (KAWAMURA et al., 2013). Todos esses fatores, com variados potenciais deletérios ao tecido, potencialmente reduzem o benefício de se preservar milhares de folículos primordiais, de forma que a taxa de nascidos vivos (estimada em 29%), é menor quando comparada a grupos pareados por idade em uso de técnicas de reprodução assistida, tratamento em que poucos óvulos são obtidos (DOLMANS, 2015).

Diversos investigadores têm trabalhado para aperfeiçoar o processo. Otimização no congelamento lento e utilização de outras modalidades como a vitrificação e o congelamento direcional têm proporcionado cada vez mais folículos saudáveis e estroma ovariano morfolologicamente normais (TING et al.,

2011). Van Eyck e colaboradores (2009) demonstraram um período de isquemia de cinco a sete dias até que o enxerto esteja devidamente vascularizado, mas muitos trabalhos publicados buscam alternativas para reduzir esse tempo de isquemia a fim de preservar o maior número de folículos (ISRAELY et al., 2003; LABIED et al., 2013; YANG et al., 2008). O grupo da disciplina de Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo tem realizado pesquisas na área, utilizando modelo animal, com roedores, para otimizar o processo e a sobrevida do tecido retransplantado (DAMOUS et al., 2015; DAMOUS et al., 2016).

Recrutamento folicular maciço

Independentemente do recurso utilizado para melhorar o processo de revascularização, os mecanismos celulares que regulam a mobilização de folículos quiescentes parecem ter papel fundamental na sobrevida e longevidade do enxerto. Os folículos ovarianos estão em sua maior parte no estágio primordial. Até o momento da ovulação, o folículo precisa passar por várias etapas de crescimento e o momento em que um folículo primordial inicia seu processo de desenvolvimento e se transforma em folículo primário é denominada recrutamento folicular, ou mobilização de folículos quiescentes (GOUGEON, 1986).

Gavish et al. (2014) demonstraram aumento expressivo na população de folículos em crescimento (40 para 70%) após o transplante. David et al. (2011) também encontraram resultados similares em seus experimentos (20 para mais de 60%). Essa ativação maciça resulta em uma menor sobrevida do tecido.

O processo que leva à ativação dos mecanismos celulares relacionados ao crescimento dos folículos no enxerto autotransplantado possivelmente advém da perda de fatores inibitórios e da indução de estimulantes que regulam o recrutamento folicular e um exemplo disso é a redução do hormônio Anti-Muleriano (HAM) no enxerto (DONNEZ et al., 2013). O HAM é produzido por pequenos folículos em crescimento e acredita-se ter uma ação inibitória nos folículos primordiais (GRUIJTERS et al., 2003). A destruição destes folículos em crescimento resultaria na diminuição da produção de HAM e conseqüentemente na perda da inibição dos folículos primordiais e, sem esse bloqueio no recrutamento, os folículos primordiais iniciariam o seu desenvolvimento, aumentando seu metabolismo e necessidades energéticas. Ao mesmo tempo, o tecido está em processo de neoangiogênese, de forma que a demanda de oxigênio e nutrientes não é atendida. Como resultado, os folículos em crescimento entram em apoptose (DONNEZ et al., 2013). Este fenômeno, quando acontece globalmente no tecido transplantado, é chamado de “burn-out”, ou seja, exaustão da coorte folicular. Contudo, existem outros mecanismos que contribuem para a sua ocorrência (DONNEZ et al., 2013).

Via PI3K/PTEN/Akt

A via Fosfoinosítídeo 3-quinase/Fosfatase e tensina/Proteína quinase B homóloga (PI3K/PTEN/Akt) está envolvida em diversos processos celulares como mitose e apoptose e, no ovário, está intimamente ligada ao processo de desenvolvimento dos folículos primordiais (HSUEH et al., 2015; MAKKER et al., 2014). Esta via, que quando ativada promove o recrutamento dos folículos, possui diversos mecanismos de ativação e supressão, mas tem como ponto

comum o Akt, proteína quinase específica de serina/treonina que desempenha um papel fundamental em vários processos celulares, como metabolismo da glicose, apoptose, proliferação celular, transcrição e migração celular (SONG et al., , 2005). Quando o Akt é fosforilado, a via é ativada com o fosfo-Akt (p-Akt) induzindo a fosforilação de FOXO3. Esta molécula, que no estado nativo se localiza dentro do núcleo, impede o recrutamento do folículo e quando está fosforilada se dirige ao citoplasma, perdendo o poder inibitório e consequentemente permitindo o recrutamento folicular (HSUEH et al., 2015) (Figura 1 e 2). Possivelmente o bloqueio desta via poderia reduzir recrutamento folicular (KALICH-PHILOSOPH et al., 2013).

Figura 1 – Via de sinalização do Akt. Fatores de ativação, através de receptores de membrana, levam à fosforilação do Akt, que ativa a via. Adaptado de Hsueh et al., 2015.

Figura 2 – Via do Akt, com diferentes agentes relacionados à sinalização celular. Adaptado de Makker, 2014

Estudos em modelo animal identificaram essa via como a principal responsável pelo esgotamento dos tecidos expostos à quimioterápicos, como a ciclofosfamida (KALICH-PHILOSOPH et al., 2013), ou seja, pelo recrutamento maciço dos folículos primordiais. Estes trabalhos avaliaram o impacto desse agente alquilante em ovários intactos *in vivo*.

A sinalização dessa via também é reconhecida por ser ativada em resposta à isquemia (LOPEZ-NEBLINA et al., 2006), podendo-se pressupor que tenha papel importante na ativação de folículos quiescentes no enxerto após o transplante.

Considerando que a via PI3K/Akt/PTEN modula a resposta tecidual ao processo de isquemia/reperfusão, que acontece no tecido ovariano descongelado após o transplante, e também está ligada ao processo de recrutamento e crescimento de folículos primordiais, entender o papel desta via e propor possíveis interferências na sinalização pode ser um caminho para melhorar a técnica para preservação da fertilidade utilizando o congelamento de tecido ovariano. Desta forma, o uso de fármacos que manipulam a via, como o AS 101, pode ser adotado em pesquisas a fim de tentar otimizar o processo.

O AS 101 (telurato de amônio tricloro-dioxoetilenoO,O') é um composto orgânico sintético não tóxico, em estudos fase 2, sintetizado pela Bar Ilan University (SREDNI et al., 1987), com propriedades imunomoduladoras, utilizado para reduzir efeitos hematológicos e dermatológicos de medicamentos quimioterápicos (KALECHMAN et al., 1991).

Em pacientes com câncer avançado tratados com o AS101, verificou-se aumento da produção de diversas citocinas, resultando na dominância de reposta Th1 e redução de resposta Th2 (SREDNI et al., 1996). Em pacientes

com câncer de pulmão avançado, o uso do AS101 em conjunto com a quimioterapia reduziu a severidade da neutropenia e trombocitopenia, efeitos colaterais do tratamento oncológico. Este efeito benéfico a inibição direta da citocina anti-inflamatória IL-10 (SREDNI et al., 2004). Porém, outros estudos demonstraram, utilizando células de pacientes com mieloma múltiplo, uma inibição da via PI3K/PTEN/Akt, com redução na fosforilação do Akt (HAYUN, 2006).

Pesquisas mostraram que o AS101 também modula negativamente a via PI3K/PTEN/Akt, reduzindo o efeito do esgotamento pela ciclofosfamida (KALICH-PHILOSOPH et al., 2013). Muitos destes estudos foram realizados com ovários bovinos. Outro estudo utilizou AS101 em ovários humanos e em camundogas modelo para endometriose. Se verificou inicialmente redução na proporção de folículos primordiais e maior ativação da via PI3K/PTEN/Akt. Com o AS101, houve redução na ativação da via e aumento da proporção de folículos primordiais (TAKEUCHI et al., 2019).

Por se tratar de um material de difícil obtenção, grande parte dos estudos com tecido ovariano foi realizada em modelo animal, com auto e xenotransplante. O ovário bovino é amplamente utilizado por diversas razões: suas dimensões são semelhantes às do ovário humano; são animais monovulatórios (apenas um óvulo liberado por ciclo estral), de fácil obtenção e sua dimensão garante grandes quantidades de córtex para estudo, o que favorece sua reprodutibilidade (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Considerando o papel da via PI3K/PTEN/Akt no recrutamento folicular associado ao aumento de folículos em crescimento do enxerto autotransplantado, formulamos a hipótese de que a via PI3K/PTEN/Akt estaria

ativada no tecido ovariano enxertado, pelo processo de isquemia após transplante. Em um modelo de ovários bovinos xenotransplantados em camundongas imunossuprimidas, utilizamos molécula AS101 que inibe a ativação PI3K/PTEN/Akt para suprimir o recrutamento folicular. O bloqueio desta via poderia reduzir a taxa de recrutamento e preservar a população de folículos primordiais. Isto levaria ao aumento da sobrevida do enxerto e, consequentemente, à elevação das taxas de sucesso.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar o efeito do AS101 no recrutamento folicular após o transplante de enxerto ovariano bovino em camundongas imunossuprimidas.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar, por imunofluorescência e “Western Blot”, se a via PI3K/PTEN/Akt está ativada nos folículos em diferentes estágios de desenvolvimento e a alteração causada pelo transplante;
- Avaliar, por meio de quantificação proteica por “Western Blot” e imunofluorescência, a ação do AS101 na via PI3K/PTEN/Akt no tecido ovariano *in vitro* e *in vivo*;
- Avaliar o efeito do AS101 na contagem e distribuição de folículos ovarianos.

