



Universidade Federal do Pará
Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental
Universidade Federal Rural da Amazônia

Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Luana de Nazaré da Silva Santana

Expressão gênica e viabilidade de folículos pré-antrais submetidos à vitrificação do
córtex ovariano de *Sapajus apella* (macacas-prego)

Belém
2012

Luana de Nazaré da Silva Santana

Expressão gênica e viabilidade de folículos pré-antrais submetidos à vitrificação do córtex ovariano de *Sapajus apella* (macacas-prego)

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.

Área de concentração: Produção Animal.

Orientadora: Profª. Dra. Regiane Rodrigues dos Santos.

Co-orientadora: Profª. Dra. Sheyla Farhayldes Souza Domingues.

Belém

2012

Luana de Nazaré da Silva Santana

Expressão gênica e viabilidade de folículos pré-antrais submetidos à vitrificação do córtex ovariano de *Sapajus apella* (macacas-prego)

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.

Área de concentração: Produção Animal.

Data da aprovação: Belém - Pa ___/___/___

Banca Examinadora

Prof^a Dr^a Sheyla Farhayldes Souza Domingues
Faculdade de Medicina Veterinária – UFPA
Co-orientadora e Presidente

Prof. Dr. Moysés dos Santos Miranda
Instituto de Ciências Biológicas - UFPA
Membro titular

Prof. Dr. Sandro Percario
Instituto de Ciências Biológicas - UFPA
Membro titular

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) –
Biblioteca Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural / UFPA, Belém-PA**

Santana, Luana de Nazaré da Silva

Expressão gênica e viabilidade de folículos pré-antrais submetidos à vitrificação do córtex ovariano de *Sapajus apella* (macacas-prego) / Luana de Nazaré da Silva Santana: orientadora, Regiane Rodrigues dos Santos; co-orientadora, Sheyla Farhayldes Souza Domingues - 2012.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Pará, Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Belém, 2012.

1. Macaco-prego - Reprodução. 2. Criopreservação de órgãos, tecidos, etc. 3. Reprodução animal. I. Título. Título

CDD – 22.ed. 636.982

AO MEU PAI

*Por toda sua sabedoria, paciência e sempre
acreditar na minha capacidade.*

À MINHA MÃE

*Por me inspirar a buscar sempre
dar o meu melhor.*

AOS MEUS IRMÃOS

*Pelo incentivo e por me fazerem sorrir
sempre que eu precisava.*

À VOCÊ

*Por estar lendo este trabalho em busca da conquista
de seus próprios sonhos como assim um dia eu também o fiz...*

Luana de Nazaré da Silva Santana

AGRADECIMENTOS

A antes de tudo a Deus, pois sem ele não somos nada. Agradeço a Ele também por colocar em minha vida todas as oportunidades e desafios que tive de enfrentar, pois elas me levaram a conhecer essas pessoas tão especiais, maravilhosas e de tamanhas qualidades que me faltam palavras para descrever todo apreço que tenho por todas elas, e sem as quais nada disso seria possível.

Sou imensamente grata à minha família que sempre esteve ao meu lado torcendo por mim a cada passo, comemorando cada acerto e me apoiando em todas as minhas decisões. Obrigada por toda dedicação, todo o apoio que me foi dado e toda confiança que foi depositada em minha capacidade, mesmo quando os obstáculos pareciam difíceis demais para serem superados. Vocês são os maiores responsáveis por mais esta vitória, a minha motivação, a minha força, o meu tudo... amo vocês.

Às minhas orientadoras Dra. Regiane Rodrigues dos Santos e Dra. Sheyla Farhayldes Souza Domingues, primeiramente, por uma orientação e competência sem igual e por todo conhecimento repassado. Mas acima de tudo por se fazerem sempre presentes (fisicamente ou não) a cada avanço dado durante a execução e elaboração do projeto.

Agradeço ainda às minha orientadores pela oportunidade de ter podido atuar junto ao Laboratório de Biologia e Medicina de Animais Silvestres da Amazônia (BIOMEDAM) e as pessoas incríveis que dele fazem parte: Adriel, Yago, Sarah, Elizabet, Márcia, Karolzinha, Débora, Stefânia, Danuza, Julianne e Danielle. Obrigada por compartilharem de suas experiências e conhecimento para a construção do meu próprio durante a concretização de mais esta etapa da minha vida.

O meu muito obrigada ao grupo de pesquisa do Laboratório de Fertilização *in vitro* (LABFIV). Ao Prof. Dr. Otávio Mitio Ohashi e ao Prof. Dr. Moysés dos Santos Miranda pela

disponibilidade e espaço fornecido para a realização dos experimentos. Que este vínculo e colaboração continue crescendo sempre!

À pessoas maravilhosas do Centro Nacional de Primatas (CENP) por todo auxílio e apoio. Não somente os funcionários da clínica, mas também os do laboratório e tratadores que sempre estavam conosco. E é claro que também aos animais experimentais por, sem nem mesmo saber, contribuíram imensamente para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Rossineide Martins da Rocha, do Laboratório de Ultraestrutura Celular na UFPA, muito obrigada por ter me recebido novamente no seu laboratório. Desde a graduação a senhora sabe bem o quanto eu tenho buscado por isso desde o início. Aos integrantes do seu laboratório por todo carinho e companheirismo durante todo o período em que estive com vocês: Yvana, Ayane, Tainá, Lia, Jean, Leonardo, Carol Borges, Carol Montes, Fabrícia e Liziane.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto Evandro Chagas da Almirante Barroso e em especial ao prof. Dr. José Antônio Picanço Diniz Júnior pela contribuição, paciência e conhecimentos repassados, e sem é claro esquecer do agora farmacêutico Fernando Lameira. Muito obrigada por todos os conselhos e pela força

Ao Prof. Dr. Sandro Percário por toda colaboração e ajuda concedida e ao Laboratório de Toxicologia (LATOX) na faculdade de farmácia (UFPA) e aos seus alunos pelo apoio.

À todos os profissionais que participaram ativamente da minha formação profissional. E finalmente agradeço a Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) pelo apoio financeiro durante o mestrado que possibilitaram uma experiência e aprendizado sem igual e ao qual poucos têm oportunidade.

“Lute com determinação, abrace a vida com paixão, perca com classe e vença com ousadia, por que a vida é muito para ser insignificante.”

Charles Chaplin.

RESUMO

A vitrificação é uma biotécnica que tem se mostrando cada vez mais promissora em várias espécies, dentre elas ruminantes domésticos (como ovelhas, cabras e vacas), e em primatas não humanos (PNH) (como o cynomologus e rhesus), e consiste na redução ultra-rápida da temperatura mediante a presença de altas concentrações de agentes crioprotetores (ACP's) em nitrogênio líquido. Desta forma o objetivo deste estudo foi o desenvolvimento de uma metodologia de criopreservação por vitrificação de Folículos Ovarianos Pré-antrais (FOPA's) em *Sapajus apella*. Para tanto, foram utilizadas fêmeas (n=9) adultas de *Sapajus apella* pertencentes ao plantel do Centro Nacional de Primatas (CENP). Foram realizadas coletas de cortéx de tecido ovariano por meio de laparotomia exploratória de modo a não inviabilizar o animal reprodutivamente. Os fragmentos expostos à 8 tratamentos diferentes: Etilenoglicol (EG) 40% + Sacarose (Sac) 0,5 M dissolvidos em TCM-199 adicionados ou não de Selênio (2,5, 5 ou 10 ng/ml) ou Trolox (25, 50 ou 100 mM). Após a exposição aos agentes crioprotetores foi analisada a viabilidade folicular antes e após a vitrificação, a partir da morfologia folicular, expressão dos genes Hsp70, Erp29, Erp60 e Sod1 através da análise por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), além de realizar a dosagem de estresse oxidativo através da TEAC (do inglês *Total Equivalent Antioxidant Activity*). As análises mostraram que a vitrificação permitiu a manutenção da viabilidade folicular mediante a exposição prévia a elevadas concentrações de ACP's, principalmente quando suplementados com trolox a 50 µM (que resultou em elevadas taxas de sobrevivência folicular) e aumento na expressão da enzima antioxidante Sod1. Enquanto na ausência do mesmo foi observado o aumento nas taxas de folículos degenerados e com vacuolização citoplasmática, além da redução na expressão da enzima antioxidante Sod1 e elevação da expressão da chaperona Erp29.

Palavras-chave: *Sapajus apella*. Vitrificação. Agente Crioprotetor (ACP's). PCR, Antioxidante.

ABSTRACT

Vitrification is a biotech that has been increasingly showing promise in several species, among them domestic ruminants (such as sheep, goats and cows) and in nonhuman primates (NHP) (as cynomologus and rhesus), and consists in reducing ultra-rapid temperature by the presence of high concentrations of cryoprotective agents (PCA's) in liquid nitrogen. Thus the aim of this study was to develop a methodology for cryopreservation by vitrification of pre-antral follicles (PF's) in *Sapajus apella*. For this purpose, we used females (n = 9) adult *Sapajus apella* squad belonging to the National Primate Center (CENP). Samples were taken from the ovarian cortex by laparotomy so as not to destabilize the animals reproducibly. The fragments exposed to 8 different treatments: Ethylene glycol (EG) + 40% Sucrose (Sac) dissolved in 0.5 M TCM-199, added to Selenium (2,5, 5 or 10 ng / ml) or Trolox (25, 50 or 100 mM). Following exposure to cryoprotective agents was analyzed follicular viability before and after vitrification, from the follicular morphology, expression of Hsp70 genes, Erp29, Erp60 SOD1 and through the analysis by Polymerase Chain Reaction (PCR), in addition to performing measurement of oxidative stress thru the TEAC (English Total Equivalent Antioxidant Activity). The analyzes showed that vitrification allowed the maintenance of follicular viability by previous exposure to concentrations of ACP's alevadas, especially when supplemented with 50 mM trolox (which resulted in high follicular survival rates) and increased expression of the antioxidant enzyme SOD1. While in the absence of it was observed an increase in rates of follicles degenerate and vacuolated, and reduced expression of the antioxidant enzyme SOD1 and increased expression of chaperone Erp29.

Key-words: *Sapajus paella*. Vitrification. Cryoprotective Agents (ACP's), PCR, Antioxidant.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1: Classificação das principais etapas da foliculogênese em mamíferos. (Fonte: Modificada de EDSON; NAGARAJA; MATZUK, 2009)..... 23
- Figura 2: Apresentação das diferentes categorias de folículos ovarianos de *S. apella*, em diferentes estágios morfológicos, analisados histologicamente. Onde primordial (PR); transição (TR); primário (PA); Secundário (SC); poliovular (PO); antral (AN); células da teca (TC). A, B, C, D, E (x400) e F (x100). (Fonte: DOMINGUES *et al.*, 2004)..... 24
- Figura 3: Durante o processo de desenvolvimento folicular muitos dos folículos recrutados findam por entrar em processo apoptótico. Isto pode ocorrer tanto na fase pré-antral (folículo primário, F-1º, e folículo secundário, F-2º), como na antral (folículo terciário, F-3º), em consequência da apoptose nas células da granulosa (CG). (Fonte: Modificada de MATSUDA-MINEHATA *et al.*, 2006)..... 26
- Figura 4: Mecanismo de neutralização de ROS por ação da enzima Superóxido Dismutase 1 (Sod1). O_2^- , radical superóxido; H_2O_2 , Peróxido de Hidrogênio; O_2 , Oxigênio; H_2O , Água; H^+ , Cátion Hidrogênio; GSH, Glutathiona Reduzida; GSSH, Glutathiona Oxidada; GSH-Px, Glutathiona Peroxidase; SOD, Superóxido desmutase. (Fonte: MOREIRA, 2010)..... 32
- Figura 5: Apresentação de representantes da espécie *Sapajus apella* (macaco-prego) em um momento de socialização..... 54
- Figura 6: Instrumentais utilizados execução da biópsia ovariana. Pinça Oftálmica do tipo Conjuntiva (em 1) com micro dente de rato. Lâmina cirúrgica (número 15) (em 2). E por ultimo a lupa de Pala (em 3). Acessado em 12 de fevereiro de 2011..... 59
- Figura 7: Disposição das Biópsias em placa de petri de vidro esterilizada. Na porção superior (setas em branco) fragmentos de tecido cortical ovariano a serem fracionadas e logo abaixo as frações para a realização do procedimento de exposição aos agentes crioprotetores como descrito no Experimento II..... 60
- Figura 8: Delineamento experimental das Fases I e II..... 60
- Figura 9: Distribuição dos grupos experimentais com suas respectivas soluções de exposição com ou sem os antioxidantes em suas respectivas concentrações.....61

- Figura 10: Desenho esquemático da vista lateral da caixa térmica desenvolvida durante o projeto para a realização do processo de vitrificação..... 62
- Figura 11: Sequência de primers desenvolvidos e validados no presente projeto..... 64
- Figura 12: Percentual do FOPA's morfologicamente normais nos fragmentos ovarianos dos seguintes grupos: controle; TCM 199; EG; EG somados à selênio (2,5, 5 ou 10 ng/ml) ou trolox (25 μ M, 50 μ M ou 100 μ M). ^{a,b} letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0.05$)..... 74
- Figura 13: Secções histológicas representando um folículo pré-antral morfologicamente normal (a), e folículos pré-antrais degenerados (b-d). Folículos normais apresentavam núcleo central (Nu), ooplasma intacto (Oo) e células da granulosa normais (GC). Folículos degenerados apresentavam núcleo picnótico (PN), células da granulosa desorganizadas (dGC), acompanhadas ou não da presença de vacúolos citoplasmáticos no oócito (Vc)..... 75
- Figura 14: Em (A) e (C) eletromicrografia de cortes do fragmento controle sem qualquer tipo de tratamento e em (B) e (D) eletromicrografia exibindo as alterações como a vacuolização (tanto em células da granulosa como no citoplasma do oócito) encontradas no fragmento tratado com Trolox a 50 μ M (A e B, 3000x; e C e D 7000x). G, Célula da Granulosa; V, Vacúolo; n, Núcleo da Célula da Granulosa; N, Núcleo do Oócito; *, Vacúolo em Célula da Granulosa; CO, Citoplasma do Oócito; ST, Célula do Estroma; m e \triangleright , Mitocôndria; \blacktriangleright , Cromatina Nuclear; \Leftrightarrow , Gotas Lipídicas..... 76
- Figura 15: Gráfico comparativo da expressão gênica dos genes Sod1, Hsp70, Erp29 e Erp60 em tecido ovariano de *S. apella* dos grupos controle, exposto ao TCM apenas, ou exposto ao EG, sozinho ou associado a selênio ou trolox. Valores do controle foram normalizados para 1. ^{a-c} indicam diferença entre os tratamentos ($P < 0,05$)..... 77
- Figura 16: Percentual de FOPA's normais antes (controle) e após a criopreservação (Vitrificação) na presença de trolox a 50 μ M (EG + trolox) e na ausência de antioxidante (EG)..... 78
- Figura 17: Fotomicrografia de FOPA's vitrificados após o processo de aquecimento corados em HE. Em (A) temos a apresentação de folículos primordiais de um fragmento expostos ao Tratamento 2 (TCM + Sacarose + Etilenoglicol) onde é possível observar a intensa vacuolização do ooplasma. Já na presença do crioprotetor Trolox

a 50 μM em (B) os FOPA's exibem uma reduao significativa desta alteraao ap3s a vitrificaao e aquecimento (A e B, escala 50 μm). V, Vac3olo no citoplasma oocit3rio..... 78

Figura 18: Comparaao da capacidade antioxidante relative em tecido ovariano criopreservado (congelaaao lenta ou vitrificaao) e cultivado in vitro em meio suplementado com BME, BMP4 e PMSG. ^{a,b} Indicam diferena significativa entre o controle e entre os tratamentos ($P < 0,05$)..... 79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
ACP	Agente Crioprotetor
AN	Folículo Antral
ATP	Adenosina trifosfato
BGA	Banco de Germoplasma Animal
BMP-4, 7 e 15	Proteínas Morfogênicas Ósseas-4, 7 e 5 (<i>Bone Morphogenetic Protein-4, 7 e 5</i>)
Ca ⁺²	Cálcio
CCO	<i>Complexo-cumulus-oophorus</i>
CENARGEN	Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CG	Célula da Granulosa
CGP's	Células Germinativas Primordiais
cm	Centímetros
CENP	Centro Nacional de Primatas
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
dGC	Células da Granulosa Desorganizadas
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EG	Etilenoglicol
EGF	Fator de crescimento (<i>Epidermal Growth Factor</i>)
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EO	Estresse Oxidativo
Erp29	Proteína do Retículo Endoplasmático 29 (do inglês <i>Endoplasmic Reticulum Protein 29</i>)
Erp60	Proteína do Retículo Endoplasmático 60 (do inglês <i>Endoplasmic Reticulum Protein 60</i>)
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FOPA	Folículo Ovariano Pré-antral
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GC	Célula da Granulosa
GDF-9	Fator de Crescimento e Diferenciação-9 (<i>Growth Factor-9</i>)

GSH-Px	Glutathiona Peroxidase
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HC	Histologia Clássica
Hsp70	Proteína de Choque Térmico (do inglês <i>Heat Shock Proteins 70</i>)
IA	Inseminação artificial
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICSI	Injeção intracitoplasmática de espermatozoides (<i>Intracitoplasmatic sperm injection</i>)
IGF-1	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina tipo 1 (<i>Insulin Growth Factor-1</i>)
KL	Kit-ligante
LH	Hormônio Luteinizante
LIF	Fator Inibidor de Leucemia
Min	Minutos
MEC	Matriz Extra Celular
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mL	Mililitros
mm	Milímetros
MO	Microscopia Óptica
MOIFOPA	Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais
Nu	Núcleo Central
O ₂	Oxigênio
O ₂ ⁻	Radical Superóxido
Oo	Ooplasma
PA	Folículo Primário
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PN	Núcleo Picnótico
PNH	Primatas não humanos
PO	Folículo Poliovular

