

## Órgão Responsável pelo Bem-Estar dos Animais | ORBEA

Instituto de Investigação Clínica e Biomédica de Coimbra (iCBR) | Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC)

### Partilha de informação sobre investigação envolvendo animais (no âmbito do Acordo de Transparência sobre a Investigação Animal em Portugal que o iCBR subscreveu)

#### 1. INVESTIGADOR RESPONSÁVEL:

<b>Nome completo:</b>	Maria Filomena Rabaça Roque Botelho
<b>Função/cargo:</b>	Professora catedrática
<b>Instituição de origem:</b>	Instituto de Biofísica, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
<b>E-mail:</b>	mfbotelho@fmed.uc.pt

#### 2. DETALHES DO PROJETO:

<b>Título:</b>	Preservação do Potencial Reprodutivo na Doente Oncológica: Estimulação da Angiogénesis do Enxerto de Tecido Ovárico Criopreservado
<b>Data de início:</b>	Setembro de 2016
<b>Data de término:</b>	Setembro de 2021
<b>Principais objetivos:</b>	O objetivo deste trabalho é estudar estratégias para promover a angiogénesis precoce do enxerto de tecido ovárico após criopreservação, diminuindo a perda de folículos e otimizando a função e a duração do enxerto. Pretendemos avaliar a ação de fatores angiogénicos, como VEGF, bFGF, hMG e simvastatina, em diferentes associações, bem como em diferentes fases do processo de criopreservação e transplante.

### **3. IMPACTO ESPERADO (OU JÁ ALCANÇADO):**

<b>Potenciais benefícios para o homem (ou para outros seres) e/ou para a sociedade em geral:</b>	Tal como referido, este projeto pretende contribuir para a preservação da fertilidade de doentes oncológicas. A criopreservação de tecido ovárico, antes da terapêutica oncológica e o seu ulterior transplante, tem-se revelado uma técnica promissora para estas doentes já que após o transplante do tecido ovárico é possível repor a função endócrina e a fertilidade, possibilitando a conceção natural. No entanto, uma das limitações desta técnica é a perda de mais de 50% dos folículos primordiais, que ocorre predominantemente nos primeiros 5 dias após o transplante, devido à isquemia que se verifica até ser estabelecida a revascularização do enxerto. A estratégia que se propõe é estimular a angiogéneses, reduzindo o tempo de isquemia, com consequente melhoria da sobrevivência dos folículos ováricos e da função endócrina, através da utilização de fatores angiogénicos, VEGF, bFGF, hMG e simvastatina, em diferentes associações, bem como em diferentes fases do processo de criopreservação e posterior transplante. O estudo com animais, no desenvolvimento destas estratégias, é fundamental para avaliar a eficácia da terapêutica <i>in vivo</i> e definir o protocolo de tratamento.
<b>Resultados já alcançados:</b>	Numa primeira fase foi utilizado tecido ovárico de rato com o tratamento <i>in vitro</i> durante 4 horas com fatores angiogénicos, como VEGF (fator de crescimento vascular endotelial), bFGF (fator de crescimento fibroblástico básico) e gonadotropina menopáusica humana (hMG). A criopreservação e cultura de 4 horas não parecem afetar o tecido, validando os procedimentos atualmente utilizados na clínica. Os resultados obtidos corroboraram o efeito da hMG na manutenção dos folículos e estroma. A suplementação em cultura com fatores angiogénicos permite iniciar o processo de angiogéneses, o que permitirá melhorar a função e duração do transplante de tecido ovárico. Posteriormente avaliado de

que forma um produto comercial composto por 40% de mel esterilizado de uso médico (MGH; Medical Grade Honey), pode contribuir para melhorar o suporte vascular e o pool de folículos em tecido ovárico de bovino (modelo animal). O MGH foi previamente testado pelo nosso grupo in vitro, tendo apresentado resultados promissores no incremento da densidade de células endoteliais no tecido ovárico cortical de bovino (TOCB). Nesta fase do projeto, os fragmentos de TOCB previamente distribuídos em 4 grupos diferentes de meio de cultura (Controlo, VEGF, MGH e Vitamina D) e incubados durante 48h, serão posteriormente transplantados em ratos imunodeprimidos (estudo in vivo), recuperados após 7 e/ou 28 dias. Os tratamentos com MGH in vitro e in vivo mostraram a maior capacidade de estimulação angiogénica (Fator VIII) e estimulação da proliferação celular (Ki-67). Uma recuperação na expressão gênica dos genes CYP11A1 (esteroidogénese) e AMHR2 (reserva ovariana) no grupo MGH in vivo também foi observada após 28 dias do transplante. Nenhum dos procedimentos está completo

#### **4. APLICAÇÃO DO PRINCÍPIO DOS 3R's:**

##### **Replacement (Substituição)**

Refira a razão por que precisa utilizar animais e por que não pode usar alternativas não-animais:

A utilização de animais é absolutamente necessária e fundamental para atingir os objetivos estabelecidos no projeto, devido ao microambiente in vitro e in vivo do tecido ovárico que influencia os processos.

##### **Reduction (Redução)**

Explique como garantirá que serão utilizados os números mínimos de animais:

O número de animais previsto é o estritamente necessário à realização do projeto, de modo a obter significância científica.

##### **Refinement (Refinamento)**

Todos os procedimentos classificados como moderados

Explique por que razão o animal/modelo que escolheu é o mais adequado para este estudo e que medidas tomou para minimizar os potenciais danos ao seu bem-estar:

serão seguidos de analgesia. Os animais serão mantidos em gaiolas individualmente ventiladas com as dimensões apropriadas e com comida e agua ad libitum. As gaiolas estarão numa sala com controlo automático dos ciclos luz/escuro (12/12h) e também da temperatura (22°C). O ruido dentro da sala será evitado ao máximo e será feita uma monitorização diária do bem-estar dos animais.