3. Métodos

3.1 Tipo de estudo

Pesquisa básica experimental, aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e pelo Comitê de Ética da Weill Cornell Medicine, em Nova York.

3.2 Dinâmica do estudo

O estudo foi dividido em cinco etapas para avaliar a atividade da via PI3k/PTEN/Akt no recrutamento e crescimento folicular, bem como o efeito do AS101 naquela via no tecido ovariano antes e após o transplante:

Experimento 1 – Análise da via PI3k/PTEN/Akt na ativação de folicular em tecido fresco, utilizando imunofluorescência (IF) (Figura 3);

EXPERIMENTO 1

Figura 3 – Desenho do experimento 1. Avaliação da via PI3K/PTEN/AKT pela técnica de IF (Imunofluorescência) em tecido ovariano bovino fresco. Com a IF, pode-se localizar cada proteína da via de estudo nos diferentes tipos de folículo.

Experimento 2 – Comparação da atividade da via PI3K/PTEN/Akt entre tecido ovariano fresco não transplantado e tecido ovariano congelado, descongelado e transplantado, com retirada após 5 dias, utilizando *Western Blot* (WB) (Figura 4);

Figura 4 – Desenho do experimento 2: comparação do tecido fresco com o tecido congelado após cinco dias de transplante em camundongas da via PI3K/PTEN/AKT pela técnica de WB (*Western Blot*)

Experimento 3 – Incubação de tecido descongelado em 2 horas com e sem AS101 e comparação por WB (Figura 5);

Figura 5 – Desenho do experimento 3. Avaliação do efeito da substância AS101 na via PI3K/PTEN/AKT no ovário bovino descongelado “in vitro” pela técnica de WB (*Western Blot*) após incubação de duas horas. O controle foi feito sem o AS101 e usou-se apenas o meio de cultura. Experimento 4 – Comparação de tecidos fresco e descongelados, com e sem AS101, recuperados em dois e cinco dias após o transplante, por WB e IF (Figura 6);

Experimento 4 – Comparação de tecidos fresco e descongelado, com e sem AS101, recuperados em dois e cinco dias após o transplante, por WB e IF (Figura 6);

Figura 6 – Desenho do experimento 4. Comparação da via PI3K/PTEN/AKT de tecido ovariano bovino fresco em relação ao descongelado, que foi incubado por duas horas, com e sem AS101 e em seguida transplantados e recuperados em dois tempos (dois e cinco dias após o transplante), pelas técnicas de WB (*Western Blot*) e de IF (imunofluorescência).

Experimento 5 - Comparação na quantidade e tipos de folículos entre tecido ovariano descongelado, com e sem tratamento com AS101, em amostras recuperadas após 14 dias do transplante, por histomorfometria (Figura 7).

Figura 7 – Desenho do experimento 5. Contagem folicular após transplante de tecido ovariano bovino, que foi descongelado e tratado *in vitro* por duas horas com ou sem AS101.

3.3 Animais

Foram utilizados dois ovários bovinos (*Bos taurus*) para o experimento de apenas um animal, a fim de reduzir a variabilidade entre os experimentos. O animal foi obtido no criadouro da Cornell University, “campus Ithaca”. A extração do órgão foi feita por um veterinário, *post mortem*. A eutanásia foi realizada com 14 dias de vida, por trauma craniano com pistola pneumática para evitar qualquer contaminação e alteração dos resultados pelo uso de anestésicos. O animal foi sacrificado exclusivamente para este experimento, conforme norma e aprovação do comitê de ética local.

Para o transplante, foram utilizadas dez camundongas imunossuprimidas (*NOD/LtSz-scid IL2R gamma*) para que o xenotransplante fosse realizado sem risco de rejeição pelo hospedeiro. O comprometimento imunológico se deve à mutação no gene receptor gama de IL-2 o que acarreta na deficiência de linfócitos maduros e de células *Natural Killer*.

3.4 Processamento do tecido ovariano

Após extração dos ovários, a medula foi retirada e o córtex foi cortado em 2x2x1 mm (volume de 4mm³) conforme técnica descrita anteriormente (KIM, 2012; ROSENDAHL et al., 2011), utilizando bisturi e tesoura. Todo o procedimento foi realizado em condições estéreis com auxílio de lupa e milimetragem na placa de petri utilizada no preparo. O tecido foi processado

submerso em meio de cultura de gametas e, após o preparo, os fragmentos foram transferidos para um criotubo de 1,8 ml para congelamento.

3.5 Congelamento e descongelamento do tecido ovariano

O congelamento lento e descongelamento foram realizados conforme técnica previamente descrita (KIM, 2012).

Para o congelamento lento, o tecido foi equilibrado em criotubos preenchidos com 1 ml de meio tampão HEPES, contendo 1,5 M de DMSO como crioprotetor, 5% de albumina (HSA), 10% de plasmanate e 0,1M de sucrose, durante 30 minutos à temperatura de 0°C. Os tubos foram então alocados no refrigerador automatizado, programado para o congelamento seguindo o seguinte roteiro:

- Resfriar a 2°C/min até -7°C;
- Manter a temperatura por 10 minutos e realizar o “seeding”;
- Continuar o resfriamento a 0.3 °C/min até -40 °C;
- Reduzir a temperatura a 10 °C/min até -140 °C.

Após o término deste protocolo, os tubos foram transferidos para nitrogênio líquido para armazenamento.

O descongelamento foi realizado com a retirada dos tubos do nitrogênio líquido, com aumento de aproximadamente 100 °C/min. Em seguida, o tecido foi lavado nas diferentes soluções por cinco minutos cada, compostas por 75% de meio HEPES e 25% de plasmanate, contendo as seguintes concentrações:

- 1,0M de DMSO com 0,1M sucrose

- 0,5M DMSO com 0,1M sucrose
- 0,1M sucrose
- Apenas HEPES com plasmanate

Após descongelamento, os futuros enxertos foram alocados em dois grupos: AS101 x controle. Os fragmentos foram incubados por duas horas em meio α -MEM suplementado com 10% de HSA, com ou sem 10 μ g/ml de AS101. Esta concentração foi previamente determinada por “kill curve” de cultura in vitro de células endoteliais derivadas de cordão umbilical (HUVEC). Após incubação, os fragmentos de tecido foram utilizados para análise histomorfométrica, imunofluorescência, quantificação proteica e transplante. A quantificação proteica foi realizada por *Western Blot* para mensuração objetiva da variação entre os grupos estudados e a imunofluorescência foi realizada para identificarmos se os achados quantitativos eram identificados nos folículos ou apenas no estroma ovariano.

3.6 Transplante

Camundongas imunossuprimidas foram anestesiadas com injeção intraperitoneal 10 μ l/g de coquetel contendo 150 mg/Kg de Ketamina, 15 mg/kg Xylazine. Após incisão medial dorsal, foi realizada ooforectomia bilateral e então colocados dois fragmentos de tecido descongelado e incubado. Em um lado, grupo AS101 e, no outro, grupo controle. Assim, cada camundonga serviu como seu próprio controle, uma vez que as variações do organismo da camundonga tiveram a mesma influência nos dois grupos (AS101 e controle). Após a cirurgia,

as camundongas foram mantidas em condições estéreis até o final do experimento. Os enxertos foram recuperados após 2, 5 ou 14 dias do transplante. A Figura 8 mostra o posicionamento do tecido no músculo glúteo máximo. Um lado tratado com AS101 e o outro em meio de cultivo para controle.

Figura 8 – Fotografia mostrando local de enxerto ovariano bovino. Lado direito, foi padronizado a implantação do tecido no grupo controle, enquanto o esquerdo foi o tecido tratado com AS101. * identifica posição do enxerto.

3.7 Histomorfometria

Enxertos e amostras pré-congelamento foram fixadas em formol e seccionadas em criostato (OCT) com espessura de 10 μ m; em seguida coradas pela hematoxilina e eosina para estudo histomorfológico (GAVISH et al., 2014). Para classificação e contagem manual, foram analisados um a cada cinco cortes (50 μ m). Apenas foram contabilizados os folículos em que foi visualizado oócito com núcleo e morfologia normal. Os critérios para o tamanho do corte e técnica para contagem seguiram as mesmas etapas propostas por Gavish e colaboradores, que realizaram seus experimentos com ovário bovino (GAVISH et al., 2014).

Os folículos foram classificados como primordial, quando houvesse um oócito cercado por células escamosas da pré-granulosa, e em crescimento, quando houvesse um oócito cercado por pelo menos uma camada de células cuboides de granulosa (GOUGEON, 1986). As lâminas foram analisadas por dois examinadores diferentes e calculou-se a média entre os valores obtidos.

A taxa de recrutamento foi definida como a razão do número de folículos em crescimento pela contagem total de folículos.