PR	Folículo Primordial
RE	Retículo Endoplasmático
RNAM	Ácido Ribonucleico Mensageiro
ROS	Formas Reativas de Oxigênio (do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>)
Sac	Sacarose
SC	Folículo Secundário
SIDA	Síndrome da Imuno Deficiência Adquirida
SOD	Superóxido desmutase
Sod1	Superóxido Dismutase 1
SV	Solução de Vitrificação
TC	Células da Teca
TCM-199	Meio de cultivo de tecido (<i>Tissue Culture Medium 199</i>)
TGF- β	Fator de Crescimento Tumoral- β (<i>Transforming Growth Factor-β</i>)
TR	Folículo Transição
V	Vacúolo
VC	Vacúolos Citoplasmáticos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	19
2.1. OBJETIVOS GERAIS.....	19
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1. O OVÁRIO DE MAMÍFEROS.....	20
3.1.1. Oogênese.....	20
3.1.2. Foliculogênese.....	22
3.1.3. Biotécnica MOIFOPA.....	26
3.1.4. Criopreservação de FOPA's.....	27
3.1.5. Vitrificação de tecido ovariano em espécies domésticas e primatas.....	29
3.1.6. Estresse Oxidativo (EO).....	31
3.1.7. Métodos de avaliação de tecido criopreservado e avanços obtidos em primatas humanos, não humanos e animais modelo (Artigo Científico 01).....	35
4. A FÊMEA DE <i>Sapajus apella</i>	54
4.1. BIOLOGIA REPRODUTIVA DA FÊMEA DE <i>Sapajus apella</i>	55
4.2. ESTADO ATUAL DO DESENVOLVIMENTO DE BIOTÉCNICAS DE REPRODUÇÃO EM <i>SAPAJUS APELLA</i>	55
5. METODOLOGIA (Artigo científico 2).....	57
5.1. ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA.....	57
5.2. LOCAL DA COLETA.....	57
5.3. GRUPO EXPERIMENTAL.....	58
5.4. COLETA DO TECIDO CORTICAL OVARIANO.....	58
5.5. EXPERIMENTOS: Exposição e Vitriificação do Tecido Cortical Ovariano.....	60

5.5.1. FASE I: Exposição do Tecido Cortical Ovariano	61
5.5.2. FASE II: Vitrificação do Tecido Cortical Ovariano	62
- Etapa de Aquecimento do Tecido Ovariano Vitricado.....	62
5.6. ANÁLISES DO TECIDO CORTICAL OVARIANO	63
- Microscopia Óptica (MO).....	63
- Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	63
- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	64
- A amplificação por PCR e determinação da estabilidade do gene.....	65
- Dosagem da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC).....	65
6. RESULTADOS	67
- <u>Coleta de tecido cortical ovariano</u> (Artigos Científicos 3).....	67
Resultados Fase I	74
- <u>Exposição do tecido ovariano às soluções de vitrificação</u>	74
Resultados Fase II	77
- <u>Vitrificação de FOPA's</u>	77
7. DISCUSSÃO	80
- <u>Coleta de tecido cortical ovariano</u> (Artigos Científicos 3).....	80
- <u>Experimentos da Fase I</u>	80
- <u>Experimentos da Fase II</u>	81
8. CONCLUSÃO	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
ANEXO	95

1. INTRODUÇÃO

A demanda de produtos de origem animal, associado ao desmatamento para fins econômicos e crescimento desordenado de cidades, vem causando uma redução cada vez maior da população de animais silvestres *in situ*. Nesse contexto se faz necessário o uso de políticas de conservação de espécies silvestres contribuindo à saúde e bem estar animal no seu habitat entre os variados ecossistemas brasileiros (EGITO; MARIANTE; ALBUQUERQUE, 2002). A adoção de estratégias de conservação são alternativas que proporcionam a permanência de indivíduos vivos em seus meio, assegurando a integridade das populações e processos ecossistêmicos que os mantém, porém, não é suficiente para evitar a fragmentação que atua no impedimento do fluxo gênico e movimentação destes animais, necessários a manutenção destes indivíduos e ecossistemas (MACIEL, 2007). Métodos alternativos de conservação e preservação em zoológicos, criatórios e Bancos de Germoplasmas Animal (BGA) são amplamente utilizadas para manter espécies, porém, os BGA possuem alta relevância, pois representam uma alternativa para evitar a perda de variabilidade genética através do armazenamento de células somáticas, gaméticas, embriões e tecidos reprodutivos (EGITO; MARIANTE; ALBUQUERQUE, 2002; EGITO et al., 2005), além da necessidade de lutar por políticas de conservação de habitats.

Dentro desse contexto, uma técnica promissora que atualmente está sendo estudada é a vitrificação, que consiste em expor o material biológico a altas concentrações de agentes crioprotetores, durante um curto intervalo de tempo, seguido de uma redução ultra-rápida da temperatura em nitrogênio líquido (SANTANA et al., 2012). Estudos da criopreservação de tecido cortical ovariano já foram realizados em ruminantes domésticos, dentre eles ovelhas (BORDES et al., 2005; COURBIERE et al., 2005, 2006; FATHI et al., 2011), cabras (SANTOS et al., 2007) e vacas (KAGAWA et al., 2009; BAO et al., 2010; CELESTINO et al., 2010; ZHANG et al., 2011), e em PNH (*cynomologus* e *rhesus*) (HASHIMOTO et al., 2010; TING et al., 2011, respectivamente), objetivando a preservação de recursos genéticos

através protocolos de criopreservação (SANTANA et al., 2012). No entanto esta exposição a altas concentrações de agentes crioprotetores pode levar ao estresse celular por choque osmótico (AMORIM et al., 2006). A fim de evitar possíveis danos consequentes da exposição a altas concentrações de crioprotetores, foram utilizados antioxidantes a fim de evitar elevados níveis de radicais livres, e com isso danos em sistemas celulares (BUCAK; ATESSAHIN; YUCE, 2008).

Neste sentido, o objetivo deste estudo foi desenvolver um protocolo de vitrificação de tecido cortical ovariano em *Sapajus apella* visto não haverem dados acerca deste método de criopreservação na espécie. Para tanto foi necessário o desenvolvimento de um método de recuperação de Folículos Ovarianos Pré-antrais (FOPA's) a partir da biópsia de córtex ovariano, evitando a ovariectomia, que inviabilizaria reprodutivamente a fêmea, bem como avaliar a exposição e a vitrificação do tecido ovariano à diferentes soluções de vitrificação. A viabilidade celular foi analisada antes e após a vitrificação, a partir da morfologia folicular, expressão dos genes Hsp70 (LI et al., 2012), Erp29 (BAMBANG et al., 2009), Erp60 (ARNAUDEAU et al., 2002) e Sod (FERRI et al., 2006), tendo em vista sua correlação com possíveis alterações intracelulares decorrentes do estresse oxidativo sofrido durante todas as etapas experimentais, além de estudos bioquímicos pela dosagem da capacidade antioxidante do tecido ovariano vitrificado através da TEAC (do inglês *Total Equivalent Antioxidant Activity*).

Por conseguinte, para a melhor compreensão do experimento, serão abordados na revisão de literatura, a caracterização do ovário de mamíferos, assim como oogênese e foliculogênese, técnicas de criopreservação com ênfase na vitrificação e outros aspectos relacionados à fisiologia reprodutiva da espécie.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

- Desenvolver um método de biópsia de córtex ovariano de *Sapajus apella*;
- Desenvolver um método de vitrificação de folículos pré-antrais de fêmeas da espécie *Sapajus apella*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da adição de antioxidantes Selênio e Trolóx na vitrificação de tecido ovariano de *Sapajus apella*;
- Avaliar a exposição de tecido ovariano a soluções de vitrificação adicionadas ou não de crioprotetores sobre a morfologia folicular e expressão de genes tais como Erp29, Erp60, Hsp70 e Sod1;
- Vitrificar tecido ovariano de *Sapajus apella* utilizando ou não um antioxidante e avaliar a expressão de genes tais como Erp29, Erp60, Hsp70 e Sod1, bem como avaliar a TEAC (*total equivalent antioxidant activity*) do tecido ovariano.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. O OVÁRIO DE MAMÍFEROS

O ovário é o órgão que exerce função de gônada feminina, e controla muitos aspectos da fisiologia do desenvolvimento do sexo feminino (EDSON, NAGARAJA; MATZUK, 2009). O ovário é composto de duas regiões distintas: a medular e a cortical. A primeira é composta de tecido conjuntivo frouxo, uma massa de vasos sanguíneos contorcidos relativamente grandes, vasos linfáticos e nervos, e na região cortical encontram-se os folículos ovarianos nas diferentes fases de desenvolvimento, corpos lúteo, corpo hemorrágico ou corpo *albicans* (DELLMAN; BROWN, 1982), sendo o folículo a unidade morfofuncional do ovário dos mamíferos, mantendo o crescimento e a maturação do oócito (DURRANT et al., 1998).

3.1.1. Oogênese

O processo de formação dos gametas femininos (oócitos) é denominado oogênese. Consiste na formação e diferenciação das Células Germinativas Primordiais (CGP's) até a formação do oócito haplóide fecundado (MARTINS et al., 2008).

Este processo tem início ainda no período pré-natal com a migração das CGP's. Esta etapa é caracterizada por três momentos. No primeiro momento tem-se a Fase de Separação, momento no qual as CGP's deixam o saco vitelínico a partir do endoderma viceral posterior (McLAREN, 2000) e atravessam epitélio do intestino primitivo e seguem rumo ao mesentério dorsal, até se incorporarem à Matriz Extra Celular (MEC). Em seguida tem-se a Fase de Migração, em que as CGP's continuam a migrar atravessando a MEC e seguindo rumo à crista gonadal, culminando com a terceira fase da migração, denominada Fase de Colonização. Neste último momento da migração as CGP's se estabelecem na crista gonadal e cessam sua migração, dando origem à gônada primordial (PEREDA; ZORN; SOTO-SUAZO, 2006).

Com o término do processo migratório e seu estabelecimento na crista gonadal, as CGP's iniciam sucessivas divisões mitóticas, e inicia-se a Fase Proliferativa (PEPLING, 2006; McLAUGHLIN; McIVER, 2009). Ao final da fase de proliferação, são formados dois tipos de células germinativas com funções diferentes, provenientes da última divisão mitótica das CGP's. Uma daria continuidade e iniciaria uma nova divisão mitótica, enquanto a outra permanece em intérfase e se diferencia posteriormente em oogônias (SADEU et al., 2006).

Nesta fase de intensa atividade mitótica há também a interação das oogônias com as células somáticas e o recrutamento dessas últimas. É neste período, de acordo com Pepling (2006), que dá-se a origem aos *Clusters* ou *Nichos*, que são uma coleção de oogônias circunscritas por células somáticas. Uma vez formadas, as oogônias entram em meiose e diferenciam-se em oócitos (HIRSHFIELD, 1991). Neste momento ocorre a primeira interrupção da divisão meiótica e a formação dos oócitos primários (diplóteno da primeira divisão meiótica ou vesícula germinativa), permanecendo neste estágio até a puberdade (DE FELICI, 2010; PEPLING, 2006; McLAUGHLIN; McIVER, 2009).

Com o pico dos Hormônios Folículo Estimulante (FSH) e Luteinizante (LH) na puberdade, imediatamente antes da ovulação, os oócitos que terminaram seu crescimento retomam a meiose. Ocorre a dissolução da vesícula germinativa, progressão para metáfase I, anáfase I e telófase I, expulsão do primeiro corpúsculo polar e formação do oócito secundário, o qual se apresenta circundado por mais de uma camada de células da granulosa (BETTERIDGE et al., 1989). Inicia-se, a seguir, a segunda divisão meiótica, em que o núcleo do oócito evolui até o estágio de metáfase II, quando ocorre a segunda interrupção da meiose (GORDON, 1994). O oócito permanece neste estágio até ser fecundado pelo espermatozóide quando, então, completa a meiose e expulsa o segundo corpúsculo polar, formando o oócito haplóide fecundado (FAIR, 2003; MOORE; PERSAUD, 1994; PEPLING, 2006)

3.1.2. Foliculogênese

Assim como a oogênese, a foliculogênese tem seu início na vida pré-natal na maioria das espécies e pode ser definida como o processo de formação, crescimento e maturação folicular, começando com a formação do folículo primordial e culminando com a ovulação (EDSON; NAGARAJA; MATZUK, 2009)

A foliculogênese pode ser dividida em basicamente duas fases. Uma independente de gonadotrofina, denominada pré-antral, sendo subdividida em ativação dos folículos primordiais e crescimento dos folículos primários e secundários (Figura 1) e outra dependente de gonadotrofina, a antral, que é subdividida em crescimento inicial e terminal dos folículos terciários, estando distribuídos dentro das categorias apresentadas esquematicamente na Figura 1 e ilustrados na Figura 2 (EDSON; NAGARAJA; MATZUK, 2009).

Figura 1: Classificação das principais etapas da foliculogênese em mamíferos.

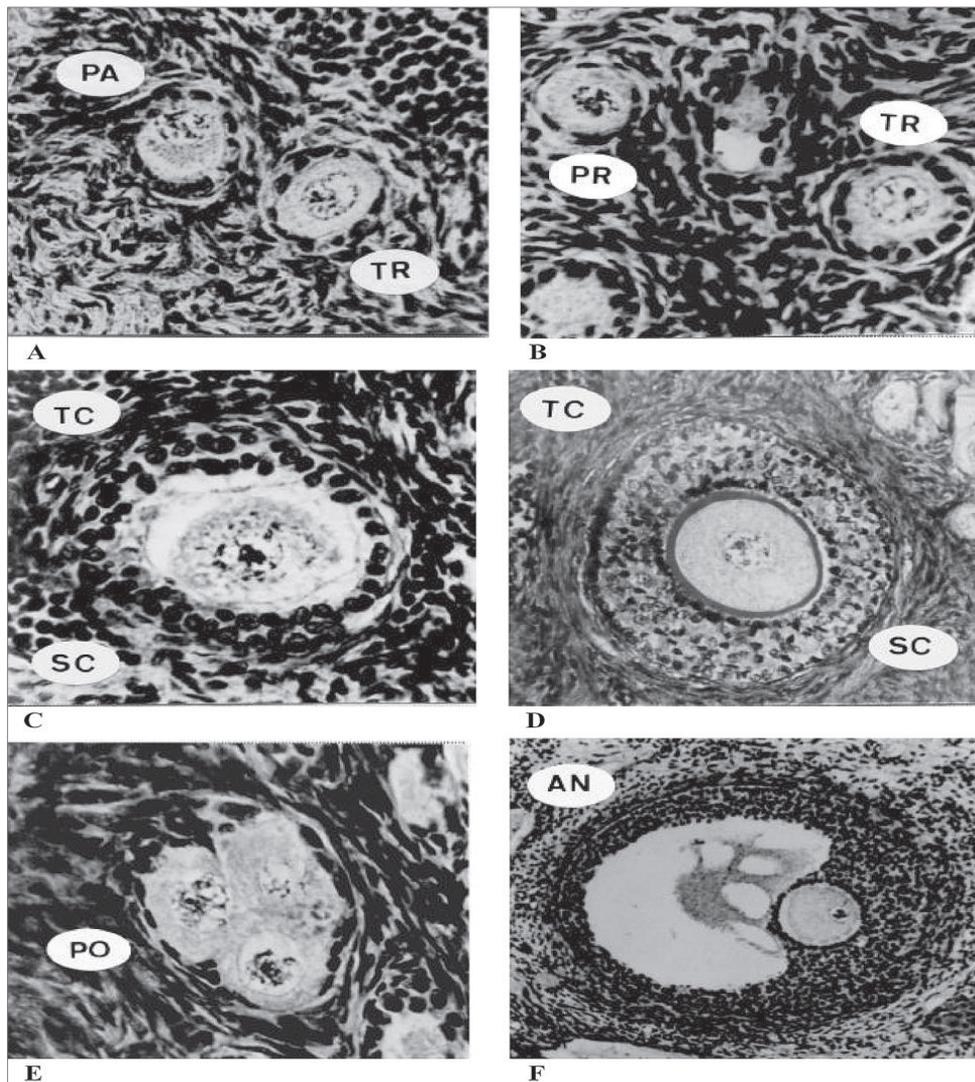
Classificação			
1	Cisto de Cél. Primordiais	Fase Independente de Gonadotrofina	
2	Folículo Primordial		
3	Folículo Primário		
4	Folículo Secundário		
5	Folículo Terciário	Fase Dependente de Gonadotrofina	
6	Ovulação		
7	Corpo Lúteo		

(Fonte: Modificada de EDSON; NAGARAJA; MATZUK, 2009)

O crescimento folicular é caracterizado pela modificação na morfologia da única camada de células da granulosa (GCs), que deixam sua configuração de pavimentosas simples para cúbica simples (LEE; MIYANO; MOOR, 2000). Neste momento é possível também observar os folículos de “transição”, assim denominados devido ser possível observar um aspecto de conformação mista na camada de células da granulosa, com células tanto de formato pavimentoso como cúbico (Figura 2) (DOMINGUES et al., 2004). Além disso, há o concomitante crescimento do oócito, além da aquisição de uma camada adicional de células

somáticas, a teca (FAIR et al., 1997; BRAW-TAL; YOSSEFI, 1997; LEE; MIYANO; MOOR, 2000; EDSON; NAGARAJA; MATZUK, 2009).

Figura 2: Apresentação das diferentes categorias de folículos ovarianos de *Sapajus apella*, em diferentes estágios morfológicos, analisados histologicamente. Onde primordial (PR); transição (TR); primário (PA); Secundário (SC); poliovular (PO); antral (AN); células da teca (TC). A, B, C, D, E (x400) e F (x100).



(Fonte: DOMINGUES et al., 2004)

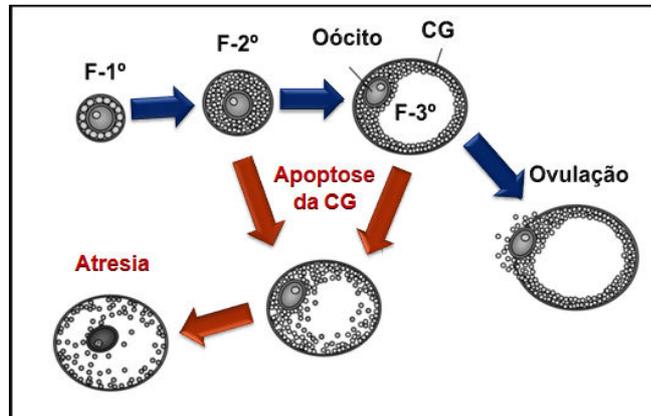
O incremento no número de células da granulosa ocorre entre as diferentes categorias foliculares, de acordo com o estágio do crescimento folicular. No decorrer do processo proliferativo das células da granulosa, quando o folículo adquire duas ou mais camadas destas células, este deixa de ser primário e passa a ser denominado Folículo Secundário.

Posteriormente, com a formação do fluido folicular, antro é formando. Após o início da formação do antro, o folículo denomina-se folículo antral terciário (Figura 2) (EDSON; NAGARAJA; MATZUK, 2009). Em primatas folículos são recrutados a cada ciclo reprodutivo. No entanto, apenas um folículo dominante normalmente é selecionado para a ovulação, enquanto muitos outros folículos antrais sofrem atresia (ASSELIN et al, 2000).