3.8 Imunofluorescência

As demais lâminas foram utilizadas para realização de imunofluorescência com os seguintes anticorpos: Akt, pAkt e DAPI (para identificação dos núcleos das células). Para as diluições e técnicas utilizadas

foram seguidas as recomendações da empresa (Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts), conforme Tabela 1. Para controle negativo, foram utilizado anticorpos inespecíficos. Os procedimentos haviam sido padronizados por membro anterior do laboratório:

Tabela 1 - Diluições utilizadas dos anticorpos primários para imunofluorescência

Anticorpo	Diluição
Akt	1:200
pAkt	1:400
DAPI	1:100

3.9 Quantificação Proteica por “Western Blot”

A quantificação de proteínas foi realizada conforme técnica previamente descrita (KURIEN; SCOFIELD, 2006). Enxertos e amostras pré-congelamento foram imersas em nitrogênio líquido e homogeneizadas para extração mecânica de proteína por maceramento. Após cálculo da concentração total, utilizando BioRad Protein Assay, quantidades iguais de proteína foram carregadas em géis para fracionamento por eletroforese (BioRad Mino-PROTEAN TGX Precast Gel). Utilizou-se um marcador de massa molecular pré-corado (Precision Plus Protein™ Prestained Standards).

A transferência para membrana de celulose foi realizada utilizando BioRad Trans-Bot Turbo Transfer System. Utilizou-se a solução de Ponceau S foi para verificar se a transferência ocorreu.

Foram utilizados os seguintes anticorpos primários overnight com agitação constante a 4°C: Akt, pAkt e Beta actina (Cell Signaling Technology Danvers, Massachusetts), conforme diluição da Tabela 2. A Beta actina é uma proteína utilizada como controle pois se mantém estável e não varia entre as amostras (RUAN et. al., 2007).

Tabela 2 - Diluições utilizadas dos anticorpos primários para quantificação proteica por *Western Blot*

Anticorpo	Diluição
Akt	1:1000
pAkt	1:2000
Beta actin	1:1000

Após lavagem com solução tampão, a membrana foi incubada com anticorpo secundário (Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts). A mensuração foi realizada em ChemiDoc MP Imaging System, após incubação do Clarity Western ECL Substrate. Para quantificar a ativação da via PI3K/PTEN/Akt foram comparadas as razões pAkt/Akt e pAkt/Beta actin: quanto maior a razão pAkt/Akt, mais ativada a via estava (KALICH-PHILOSOPH et al., 2013).

3.10 Análise Estatística

Os dados foram armazenados no programa Microsoft Excel. Os achados foram comparados para as variáveis quantitativas com uso de testes de Mann-Whitney ou teste t-Student conforme distribuição de probabilidade dos dados e foi verificada a existência de associação das características qualitativas entre os grupos usando de testes qui-quadrado ou teste exatos de Fisher. Os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

4. Resultados

4.1 Experimento 1 – Análise da via PI3k/PTEN/Akt na ativação de folicular em tecido fresco, utilizando a imunofluorescência

O objetivo do Experimento 1 foi demonstrar se a via PI3K/PTEN/Akt está ativada no recrutamento folicular fisiológico. Para isso, foi utilizado tecido ovariano bovino fresco e avaliado por IF. Duas amostras foram utilizadas para este experimento.

Foi realizado IF utilizando os anticorpos específicos para Akt (Figura 9a) e pAkt (Figura 9b-d) para localizar em quais células a via estava ativada (ou inibida) e em que tipo de folículos o efeito era mais evidente.

Em todo o tecido foi observado de forma homogênea a presença de Akt (Figura 9a), tanto das células de estroma quanto nos folículos. Porém os folículos em crescimento (asterisco na Figura 9c-d) e antrais (Figura 9b) exibiram a presença de pAkt nas células da granulosa, enquanto nos folículos primordiais a expressão de pAkt foi fraca ou inexistente (setas nas Figuras 9c-d).

Figura 9 – Fotomicrografia da reação de imunofluorescência em tecido ovariano bovino fresco. Em todas as Figuras: Azul corresponde a DAPI (núcleo das células), seta para folículos primordiais, asterisco para folículos em crescimento; a – folículo antral, verde para Akt; b – folículo antral, verde para pAkt; c e d – folículos primordiais e em crescimento, verde para pAkt

Esses resultados, sugerem que a via PI3K/PTEN/Akt estava ativada nos folículos em crescimento uma vez que encontramos nestes folículos maior expressão da forma ativa do Akt (pAkt), enquanto nos folículos primordiais essa expressão foi mínima ou inexistente.

4.2 Experimento 2 – Comparação entre tecido ovariano fresco não transplantado e tecido ovariano congelado, descongelado e transplantado, com retirada após 5 dias

O objetivo do experimento 2 foi demonstrar como a via PI3K/PTEN/Akt se comportou após o transplante ovariano. Para isso, comparamos o tecido fresco com tecido descongelado cinco dias após o retransplante. A hipótese é que no tecido transplantado, a via estaria mais ativada, quando comparada ao tecido fresco. Para este experimento foram utilizadas oito amostras.

Foi realizado WB para comparação do tecido fresco com o tecido 5 dias após o transplante. Este prazo foi definido a partir de estudos prévios (VAN EYCK; JORDAN; GALLEZ; HEILIER *et al.*, 2009), que demonstraram que este período seria suficiente para a revascularização do tecido.

Considerando o tecido fresco como referência, a relação de pAkt/Akt no tecido transplantado foi 42,9% maior (DP $\pm$ 23,8%; $p=0,028$). A relação pAkt/ β -Actina apresentou aumento de 49,2%, porém sem significância estatística (DP $\pm$ 42,6%; $p=0,052$). Os dados obtidos no WB estão discriminados na Tabela 3 e as imagens obtidas e gráficos de comparação estão representados na Figura 10a-c.

Estes estudos sugerem que a via PI3K/PTEN/Akt estaria com maior ativação após o transplante de enxerto ovariano, quando comparada à tecido fresco.

Tabela 3 – Resultado de *Western Blot* obtido de comparando amostras descongeladas após 5 dias do transplante, utilizando padrão a amostra a fresco

D5	pAkt/Akt	pAkt/B actin
Amostra 1	1,543	1,62
Amostra 2	1,259	1,287
Amostra 3	1,205	1,04
Amostra 4	1,71	2,024
Média	1,429	1,493
Desvio padrão	0,239	0,427
Valor p	0,018	0,052

Aplicou-se o teste “T de Student”.

Figura 10 – *Western blot* de tecido ovariano bovino fresco e descongelado após 5 dias do transplante. a – Imagem obtida do *Western Blot* de tecido fresco e descongelado para Akt, pAkt e β-actina; b – comparação do resultado quantitativo do *Western blot* da relação Akt/pAkt; c - comparação do resultado quantitativo do *Western blot* da relação pAkt/ β-actina (*: p=0,018). Aplicou-se o teste “T de Student”.

4.3 Experimento 3 – Incubação de tecido descongelado em duas horas com e sem AS101

O AS101 foi utilizado para tentar reduzir a ativação da via PI3K/PTEN/Akt. No experimento 2 observamos que esta via apresenta ativação maior do que o estado fisiológico após o transplante. Para este experimento foram utilizadas seis amostras.

Após cultivo em AS101 por duas horas, as amostras foram comparadas com tecido cultivado em meio de cultivo embrionário. Em seguida foi realizado WB para avaliar o efeito do AS101 na supressão da ativação da via PI3K/PTEN/Akt. O resultado de cada amostra está descrito na Tabela 4 e na Figura 11.

Imediatamente após 2 horas de cultivo, o grupo AS101 apresentou 33% de redução na relação pAkt/Akt ($DP \pm 0,112$ $p=0,037$). A relação pAkt/ β -Actina mostrou a mesma tendência, porém sem significância estatística. (razão de 0,701 $DP 0,09$ $p=0,06$). Tais achados sugerem que o AS101 poderia reduzir a ativação da via PI3K/PTEN/Akt, contrabalanceado o efeito resultante do transplante do enxerto criopreservado.

Tabela 4 – Resultado de *Western Blot* comparando amostra descongelada após duas horas em AS101, utilizando com base, as amostras controle, em meio de cultivo apenas

AS101	pAkt/Akt	pAkt/B actin
Amostra 1	0,817	0,7651
Amostra 2	0,862	0,6375
Amostra 3	0,649	*
Média	0,776	0,7013
Desvio Padrão	0,112	0,0902
Valor p	0,037	0,067

*: Amostra desprezada por erro na transcrição. Aplicou-se o teste “T de Student”.

Figura 11 – *Western Blot* de tecido ovariano bovino descongelado, em cultivo com e sem AS101. a- Imagem obtida do *Western blot* de amostra descongelada para Akt, pAkt β-actina; b – comparação do resultado quantitativo do *Western blot* da relação Akt/pAkt; c - comparação do resultado quantitativo do *Western blot* da relação pAkt/ β-actina (**: p=0,037). Aplicou-se o teste “T de Student”.