A atresia folicular pode vir a ocorrer em qualquer fase do crescimento folicular. O desenvolvimento e a atresia de folículos ovarianos de vertebrados são regulados por interferência, entre os sinais de morte celular e a sobrevivência, onde acredita-se que as alterações que levam a apoptose não estão simplesmente ligadas a expressão de um fator, mas no desequilíbrio entre eles. Este desequilíbrio na sinalização pode ser de ordem parácrina, pelas células do estroma e da granulosa, autócrina e/ou justácrina por um folículo dominante (EDSON; NAGARAJA; MATZUK, 2009; MATSUDA-MINEHATA et al., 2006; MCLAUGHLIN; MCIVER, 2009).

A apoptose das células da granulosa (CG) representa uma das principais vias, das quais folículos defeituosos ou excessivos são rápida e eficazmente eliminados. Muitos fatores têm sido apontados como responsáveis pelo controle da atresia folicular, incluindo ligantes e receptores de morte, caspases, pró e anti-apoptótico membros da família Bcl-2, gonadotrofinas, cálcio e a comunicação intercelular juncional, tendo em vista que uma vez desfeita essa comunicação (ASSELIN et al., 2000; MATSUDA-MINEHATA et al., 2006) (Figura 3).

Figura 3: Durante o processo de desenvolvimento folicular muitos dos folículos recrutados findam por entrar em processo apoptótico. Isto pode ocorrer tanto na fase pré-antral (folículo primário, F-1°, e folículo secundário, F-2°), como na antral (folículo terciário, F-3°), em consequência da apoptose nas células da granulosa (CG).



(Fonte: Modificada de MATSUDA-MINEHATA et al., 2006)

3.1.3. Biotécnica MOIFOPA

Como já descrito, o ovário mamífero contém milhares de oócitos, inclusos em sua maioria (cerca de 90%) nos FOPA's. No entanto, apenas cerca de 0,1% poderá ovular, conseqüentemente, terá alguma possibilidade de ser fecundado. Desta forma, pode-se considerar crucial a recuperação de milhares de folículos pré-antrais, a partir de um único ovário para posteriormente utilizá-los em biotécnicas da reprodução (FIGUEIREDO et al., 2007), como produção *in vitro* de embriões (PIVE) que pode ser por meio das seguintes técnicas: Fertilização *in vitro* (FIV), Injeção intracitoplasmática de espermatozóides (*Intracitoplasmatic sperm injection*) (ICSI) (EGITO et al., 2002, 2005) e a transferência nuclear por células somáticas (TNCS) ou embrionárias (Domingues, Lima, Santos. 2011). Essas biotécnicas se desenvolvem adequadamente em espécies ameaçadas de extinção, contribuiriam para a conservação genética dessas.

Por este motivo, a MOIFOPA (Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais) tem recebido grande atenção nos últimos anos, não só pelo interesse de

vislumbrar a melhor compreensão dos mecanismos da fisiologia folicular, em especial na foliculogênese na fase pré-antral, mas também pelos resultados que pode proporcionar para a biotecnologia da reprodução (FIGUEIREDO et al., 2007). De acordo com os mesmo autores, a MOIFOPA é uma biotécnica que consiste no isolamento ou resgate e conservação, visando posterior estocagem por um curto (resfriamento) ou longo período (congelamento) e no cultivo de FOPA's, a fim de promover o crescimento, maturação e fecundação *in vitro* dos oócitos inclusos em FOPA's.

3.1.4. Criopreservação de FOPA's

A criopreservação compreende a conservação de material biológico a temperaturas ultra-baixas, geralmente em nitrogênio líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, ou em sua fase de vapor a $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os únicos estados físicos existentes abaixo de $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ são o cristalino e o vítreo e, em ambos, a viscosidade é muito elevada, a difusão é considerada insignificante (dependendo do tempo de armazenamento), a energia cinética molecular é muito baixa e as reações metabólicas impulsionadas por energia térmica ocorrerão muito lentamente ou serão paralisadas completamente (KARTHA, 1985).

Seu objetivo é garantir que as células permaneçam com baixa taxa metabólica durante o período de estocagem. Entretanto, para que isso seja possível após longos períodos de conservação, alguns fatores devem ser levados em consideração como: a escolha do tipo e da concentração de agentes crioprotetores, a taxa de redução da temperatura de congelamento, a manutenção da temperatura de estocagem, a escolha do procedimento de descongelamento e as técnicas utilizadas para assegurar a remoção do crioprotetor (GORDON, 1994).

De acordo com Castro e colaboradores (2011), independente do método utilizado, a criopreservação baseia-se em cinco etapas fundamentais:

- 1) Exposição aos Agentes Crioprotetores (ACP): Para permitir a difusão desses agentes nos compartimentos celulares;

- 2) Resfriamento com redução da temperatura de forma gradual (congelamento lento) ou súbita (vitrificação): Na qual a amostra passa da temperatura ambiente para a temperatura criogênica;
- 3) Armazenamento ou Estocagem: Permitindo a preservação do material em temperatura ultrabaixa por períodos indefinidos;
- 4) Descongelamento ou aquecimento: Etapa na qual ocorre o resgate do material criopreservado e retomada do metabolismo celular; e
- 5) Diluição ou remoção do ACP: A fim de evitar, na presença de temperatura fisiológica ou ambiente, a produção de metabólitos secundários, o que intensificaria a ação tóxica destes aditivos.

A capacidade do material biológico de sobreviver ao processo de criopreservação depende da tolerância aos agentes crioprotetores, da desidratação e da velocidade de redução da temperatura, podendo ser realizada por dois métodos básicos: Congelamento Convencional (ou lento) e Vitrificação.

A congelamento lento, onde a redução da temperatura ocorre de modo gradual, é usualmente realizada na presença de baixas concentrações de agentes crioprotetores ($\approx 1,5$ mol/l). Nesse método, o material é resfriado lentamente a uma velocidade de $2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Uma vez que a desidratação celular é suficientemente atingida (entre -30 a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$), o material é estocado em nitrogênio líquido ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) (PAYNTER, 2000).

Em contrapartida a vitrificação envolve a exposição do material biológico a altas concentrações de agentes crioprotetores (geralmente entre 4 e 6 mol/L), por um curto período de tempo, geralmente à temperatura ambiente, seguido de um resfriamento ultra-rápido em nitrogênio líquido, não sendo necessária a utilização de equipamentos sofisticados e de alto custo (PAYNTER, 2000).

Uma linha de pesquisa que sido cada vez mais estudada é a criopreservação de tecido cortical ovariano, por representar uma importante alternativa para a manutenção da fertilidade

de mulheres submetidas a tratamentos radio ou quimioterápicos, uma vez que o auto-transplante, após a terapia, possibilita o retorno das funções ovarianas (DONNEZ; DOLMANS, 2010). Além disso, representa uma alternativa promissora para a preservação de patrimônios genéticos de animais em perigo de extinção, o que possibilitará posterior utilização em programas de reprodução assistida, viabilizando o sucesso de pesquisas com animais que apresentam dificuldades reprodutivas ou aqueles utilizados como modelo experimental (SANTOS et al., 2010), em especial os PNH, que servem como referência para estudos na espécie humana e para as pesquisas biomédicas.

3.1.5. Vitrificação de tecido ovariano em espécies domésticas e primatas

A vitrificação consiste na exposição do material biológico a altas concentrações de crioprotetor por um curto período de tempo, seguido de um resfriamento ultra-rápido em nitrogênio líquido. Este método apresenta como vantagem seu baixo custo, pois não necessita de equipamentos sofisticados para sua realização. Contudo, em ambos os procedimentos existe o risco de dano folicular devido à toxicidade dos crioprotetores utilizados (SANTOS et al., 2010).

Fahy (1986) sugeriu o uso de vitrificação como uma alternativa para a criopreservação de órgãos. Sendo mais tarde apresentado por Sugimoto e colaboradores (1996) a possibilidade de vitrificar tecido ovariano de ratos recém-nascidos. Portanto, a partir de seus estudos pioneiros, Fahy e Sugimoto e colaboradores constituíram a base da pesquisa de vitrificação de tecido ovariano.

De acordo com Stachecki e Cohen (2004), a vitrificação possui dois aspectos básicos a serem levados em consideração. O primeiro consiste nas altas concentrações de crioprotetores utilizadas na exposição, o que aumenta os efeitos tóxicos, e o segundo é que, apesar deste efeito durante o período de equilíbrio, a vitrificação, devido ser um processo altamente rápido, aumenta as taxas de sobrevivência.

Além disso, apesar da importância do processo de criopreservação, existem dois fatores que também podem levar à morte celular durante a congelação/descongelação: o choque osmótico (AMORIM et al., 2011). Possivelmente, os dois fatores supracitados podem causar danos aos FOPA's via estresse oxidativo e apoptose, o que indicaria a suplementação do meio de criopreservação com um fator anti-oxidante, que permeabilize as células facilmente, reduzindo os danos causados pela redução da temperatura no tecido ovariano.

Courbiere e colaboradores (2009) propõem que os folículos ovarianos imaturos teriam uma maior resistência e por isto estes apresentaram uma melhor sobrevivência quando comparados com oócitos maduros (Metáfase II). Além disso, de acordo com os mesmos autores, esta característica talvez se deva aos FOPA's serem menores do que os folículos maduros e por apresentarem menor atividade metabólica, o que os tornariam, assim, adequado para fins de modelo de pesquisa.

O primeiro relato de vitrificação de tecido ovariano em grandes mamíferos foi publicado pela Isachenko e colaboradores (2003), o qual realizou a vitrificação de tecido ovariano humano. Mais tarde, os estudos envolvendo outros mamíferos de grande porte, tais como primatas não humanos e ruminantes, tiveram início.

Em 2005 foi relatado o nascimento após a vitrificação de hemi-ovários, seguida por autotransplante em ovelha (BORDES et al., 2005). Embora tal sucesso não tenha se repetido ainda em outros mamíferos de grande porte, esta é uma confirmação de que a vitrificação de tecido ovariano é uma técnica muito promissora. Diferentemente de congelação lenta, o que não pode ser aplicado em órgãos inteiros, vitrificação elimina os riscos de formação de cristais de gelo intracelular (AMORIM et al., 2011). Além disso, quando os mamíferos selvagens são encontrados mortos no jardim zoológico ou em áreas remotas, o tecido do ovário pode ser imediatamente preservados por vitrificação sem a necessidade de energia eléctrica ou equipamentos complexos.

3.1.6. Estresse Oxidativo (EO)

Apesar dos ACP's melhorarem a sobrevivência celular por evitar danos causados pela redução extrema da temperatura e desidratação, eles podem acarretar outras injúrias nas células, como estresse osmótico, devido à alta concentração de soluto. Conseqüentemente, a concentração de ACP's e o tempo de exposição antes do congelamento, devem estar equilibrados alcançando uma desidratação suficiente e a penetração do ACP no tecido, reduzindo danos citotóxicos (AMORIM et al., 2006). No entanto, deve-se considerar que uma das primeiras conseqüências que se tem ao remover um tecido do seu local de origem é a Interrupção do Fluxo Sanguíneo (IFS). Esta interrupção leva à depleção de substratos, especialmente de oxigênio e glicose, e assim ativação de uma via metabólica glicolítica que faz com que haja uma acidose metabólica. Esta por sua vez pode aumentar a formação de radicais livres, interferindo na síntese de proteínas intracelulares (DURUKAN; TATLISUMAK, 2007).

A célula apresenta alguns mecanismos próprios que a auxiliam a reagir aos processos oxidantes conseqüentes dos radicais livres produzidos durante o próprio metabolismo através da cadeia respiratória mitocondrial. Este radical pode causar danos ao DNA, RNA, às proteínas, lipídios e membranas celulares do núcleo e mitocondrial. No DNA o ataque ao açúcar pode ser realizado por abstração de um dos átomos de hidrogênio e quase sempre leva à ruptura da cadeia de DNA (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

O estresse oxidativo é responsável por diferentes tipos de danos, incluindo a peroxidação lipídica de membranas, a oxidação de aminoácidos e ácidos nucléicos, apoptose e necrose, sendo definido como um desbalanço intracelular entre a produção de Formas Reativas de Oxigênio ou ROS (do inglês *Reactive Oxygen Species*) (LIMA-VERDE et al., 2007). De acordo com Durukan e Tatlisumak, 2007, as espécies reativas de oxigênio reagem irreversivelmente com vários constituintes celulares, tais como proteínas, ligações duplas de fosfolípidos (ou seja as membranas sejam de organelas ou da própria célula), e DNA nuclear,

(LIMA-VERDE et al., 2007) e estimulando a ação de enzimas antioxidantes (CHEN et al., 2009).

A glutathiona peroxidase atua na matriz do citosol e das mitocôndrias, enquanto a vitamina E age nas membranas celulares. Juntamente com o tocoferol este mineral atua interceptando radicais livres antes que eles possam danificar as membranas celulares protegendo as membranas e organelas de danos oxidativos, facilitando a união entre o oxigênio e hidrogênio no final da cadeia metabólica (Figura 04) (VIARO; VIARO; FLECK, 2001).

De acordo com Zhang e Richardson (2011) quando uma célula é exposta a situações que induzem seu estresse (radiação, homocisteína ou dopamina) ocorre um aumento acentuado na expressão da Proteína do Reticulo Endoplasmático 29 (do inglês *Endoplasmic Reticulum Protein 29 / Erp29*), uma proteína localizada na porção luminal do Reticulo Endoplasmático (RE). Este na sua expressão em situações de estresse podem indicar um potencial papel protector contra estresse celular. No entanto ela também é apontada por Bambang et al (2009) como sendo um regulador negativo da proliferação celular e/ou tumorigênese, uma vez que é expressa em maior quantidade por tumores de crescimento lento.

Assim como a Erp29, a Erp60 (também conhecida como Calreticulina) é uma proteína presente no RE e mitocôndrias e esta relacionada com a homeostase da concentração de íons cálcio (Ca^{2+}) pelo seu transporte para o interior destas organelas. Assim sendo alterações como a superexpressão deste gene aumenta o influxo de Ca^{2+} fluxos em todo o RE, mas diminui na mitocondrial e potencial de membrana. Esta alteração no fluxo de Ca^{2+} entre as duas organelas pode danificar as mitocôndrias, representando o aumento da susceptibilidade das células que expressam níveis elevados de calreticulina a estímulos apoptóticas (ARNAUDEAU et al., 2002).

Outro gene que tem sua expressão alterada em uma situação de estresse celular é o Hsp70, uma Proteína de Choque Térmico (do inglês *Heat Shock Proteins / HSP's*). Este tipo de proteína é exposto tanto em condição de hipertermia quanto de demais estados de

alteração homeostática, tais como exposição a metais pesados, aumento na concentração de cálcio intracelular, diminuição de glicose para fornecimento de energia às células, infecções virais e bacterianas, hipóxia, análogos de aminoácidos, estresse oxidativo, presença de toxinas, etc (NETO; SILVA; MACEDO, 2008). Tupling e colaboradores, 2007, em seus estudos em células musculares humanos, observaram um aumento da expressão deste gene em situações de estresse agudo imediatamente após o exercício (87%) e em mamíferos este gene é apontado como um dos mais suscetíveis a alterações em sua expressão em tal situação.

Outro mecanismo que o organismo encontrou para se proteger da ação dos radicais livres foi através do sistema antioxidante de moléculas pequenas. Neste sistema, moléculas de baixo peso molecular, tais como a vitamina A, E e C, o beta caroteno e o ácido úrico, reagem diretamente com os radicais livres diminuindo sua reatividade (MOREIRA, 2010). Distribui-se em ambas às fases da bicamada de lipídios das biomembranas, tornando-se um excelente protetor contra a lipoperoxidação. Além disso, o trolox pode ser adicionado diretamente à membrana lipídica sem a necessidade de solventes ou outros métodos de extração Trolox (BARCLAY; ARTZ; MOWAT, 1995).

Sendo as mitocôndrias o principal local de produção de ROS, elas conseqüentemente necessitam de uma defesa antioxidante bem eficaz para evitar danos às funções das proteínas, da integridade membrana e ao DNA mitocondrial; preservando a homeostase mitocondrial. De modo que, alterações em sua expressão podem levar à perda significativa de potencial de membrana mitocondrial, diminuição dos níveis de ATP e aumento da produção de ROS (CARRÌ; COZZOLINO, 2011).

Agarwal et al. (2003) sugerem o envolvimento dos ROS no processo de apoptose no ovário. Pois, o transporte de elétrons (mitocondrial) associado com a esteroidogênese constitui caminhos importantes para a produção de radicais livres, principalmente em células da teca em folículos antrais (HSUEH et al., 1996, ORTEGA-CAMARILLO et al., 2009).

3.1.7. Métodos de avaliação de tecido criopreservado e avanços obtidos em primatas humanos, não humanos e animais modelo

Artigo 1

Para uma melhor compreensão dos métodos de avaliação do tecido criopreservado, anexamos a nossa revisão recentemente aceita para publicação (SANTANA et al., 2012a). A seguir, o artigo completo é apresentado:

Vitrification of ovarian tissue from primates and domestic ruminants: an overview

L.N. Santana^{1,2}, R. Van den Hurk³, I.C. Oskam⁴,

A.B. Brito^{1,2}, D.C. Brito^{1,2}, S.F.S. Domingues^{1,2}, R.R. Santos^{1,2,3*}

¹ Laboratory of Wild Animal Biology and Medicine, Universidade Federal do Pará, Brazil.

² Animal Science Post-graduation Program, Universidade Federal do Pará, Brazil.

³ Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands.

⁴ Biokapital, Geno. Hamar, Norway.

*Correspondence to Regiane R Santos

Faculty of Veterinary Medicine

Yalelaan 104, 3584 CM, Utrecht, The Netherlands.

Tel.: +31 30 2531078;

fax: +31 30 2534125

E-mail: R.Rodriguesdossantos@pq.cnpq.br

Abstract

In the last decade, vitrification protocols to preserve human ovarian tissue have been regularly reported; even more often than the protocols developed for large mammals, such as ruminants and non-human primates. In order to facilitate the use of domestic ruminants (cows, goats and sheep) and non-human primates as animal models, application of similar protocols as used for human material is performed. Next to it, the addition of indispensable or exclusion of avoidable compounds in the vitrification of human ovarian tissue should be tested in such experiments with animal models. The objective of this mini-review is to summarize the current protocols used for the vitrification of ovarian tissue and to evaluate the vitrification methods in humans, non-human primates and domestic ruminants.