Experimento 4 – Comparação de tecidos fresco e descongelados, com e sem AS101, recuperados em dois e cinco dias após o transplante

Para determinar se a exposição transitória de AS 101 era suficiente para causar alterações consistentes no tecido descongelado e transplantado, foram realizadas avaliações em amostras recuperadas após dois e cinco dias após o transplante e comparadas amostras expostas e não expostas ao AS101 em meio de cultura por duas horas antes do transplante. Para este experimento foram utilizadas 20 amostras.

Considerando que a revascularização do enxerto ocorre em cinco dia (VAN EYCK et al., 2009), o período de dois dias foi escolhido pensando em um momento em que a revascularização ainda havia acontecido e o tecido estaria sujeito a grande ativação da via PI3K/PTEN/Akt. O período de cinco dias foi determinado por se tratar de período em que a vascularização estaria completa e a sinalização celular poderia retomar sua atividade regular.

Após extração da amostra foi realizado WB para avaliar o efeito do AS101 na supressão da ativação da via PI3K/PTEN/Akt nos diferentes *end-points* (dois e cinco dias). O resultado de cada amostra está descrito nas Tabela 5 e 6, respectivamente, e nas Figuras 12 e 13.

Após dois dias do transplante, o grupo AS101 apresentou 34,2% de redução na relação pAkt/Akt (DP $\pm 0,155$ p=0,031). A relação pAkt/ β -Actina mostrou a mesma tendência de redução, estatisticamente significativa (razão de 0,514 DP 0,228 p=0,033).

Após cinco dias do transplante, o grupo AS101 apresentou 28,9% de redução na relação pAkt/Akt (DP $\pm 0,155$ p=0,026). A relação pAkt/ β -Actina

mostrou a mesma tendência de redução, estatisticamente significativa (razão de 0,514 DP 0,228 $p=0,033$). Comparando com os dados coletados após dois dias de transplante, pode-se notar menor efeito do AS101 no *end-point* mais tardio.

Estes resultados sugerem que o AS101 poderia ser utilizado *in vivo* para reduzir a ativação da via PI3K/PTEN/Akt, efeito que poderia ser benéfico tanto durante o período de isquemia, quanto logo após a revascularização do tecido.

Tabela 5 - Resultado de *Western Blot* comparando enxerto tratado com AS101, após dois dias de transplante, utilizando como base o tecido mantido em meio de cultivo

AS101 (D2)	pAkt/Akt	pAkt/B actin
Amostra 1	0,82	0,576
Amostra 2	0,511	0,261
Amostra 3	0,642	0,705
Média	0,658	0,514
Desvio padrão	0,155	0,228
Valor p	0,031	0,033
Aplicou-se o teste "T de Student".		

Tabela 6 – Resultado de *Western Blot* comparando enxerto tratado com AS101, após cinco dias de transplante, utilizando como base o tecido mantido em meio de cultivo

AS101 (D5)	pAkt/Akt	pAkt/B actin
Amostra 1	0,979	1,016
Amostra 2	0,683	1,003
Amostra 3	0,702	0,522
Amostra 4	0,982	0,705
Amostra 5	0,708	0,312
Amostra 6	*	0,787
Média	0,811	0,724
Desvio padrão	0,155	0,275
Valor p	0,026	0,029

* Erro de leitura. Aplicou-se o teste “T de Student”.

Figura 12 – *Western Blot* de tecido ovariano bovino descongelado, em cultivo com e sem AS101 após dois dias de transplante. a- Imagem obtida do *Western blot* de amostra descongelada para Akt, pAkt β-actina; b – comparação do resultado quantitativo do *Western blot* da relação Akt/pAkt; c - comparação do resultado quantitativo do *Western blot* da relação pAkt/ β-actina (*: p=0,031). Aplicou-se o teste “T de Student”.

Figura 13 – *Western Blot* de tecido ovariano bovino descongelado, em cultivo com e sem AS101 após cinco dias de transplante. a- Imagem obtida do *Western blot* de amostra descongelada para Akt, pAkt β -actina; b – comparação do resultado quantitativo do *Western blot* da relação Akt/pAkt; c - comparação do resultado quantitativo do *Western blot* da relação pAkt/ β -actina (**: $p=0,029$; *: 0,26). Aplicou-se o teste “T de Student”.

Para determinar se a supressão da via PI3K/PTEN/Akt, pela ação do AS101, identificada no WB após o transplante está relacionado ao recrutamento folicular foi realizado estudo de IF. A microscopia confocal de tecido recuperado após 5 dias de transplante mostrou redução da ativação de Akt na resolução folicular após cultura transiente in vitro de tecido ovariano em AS101 (Figura 14).

Aglomerados de folículos foram evidentes em ambos os enxertos de Controle (Figura 14a-c) e AS101 (Figura 14d-f), ao passo que pAkt foi identificado nas células da granulosa da maioria dos folículos primordiais e primários do grupo controle (Figura 14c), enquanto pAkt estava relativamente ausente dos folículos primordiais e apenas minimamente presente nos folículos do estágio antral dos enxertos tratados com AS101 (Figura 14f).

Para definir um limiar objetivo dos níveis de pAkt em micrografias confocais, os tecidos tratados com controle e AS101, o microscópio confocal foi calibrado com os mesmos parâmetros para captação do sinal (Figura 15g-h). A intensidade do sinal de pAkt foi consistentemente maior em aglomerados de folículos da amostra do grupo controle.

Esses resultados sugerem que a ativação da sinalização PI3K/PTEN/Akt estava aumentada nos folículos em repouso após o transplante de tecido ovariano e que essa ativação pode ser reduzida por cultura transiente in vitro com o composto AS101.

Figura 14 – Fotomicrografia da reação de imunofluorescência para pAkt em enxertos após cinco dias do transplante , com e sem AS101 verde: pAkt; azul: núcleo; a-c: grupo controle; d-f: grupo AS101; c e f: folículos primordiais em destaque na imagem. Pode-se visualizar a expressão de pAkt nos folículos em crescimento (identificados com *), mesmo no tecido exposto ao AS101

Figura 15 – Fotomicrografia da reação de imunofluorescência para pAkt em enxertos após cinco dias do transplante, com captação de intensidade do sinal padronizada verde: pAkt; azul: núcleo; g – controle, h – AS101. Em detalhe nas duas imagens o aglomerado de folículos primordiais, com grande captação de pAkt no grupo controle e mínima no grupo AS101

Experimento 5 - Comparação na quantidade e tipos de folículos entre tecido ovariano descongelado, com e sem tratamento com AS101, em amostras recuperadas após 14 dias do transplante

Os experimentos anteriores sugeriram que a via PI3K/PTEN/Akt estava ativada após o transplante e que o uso do AS101 foi capaz de reduzir essa ativação suprafisiológica. O objetivo deste experimento foi demonstrar se o uso do AS101 foi capaz de alterar a taxa de recrutamento folicular e se reduziu a perda folicular após o transplante.

Novamente amostras de tecido descongelados foram analisados após o transplante, após exposição transitória de AS101 e comparadas com grupo controle. Os enxertos foram analisados por histomorfometria após 14 dias do transplante, período em que o processo de isquemia/resvascularização já estava concluído.

Quando comparado com o grupo controle, o enxerto tratado com AS 101 apresentou, em média, 10,5% a mais folículos por transplante ($p=0,041$). No grupo controle foram identificados $243,66 \pm 117,3$ folículos e no grupo AS101 foram identificados $269,16 \pm 84,4$.

A taxa de recrutamento folicular foi menor no grupo AS101 ($34,4 \pm 6,64\%$ vs $44,45 \pm 6,15\%$; $p=0,0008$) e a porcentagem de folículos primordiais foi superior no grupo AS101 ($65,85 \pm 6,64\%$ vs $55,55 \pm 6,16\%$, $p=0,0008$). A distribuição da contagem média de folículos primordiais e em crescimento está representada no gráfico 1 e a contagem folicular de cada amostra analisada está detalhada no ANEXO.

Gráfico 1 – Contagem folicular média das amostras analisadas 14 dias após o transplante. Aplicou-se o teste “T de Student”.

5. Discussão

O autotransplante de tecido ovariano descongelado, apesar de ainda ser considerado experimental em muitos países como os Estados Unidos, surge como uma nova maneira para preservação da fertilidade para pacientes com doenças neoplásicas, autoimunes e hematológicas (ASRM, 2014).

Esse grupo de pacientes enfrentam doenças graves e as terapias propostas, como quimioterapia e radioterapia possuem diversos efeitos colaterais, com a gonadotoxicidade, um dos efeitos colaterais irreversíveis e que pode afetar a qualidade de vida após o tratamento oncológico (LOREN et al., 2013; ALVAREZ et al., 2018).

Existem tratamentos para preservação da fertilidade, porém, atualmente são reconhecidos como métodos consagrados o congelamento de óvulos e o congelamento de embriões (LOREN et al., 2013; ASRM, 2013). Ambas as técnicas seguem os preceitos dos tratamentos de fertilização *in vitro*, difundidos por todo o globo.

Porém, nas duas situações, são necessários 10 a 14 dias, em média, para a coleta do gameta feminino, o que pode inviabilizar a realização do tratamento em situações oncológicas graves (ASRM, 2013). Além disso, só pode ser oferecido para mulheres em idade reprodutiva, o que pode ser problemático para meninas pré-puberes diagnosticadas com doenças neoplásicas (ASRM, 2014; COBO et al., 2018).

Neste contexto, o congelamento de tecido ovariano seria uma alternativa viável para preservação da fertilidade (ASRM, 2014). Autores advogam que a técnica não deveria mais ser considerada experimental pelos resultados consistentes, obtidos em diferentes centros (DONNEZ et al. 2015).

Um dos principais fatores limitadores para o sucesso da técnica está na sobrevida do tecido após o transplante, etapa em que são perdidos dois terços dos folículos criopreservados (DAVID et al., 2011; GAVISH et al., 2014). Existe, inclusive, questionamento na literatura se a gravidez realmente advém da população de folículos primordiais preservados ou se ocorre algum mecanismo de sinalização celular que recruta potenciais folículos dormentes no ovário que não foi extraído e permaneceu *in situ* durante o tratamento oncológico (OKTAY et al., 2011). Este questionamento seria mais relevante para pacientes que obtiveram gestação espontânea, entretanto, existe relato de gestação advinda de oócitos obtidos de transplante heterotópico em paciente submetida previamente a ooforectomia bilateral (KRISTENSEN, 2017). Neste caso, a gestação somente poderia ter acontecido pelo tecido criopreservado. De qualquer forma, não existe dúvida que grande parte da dificuldade da técnica está na preservação dos folículos primordiais após o descongelamento e transplante (KIM, 2012; GAVISH et al., 2014; DONNEZ et al., 2015; JADOUL et al., 2017).

A maior parte da população folicular está no estágio primordial, localizada no córtex ovariano (GOUGEON, 1986). O folículo primordial é composto pelo ovócito circundado de uma camada de células de pré-granulosa e permanece em estágio de quiescência, até o momento do recrutamento e crescimento para os próximos estágios de desenvolvimento (JUNQUEIRA, 2004). Esse fenômeno acontece pela transformação das células da granulosa para formato cuboide com multiplicação em camadas e crescimento do oócito. Considerando que o folículo primordial é uma estrutura com baixa atividade celular, é possível supor que as necessidades energéticas sejam baixas (DONNEZ et. al, 2013). Assim,

a hipóxia após o retransplante poderia não ser a única explicação para a perda oocitária maciça.

A via PI3K/PTEN/Akt, relacionada com diversos mecanismos de sinalização e atividade celular, também está diretamente relacionada ao balanço quiescência/recrutamento folicular. Alterações nesta via podem influenciar o ritmo de seleção e crescimento dos folículos primordiais e consequente tempo de vida reprodutiva (HSUEH et al., 2015; MAKKER et al., 2014).

A fim de estabelecer um sistema reproduzível para o nosso estudo experimental, usamos o ovário bovino, permitindo comparações controladas em grande escala com tecidos do mesmo animal doador. O ovário bovino fornece um bom modelo não humano porque é mono-ovulatório e compartilha muitas marcas moleculares, temporais e morfológicas com humanos (ARAÚJO et al., 2014). O xenotransplante, enxerto de tecido bovino em camundongas imunossuprimidas, foi utilizado para realização dos experimentos, uma vez que o objetivo principal era estudar os mecanismos de sinalização celular, a dinâmica de recrutamentos folicular com e sem inibição da via PI3K/PTEN/Akt. O benefício de se utilizar este modelo está relacionado à logística do estudo, uma vez que transplantar em vacas dificultaria e encareceria muito a dinâmica do estudo, sem um real benefício comprovado. O xenotransplante já foi utilizado em estudos anteriores e o camundongo parece ser um bom receptor pelas facilidades no cuidado dos animais (DOLMANS et al., 2007; GAVISH et al., 2014).

Na primeira etapa deste estudo, foi observada a relação da via no recrutamento folicular, com maior fosforilação de Akt em folículos e crescimento e em segunda etapa, a ativação dessa via. Esse fenômeno fica claro pela relação

pAkt/Akt aumentada no tecido transplantado, tanto dois quanto cinco dias após a cirurgia, quando comparado ao tecido virgem de tratamento.

Outros mecanismos poderiam explicar o rápido recrutamento da coorte de folículos primordiais, considerando os mecanismos que regulam o estado de quiescência (DONNEZ et al. 2013). O HAM, produzido por folículos em crescimento (GRUIJTERS et al., 2003), tem sua produção praticamente interrompida após o congelamento, uma vez que os folículos produtores não sobrevivem ao processo (DOLMANS et al., 2007). Essa parada repentina na liberação da HAM possivelmente promove um desbalanço nos mecanismos reguladores que coordenam o crescimento folículos primordiais e consequente recrutamento maciço (DONNEZ et al., 2013). Esse mesmo fenômeno foi identificado em camundongos geneticamente modificados para não expressar HAM. Neste experimento, a falta de HAM resultou em grande recrutamento de folículos primordiais, nos dias iniciais de vida, seguido de falência ovariana prematura (DURLINGER et al., 1999). O efeito inibitório do recrutamento folicular também foi demonstrado in vitro, em cultura de ovários de camundogas, uma vez que o HAM foi capaz de inibir o recrutamento folicular induzido por FSH (DURLINGER et al., 2001). Este mesmo efeito poderia ser utilizado isoladamente ou em combinação com AS101 para preservar a coorte de folículos primordiais após o transplante de tecido criopreservado. No nosso estudo sugere que o uso do AS101 protege o tecido da ativação maciça durante o maior período de isquemia. Uma vez que a vascularização tenha acontecido, os folículos poderiam crescer com o suporte necessário para apresentar boa sobrevida, produzir e liberar HAM e reestabelecer o balanço fisiológico do recrutamento folicular. Apesar de parecer uma teoria promissora, não existem estudos que comprovem

que tal efeito ocorreria em enxertos criopreservado e transplantados, de forma que são necessários experimentos para demonstrar tal suspeita.

Os benefícios de proteger a coorte folicular da rádio/quimioterapia pela extração de tecido ovariano e congelamento são contrapostos pelas influências citotóxicas severas que são introduzidas durante o congelamento/descongelamento e posterior transplante. De fato, a mesma via (PI3K/PTEN/Akt) que promove o esgotamento folicular durante a quimioterapia é ativada durante a hipóxia e a reperfusão do tecido ovariano após o transplante e provavelmente induz a mobilização precoce dos folículos no enxerto (KALICH-PHILOSOPH et al., 2013; HSUEH et al., 2015).

Na terceira fase do estudo, foi avaliada e demonstrada a ação do AS101 na modulação da via PI3K/PTEN/Akt in vitro. O AS101, composto orgânico desenvolvido e utilizado para minimizar efeitos hematológicos e dermatológicos dos quimioterápicos, também reduziu a atividade da via estudada, após cultivo transiente por duas horas.

Diversas maneiras poderiam ser utilizadas para expor o tecido à droga. Essa forma foi escolhida, baseada em outros estudos que analisaram o impacto de outras substâncias nos enxertos ovarianos antes do transplante, como por exemplo, com a exposição à VEGF, melatonina e vitamina E com o intuito de aumentar a vascularização e reduzir o estresse oxidativo após o transplante (FRIEDMAN et al., 2012; ABIR et al., 2017). Friedman e colaboradores (2012) utilizaram a cultura do tecido ovariano por duas horas antes do transplante, em meio de cultura com VEGF e vitamina E

Outras formas para entrega da droga poderiam ser utilizadas. Henry e colaboradores utilizaram matriz extracelular com VEGF em torno do tecido

transplantado para obter menor tempo de revascularização do enxerto (HENRY et al., 2015). Wang e colaboradores (2013) realizaram experimento com córtex ovariano humano xenotransplantados em coelhas, no qual, foi realizado injeção de VEGF diretamente no local do enxerto após a cirurgia. Ambas técnicas seriam factíveis no modelo para testar o AS101 com potencial benefício. A cultura por duas horas foi escolhida, pois, teoricamente, em caso de inibição prolongada da via, poderia ocorrer um efeito muito intenso e consequentemente morte celular. Para definir qual a melhor via para entrega do AS101 no tecido são necessários novos estudos.

Além de manter uma reserva de folículos quiescentes e, assim, garantir a longevidade do tecido ovariano transplantado, restringir a mobilização prematura pode ser um fator importante na promoção do desenvolvimento folicular robusto. Considerando que células em crescimento apresentam maior consumo de oxigênio e nutrientes, pode-se inferir que à medida que os folículos crescem, suas necessidades metabólicas aumentam e os folículos maiores seriam mais suscetíveis à privação de oxigênio. Após o transplante, há uma janela crítica na qual o enxerto é exposto a um ambiente inflamatório hipóxico. A mobilização de folículos durante essa janela de estresse metabólico pode comprometer criticamente seu crescimento e maturação e, em última análise, resultar em menor rendimento do tecido transplantado e pior qualidade oocitária. Ao mitigar a ativação precoce de folículos quiescentes, a inibição transitória da ativação de Akt pode reduzir o impacto da coorte folicular à exposição oocitária ao ambiente metabólico severo durante a janela pós-transplante. A alteração do consumo metabólico do tecido não foi avaliada neste estudo e novas pesquisas podem elucidar a validade desta teoria.