Introduction

In 1986, Fahy¹ suggested the use of vitrification as an alternative for organ cryopreservation. Ten years later, the groundbreaking studies of Sugimoto et al.², showed the possibility to vitrify ovarian tissue from neonatal rats. Therefore, pioneering studies from Fahy¹ and Sugimoto et al.² constituted the basis of the ovarian tissue vitrification research from the past fifteen years. In 2002, De la Peña and coworkers³ reported the birth of pups after transfer of mouse embryos derived from vitrified preantral follicles (PFs).

Though mice and rats are not the most appropriate models for large mammals regarding ovarian tissue cryopreservation, such approach helped to elicit further understanding of the preservation of female fertility. The first report of ovarian tissue vitrification in large mammals was published by Isachenko et al.,⁴ who performed vitrification of human ovarian tissue. Later on, studies involving other large mammals, such as non-human primates and ruminants, have been carried out. In 2005, live births have been reported after vitrification of hemi-ovaries, followed by autotransplantation in sheep.⁵ Although such success has not been repeated, as yet, in other large mammals, this is a confirmation that vitrification of ovarian tissue is a very promising technique. Differently from slow freezing, which can not be applied in whole organs, vitrification eliminates the risks of intracellular ice-crystal formation.⁶ Furthermore, when wild mammals are found dead in the zoo or in remote areas, the ovarian tissue can be immediately preserved by vitrification without the needs of electricity or complex equipments. In the present review we summarize the advances and challenges involving the vitrification of ovarian tissue from primates and domestic ruminants in order to preserve PFs.

Animal model or direct application?

Cryopreservation of ovarian tissue is an important tool to preserve the fertility of women prior to cancer treatment onset,⁷ as well as to preserve animal biodiversity.⁸ In both cases, domestic ruminants (sheep, goats and cows) and non-human primates can be used as

animal models to develop and optimize cryopreservation protocols. However, based on a compilation of publications with respect to vitrification of PFs at MEDLINE, most of the studies have been performed using human ovarian tissue.

Table 1 summarizes information on the vitrification of ovaries and ovarian fragments of primates (human and non-human) and domestic ruminants from 2003 up to 2011. The increased interest in ovarian tissue vitrification is shown by the high percentage (45.5%, i.e. 15 from 33) of the ovarian studies, which has been published in the last two years. From 2003 to November 2011, 51.5% of the vitrification studies with ovarian tissue are accomplished with human tissue, while ovine and bovine ovarian tissues were second and third choice, each one representing 18.2% and 15.1% of the studies. In addition to these studies, there are two reports (6.1%) that used caprine ovarian tissue and three (9.1%) applying non-human primate ovarian tissue.

It is well known that preservation of woman fertility encompasses most of the ovarian tissue cryopreservation studies. However, screening of protocols used for the cryopreservation of animal tissues is indicated before introducing these protocols for the cryopreservation of human ovarian tissue into clinical practice. Replication is crucial to evaluate an experimental condition, and the ovarian tissue from different donors may respond differently to the vitrification procedure, which for example is due to tissue consistency, size and donor age. In the studies involving ovarian tissue vitrification, the mean number of replicates varied from 6 (monkeys) to 15 (goats), while the number of experimental repetitions ranged from 3 (human) to 35 (sheep) trials per experiment. The ovarian tissue was collected from young and adult donors, and the size of the vitrified tissue varied from 0.5 mm³ to the whole organ (ovary) (Table 2). Therefore, it is difficult to compare studies performed within the same species and among different ones, demonstrating that there is no standardized guideline to perform studies on the vitrification of ovarian tissue.

Although every laboratory may have a standard procedure to test vitrification, an effective network among clinicians/researchers involved in the vitrification of ovarian tissue from human and animal models would help to define criterion regarding the size of ovarian tissue, the reproductive age of donors, the vitrification and the analysis methods, to develop a consistent evaluation system of the vitrification protocols.

Cryoprotectants, supplements and vitrification methods: miscalculated risks

Before vitrification, ovarian tissue is permeated with intracellular cryoprotectants such as ethylene glycol (EG), dimethyl sulfoxide (DMSO), propylene glycol (PROH), glycerol (GLY) or other compounds alone or in combination. To this end, ovarian tissue exposure/perfusion to cryoprotectants has been performed for just some seconds⁹ or for long periods, e.g. for 45 minutes.¹⁰⁻¹² Although exposure time depends on the temperature, tissue size, cryoprotectant type and concentration, the methods of tissue permeation and cryoprotectant removal, we must bear in mind that cryoprotectants are generally toxic to the cells and, when used at high concentrations like in vitrification procedures, they may represent a risk of osmotic stress and genotoxicity. Cytotoxicity is the major problem caused by vitrification solutions¹³ and has been indicated as the most important barrier to successful vitreous preservation of complex tissues.¹⁴⁻¹⁶ As highlighted by Aye et al.¹⁷, cell exposure to high concentrations of EG and PROH induce chromosomal damage in eukaryotic cells.

Composition of a vitrification solution is variable from a single intracellular cryoprotectant, e.g. EG alone,^{4,18} to complex mixtures of these compounds, e.g. DMSO and PROH¹⁰ either or not supplemented with serum, sugars or other compounds used to reduce osmotic shock. The chemistry of intracellular cryoprotectants and their toxicity have been reviewed¹⁹ and will not be considered here. Emphasis, however, must be given to the vitrification cocktails and additives used for ovarian tissue vitrification. Cryoprotectant cocktails are used to improve vitrification. Accordingly Vajta and Nagy,²⁰ combining low concentrations of different cryoprotectants decreases the specific toxicity of an individual cryoprotectant. However, it is

crucial to determine if the compounds present additive or synergic characteristics, which either reduce or increase cytotoxicity.²¹ These latter authors have shown that (i) combining cryoprotectants may increase toxicity synergistically and (ii) due to negative osmotic effects, addition of non-permeating solutes increases the cytotoxicity of vitrification solution. Although combination of cryoprotectants may lead to synergic toxicity, live births in large mammals were reported after vitrification of hemi-ovaries from sheep in a solution containing 2.62 M DMSO + 2.60 M acetamide + 1.31 M PROH + 0.0075 M polyethylene glycol.⁵ However, a malformed animal was born, and when the same solution was used to vitrify whole ovaries, no follicular survival was observed, while most damage was oocyte nucleus related.²² Regarding non-permeating solutes, indeed Celestino et al.²³ have reported the ineffectiveness of the addition of 0.5 M sucrose on the preservation of bovine PFs morphology during vitrification. More consistently, Bao et al.¹² showed that addition of sucrose to the vitrification medium was deleterious to bovine PFs. Sucrose is the most used non-permeable cryoprotectant followed by trehalose (Figure 1).

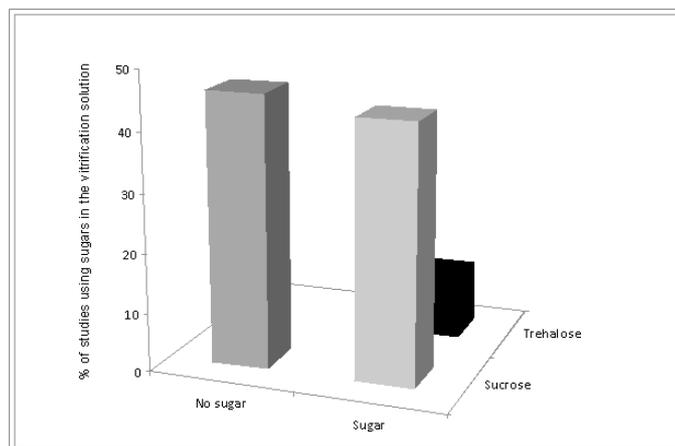


Figure 1. Mean percentages of studies reporting vitrification of ovarian tissue in the absence or presence of sugars (sucrose or trehalose).

Bovine serum, another additive commonly present in cryopreservation solutions, has been replaced by human serum albumin or synthetic serum substitute in most human ovarian tissue

vitrification protocols.^{10,11,24-31} The most recent vitrification protocols studied in monkey also did exclude bovine serum from vitrification solution,^{32,33} as well as those performed in sheep.^{5,22,34-37} Figure 2 shows the decline of the use of bovine serum in vitrification protocols in the last years. Use of animal serum, commonly fetal calf serum (FCS), is of particular concern in the entire cryopreservation process. Although FCS is rich in compounds that may support cell survival and is regulated by guidelines for production and handling, it does not eliminate totally uncharacterized substances, or even the risk of transmitting infectious agents or other pathogens.³⁸ Therefore, elimination of animal derived additives, such as serum or egg-yolk from the vitrification solution, remains the best approach.

Risks of tissue contamination, however, are not limited to the presence of serum in the vitrification solution. There is some debate whether filtered liquid nitrogen is free from virus and prions. It is well known that various infectious agents may survive to adverse conditions, such as extreme low temperatures, including those in liquid nitrogen (-196°C). Therefore, although many vitrification systems can be successfully used to preserve ovarian tissue, the risk of direct contact of this tissue with liquid nitrogen becomes imperative to develop a safe cryopreservation protocol and germplasm banking. Although supplementation of the vitrification solutions with FCS has been diminished, the use of closed systems is not, as yet, a common pattern. Most of the new vitrification techniques, which are successful to maintain follicular morphology and viability, consist in the use of open systems. Fortunately, the return to the use of closed devices has been observed in 2011 (Figure 2).

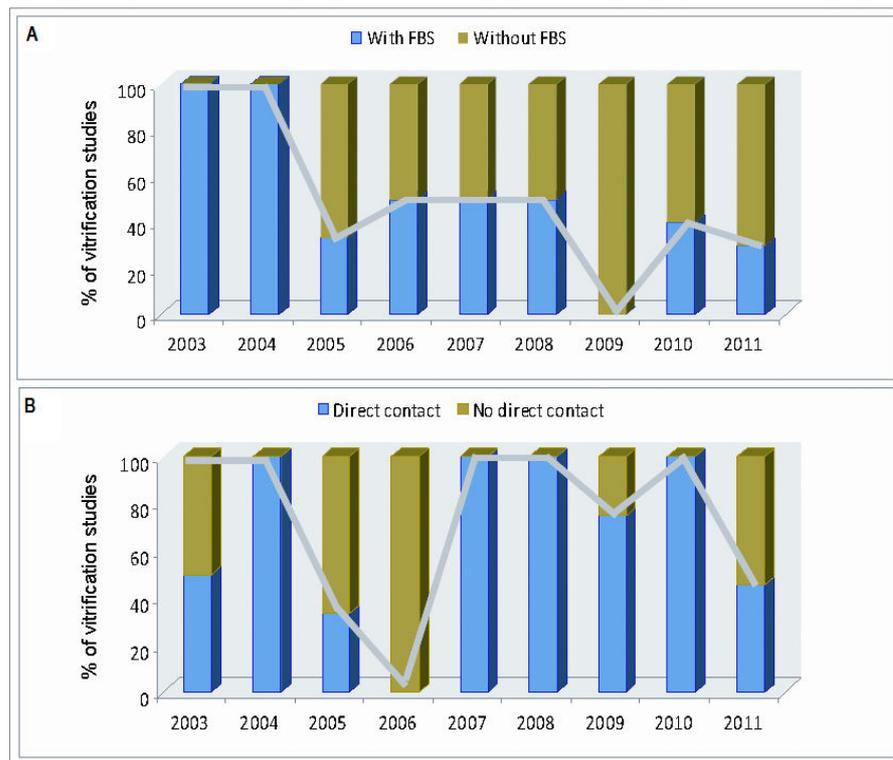


Figure 2. Mean percentages of studies reporting vitrification of ovarian tissue using solutions supplemented with fetal bovine serum (A) or in direct contact with liquid nitrogen (B).

What does a successful ovarian tissue vitrification mean?

Although there are many techniques and cryoprotectant solutions available, the assessment of ovarian tissue vitrification relies mostly on the maintenance of follicular morphology. However, preserved cell morphology is not a guarantee of gamete functionality. Therefore, morphology preservation should not be considered as a major criterion of success. As an alternative, vital staining of follicles through Trypan Blue exclusion or viability fluorescent markers, e.g. calcein-AM and ethidium homodimer, is applied. According Amorim et al.³⁹, Trypan Blue staining has the same accuracy of classical histology to detect normal follicles. However, the Trypan Blue exclusion test will depend on the person who counts the number of positive cells, and unstained follicles are not a guarantee that cells are free of apoptosis.

The use of fluorescent markers to detect esterase activity in the ooplasm (through a positive calcein immunoreaction) and membrane integrity (through a positive ethidium homodimer

immunoreaction)⁴⁰ is a more accurate method to evaluate follicular cell viability. Nevertheless, integer membrane and esterase activity are not exclusion parameters for degenerating cells in the near future, and these temporary survival analyses of the follicles do not assure their ability to grow.

Biochemical parameters such as hormonal assays^{4,5,10,25} or lactate dehydrogenase assay^{41,42} do contribute in the investigation on the follicular functionality. However, investigation of follicular development remains the best method to evaluate the success of ovarian tissue vitrification. Although IVC for 2 hours³⁹ or even 42 days⁴³ has been used to determine follicular survival after vitrification, there is no effective protocol for the complete *in vitro* development of primordial follicles from large mammals. Therefore, ovarian tissue auto- or xeno-transplantation is preferred as a direct method to detect follicular functionality. In this context, it has to be remarked that the ability of a follicle to develop will not always end up with an oocyte able to be fertilized. Moreover, if fertilized, embryo development and risk of offspring with malformation may be experienced.⁵

There is a paucity of studies on the up- or down-regulation of genes encoding growth factors involved in the follicular survival and development after vitrification of ovarian tissue, or simply after exposure of ovarian tissue to vitrification solutions. As reported on MEDLINE, in this regard only one study has been published, describing the expression of GAPDH.¹⁰ However, as GAPDH is a so-called stably expressed gene, information regarding genes related to ovarian tissue function after vitrification is not available. In a recent study (data not yet published), we have observed that non-human primate ovarian tissue exposed to vitrification solutions shows ooplasm vacuolization, which was related to down-regulation of superoxide dismutase and up-regulation of a protein related to endoplasmic reticulum stress.

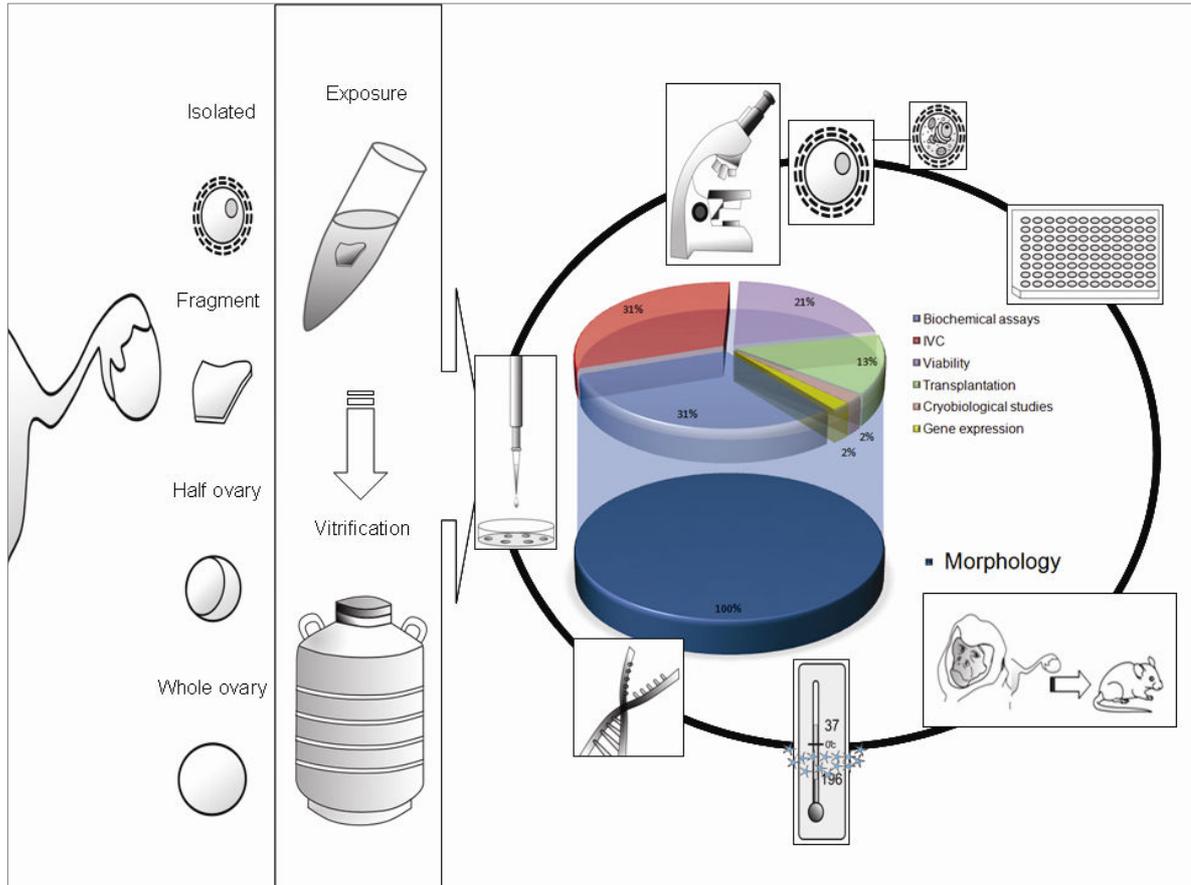


Figure 3. A summary of the methods used to evaluate ovarian tissue quality after vitrification. Finally, in 78% of the studies only follicles were evaluated after ovarian tissue vitrification, whereas stromal cells and vessel integrity have been neglected. Only in a few studies these two compartments have gained some attention (16% and 6% of the studies referred to stromal cells and vessel integrity, respectively). A summary of methods used to evaluate ovarian tissue quality after vitrification is presented in Figure 3. The main results obtained are shown in Table 3.

Conclusions

Many vitrification protocols have been developed and are readily available to be applied in human clinical practice and animal reproduction centers. However, several issues related to vitrification safety and risks need to be controlled. Any cryoprotectant, as a chemical compound, may be considered a hazard, which means that high or low risks due to

cryoprotectant exposure must be evaluated. It is essential to exclude possible contaminants during vitrification, such as serum or contact with liquid nitrogen. Success of vitrification protocols must be evaluated following concrete parameters other than be limited to morphological issues. The implementation of tests using animal models like domestic ruminants must be considered, but protocols must fulfill the same safety guidelines proposed to human and non-human primates.

Acknowledgements

This research was supported by CNPq and CAPES. RR Santos is supported by CNPq (project 483439/2009-6), Brazil. L. Santana is supported by a grant from CAPES.