Foi observado neste estudo que a cultura transiente in vitro de tecido ovariano bovino descongelado reduziu a ativação de Akt e aumentou a relação e o volume de folículos primordiais duas semanas após o transplante. Esta abordagem pode fornecer um meio direto de aumentar a efetividade de amostras clínicas em pacientes submetidas a auto-transplante de tiras corticais ovarianas.

O AS101 foi usado anteriormente para reduzir o recrutamento prematuro de folículos em camundongos expostos à ciclofosfamida enxerto (KALICH-PHILOSOPH et al., 2013). Nestes estudos, a hiperativação de PI3K/PTEN/Akt conduziu a mobilização folicular induzida por ciclofosfamida; no entanto, outros grupos demonstraram um fenômeno semelhante no contexto do transplante de tecido ovariano. David e colaboradores relataram que o transplante de córtex ovariano fresco ou congelado e descongelado resultou em recrutamento elevado (DAVID et al., 2011). Dolmans e colaboradores em 2007, mostraram que o xenotransplante de tiras corticais humanas inteiras ou folículos humanos isolados resultou na ativação do crescimento e maturação folicular (DOLMANS et al., 2007). Gavish e colaboradores (2014), em um esforço para aumentar a revascularização do tecido ovariano transplantado, cortaram pela metade, em espessura, as tiras corticais ovarianas e inesperadamente notaram um aumento significativo na mobilização folicular e redução da coorte (GAVISH et al., 2014).

Estes e outros estudos sugerem que a excisão e processamento do tecido ovariano perturba as relações de sinalização parácrinas que tipicamente equilibram a mobilização contínua de coortes foliculares, com a manutenção de uma reserva folicular latente que permite a fertilidade sustentada a longo prazo. De fato, esforços recentes visam explorar os efeitos da disrupção dos tecidos ovarianos e a ativação de PI3K/PTEN/Akt para promover a maturação folicular

em pacientes com insuficiência ovariana prematura (SUZUKI et al., 2015). Suzuki e colaboradores (2015) reportaram gestação após ativação da via do Akt e sinalização por Hippo, via fundamental para controle do tamanho dos órgãos do corpo humano. Essa ativação foi realizada em pacientes com insuficiência ovariana prematura, por exérese do tecido, cultura transiente e fragmentação do tecido. Após retransplante, foi notado mobilização folicular e gestação com uso das técnicas de FIV. Nossos dados trazem dados adicionais de que a ativação de Akt pode estar relacionada com a mobilização folicular.

A fim de demonstrar um benefício para o volume folicular no tecido ovariano tratado com AS101, utilizamos os ovários pré-púberes, que contêm uma alta densidade de folículos primordiais e, assim, permitem uma comparação clara do grau de diferença entre os grupos. Um possível caminho para verificar se esta abordagem possui aplicação clínica, seria realizar estudos usando córtex ovariano humano com xenotransplante em animais, apesar das questões éticas relacionadas ao transplante entre humanos/não-humanos, como segurança e potencial risco de transmissão de doença (DITTRICH et al., 2015). Além disso, para definir se a retenção aumentada de folículos quiescentes na janela pós-transplante se traduz em aumento da produção de oócitos maduros, os enxertos de longo prazo devem ser acompanhados com hiperestimulação controlada dos animais transplantados.

Este estudo apresenta pontos importantes: é o primeiro estudo a avaliar a modulação da via PI3K/PTEN/Akt em tecido criopreservado para preservar a população de folículos primordiais. Foram utilizados, em todos os experimentos, ovários de um mesmo animal e nos transplantes, cada camundongo serviu como o próprio controle, o que presumidamente reduziu potenciais vieses nos

experimentos. Foi utilizado congelamento lento, técnica já descrita, validada em estudos anteriores e com mais de 80 gestações publicadas (DONNEZ et al.,2015).

Além disso, o desenho do estudo permitiu construir um raciocínio, baseado nos conhecimentos de fisiologia, que corrobora com a hipótese de que a inibição da via PI3K/PTEN/Akt, pelo AS101, reduziu a mobilização e perda maciça de folículos primordiais.

Por outro lado, o estudo possui limitações: A determinação da dosagem de AS101 foi realizada por curva de sobrevivência de cultura de células endoteliais derivadas de cordão umbilical humano (HUVEC), o que não necessariamente seria a melhor dose para exposição do tecido. Novos estudos deverão validar a concentração ótima para o cultivo tecidual antes do transplante. Além disso, a população folicular foi avaliada em curto prazo após o transplante, sendo observado maior número de folículos primordiais, porém não é possível concluir se essa preservação realmente teria impacto na chance de gravidez futura. Foram utilizados ovários bovinos, que apesar de serem similares ao humano, não validam o uso na prática clínica. Por fim, em relação ao AS101, novos estudos de segurança e efetividade são necessários que garantam seu uso na prática clínica.

O estudo desenvolvido propõe uma nova perspectiva para explicar a perda maciça de folículos primordiais após o transplante de tecido ovariano criopreservado. A redução da ativação suprafisiológica da via PI3K/PTEN/Akt deve ser um objetivo a ser alcançado e aperfeiçoado em pesquisas futuras, assim como a associação desta abordagem com as outras, já pesquisadas na

literatura, para reduzir o tempo de isquemia do enxerto e consequentemente aumentar a eficácia desta técnica para preservação da fertilidade.

6. Conclusões

Em nosso estudo pudemos observar que:

1- A exposição do enxerto ovariano bovino ao AS101, antes do xenotransplante em camundogas imunossuprimidas, reduziu a taxa de recrutamento folicular após 14 dias;

2- A via PI3K/PTEN/Akt está menos ativada em folículos primordiais e mais ativada em folículos em crescimento. Após o descongelamento e transplante, a via apresenta ativação suprafisiológica, conseqüentemente ocorre maior recrutamento folicular e perda oocitária;

3- A cultura de tecido ovariano bovino com AS101, após o descongelamento, reduziu a ativação da via PI3K/PTEN/Akt, *in vitro* e *in vivo* após o xenotransplante;

4- O tecido exposto ao AS101 apresentou menor taxa de folículos em crescimento e maior população de folículos, tanto na contagem global quanto de folículos primordiais.

7. Referências bibliográficas

Abir R, Fisch B, Fisher N, Samara N, Lerer-Serfaty G, Magen R, Herman-Edelstein M, Ben-Haroush A, Stein A, Orvieto R. Attempts to improve human ovarian transplantation outcomes of needle-immersed vitrification and slow-freezing by host and graft treatments. *J Assist Reprod Genet.* 2017 May;34(5):633-644.

ALVAREZ, R. M.; RAMANATHAN, P. Fertility preservation in female oncology patients: the influence of the type of cancer on ovarian stimulation response. **Hum Reprod**, 33, n. 11, p. 2051-2059, Nov 2018.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer - Facts & Figures. In. Atlanta: 2014. Disponível em www.cancer.org ; Acesso em 23/09/2019

ASRM, AMERICAN SOCIETY OF REPRODUCTIVE MEDICINE PRACTICE COMMITTEE. Mature oocyte cryopreservation: a guideline. **Fertil Steril**, 99, n. 1, p. 37-43, Jan 2013.

ASRM, AMERICAN SOCIETY OF REPRODUCTIVE MEDICINE PRACTICE COMMITTEE. Ovarian tissue cryopreservation: a committee opinion. **Fertil Steril**, 101, n. 5, p. 1237-1243, May 2014.

ARAÚJO, V. R.; GASTAL, M. O.; FIGUEIREDO, J. R.; GASTAL, E. L. In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. **Reprod Biol Endocrinol**, 12, p. 78, 2014.

Baird DT, Webb R, Campbell BK, Harkness LM, Gosden RG. Long-term ovarian function in sheep after ovariectomy and transplantation of autografts stored at -196 C. *Endocrinology*. 1999 Jan;140(1):462-71.

Cobo A, García-Velasco J, Domingo J, Pellicer A, Remohí J. Elective and Onco-fertility preservation: factors related to IVF outcomes. *Hum Reprod*. 2018 Dec 1;33(12):2222-2231.

Damous LL, Nakamuta JS, Satri de Carvalho AE, Carvalho KC, Soares JM Jr, Simões Mde J, Krieger JE, Baracat EC. Scaffold-based delivery of adipose tissue-derived stem cells in rat frozen-thawed ovarian autografts: preliminary studies in a rat model. *J Assist Reprod Genet*. 2015 Aug;32(8):1285-94.

Damous LL, Silva SM, Carbonel AA, Simões Mde J, Baracat EC, Montero EF. Progressive Evaluation of Apoptosis, Proliferation, and Angiogenesis in Fresh Rat Ovarian Autografts Under Remote Ischemic Preconditioning. *Reprod Sci*. 2016 Jun;23(6):803-11.

Damásio LC, Soares-Júnior JM, Iavelberg J, Maciel GA, de Jesus Simões M, Dos Santos Simões R, da Motta EV, Baracat MC, Baracat EC. Heterotopic ovarian transplantation results in less apoptosis than orthotopic transplantation in a minipig model. *J Ovarian Res*. 2016 Mar 15;9:14.