References

1. Fahy GM. Vitrification: a new approach to organ cryopreservation. *Prog Clin Biol Res* 1986; 224:305-335.
2. Sugimoto M, Miyamoto H, Kabasawa T, *et al.* Follicle survival in neonatal rat ovaries cryopreserved by vitrification ccessful vitrification of bovine and human ovarian tissue. *Cryo-Lett* 1996;17:93-98.
3. De la Peña EC, Takahashi Y, Katagiri S, *et al.* Birth of pups after transfer of mouse embryos derived from vitrified preantral follicles. *Reproduction* 2002;123:593–600.
4. Isachenko V, Isachenko E, Rahimi G, *et al.* Cryopreservation of human ovarian tissue by direct plunging into liquid nitrogen: negative effect of disaccharides in rapid freezing solution. *Cryo-Lett* 2002;23:333–344.
5. Bordes A, Lornage J, Demirci B, *et al.* Normal gestations and live births after orthotopic autograft of vitrified-warmed hemi-ovaries into ewes. *Hum Reprod* 2005;20:2745-2748.

6. Amorim CA, Curaba M, Van Langendonckt A, *et al.* Vitrification as an alternative means of cryopreserving ovarian tissue. *Reprod Biomed Online* 2011;23:160-186.
7. von Wolff M, Donnez J, Hovatta O, *et al.* Cryopreservation and autotransplantation of human ovarian tissue prior to cytotoxic therapy—a technique in its infancy but already successful in fertility preservation. *Eur J Cancer* 2009;45:1547-1553.
8. Santos RR, Amorim C, Cecconi S, *et al.* Cryopreservation of ovarian tissue: an emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. *Anim Reprod Sci* 2010;122:151-163.
9. Gandolfi F, Paffoni A, Papasso BE, *et al.* Efficiency of equilibrium cooling and vitrification procedures for the cryopreservation of ovarian tissue: comparative analysis between human and animal models. *Fertil Steril* 2006;85:1150-1156.
10. Isachenko V, Lapidus I, Isachenko E, *et al.* Human ovarian tissue vitrification versus conventional freezing: morphological, endocrinological, and molecular biological evaluation. *Reproduction* 2009;138:319-327.
11. Kagawa N, Silber S, Kuwayama M. Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue. *Reprod Biomed Online* 2009;18:568-577.
12. Bao RM, Yamasaka E, Moniruzzaman M, *et al.* Development of vitrified bovine secondary and primordial follicles in xenografts. *Theriogenology* 2010;74:817-827.
13. Pegg DE. Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol* 2007;368:39-57.
14. Fahy GM. The relevance of cryoprotectant “toxicity” to cryobiology. *Cryobiology* 1986;23:1-13.
15. Fahy GM, Wowk B, Wu J *et al.* Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. *Cryobiology* 2004;48:22-35.
16. Fahy GM. Cryoprotectant toxicity neutralization. *Cryobiology* 2010;60:45-53.

17. Aye M, Di Giorgio C, De Mo M, *et al.* Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants used for human oocyte vitrification: dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol. *Food Chem Toxicol* 2010;48:1905-1912.
18. Santos RR, Tharasanit T, Van Haefen T, *et al.* Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods. *Cell Tissue Res.* 2007;327:167-176.
19. Pegg DE. Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol* 2007;368:39-57.
20. Vajta G, Nagy ZP. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod Biomed Online* 2006;12:779-796.
21. Lawson A, Ahmad H, Sambanis A. Cytotoxicity effects of cryoprotectants as single-component and cocktail vitrification solutions. *Cryobiology* 2011;62:115-122.
22. Courbiere B, Caquant L, Mazover C, *et al.* Difficulties improving ovarian functional recovery by microvascular transplantation and whole ovary vitrification. *Fertil Steril* 2009;91:2697-2706.
23. Celestino JJ, Santos RR, Melo MAP, *et al.* Vitrification of bovine ovarian tissue applying the SSV method. *Biopreserv Biobank* 2010;8:219-221.
24. Li YB, Zhou CQ, Yang GF. Modified vitrification method for cryopreservation of human ovarian tissues. *Chin Med J* 2007;120:110-114.
25. Huang L, Mo Y, Wang W, *et al.* Cryopreservation of human ovarian tissue by solid-surface vitrification. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008;139:193-198.
26. Keros V, Xella X, Hultenby K, *et al.* Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. *Hum Reprod* 2009;24:1670-1683.
27. Rahimi G, Isachenko V, Kreienberg R, *et al.* Re-vascularization in human ovarian tissue after conventional freezing or vitrification and xenotransplantation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2010;149:63-67.

28. Zhou XH, Wu YJ, Shi J, *et al.* Cryopreservation of human ovarian tissue: comparison of novel direct cover vitrification and conventional vitrification. *Cryobiology* 2010;60:101-105.
29. Chang HJ, Moon JH, Lee JR, *et al.* Optimal condition of vitrification method for cryopreservation of human ovarian cortical tissues. *J Obstet Gynaecol Res* 2011;37:1092-1101.
30. Oktem O, Alper E, Balaban B, *et al.* Vitrified human ovaries have fewer primordial follicles and produce less antimüllerian hormone than slow-frozen ovaries. *Fertil Steril* 2011;95:2661-2664.
31. Sheiki M, Hultenby K, Niklasson B, *et al.* Clinical grade vitrification of human ovarian tissue: an ultrastructural analysis of follicles and stroma in vitrified tissue. *Hum Reprod* 2011;26:594-603.
32. Hashimoto S, Suzuki N, Yamanaka M, *et al.* Effects of vitrification solutions and equilibration times on the morphology of cynomolgus ovarian tissues. *Reprod Biomed Online* 2010;21:501-509.
33. Ting AY, Yeoman RR, Lawson MS, *et al.* In vitro development of secondary follicles from cryopreserved rhesus macaque ovarian tissue after slow-rate freeze or vitrification. *Hum Reprod* 2011;26:2461-2472.
34. Courbiere B, Odagescu V, Baudot A, *et al.* Follicular viability and histological assessment after cryopreservation of whole sheep ovaries with vascular pedicle by vitrification. *Fertil Steril* 2005;84:1065-1071.
35. Courbiere B, Odagescu V, Baudot A, *et al.* Cryopreservation of the ovary by vitrification as an alternative to slow-cooling protocols. *Fertil Steril* 2006;86:1243-1251.
36. Fathi R, Valojerdi MR, Eimani H, *et al.* Sheep ovarian tissue vitrification by two different dehydration protocols and needle immersing methods. *Cryo-Lett* 2011;32:51-56.

37. Melo MAP, Oskam IC, Celestino JJ, *et al.* Adding ascorbic acid to vitrification and IVC medium influences preantral follicle morphology, but not viability. *Reprod Domest Anim* 2011;46:742-745.
38. Zeisberger SM, Schulz JC, Mairhofer M, *et al.* Biological and physicochemical characterization of a serum- and xeno-free chemically defined cryopreservation procedure for adult human progenitor cells. *Cell Transplant* 2011;20:1241-1257.
39. Amorim CA, David A, Van Langendonck A, *et al.* Vitrification of human ovarian tissue: effect of different solutions and procedures. *Fertil Steril* 2011;95:1094-1097.
40. Schotanus K, Hage WJ, Van den Hurk R. Effects of conditioned media from murine granulosa cell lines on the growth of isolated bovine preantral follicles. *Theriogenology* 1997;48:471-483.
41. Xiao Z, Wang Y, Li L, *et al.* Needle immersed vitrification can lower the concentration of cryoprotectant in human ovarian tissue cryopreservation. *Fertil Steril* 2010;94:2323-2328.
42. Zhang JM, Sheng Y, Cao YZ, *et al.* Cryopreservation of whole ovaries with vascular pedicles: vitrification or conventional freezing? *J Assist Reprod Genet* 2011;28:445-452.
43. Rahimi G, Isachenko E, Isachenko V, *et al.* Comparison of necrosis in human ovarian tissue after conventional slow freezing or vitrification and transplantation in ovariectomized SCID mice. *Reprod Biomed Online* 2004;9:187-193.
44. Rahimi G, Isachenko E, Sauer H, *et al.* Effect of different vitrification protocols for human ovarian tissue on reactive oxygen species and apoptosis. *Reprod Fertil Dev* 2003;15:343-349.
45. Wang Y, Xiao Z, Li L, *et al.* Novel needle immersed vitrification: a practical and conventional method with potential advantages in mouse and human ovarian tissue cryopreservation. *Hum Reprod* 2008;23:2256-2265.

46. Yeoman RR, Wolf DP, Lee DM. Coculture of monkey ovarian tissue increases survival after vitrification and slow rate freezing. *Fertil Steril* 2005;83:1248-1254.
47. Carvalho AA, Faustino LR, Silva CM, *et al.* Influence of vitrification techniques and solutions on the morphology and survival of preantral follicles after in vitro culture of caprine ovarian tissue. *Theriogenology* 2011;76:933-941.

Table 1. Vitrification reports of ovarian tissue from large mammals (2003-2011) (Source MEDLINE)

Year	Species					Total
	Human	Non-human primate	Ovine	Caprine	Bovine	
2003	2 ^{4,44}	0	0	0	0	2
2004	1 ⁴³	0	0	0	0	1
2005	0	1 ⁴⁶	2 ^{5,34}	0	0	3
2006	1 ⁹	0	1 ³⁵	0	1 ⁹	3
2007	1 ²⁴	0	0	1 ¹⁸	0	2
2008	2 ^{25,45}	0	0	0	0	2
2009	3 ^{10,11,26}	0	1 ²²	0	1 ¹¹	5
2010	3 ^{27,28,41}	1 ³²	0	0	2 ^{12,23}	6
2011-	4 ^{29-31,39}	1 ³³	2 ^{36,37}	1 ⁴⁷	2 ⁴²	9
Total (%)	17 (51.5)	3 (9.1)	6 (18.2)	2 (6.1)	5 (15.1)	33 (100)

Table 2. Summary of ovarian tissue donors age, number of experimental replicates and size of vitrified ovarian tissue (during the period 2003-2011) from human and non-human primates (NHP), and domestic ruminants (goat, sheep and cow).

Species	Range age donors	Mean n ^o of replicates per study (range)	Size ovarian tissue
Human	18 – 43 years old	11.50 ± 0.23 (03-26)	1 ± 0,5 mm ³ – 5x5x8mm
Monkey	1 day – 9 years old	06.00 ± 0.58 (04-07)	1x2x2 mm – 1x3x3 mm
Goat	Adult – slaughterhouse	15.00 ± 3.55 (10-20)	1 mm ³ or 9 mm ³
Sheep	5 months – 1.5 years	12.67 ± 1.06 (05-35)	1 mm ³ or half or whole ovary
Cow	Adult – slaughterhouse	09.75 ± 2.46 (03-25)	~ 0,5x1x1 – 3x3x1 mm or whole ovary
Total		10.98 ± 1.58 (03-35)	

Table 3. Main outcomes after vitrification of ovarian tissue from primates and domestic ruminants (2003-2011)

Species	Cryoprotectants	Main outcomes
Human	40% EG + 0.35 M sucrose ^{4,44}	Both follicles and stroma protected from damage ⁴ ; ↑ ROS levels and increased apoptosis in the tissue ⁴⁴
	3.58 M EG + 2.82 M DMSO ⁹	< 18% normal PFs ⁹
	2.62 M DMSO + 2.60 M acetamide + 1.31 M PROH + 0.0075 M PEG ^{10,27}	> 80% normal PFs, normal hormonal activity after 16 days IVC, but ↓ expression of GAPDH ¹⁰ ; Four weeks after xenografting, 65% normal PFs ²⁷
	20% EG + 20% DMSO + 0.5 M sucrose ¹¹	> 89% viable oocytes ¹¹
	2 M DMSO + 2 M PROH + 0.2 M sucrose ²⁴	80% normal PFs after warming, 24% normal PFs after 2 weeks IVC with secretion of E2 and P4 ²⁴
	20% DMSO + 20% EG ²⁵	>85% normal PFs, ↓ apoptosis, follicular development after 10 d IVC with E2 and P4 secretion ²⁵
	10% DMSO + 10% PROH + 10% EG + 10% PVP ^{26,31}	53% normal PFs and 33% ultrastructurally intact oocytes ²⁶ ; >70% normal PFs with well preserved ultrastructure of oocytes, granulosa cells and stromal cells before and after 24 h IVC ³¹
	15%EG + 15% DMSO ^{28,45}	76% normal PFs, 75% ultra structurally intact PFs, > 24% apoptotic cells and reduced follicular density after xenografting ²⁸ ; >80% normal primordial follicles, >87% ultrastructurally intact oocytes and normal follicular density after transplantation ⁴⁵
	40% EG + 18% Ficoll + 0.3 M sucrose ²⁹	34.7 % normal PFs and 31.5% apoptotic cells ²⁹
	15% PROH + 15% EG + 0.2 M sucrose ³⁰	Reduced follicular density, and after 3 d IVC reduced AMH and E2 levels ³⁰
38% EG + 0.5 M trehalose ³⁹	94% normal PFs before IVC and after 2 hours IVC 60% normal PFs ³⁹	
2.15 M EG + 1.69 M DMSO + 0.5 M sucrose ⁴¹	After warming >80% normal PFs, >80% oocytes presenting normal ultra structure, 20% apoptotic cells, but no information on follicular survival after 14 d IVC ⁴¹	
25% GLY + 25% EG + 1% SupercoolR X-100 ⁴³	No increase in necrotic areas when compared to fresh tissue ⁴³	
Monkey	5.64 M EG + 5% PVP + 0.5 M sucrose ³¹	>92% normal PFs with 88% ultrastructurally intact mitochondria, and normal number of lysosomes ³¹
	3 M GLY + 4.5 M EG ³²	35% normal oocytes and 73% normal granulosa cells, secondary follicles were isolated and cultured resulting in some antral follicles but most follicles with delayed growth ³²
	3.4 M GLY + 4.5 M EG ⁴⁶	> 70 % viable follicles after warming and > 89 % viable follicles after IVC for 5 days ⁴⁶
Goat	35% EG + 0.5 M sucrose ¹⁸	80% normal PFs; after warming >70% viable PFs and after 24 h IVC 58% viable PFs ¹⁸
	6M EG + 0.25 M sucrose ⁴⁷	> 70% normal PFs after warming and 70% viable PFs after 24 h IVC ⁴⁷
Sheep	2.62 M DMSO + 2.60 M acetamide + 1.31 M PROH + 0.0075 M PEG ⁵	82% normal PFs after warming; Recovery of P4 levels for one year after autografting. Three pregnancies, five live births but a malformed lamb was born and another died 2 mo after delivery ⁵
	2.75 M DMSO + 2.76 M formamide + 1.97 M PROH ^{22,34,35}	~50% normal PFs ^{22,34} ; No follicular survival ³⁵
	15% DMSO + 15% EG ³⁶	50% normal PFs and 22% apoptotic cells ³⁶
	40% EG + 0.5 M sucrose ³⁷	> 80% normal PFs after warming and >60% viable preantral follicles after 5 days IVC ³⁷
Cow	3.58 M EG + 2.82 M DMSO ⁹	38% normal PFs ⁹
	20% EG + 20% DMSO + 0.5 M sucrose ¹¹	>89% normal oocytes ¹¹
	15% EG + 15% DMSO ¹²	No apparent changes in stromal cells morphology and > 80% normal primordial follicles. But 6 month after xenografting, there was decreased follicular density, abnormal developing of secondary follicles ¹²
	4 M EG ²³	80% normal PFs ²³
	25% DMSO + 25% PROH ⁴²	59% normal and >60% viable PFs after warming. 14 days IVC lead to reduced levels of E2 and P4 ⁴²

AMH: anti-müllerian hormone; E2: estradiol; GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; IVC: in vitro culture; P4: progesterone; PEG: polyethylene glycol; PVP: polyvinylpyrrolidone; ROS:

reactive oxygen species.

4. A FÊMEA DE *Sapajus apella*

A espécie *Sapajus apella*, anteriormente classificado como *Cebus apella* (ALFARO, 2012ab; BOUBLI et al, 2012), pertence à Ordem Primates, Subordem Haplorrhini, Infraordem Platyrrhini (WILSON; REEDER, 2005), estando inseridos na família Cebidae e Gênero *Sapajus*, sendo conhecidos popularmente como “Macaco-prego”, assim como grande parte de outros indivíduos do gênero *Sapajus* (*libidinosus*; *macrocephalus*; *nigritus*), diferente de indivíduos do gênero *Cebus* (*olivaceus*; *albifrons*; *kaapori*), sendo normalmente conhecidos por “Caiarara” (FREESE; OPENHEIMER, 1981; REIS; PERACCHI; ANDRADE, 2008; BOUBLI et al, 2012) ou popularmente como “Macaco-prego” (FREESE; OPENHEIMER, 1981), sendo onívoro e, em ambiente natural, formam grupos de 20 a 30 indivíduos.

Os primatas do gênero *Sapajus* estão distribuídos biogeograficamente em zonas neotropicais, especificamente na região do Bioma Amazônico (Brasil: PA, AM, MA, RO, MT; Bolívia; Perú). Estes animais preferencialmente alojam-se em estratos arbóreos, porém, não apresentam grandes dificuldades adaptativas, sendo descritos em florestas primárias, secundárias caatingas, mangues, palmeiras e campos (SILVA JÚNIOR, 2002; SILVA, 2007; BOUBLI et al, 2012). A taxonomia entre *Sapajus* e *Cebus* é amplamente discutida devido a semelhanças ecológicas (CUNHA, 2007; VAZ; PORT-CARVALHO, 2010), morfológicas (WRIGHT, 2006) e genéticas (MATAYOSHI, 1987; SILVA JUNIOR, 2001; AMARAL et al, 2008). Sendo a presença de tufo preto no alto da cabeça e a coloração mais escura da pelagem dos membros e da cauda são características marcantes (HIRSCH et al., 2008) (Figura 5).

Figura 5: Apresentação de representantes da espécie *Sapajus apella* (macaco-prego) em um momento de socialização.



4.1. BIOLOGIA REPRODUTIVA DE FÊMEAS DE *Sapajus apella*

Quanto aos seus aspectos reprodutivos, o início da maturidade sexual das fêmeas varia de 4-5 anos. Esta espécie apresenta comportamento poligâmico, podendo se reproduzir até os 25 anos (NAGLE; DENARI, 1983) e sobreviver em cativeiro até 20 ou 40 anos (NOWAK; PARADISO, 1983) (DOMINGUES *et al.*, 2005).

A fêmea de *Sapajus apella* apresenta um ciclo menstrual variando de 18 a 21 dias (LINN *et al.*, 1995; DOMINGUES, 2007; ORTIZ *et al.*, 2005) e geralmente ovula um único oócito a cada ciclo. As fêmeas de *Sapajus apella* apresentam mudanças cíclicas do epitélio vaginal, acompanhando a ciclicidade ovariana (NAGLE *et al.*, 1980; HEARN, 1994). Estas alterações podem ser observadas com o aumento da quantidade de células intermediárias, superficiais e queratinizadas, assim como pela presença ou ausência de eritrócitos e leucócitos, podendo ser utilizadas para determinar o período em que a ovulação irá acontecer (MARTINS, 2004).

De acordo com Domingues e colaboradores (2004) em *Sapajus apella* do número total de folículos 80% \pm 4,95 foi normal e 20% \pm 4,95 foi considerado degenerado. Além disso, foi observado que o folículo de transição tem a maior porcentagem de folículos normais, seguidas de folículos secundário, primário e primordial. Onde o percentual de folículos normais foi significativamente maior que o de folículos degenerados em todas as categorias.

4.2. ESTADO ATUAL DO DESENVOLVIMENTO DE BIOTÉCNICAS DE REPRODUÇÃO EM *Sapajus apella*

Cada vez mais e mais dados acerca desta espécie tem sido gradualmente obtidos. Um dele foi o trabalho publicado por Domingues e colaboradores em 2003 para a adaptação de um procedimento mecânico para o isolamento de folículos pré-antrais de *S. apella*. Para isso foi avaliado o efeito do intervalo de cortes seriados do *tissue chopper* sobre o número de folículos pré-antrais. Onde no intervalo de corte de 500 μ m foram obtidos os melhores resultados.

Já em 2004, Domingues e colaboradores fizeram um levantamento quantitativo e qualitativo da população folicular ovariana de fêmeas de *S. apella* através de microscopia óptica para posteriores estudos *in vivo* ou *in vitro* da foliculogênese de PNH neotropicals desta. Onde estes foram classificados em folículos primordiais, transição, primário e secundário, assim como a mensuração do diâmetro médio folicular, oocitário e do núcleo do oócito para acompanhar o desenvolvimento folicular.

Recentemente Brito e colaboradores, em 2011, realizaram um estudo acerca da expressão gênica em tecido cortical ovariano da espécie *S. apella*. Em seu trabalho foi feita a

extracção de RNA total e síntese de cDNA e analisada a estabilidade do gliceraldeído-2-fosfato desidrogenase (GAPDH), hipoxantina fosforribosil 1 (HPRT1) e TATA-binding protein (TBP), onde foi observado que HPRT1 e TBP são os genes de referência mais estáveis e por isso adequados para a normalização de outros tanto para tecido a fresco como crioprottegido nesta espécie.

Atualmente, técnicas de reprodução assistida objetivando a Maturação *in vitro* (MIV) e a Produção de Embriões *in vitro* (PIVE) já são uma realidade na espécie. A exemplo destes avanços, temos o trabalho de Lima e colaboradores (2012), em que foi feito não somente a coleta dos oócitos, mas também a sua MIV durante os tempos de 36 e 40 horas e sua posterior FIV ou ativação partenogenética (DOMINGUES **et al.**, 2007, 2010; LIMA **et al.**, 2012).

Artigo 2

Devido à interação entre o experimento referente à vitrificação do presente projeto e o estudo de congelação lenta relacionado a outra dissertação de mestrado, os dados apresentados abaixo farão parte de um artigo de Congelação Lenta e Vitrificação de Tecido Ovariano de Macaco-Prego, a ser submetido ao periódico Cell Tissue and Reseach. Ambas as responsáveis pelos experimentos serão as primeiras autoras do artigo. Abaixo, a metodologia, resultados e discussão do estudo referente à vitrificação.

5. METODOLOGIA

O presente experimento foi submetido e aprovado pelo comitê de ética do Instituto Evandro Chagas em maio de 2009 e realizado no Centro Nacional de Primatas (CENP-SVS), localizado na cidade de Ananindeua - Pará (latitude: 1°22'33'' sul, longitude: 48°22'33'' oeste). Além disso, foi aprovado pelo CNPq com recursos para material de consumo. Foram utilizadas nove (09) fêmeas adultas de *Sapajus apella*, com histórico comprovado de atividade reprodutiva regular. As fêmeas foram mantidas em galpões telados, em gaiolas de alumínio individuais sujeitas ao fotoperíodo natural e com alimentação balanceada, à base de frutas, verduras, legumes, ração peletizada e água *ad libitum*.

5.1. ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA

Todos os procedimentos experimentais foram submetidos para avaliação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPAN) do Instituto Evandro Chagas (IEC/SVS/MS) e seguiu todas as orientações contidas na resolução nº1 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA-MCT). Quanto aos aspectos de biossegurança, os profissionais envolvidos utilizaram os equipamentos de proteção individual e coletiva pertinentes, seguindo os procedimentos operacionais da instituição. O material utilizado foi esterilizado e devidamente descartado (Descarpack®). Houve sempre a presença de, pelo menos, um médico veterinário para a verificação do estado de saúde do animal.

5.2. LOCAL DA COLETA

As coletas dos tecidos ovarianos foram realizadas dentro das instalações físicas do Centro Nacional de Primatas, órgão da Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde (CENP/SVS/MS), localizado na rodovia BR-316, Km 7, município de Ananindeua, estado do Pará (1° 22' 57"S, 48° 22' 52"W).

5.3. GRUPO EXPERIMENTAL

Os animais selecionados para os experimentos eram pertencentes ao plantel reprodutivo do CENP. Estes permaneceram instalados em gaiolas coletivas de alvenaria e tela (3,85m x 2,30m x 2,55m), dentro do galpão de reprodução VI. A gaiola era composta por recinto duplo, com comunicação lateral controlada através de portinhola, utilizada no manejo do grupo. Cada gaiola coletiva possuía um grupo reprodutivo, composto por um macho e em média, cinco fêmeas, os quais foram submetidos a fotoperíodo natural e a alimentação diária balanceada à base de hortifrutigranjeiros, ração peletizada específica para primatas neotropicais (MEGAZOO® P18, Proteína 18%, Fibra Máx. 6,5%, Betim – MG) e água *ad libitum*.

5.4. COLETA DO TECIDO CORTICAL OVARIANO

Para o desenvolvimento dos protocolos experimentais foram utilizadas quatro fêmeas (n=4) adultas de *S. apella* para realização das coletas de fragmentos ovarianos. Para tanto, os animais foram contidos com Cloridrato de ketamina (10mg/PV) e Xilazina (1mg/PV) e permaneceram sob ação de anestesia inalatória (Halotano a 2%) (DOMINGUES et al., 2003; DOMINGUES, 2007), as coletas dos tecidos foram realizadas por meio de laparotomia exploratória.

O acesso se deu pela porção abdominal do animal com uma incisão de aproximadamente 5 centímetros (5cm) no sentido longitudinal sobre a linha Alba, procedimento que permitiu a exploração da cavidade abdominal e o tracionamento do ovário ao nível da superfície abdominal para que fosse realizada a retirada da biópsia em um único ovário para cada animal, conforme descrito por Domingues e colaboradores (2007) (Figura 01.A, Artigo 3).

No entanto, para que fosse possível a retirada de um fragmento suficientemente grande e de profundidade reduzida foi feita a adaptação de uma técnica cirúrgica odontológica utilizada para a obtenção de finas lâminas de tecido gengival para a realização de enxerto em áreas danificadas. Esta técnica consiste em delimitação da área a ser biopsiada e subsequente retirada do tecido tal como descrito em Santana e colaboradores (2012) (Figura 01.A a D, Artigo 3).

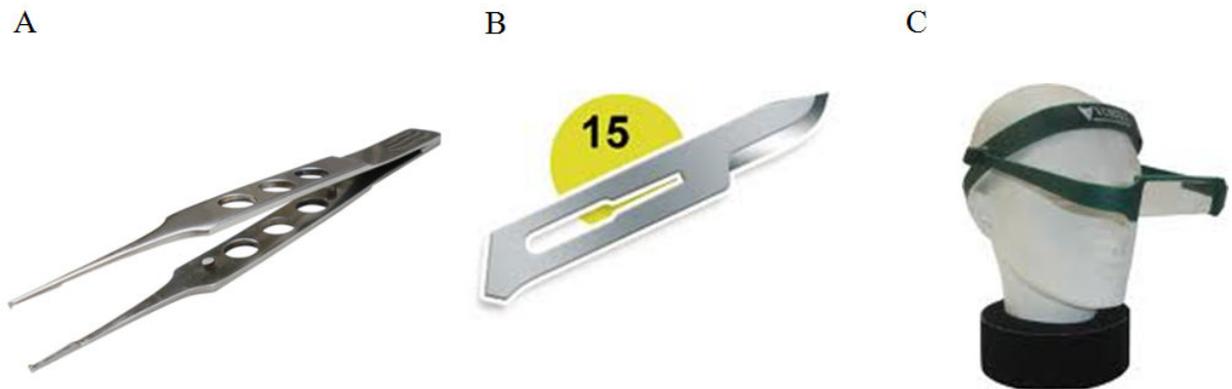
O fato de esta técnica ter por objetivo manter a biópsia o mais superficial possível reduziu consideravelmente o sangramento e os riscos de hemorragia ocasionada por um vaso de maior calibre. Somado a isto se tem ainda a hemostasia passiva da superfície durante a retirada da biópsia através da irrigação com soro fisiológico resfriado a uma temperatura de 20°C a fim de proporcionar uma contração vascular superficial e interrupção de qualquer

sangramento decorrente do procedimento a fim de evitar provocar maiores danos não somente ao ovário, mas ao animal.

A técnica cirúrgica foi realizada com o auxílio de uma pinça oftálmica com micro dente de rato (Figura 06.A) e lâmina de bisturi número 15 (Figura 06.B) montada em cabo, para melhor manuseio da biópsia durante sua retirada pela técnica de retalho e então o seu fracionamento.

Além da utilização de instrumentais que permitiram um manuseio mais delicado das peças, adicionou-se ainda o uso de uma Lupa de Pala (ou Lapela) com aumento de 7 vezes (7x) que possibilitou a aquisição de uma lâmina de tecido composta essencialmente da região cortical do ovário, a qual constituiu a área de interesse neste estudo por ser o local onde estão alojados os folículos pré-antrais, conforme protocolo já estabelecido pelo grupo de pesquisa (BIOMEDAM).

Figura 06: Instrumentais utilizados execução da biópsia ovariana. Pinça Oftálmica do tipo Conjutiva (em A) com micro dente de rato. Lâmina cirúrgica (número 15) (em B). E por ultimo a lupa de Pala (em C).



Acessado em 12 de fevereiro de 2011.

As biópsias do tecido cortical ovariano possuíam aproximadamente 1mm de profundidade por 1mm de largura e 3mm de comprimento (Figura 01.E a F, Artigo 3) e foram divididas em fragmentos de 1mm³ e expostos aos tratamentos tal como descrito no Experimento II (Figura 07). Este processo durava em média 20 minutos a partir do momento em que o tecido era dissecado e fracionado até da-se início a exposição dos fragmentos nos tratamentos sugeridos ao mesmo tempo.

5.5.1. FASE I: Exposição do Tecido Cortical Ovariano

O Experimento I consistiu na realização dos experimentos relacionados a etapa de exposição do tecido ovariano, o método desenvolvido por Santos e colaboradores (2007) para caprinos foi adaptado, ou seja, realizado em combinação ou não com antioxidante (Selênio ou Trolox). Onde para o experimento foram utilizados 4 fêmeas, as biopsias ovarianas coletadas e divididas em 9 fragmentos de 1 mm³, por ovário. Um fragmento foi escolhido aleatoriamente e destinado para histologia clássica (HC) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Este fragmento constituiu o grupo Controle, o qual não recebeu qualquer tipo de tratamento. Enquanto os demais 8 fragmentos foram expostos ao Etilenoglicol (EG) 40% + Sacarose (Sac) 0,5 M dissolvidos em TCM-199 adicionados ou não de Selenio (2,5, 5 ou 10 ng/ml) ou Trolox (25, 50 ou 100 mM) (Figura 07).

Para evitar danos causados pelo choque das altas concentrações de EG optou-se por realizar a exposição com aumento gradual de sua concentração através da utilização de duas soluções descritas como Solução de Vitrificação 1 (SV1) e Solução de Vitrificação 2 (SV2), como está representado na Tabela 1 e cujos protocolos de preparo constam no Anexo 1. Já que alguns trabalhos realizados tendo como enfoque o desenvolvimento de técnicas e protocolos de criopreservação tecidual mostraram que a exposição tecidual a elevadas concentrações de EG podem ser prejudicial à viabilidade do tecido pós vitrificação (SANTOS et al., 2007).

Figura 09: Distribuição dos grupos experimentais com suas respectivas soluções de exposição com ou sem os antioxidantes em suas respectivas concentrações.

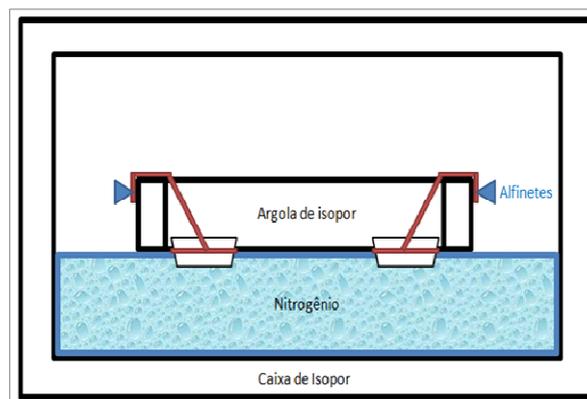
Antioxidante	Tratamento	SV1	SV2
Controle	T1	TCM199 somente	TCM199 somente
	T2	40 ml TCM Hepes + 10 ml EG + 8.6 g Sac	30 ml TCM Hepes + 20 ml EG + 8.6 g Sac
Selênio	T3	2.5 ng/ml, misturar 15 ml de LS2 + 15 ml de SV1	2.5 ng/ml, misturar 15 ml de LLS2 + 15 ml de SV2
	T4	de 5 ng/ml, misturar 15 ml de LS1 + 15 ml de SV1	5 ng/ml, misturar 15 ml de LLS1 + 15 ml de SV2
	T5	30 µl de Selênio B a 29,97 ml de SV1 = 10 ng/ml (LS1)	30 µl de Selênio B a 29,97 ml de SV2 = 10 ng/ml
Trolox	T6	25 µM, misturar 7.5 ml de LT2 + 7.5 ml de SV1	25 µM, misturar 7.5 ml de LLT2 + 7.5 ml de SV2
	T7	50 µM, misturar 7.5 ml de LT1 + 7.5 ml de SV1	50 µM, misturar 7.5 ml de LLT1 + 7.5 ml de SV2
	T8	150 µl Trolox A em 14850 µl SV1= 100 µM Trolox	150 µl Trolox A em 14850 µl SV2= 100 µM Trolox

Após o término de cada tratamento, um fragmento de cada grupo experimental foi fixado e submetido à Histologia Clássica (HC), Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (Figura 07).

5.5.2. **FASE II: Vitriificação do Tecido Cortical Ovariano**

Nesta fase foram coletados de cada ovário de 5 fêmeas, 7 fragmentos (1mm³) por fêmea. Um fragmento escolhido e destinado para análise histológica. Enquanto os demais 6 fragmentos foram criopreservados utilizando os tratamentos que resultaram em maiores e piores taxas de viabilidade pós criopreservação nas soluções de vitriificação (n=5) (Figura 08) e submetidos à vitriificação em uma caixa térmica desenvolvida pela discente (Figura 09) e estocado em um botijão de nitrogênio líquido a -196°C.

Figura 10: Desenho esquemático da vista lateral da caixa térmica desenvolvida durante o projeto para a realização do processo de vitriificação.



- Etapa de Aquecimento do Tecido Ovariano Vitriificado

Para o aquecimento dos fragmentos de córtex ovariano os mesmos foram retirados do nitrogênio e mantidos a temperatura ambiente durante 30 segundos e depois lavados a uma temperatura de 37°C em TCM 199 acrescido de tampão HEPES e Sacarose na primeira lavagem durante 3 minutos e depois duas lavagens apenas com TCM 199 acrescido de tampão HEPES durante 5 e 7 minutos, respectivamente, para somente então seguirem as demais análises, assim como apresentado na figura a seguir (Figura 08).

5.6. ANÁLISES DO TECIDO CORTICAL OVARIANO

- Microscopia Óptica (MO)

Foi feita a avaliação folicular através da Microscopia Óptica (MO) em 2 momentos durante o experimento, tanto logo após a exposição aos tratamentos propostos ao início do projeto (Microscopia Óptica) conforme descrito na Figura 08, como após a vitrificação para avaliação dos efeitos resultantes do processo de vitrificação e devitrificação (Histologia Clássica).

Secções semi-finas (1 μm) foram montadas em lâminas de vidro e coradas com o corante azul de metileno e destinadas à microscopia óptica. Os fragmentos de córtex ovariano foram observados a cada 10ª secção. Os folículos primordiais, transição, primários, secundários e antrais foram avaliados, contados e medidos para estimar a população folicular relativa, de acordo como descrito por Domingues et al. (2004). Etapa esta foi realizada no Laboratório de Ultraestrutura no Instituto de Ciências Biológicas da na Universidade Federal do Pará (UFPA).

Já os fragmentos ovarianos aquecidos após a vitrificação foram fixados (formolaldeído 10%), desidratados em concentrações crescentes de álcool, embebidos em parafina e seccionados a 5 μm . Cada secção montada em lâmina e corada com hematoxilina-eosina (HE). A qualidade folicular foi avaliada basicamente, pela integridade morfológica do oócito, células da granulosa e membrana basal (SANTOS et al., 2006; DEPALO et al., 2009). Etapa esta também realizada no Laboratório de Ultraestrutura no Instituto de Ciências Biológicas da na Universidade Federal do Pará (UFPA).

- Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para avaliar a integridade do núcleo (membrana nuclear), mitocôndria e distribuição das organelas do oócito, utilizou-se as secções ultra-finas (60-70nm). Os fragmentos com dimensões de no máximo de 1 mm^3 fixados em Paraformaldeído 2% e Glutaraldeído 2.5% em tampão cacodilato de sódio 0.1M (pH 7.2) por 3 h. Após fixação e cinco lavagens, os fragmentos foram novamente fixados em tetróxido de ósmio 1%, ferrocianeto de potássio 0.8% e cloreto de cálcio 5mM em tampão cacodilato de sódio 0.1M (pH 7.2) por 1h a 4°C. Em seguida, as amostras passaram pelo processo de desidratação através de um gradiente de soluções de acetona (50-100%). A infiltração da resina foi realizada utilizando acetona e Epon nas seguintes proporções: 2:1; 1:1; 1:2 (6h cada) e Epon puro por 8h. Para a inclusão, os tecidos ficaram em resina Epon por 48h a 60°C. Para o contraste utilizou-se acetato de uranila e citrato de chumbo, para visualização em microscópio de elétron de transmissão (Jeol JEM

100C). Tal etapa foi realizada na UFPA (semifinos) e Instituto Evandro Chagas – Almirante Barroso (Ultrafinos).

- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A expressão dos genes foi quantificada por meio da PCR em tempo real. As reações utilizaram os seguintes pares de *primers*: Erp29, Erp60, Hsp70 e Sod1. Para tanto, as amostras de cada tratamento foram mantidas em RNAlater após a exposição a -20°C até a extração do RNA (Tabela 02).

Figura 11: Sequência de primers desenvolvidos e validados no presente projeto.

Gene	Sequência	No. de bases	Posição do primer	Referência
Erp29	5'- GCCCTTCCCCTGGATACGGTCA 3'- CATCCTGCTTCTCACCGTAGGGGT	103	55	Brito, 2012
Erp60	5'- GCCCGCCATGCTGCTATCCG 3'- AGTCCACCCGCTCCGTCCA	108	74	Brito, 2012
Hsp70	5'- TGACCCTCCTGTTGGCTGGCT 3'- CCAACGGAACAATAGGTGGTGGCC	100	52	Brito, 2012
Sod1	5'- GCCGCACATTGGTGGTCCATGAA 3'- AAGCCAGACGACCTCCAGCGT	96	425	Brito, 2012

(Pesquisa de laboratório, 2012)

O RNA foi extraído e sua transcrição reversa e a quantificação da expressão gênica foram realizadas na Universidade Federal do Pará (UFPA) seguindo o protocolo desenvolvido pelo grupo de pesquisa (BRITO et al., 2011). Onde o RNA total foi extraído usando o reagente de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA). A concentração de RNA foi estimada por leitura da absorvância a 260 nm e foi verificado para a pureza a 280 nm em espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000 e ND-8000 8-Sample, NanoDrop, Wilmington, DE).

Todas as amostra foram ajustadas para 45 ng/ml de RNA e para então sintetizar o ADNc. A transcrição reversa foi realizada num volume total de 20 µL de composto 10 µl de RNA de exemplo, 2 µl tampão (transcrissao reversa) RT, 0,8 µl mistura de dNTP (100 mM), 2 µL Primers RT aleatórios, 1 µl MultiScribe™ transcriptase reversa, 1 µl Inibidor de RNase e 3,2 µl de água ultra-pura (High Capacity kit transcrição reversa, Applied Biosystems, Foster City, CA). A mistura foi incubada a 42 ° C durante 1 h, em seguida a 80 ° C durante 5 min, e, finalmente, armazenada a -20 °C. O controle negativo foi preparado sob as mesmas condições, mas sem a adição do ácido nucleico.

- A amplificação por PCR e determinação da estabilidade do gene

O qPCR foi realizada utilizando um termociclador (ABI PRISM 7500 PCR em tempo real do sistema, Applied Biosystems). Os iniciadores escolhidos para realizar a amplificação de genes candidatos de referência diferentes são mostrados na Tabela 2. Eficiência de amplificação foi determinada por placa usando LinRegPCR (WANG et al., 2011). Os dados foram analisados utilizando a eficiência corrigida Delta-Delta-Ct método (PFAFFL, 2001). Os valores de mudança de dobra dos genes que codificam Erp29, Erp60, Hsp70 e Sod1 (Tabela 02) foram normalizados utilizando a média geométrica dos valores de mudança de vezes de dois genes de referência: HPRT1 e TBP (BRITO, 2012). Reações de amplificação por PCR consistem de desnaturação inicial e activação da polimerase: Estágio 1 (2 min a 50 °C), Estágio 2 (10 min a 95 °C), Estágio 3 (45 ciclos de 15 s a 95 °C, 15 s, a 58 °C, 45 s, a 60 °C (extensão), Estágio 4 (15 s, a 95 °C, 1 min a 60 °C e 15 s a 95 °C). A extensão foi realizada por 45 segundos a 60 °C.

As amostras de cada tratamento foram mantidas a -80 °C até a extração do RNA. Para tanto o RNA total foi extraído com a utilização do reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) isolado utilizando o Kit Rneasy e o Rnase-free Dnase set (Qiogen®), seguindo as instruções do fabricante, sendo a transcrição reversa e quantificação da expressão gênica realizada de acordo com o descrito previamente por Silva e colaboradores (2004) e a regulação dos genes quantificada e comparada via software fornecido (Qiogen).

- Dosagem da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC)

Foram feitas as análises de acordo com a absorbância p/ cada amostra. As análises foram feitas de modo que a diluição fosse compatível com a capacidade de leitura do equipamento a fim de possibilitar repetições das amostras, se necessário.

Para tanto, elas foram maceradas com o auxílio de broca carbide (multilaminada) de aço número 3 em baixa rotação (para evitar o aquecimento durante a maceração) e posteriormente finalizadas a diluição com o "mini mixer" cuja ponta foi adaptada para o processo. Além disso, as amostras eram maceradas em um volume mínimo de acordo com o peso de cada fragmento na proporção de 1:10 com PBS para então ser feita a diluição final no volume de 1:100.

O potencial antioxidante foi determinado segundo a sua equivalência a um potente antioxidante conhecido, o trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametocromono-2-carboxílico; Aldrich Chemical Co 23881-3), o qual é um análogo sintético hidrossolúvel da vitamina E.

Seguiu-se o método proposto por Miller et al. (1993), modificado por Re et al. (1999), em condições adaptadas de temperatura, proporções relativas dos reagentes e tempo de

mensuração. Trata-se de uma técnica colorimétrica baseada na reação entre o ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-ácido-6-sulfônico-diamônio) com persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$), produzindo diretamente o radical cátion $ABTS^{•+}$, cromóforo de coloração verde/azul, com absorvância máxima nos comprimentos de onda 645, 734 e 815nm. A adição de antioxidantes a este radical cátion pré-formado o reduz novamente a ABTS, na extensão e escala de tempo dependente da capacidade antioxidante, concentração de antioxidantes e duração da reação. O que foi mensurado por espectrofotometria pela observação da mudança na absorvância lida a 734nm durante um determinado intervalo de tempo. Assim, a extensão da descoloração como índice de inibição do radical cátion $ABTS^{•+}$ foi determinada como a atividade antioxidante total da amostra, sendo então calculada a sua relação com a reatividade do trolox como padrão, sob as mesmas condições. Os resultados finais foram expressos em micromoles por litro ($\mu M/l$) correspondente a concentração do trolox com capacidade antioxidante equivalente à da amostra, padrão de medida este denominado *trolox equivalente antioxidant capacity* (TEAC).

6. RESULTADOS

- Coleta de tecido cortical ovariano

Artigos Científicos

Artigo 3

Para a realização do presente estudo, foi necessário o desenvolvimento de um método de coleta de tecido ovariano através de laparoscopia. Tal método foi desenvolvido e aceito para publicação pelo periódico científico *Zygote* (doi:10.1017/S0967199411000724). Abaixo, o artigo completo:

Adaptation of a *trap door* technique for the recovery of ovarian cortical biopsies from *Cebus apella* (capuchin monkey)

Luana N. Santana^{1,2}, Adriel B. Brito^{1,2}, Danielle C. Brito¹,
Julianne S. Lima^{1,2}, Sheyla F.S. Domingues^{1,2}, Regiane R. Santos^{1,2,3*}

¹Laboratory of Wild Animal Biology and Medicine, Universidade Federal do Pará, Brazil.

²Animal Science Post-graduation Program, Universidade Federal do Pará, Brazil.

³Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands

*Correspondence to Regiane R. Santos

Faculty of Veterinary Medicine

Yalelaan 104, 3584 CM, Utrecht, The Netherlands.

Tel.: +31 30 2531078;

fax: +31 30 2534125

E-mail: R.Rodriguesdossantos@pq.cnpq.br

Summary

Our objective in the present study was to establish an optimal procedure for the recovery of ovarian biopsies from capuchin monkeys. For this, we have adapted a trap door biopsy method. Follicular density and quality in the biopsies were evaluated. Additionally, ultrasound analysis was performed before and continuously after surgery to assess ovarian structures. Ovarian tissue biopsies recovered by trap door technique allowed the successful harvesting of primordial follicles from capuchin monkeys, and no uneventful event was recorded. The cycle of the females was not affected by surgery and no adhesions were found thereafter. In conclusion, the adaptation of a trap door biopsy method is a safe procedure and allows recovery of healthy primordial follicles.

Keywords ovarian biopsy – *Cebus apella* – primordial follicles – morphology - ultrasound

Introduction

Cryopreservation of human ovarian tissue has successfully resulted in 13 live births (Donnez et al., 2011). However, there is a paucity of efficient cryopreservation protocols for primordial follicles enclosed in the ovarian tissue from non-human primates (NHP), in special New World primates. Due to species-specific differences, cryopreservation protocols developed using mice as model can not be directly applied in primates (Santos et al., 2010). As well, protocols developed using human ovarian tissue should be tested in NHP species before application. Therefore, tissue collection from NHP and experimentation is crucial. Ovarian tissue can be collected from animals found dead at zoos or from live animals by laparoscopy. The first one is a simple procedure, but will not depend solely on an efficient network between zoo and research institutions, but on the healthy and reproductive condition of the females. For example, most of the females that die naturally are senile, which means ovaries with a depleted population of primordial follicles. Laparoscopy, although more traumatic, allows a controlled collection of ovarian biopsies from healthy animals within their normal reproductive lifespan. Furthermore, ovarian biopsy may be performed by laparoscopy simultaneously with antral follicles puncture, under ultrasound monitoring (Domingues et al., 2010). An efficient method to collect ovarian biopsies from *Cebus apella* (capuchin monkeys), has not been described as yet. Therefore, we have performed ovarian tissue biopsies by modifying a method developed for gingival tissue so-called *trap door* (Edel, 1974). Success of the technique was assessed by ultrasound monitoring, as well as morphological and quantitative analysis of primordial follicles.

Materials and Methods

Our study was approved by the local institutional ethics committee (no.029/2009/CEPAN/IEC/SVS/MS) and the Brazilian Institute for Wildlife and Environment (IBAMA). Five healthy and sexually mature *C. apella* females (15 to 20 years old, weight range: 1.9 to 2.8 kg) were selected for our study. Their daily diet consisted of fresh fruits and commercial pellet chow (FOXY Junior Supreme, 28% crude protein; Provimi, São José dos Pinhais, Paraná, Brazil). Milk, vitamins, minerals, and eggs were supplied once a week. Tap water was available *ad libitum*. The females were kept indoors under a natural photoperiod and housed individually in cages (80 x 90 x 80 cm) at the National Primate Center, Ananindeua, Pará, Brazil. All females presented regular reproductive history. All procedures were performed under general anaesthesia. Each animal was anesthetized with ketamine hydrochloride (10 mg/kg; IM; Vetanarcol, Köning S.A., Avellaneda, Argentina) and xylazine hydrochloride (1 mg/kg; IM; Kensol, Köning S.A.). Before and after surgeries, the females were submitted to 2D ultrasound and Triplex Doppler examination to evaluate uterus and ovaries dimensions, as well as Color and Spectral Doppler of uterine and uterus-ovary-ligament (UOL) arteries (Domingues et al., 2007). To this end, the females were placed in dorsal recumbence. Trans-abdominal 2D ultrasound was used to visualize the uterus, ovaries and ovarian structures. A real-time B-mode diagnostic ultrasound with a multi-frequency (5–8 MHz) micro convex transducer (US/conducted with an HDI 4000 PHILIPS scanner - Philips Medical Systems, Bothell, W.A., USA) was used. Uterine length was calculated as the distance from the fundus of the uterus to the cervix (long axis of the uterus). The uterine height was perpendicular to this axis (dorsum ventral diameter), measured on the long axis view from anterior to posterior walls. The width (transverse diameter) was measured in the axial view. Similarly, the length, height, and width of both ovaries were measured. All measurements were made by obtaining the maximal size in the appropriate dimension, freezing the image, and using internal callipers. Uterine and ovarian volumes were calculated by the ultrasound system using a formula for an ellipsoid [$\pi/6$ (length vs width vs height)]. Uterine and UOL arteries were visualized using colour Doppler ultrasound. The right and left uterine arteries and the UOL arteries were evaluated on the long axis and the axial view, respectively. Blood flow velocity waveforms were obtained by positioning a sample volume to a coloured spot and activating the spectral Doppler; resistance index (RI) and pulsatility index (PI) were also determined. In brief, the RI was calculated as the difference between the maximal systolic and end diastolic blood flow, divided by the value of maximal systolic flow. The PI value was calculated as the difference between the peak systolic shifted frequency and the diastolic frequency, divided by the time-averaged maximum frequency over the entire

cardiac cycle. Ovarian biopsies were collected by exploratory laparoscopy. For this, a ventral midline skin incision was made to reach the ovaries, as described by Domingues et al. (2007). To obtain the ovarian tissue samples, we have modified a technique so-called *trap door*, previously described to harvest gingival biopsies (Edel, 1974). Briefly, we have performed a 1 mm thickness circular incision in the surface of the ovarian tissue and an ovarian cortical envelope flap was raised by means of an N°. 15 blade (Paramount Surgimed LTDA -New Delhi, Delhi, India). The tissue was then removed, kept in pre-warmed (37 °C) 0.9% NaCl solution and subjected to fragmentation of 1 mm x 5 mm x 8 mm ovarian tissue pieces. Suture was unnecessary and bleeding was repressed by gently pressing the sampled area with cold (15 °C) 0.9% saline-soaked gauze. On completion of the procedure, ovarian fragments were subjected to microscopic examination of stromal cells and primordial follicles. Ovarian tissue biopsies were fixed in 2% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in 0.1M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) for 3 hours. Semi-thin sections of 1 µm thickness were stained with toluidine blue. Primordial follicles were defined as follicles with an oocyte surrounded either by one flattened and/or cuboidal layer of granulosa cells. To avoid counting a follicle more than once, primordial follicles were counted only in the sections where their oocyte nucleus was observed. Follicular quality was evaluated based on the morphological integrity of the oocyte, the granulosa cells and the basement membrane as described previously (Santos et al., 2006). Briefly, primordial follicles were classified as morphologically normal when they contain an intact oocyte and intact granulosa cells, or degenerated when their oocyte nucleus has become pycnotic, ooplasm was shrunken or when granulosa cells have detached from the basement membrane.

Results

All the procedures were performed within 68 ± 7 minutes. Biopsies harvesting was uneventful and ovarian biopsy specimens were collected successfully in all animals. Bleeding was minimal and it was sufficiently controlled by slightly pressing the tissue and using cold 0.9% saline solution-soaked gauze. After recovering eight biopsy specimens of 1.0 mm x 5 mm x 8 mm, most of the ovarian surface remained intact. There were no postoperative complications and all animals were recovered within 24 hours. The complete procedure is detailed in Figure 1 (A-F).

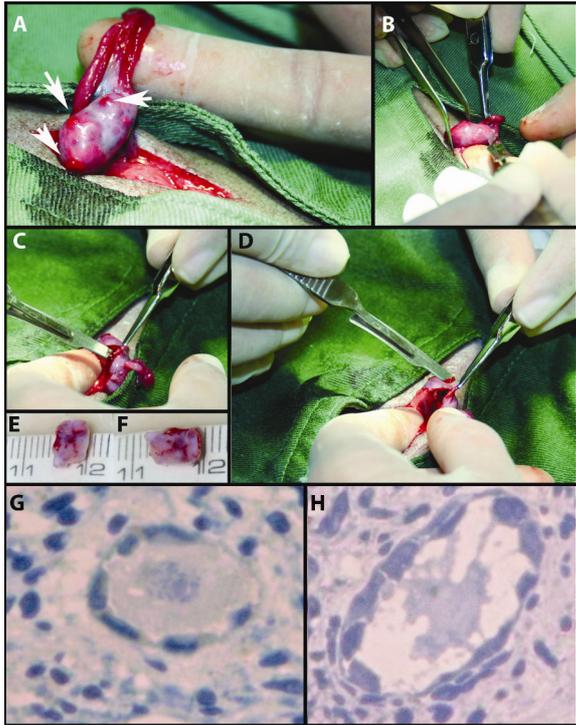


Figure 1. Ovarian biopsy from a female capuchin monkey (*C. apella*). A: The macroscopic normal appearance of one ovary presenting functional corpora lutea (see arrows). B: 1 mm thickness incision in the ovarian cortex. C: preparation of the ovarian cortical envelope flap. D: Biopsy recovery. E, F: ovarian biopsies 1 mm x 5 mm x 8 mm. G,H: Light microscopic appearance of morphologically normal (G) and degenerated (H) primordial follicles after toluidin blue staining (400x).

Ultrasound analysis confirmed that ovaries and uterine structures were normal, without adhesions or fibrosis after surgery (Figure 2A). Furthermore, it was possible to visualize growing antral follicles five months after surgery, confirming ovarian functionality (Figure 2B).

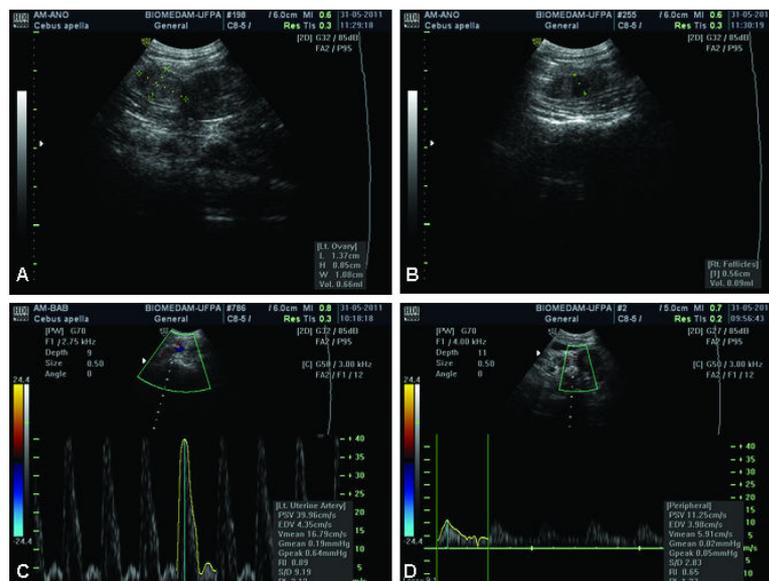


Figure 2. Ultrasonography of the reproductive tract from a female capuchin monkey (*C. apella*). A: Longitudinal view of the ovary. B: Longitudinal view of an antral follicle 5 months after surgery. C, D: Waveform for uterine (C) and UOL (D) arteries.