David A, Dolmans MM, Van Langendonck A, Donnez J, Amorim CA. Immunohistochemical localization of growth factors after cryopreservation and 3

weeks' xenotransplantation of human ovarian tissue. *Fertil Steril*. 2011 Mar 15;95(4):1241-6.

Dittrich R, Lotz L, Fehm T, Krüssel J, von Wolff M, Toth B, van der Ven H, Schüring AN, Würfel W, Hoffmann I, Beckmann MW. Xenotransplantation of cryopreserved human ovarian tissue--a systematic review of MII oocyte maturation and discussion of it as a realistic option for restoring fertility after cancer treatment. *Fertil Steril*. 2015 Jun;103(6):1557-65.

Dolmans MM, Binda MM, Jacobs S, Dehoux JP, Squifflet JL, Ambroise J, Donnez J, Amorim CA. Impact of the cryopreservation technique and vascular bed on ovarian tissue transplantation in cynomolgus monkeys. *J Assist Reprod Genet*. 2015 Aug;32(8):1251-62.

Dolmans MM, Martinez-Madrid B, Gadisseux E, Guiot Y, Yuan WY, Torre A, Camboni A, Van Langendonck A, Donnez J. Short-term transplantation of isolated human ovarian follicles and cortical tissue into nude mice. *Reproduction*. 2007 Aug;134(2):253-62.

DONNEZ, J.; DOLMANS, M.-M. Ovarian tissue freezing: current status. **Current Opinion in Obstetrics & Gynecology**, 27, n. 3, p. 222-230, Jun 2015.

Donnez J, Dolmans MM, Pellicer A, Diaz-Garcia C, Sanchez Serrano M, Schmidt KT, Ernst E, Luyckx V, Andersen CY. Restoration of ovarian activity

and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation. *Fertil Steril*. 2013 May;99(6):1503-13.

Durlinger AL, Grujters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM, Rose UM, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology*. 2001 Nov;142(11):4891-9.

Durlinger AL, Kramer P, Karels B, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology*. 1999 Dec;140(12):5789-96.

Gavish Z, Peer G, Roness H, Cohen Y, Meirow D. Follicle activation and 'burn-out' contribute to post-transplantation follicle loss in ovarian tissue grafts: the effect of graft thickness. *Hum Reprod*. 2015 Apr;30(4):1003.

GOUGEON, A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. **Hum Reprod**, 1, n. 2, p. 81-87, Feb 1986.

GRUIJTERS, M. J. G.; VISSER, J. A.; DURLINGER, A. L. L.; THEMME, A. P. N. Anti-Müllerian hormone and its role in ovarian function. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 211, n. 1-2, p. 85-90, Dec 15 2003.

HAFEZ, E.; HAFEZ, B. *Reprodução Animal*. Editora Manole 2004.

Hayun M, Naor Y, Weil M, Albeck M, Peled A, Don J, Haran-Ghera N, Sredni B. The immunomodulator AS101 induces growth arrest and apoptosis in multiple myeloma: association with the Akt/survivin pathway. *Biochem Pharmacol.* 2006 Nov 30;72(11):1423-31.

Henry L, Labied S, Fransolet M, Kirschvink N, Blacher S, Noel A, Foidart JM, Nisolle M, Munaut C. Isoform 165 of vascular endothelial growth factor in collagen matrix improves ovine cryopreserved ovarian tissue revascularisation after xenotransplantation in mice. *Reprod Biol Endocrinol.* 2015 Mar 7;13:12.

Henry L, Fransolet M, Labied S, Blacher S, Masereel MC, Foidart JM, Noel A, Nisolle M, Munaut C. Supplementation of transport and freezing media with anti-apoptotic drugs improves ovarian cortex survival. *J Ovarian Res.* 2016 Feb 12;9:4. doi: 10.1186/s13048-016-0216-0.

HSUEH, A. J.; KAWAMURA, K.; CHENG, Y.; FAUSER, B. C. Intraovarian control of early folliculogenesis. **Endocr Rev**, 36, n. 1, p. 1-24, Feb 2015.

Israely T, Dafni H, Granot D, Nevo N, Tsafiriri A, Neeman M. Vascular remodeling and angiogenesis in ectopic ovarian transplants: a crucial role of pericytes and vascular smooth muscle cells in maintenance of ovarian grafts. *Biol Reprod.* 2003 Jun;68(6):2055-64.

Jadoul P, Guilmain A, Squifflet J, Luyckx M, Votino R, Wyns C, Dolmans MM. Efficacy of ovarian tissue cryopreservation for fertility preservation: lessons learned from 545 cases. *Hum Reprod.* 2017 May 1;32(5):1046-1054.

Junqueira, L; Carneiro, C. *Histologia Básica*. Editora Guanabara Koogan S.A. (10° Ed), 2004

Kalechman Y, Albeck M, Oron M, Sobelman D, Gurwith M, Horwith G, Kirsch T, Maida B, Sehgal SN, Sredni B. Protective and restorative role of AS101 in combination with chemotherapy. *Cancer Res.* 1991 Mar 1;51(5):1499-503.

Kalich-Philosoph L, Roness H, Carmely A, Fishel-Bartal M, Ligumsky H, Paglin S, Wolf I, Kanety H, Sredni B, Meirow D. Cyclophosphamide triggers follicle activation and "burnout"; AS101 prevents follicle loss and preserves fertility. *Sci Transl Med.* 2013 May 15;5(185):185ra62.

Kawamura K, Cheng Y, Suzuki N, Deguchi M, Sato Y, Takae S, Ho CH, Kawamura N, Tamura M, Hashimoto S, Sugishita Y, Morimoto Y, Hosoi Y, Yoshioka N, Ishizuka B, Hsueh AJ. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Oct 22;110(43):17474-9.

KIM, S. S. Assessment of long term endocrine function after transplantation of frozen-thawed human ovarian tissue to the heterotopic site: 10 year longitudinal

follow-up study. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, 29, n. 6, p. 489-493, Jun 2012.

Kim SS, Donnez J, Barri P, Pellicer A, Patrizio P, Rosenwaks Z, Nagy P, Falcone T, Andersen C, Hovatta O, Wallace H, Meirow D, Gook D, Kim SH, Tzeng CR, Suzuki S, Ishizuka B, Dolmans MM. Recommendations for fertility preservation in patients with lymphoma, leukemia, and breast cancer. *J Assist Reprod Genet.* 2012 Jun;29(6):465-8.

Kristensen SG, Giorgione V, Humaidan P, Alsbjerg B, Bjørn AB, Ernst E, Andersen CY. Fertility preservation and refreezing of transplanted ovarian tissue- a potential new way of managing patients with low risk of malignant cell recurrence. **Fertil Steril.** 2017 May;107(5):1206-1213.

KURIEN, B. T.; SCOFIELD, R. H. Western blotting. **Methods**, 38, n. 4, p. 283-293, Apr 2006.

Friedman O, Orvieto R, Fisch B, Felz C, Freud E, Ben-Haroush A, Abir R. Possible improvements in human ovarian grafting by various host and graft treatments. *Hum Reprod.* 2012 Feb;27(2):474-82.

LABIED, S.; DELFORGE, Y.; MUNAUT, C.; BLACHER, S. *et al.* Isoform 111 of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF(111)) Improves Angiogenesis of Ovarian Tissue Xenotransplantation. **Transplantation**, 95, n. 3, p. 426-433, Feb 15 2013.

LEE, S. J.; SCHOVER, L. R.; PARTRIDGE, A. H.; PATRIZIO, P. *et al.* American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. **Journal of Clinical Oncology**, 24, n. 18, p. 2917-2931, Jun 20 2006.

LEKOVICH, J.; LOBEL, A. L.; STEWART, J. D.; PEREIRA, N. *et al.* Female patients with lymphoma demonstrate diminished ovarian reserve even before initiation of chemotherapy when compared with healthy controls and patients with other malignancies. **J Assist Reprod Genet**, Mar 2016.

LOPEZ-NEBLINA, F.; TOLEDO-PEREYRA, L. H. Phosphoregulation of signal transduction pathways in ischemia and reperfusion. **Journal of Surgical Research**, 134, n. 2, p. 292-299, Aug 2006.

LOREN, A. W.; MANGU, P. B.; BECK, L. N.; BRENNAN, L. *et al.* Fertility Preservation for Patients With Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update. **Journal of Clinical Oncology**, 31, n. 19, p. 2500-+, Jul 1 2013.

Man L, Park L, Bodine R, Ginsberg M, Zaninovic N, Schattman G, Schwartz RE, Rosenwaks Z, James D. Co-transplantation of Human Ovarian Tissue with Engineered Endothelial Cells: A Cell-based Strategy Combining Accelerated Perfusion with Direct Paracrine Delivery. *J Vis Exp*. 2018 May 16;(135).

MAKKER, A.; GOEL, M. M.; MAHDI, A. A. PI3K/PTEN/Akt and TSC/mTOR signaling pathways, ovarian dysfunction, and infertility: an update. **Journal of Molecular Endocrinology**, 53, n. 3, p. R103-R118, Dec 2014.

NISOLLE, M.; CASANAS-ROUX, F.; QU, J. P.; MOTTA, P. *et al.* Histologic and ultrastructural evaluation of fresh and frozen-thawed human ovarian xenografts in nude mice. **Fertility and Sterility**, 74, n. 1, p. 122-129, Jul 2000.

OKTAY, K; TÜRKÇÜOĞLU, I; RODRIGUEZ-WALLBERG, KA. Four spontaneous pregnancies and three live births following subcutaneous transplantation of frozen banked ovarian tissue: what is the explanation? **Fertil Steril**. 2011 Feb;95(2):804.e7-10.

ROSENDAHL, M.; SCHMIDT, K. T.; ERNST, E.; RASMUSSEN, P. E. *et al.* Cryopreservation of ovarian tissue for a decade in Denmark: a view of the technique. **Reproductive Biomedicine Online**, 22, n. 2, p. 162-171, Feb 2011.

Ruan W, Lai M. Actin, a reliable marker of internal control? Clin Chim Acta. 2007 Oct;385(1-2):1-5. Epub 2007 Jul 14. Review.

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2012. **CA Cancer J Clin**, 62, n. 1, p. 10-29, 2012 Jan-Feb 2012.

SMITH, G. D.; SERAFINI, P. C.; FIORAVANTI, J.; YADID, I. *et al.* Prospective randomized comparison of human oocyte cryopreservation with slow-rate freezing or vitrification. **Fertil Steril**, 94, n. 6, p. 2088-2095, Nov 2010.

Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med*. 2005 Jan-Mar;9(1):59-71. Review.

SREDNI, B.; CASPI, R. R.; KLEIN, A.; KALECHMAN, Y. *et al.* A NEW IMMUNOMODULATING COMPOUND (AS-101) WITH POTENTIAL THERAPEUTIC APPLICATION. **Nature**, 330, n. 6144, p. 173-176, Nov 12 1987.

Sredni B, Tichler T, Shani A, Catane R, Kaufman B, Strassmann G, Albeck M, Kalechman Y. Predominance of TH1 response in tumor-bearing mice and cancer patients treated with AS101. *J Natl Cancer Inst*. 1996 Sep 18;88(18):1276-84.

Sredni B, Weil M, Khomenok G, Lebenthal I, Teitz S, Mardor Y, et al. Ammonium trichloro (dioxoethylene-o,o')tellurate (AS101) sensitizes tumors to chemotherapy by inhibiting the tumor interleukin 10 autocrine loop. *Cancer Res* 2004;64:1843–52

SUZUKI, N.; YOSHIOKA, N.; TAKAE, S.; SUGISHITA, Y. *et al.* Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency. **Human Reproduction**, 30, n. 3, p. 608-615, Mar 2015.

Takeuchi A, Koga K, Satake E, Makabe T, Taguchi A, Miyashita M, Takamura M, Harada M, Hirata T, Hirota Y, Yoshino O, Wada-Hiraike O, Fujii T, Osuga Y. Endometriosis Triggers Excessive Activation of Primordial Follicles via PI3K-PTEN-Akt-Foxo3 Pathway. J Clin Endocrinol Metab. 2019 Nov 1;104(11):5547-5554. doi: 10.1210/jc.2019-00281.

TING, A. Y.; YEOMAN, R. R.; LAWSON, M. S.; ZELINSKI, M. B. In vitro development of secondary follicles from cryopreserved rhesus macaque ovarian tissue after slow-rate freeze or vitrification. **Hum Reprod**, 26, n. 9, p. 2461-2472, Sep 2011.

Van Eyck AS, Jordan BF, Gallez B, Heilier JF, Van Langendonckt A, Donnez J. Electron paramagnetic resonance as a tool to evaluate human ovarian tissue reoxygenation after xenografting. Fertil Steril. 2009 Jul;92(1):374-81.

WALLACE, W. H.; THOMSON, A. B.; SARAN, F.; KELSEY, T. W. Predicting age of ovarian failure after radiation to a field that includes the ovaries. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, 62, n. 3, p. 738-744, Jul 2005.

Wang L, Ying YF, Ouyang YL, Wang JF, Xu J. VEGF and bFGF increase survival of xenografted human ovarian tissue in an experimental rabbit model. J Assist Reprod Genet. 2013 Oct;30(10):1301-11.

Yang H, Lee HH, Lee HC, Ko DS, Kim SS. Assessment of vascular endothelial growth factor expression and apoptosis in the ovarian graft: can exogenous

gonadotropin promote angiogenesis after ovarian transplantation? Fertil Steril.
2008 Oct;90(4 Suppl):1550-8.

Anexo I

Protocol preview

PI: James, Daylon J
Number: 2014-0008
Title: Assessment of Angiogenic and Hematopoietic Tissues in Mouse

General

01 Title
 Assessment of Angiogenic and Hematopoietic Tissues in Mouse

Personnel

PE.01 Protocol personnel

User	Institution
James, Daylon J Email: dj2001@med.cornell.edu Phone:	WCMC
Blodgett, Anika Email: anb2073@med.cornell.edu Phone:	WCMC
Karipcin, Fethiye Sinem Email: fsk9002@med.cornell.edu Phone:	WCMC
Lis, Raphael Email: ral2020@med.cornell.edu Phone:	WCMC
Man, Limor Email: lim2030@med.cornell.edu Phone:	WCMC
Reichman, David Eric Email: der2005@med.cornell.edu Phone:	WCMC
Stubbs, Rodriq E. Email: res2011@med.cornell.edu Phone:	WCMC
Wen, Duancheng Email: duw2001@med.cornell.edu Phone:	WCMC
Zaninovic, Nikica Email: nizanin@med.cornell.edu Phone:	WCMC

PE.02 Personnel entitlements

Personnel on protocol	Contact person	Permission to edit	Animal requisitioner	Animal user
James, Daylon J	✓	✓	✓	✓
Blodgett, Anika	✓		✓	✓
Karipcin, Fethiye Sinem				✓
Lis, Raphael				✓
Man, Limor			✓	✓
Reichman, David Eric		✓	✓	✓
Stubbs, Rodriq E.		✓		
Wen, Duancheng			✓	✓
Zaninovic, Nikica			✓	✓

Anexo II

Daylon James, Ph.D.

Assistant Professor, Department of Reproductive Medicine

Director, Clinical Endocrine Laboratory, Center for Reproductive Medicine

Manager, Tri-Institutional Stem Cell Derivation Laboratory

March 31, 2017

Declaration

I declare that Dr. Alexandre Lobel performed his research fellowship from December 12, 2014 until December 11, 2015 at Weill Cornell Medicine in New York under my supervision. He carried out the research project "Transient Akt inhibition mitigates premature follicular mobilization in transplanted ovarian tissue" (in portuguese *"Efeitos da inibição da via PI3K/PTEN/Akt no recrutamento folicular após transplante de enxerto ovariano criopreservado"*) and is authorized to use the data resulting from this study for publication, in scientific presentation, post graduation and for future research.

Sincerely,

Daylon James
Principal Investigator
Assistant Professor of Stem Cell Biology
Center for Reproductive Medicine
Weill Cornell Medicine

515 East 71st Street, S501, New York, NY 10065 | T. 212.746.3173 | C. 917.545.0893 | F. 212.746.8871 | djj2001@med.cornell.edu

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Amalido, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada **“Efeitos da inibição da via PI3K/PTEN/Akt no recrutamento folicular após transplante de enxerto ovariano criopreservado”**, registrada com o nº 035/17, sob a responsabilidade de **Paulo Cesar Serafini e Alexandre Likier Steinberg Lobel**, apresentada pelo Departamento de Obstetrícia e Ginecologia - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em 31.03.17

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 01-01-2016 Término: 10-12-2016
Espécie/linhagem/raça	Não se aplica
Nº de animais	Não se aplica
Peso/Idade	Não se aplica
Sexo	Não se aplica
Origem	Não se aplica

CEUA-FMUSP, 31 de Março de 2017

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua.fm@usp.br

Anexo IV – Contagem folicular após 14 dias de transplante, com e sem exposição prévia ao AS101

	CONTROL						AS101				
Camundongo	Total	Primordial	Crescimento	Em	Taxa de recrutamento (%)	Porcentagem de primordiais(%)	Total	Primordial	Em Crescimento	Taxa de recrutamento (%)	Porcentagem de primordiais (%)
1	386	215	171		44,30	55,70	433	310	123	28,41	71,59
2	206	120	86		41,75	58,25	165	102	63	38,18	61,82
3	143	92	51		35,66	64,34	165	124	41	24,85	75,15
4	238	138	100		42,02	57,98	276	186	90	32,61	67,39
5	288	139	149		51,74	48,26	387	236	151	39,02	60,98
6	201	98	103		51,24	48,76	189	110	79	41,80	58,20
TOTAL	1462	802	660		45,14	54,86	1615	1068	547	33,87	66,13
Média	243,667	133,67	110		44,45	55,55	269,17	178	91,17	34,14	65,86
Desvio Padrão	84,41	44,40	43,47		6,16	6,16	117,39	82,67	40,13	6,64	6,64