Ovarian length, height, width, and volume were 1.22 ± 0.08 , 0.83 ± 0.05 , 0.91 ± 0.11 , and $520 \pm 10 \text{ mm}^3$. There was no difference between RI and PI values of the uterine arteries (RI: 0.93 ± 0.08 ; PI: 2.83 ± 0.8) and uterine-ovarian ligament (RI: 0.65 ± 0.005 ; PI: 1.39 ± 0.9) before and after surgery. Wave flow of blood vessels presented normal systolic and diastolic components (Figures 2C and 2D). Sections of the ovarian biopsies stained with toluidine blue showed that normal (Figure 1G) and degenerated follicles (Figure 1H) were found. The follicular density in the biopsies was of 41 ± 4.25 primordial follicles/ mm^2 and $> 75 \%$ of them was morphologically normal.

Discussion

We have adapted an efficient biopsy method to recover ovarian tissue from capuchin monkeys. The trap door method (Edel, 1974) did allow the recovery of primordial follicles and resulted in minimum bleeding. This can be explained by the fact that the specimens were only 1 mm thick, and the hypothermia caused by pressing the sampled tissue with cold saline-soaked gauze. Cold compression consists in an effective alternative to reduce bleeding by vasoconstriction. Moreover, cold also reduces edema and decreases the production of inflammatory agents (Taskin et al., 2011). Probably, this procedure also avoids adhesions after surgery, which was confirmed by ultrasound analysis. Using ultrasound evaluation we have measured the ovarian dimensions. Meirou et al. (1999) have estimated the surface area of human ovary as 540 mm^2 . In the present study, the volume of the ovary of capuchin monkeys was of $\sim 500 \text{ mm}^3$. Our measurements were all similar to those previously reported by Domingues et al. (2007), when measuring ovarian dimensions (length, height, width and volume) from healthy mature capuchin monkeys. Together with these findings, we have observed that follicular density was within the normal parameters (Domingues et al., 2004) and more than 75% of the primordial follicles were healthy, confirming the success of our procedure. Cryopreservation of ovarian tissue is already a reality in large mammals (Santos et al., 2010; Figueiredo et al., 2011), which is a precedent for the successful preservation and complete development of primordial follicles from NHP found dead or being part of assisted reproductive programs. Therefore, the next steps to be conducted are the cryopreservation and the development of *in vitro* culture systems of primordial follicles enclosed in ovarian fragments. We conclude that laparoscopic collection of ovarian tissue using the modified trap door method together with tissue compression with cold saline-soaked gauze is an efficient procedure to harvest healthy primordial follicles. The use of *Cebus apella* as model will help many researchers to preserve female gametes from endangered or threatened NHP species.

Acknowledgements

This study was supported by the project N^o. 483439/2009-6 from CNPq, Brazil. The authors thank CENP for the logistical support.

References

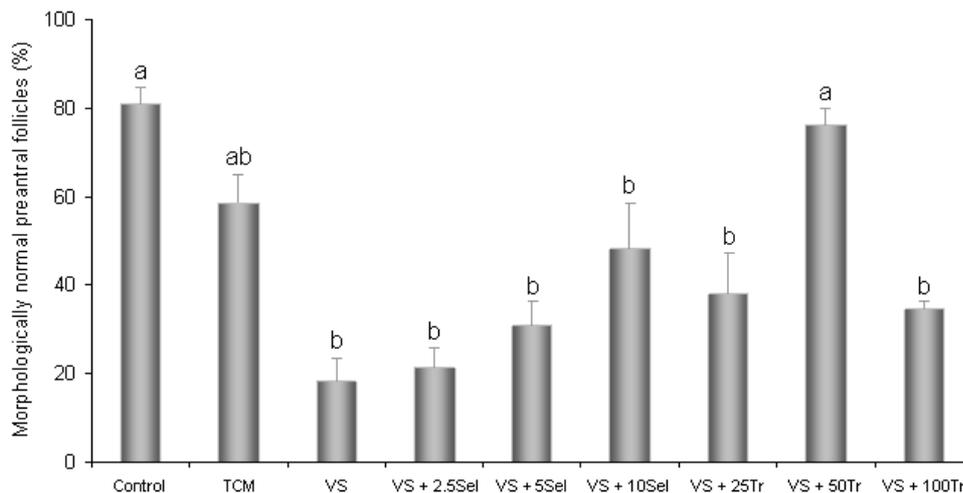
- Domingues, S.F.S., Diniz, L.V., Furtado, S.H.C., Ohashi, O.M., Rondina, D., Silva, L.D.M. (2004). Histological study of capuchin monkey (*Cebus apella*) ovarian follicles. *Acta Amazonica* **30**, 495-501.
- Domingues, S.F.S., Caldas-Bussiere, M.C., Martins, N.D., Carvalho, R.A. (2007). Ultrasonographic imaging of the reproductive tract and surgical recovery of oocytes in *Cebus apella* (capuchin monkeys). *Theriogenology* **68**, 1251-9.
- Domingues, S.F.S., Caldas-Bussiere, M.C., Petretski, M.D., Ohashi, O.M., Lima, J.S., Santos, R.R., Cordeiro, M.S., Gomes de Castro, P.H. (2010). Effects of follicular phase and oocyte-cumulus complexes quality on the protein profile and in vitro oocyte meiosis competence in *Cebus apella*. *Fertil. Steril.* **93**, 1662-7.
- Donnez, J., Silber, S., Andersen, C.Y., Demeestere, I., Piver, P., Merow, D., Pellicer, A., Dolmans, M.M. (2011). Children born after autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue. A review of 13 live births. *Ann. Med.* **43**, 437-50.
- Edel, A. (1974) Clinical evaluation of free connective tissue grafts used to increase the width of keratinised gingiva. *J. Clin. Periodontol.* **1**, 185-96.
- Figueiredo, J.R., Rodrigues, A.P., Silva, J.R., Santos, R.R. (2001) Cryopreservation and in vitro culture of caprine preantral follicles. *Reprod. Fertil. Dev.* **23**, 40-7.
- Meirow, D., Fasouliotis, S.J., Nugent, D., Schenker, J.G., Gosden, R.G., Rutherford, A.J. (1999). A laparoscopic technique for obtaining ovarian cortical biopsy specimens for fertility conservation in patients with cancer. *Fertil. Steril.* **71**, 948-51.
- Santos, R.R., Rodrigues, A.P., Costa, S.H., Silva, J.R., Matos, M.H., Lucci, C.M., Bao, S.N., Van den Hurk, R., Figueiredo, J.R. (2006). Histological and ultrastructural analysis of cryopreserved sheep preantral follicles. *Anim. Reprod. Sci.* **91**, 249-63.
- Santos, R.R., Amorim, C., Cecconi, S., Fassbender, M., Imhof, M., Lornage, J., Paris, M., Schoenfeldt, V., Martinez-Madrid, B. (2010). Cryopreservation of ovarian tissue: an emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. *Anim. Reprod. Sci.* **122**, 151-63.
- Taskin, U., Yigit, O., Bilici, S., Kuvat, S.V., Sisman, A.S., Celebi, S. (2011). Efficacy of the combination of intraoperative cold saline-soaked gauze compression and corticosteroids on rhinoplasty morbidity. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* [Epub ahead of print]

Resultados Fase I

- Exposição do tecido ovariano às soluções de vitrificação

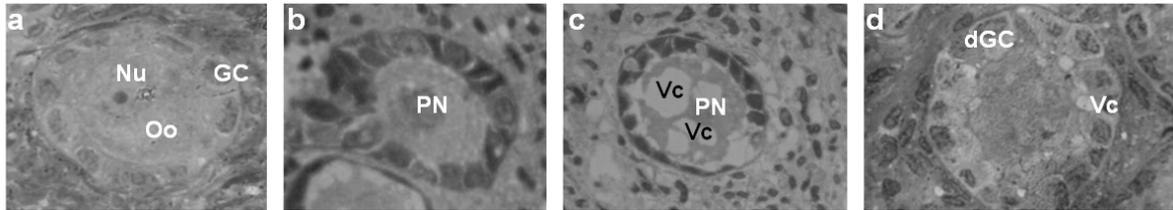
A análise dos FOPA's foi realizada através de técnica de histologia dos tecidos corticais do ovário a fim de avaliar FOPA's inclusos nos fragmentos submetidos às soluções de vitrificação. Para a seleção do tratamento mais adequado dentre os propostos (Tabela 1) foram examinadas 971 FOPA's (com um mínimo de 100 por tratamento). No grupo controle, 81% dos folículos manteve-se morfológicamente normal, não diferindo ($P > 0.05$) do encontrado no material tratado à solução TCM 199, que apresentou 50% de folículos normais, enquanto que, ao adicionar Trolox (50 μM) se observou uma taxa de 76%. Entretanto, ao realizar exposições das amostras de fragmentos ovarianos em solução de EG (18%) ou suplementados com os seguintes *buffers*: 2,5 ng/ml selênio (21%), 5 ng/ml selênio (31%), 10 ng/ml selênio (48%), 25 μM trolox (38%), ou 100 μM trolox (34%) obteve-se como resultado uma queda ($P < 0,05$) na porcentagem dos FOPA's morfológicamente normais em estudo (Figura 10).

Figura 12: Percentual de FOPA's morfológicamente normais nos fragmentos ovarianos dos seguintes grupos: controle; TCM 199; EG; EG somados à selênio (2,5, 5 ou 10 ng/ml) ou trolox (25 μM , 50 μM ou 100 μM). ^{a,b} letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0.05$).



Durante a avaliação dos FOPA's submetidos a vitrificação foram observadas a presença da vacuolização dos oócitos presentes em FOPA's degenerados. Já nos grupos controle e contendo apenas TCM, foi identificada a presença de picnose nuclear e retração citoplasmática, ambas características de degeneração celular (Figura 11). Contudo a vacuolização citoplasmática foi minimizada com a adição de antioxidante (Trolox, 50 μM) como observado nas imagens MET (Figura 12).

Figura 13: Secções histológicas representando um folículo pré-antral morfologicamente normal (a), e folículos pré-antrais degenerados (b-d). Folículos normais apresentavam núcleo central (Nu), ooplasma intacto (Oo) e células da granulosa normais (GC). Folículos degenerados apresentavam núcleo picnótico (PN), células da granulosa desorganizadas (dGC), acompanhadas ou não da presença de vacúolos citoplasmáticos no oócito (Vc).

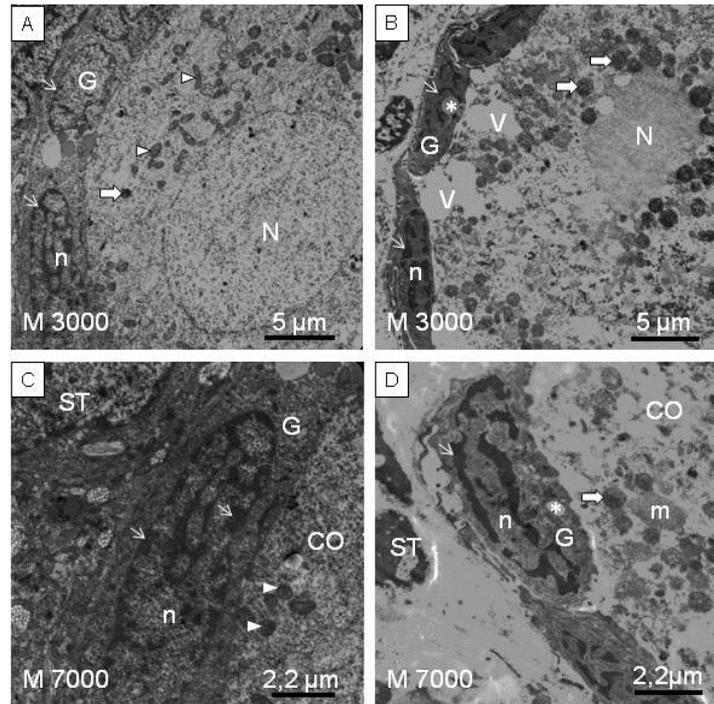


Os oócitos dos fragmentos controle (sem qualquer tipo de tratamento) apresentaram baixa eletrodensidade tanto no citoplasma como no núcleo, em relação às células da granulosa e do estroma. O núcleo, por sua vez, encontrava-se bem delimitado e de formato oval. Além disso, a cromatina nuclear do oócito, ao contrário do observado nas células da granulosa, não estava condensada (Figura 12, A). Quanto à distribuição das organelas no oócito do folículo controle seu citoplasma mostrou-se homogêneo, com mitocôndrias agrupadas próximo ao núcleo (Figura 12, A). Além disso, vesículas lipídicas encontram-se presentes (Figura 12, C).

No fragmento submetido ao melhor tratamento selecionado (crioprotectores acrescido de trolox 50 μ M) o folículo apresentou uma alteração em sua forma tanto nas células da granulosa como do oócito, evidente também no núcleo de ambos (Figura 12, B e D). Onde, o núcleo do oócito deixa de ser oval ou circular e adquire um aspecto irregular, porém mantendo ainda sua cromatina descondensada (Figura 12, B). Já o núcleo das células da granulosa apresentou sua cromatina condensada e aglomerada periféricamente ao núcleo (da mesma forma que o observado no fragmento controle), além de apresentar o formato chanfrado (Figura 12, D). Ela ocorre em todo o tecido, o que inclui as células do estroma (Figura 12, D).

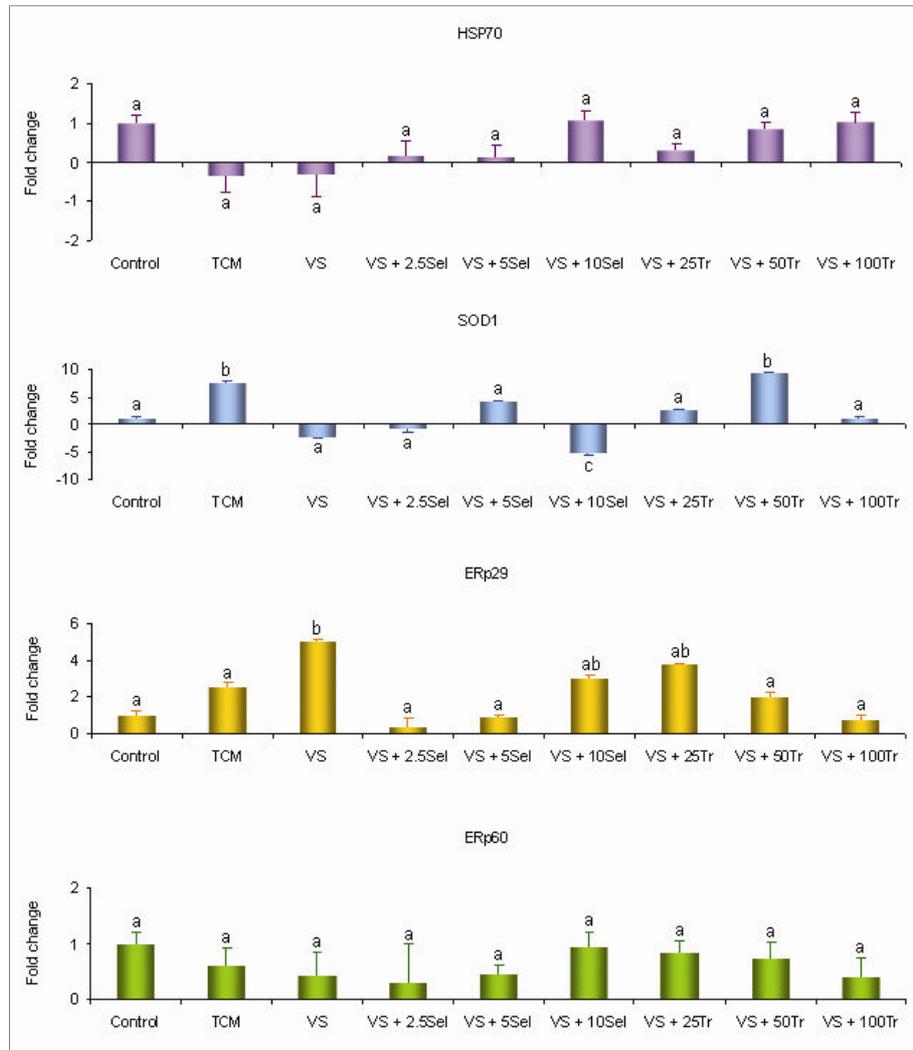
Quanto a distribuição das organelas no citoplasma no fragmento tratado é observado um citoplasma há uma redução no espaçamento entre as mesmas, onde as mitocôndrias e as vesículas lipídicas encontram-se agrupadas próximo ao núcleo (Figura 12, B) formando verdadeiros “aglomerados” próximos ao núcleo. Contudo apesar das alterações encontradas a disposição da membrana do oócito manteve-se justaposta a das células da granulosa (Figura 12, D).

Figura 14: Em (A) e (C) eletromicrografia de cortes do fragmento controle sem qualquer tipo de tratamento e em (B) e (D) eletromicrografia exibindo as alterações como a vacuolização (tanto em células da grânulosa como no citoplasma do oócito) encontradas no fragmento tratado com Trolox a 50 μ M (A e B, 3000x; e C e D 7000x). G, Célula da Granulosa; V, Vacúolo; n, Núcleo da Célula da Granulosa; N, Núcleo do Oócito; *, Vacúolo em Célula da Granulosa; CO, Citoplasma do Oócito; ST, Célula do Estroma; m e \blacktriangleright , Mitocôndria; \blacktriangleleft , Cromatina Nuclear; \rightleftharpoons , Gotas Lipídicas.



A expressão do mRNA de Erp29, Erp60, Hsp70 e Sod1, em tecidos ovarianos analisados através da técnica de PCR são apresentados na Figura 12, na qual, ao analisar-se a expressão dos genes Hsp70 e Erp60, apresentaram expressão semelhante nos fragmentos submetidos ao tratamento com TCM ou às soluções de vitrificação em comparação ao grupo controle. Entretanto, Sod1 apresentou uma redução em sua expressão ($P < 0,05$) ao ser exposto à EG (2,2 vezes) ou ao EG suplementado com 10 ng/ml selênio (5,1 vezes). Porém, esta expressão sofreu um aumento quando submetido a tratamento com TCM 199 (7,5 vezes) ou ao EG adicionado de Trolox a 50 μ M (9,3 vezes). Ocorreu também um expressivo aumento para o gene Erp29 (5 vezes) quando submetido ao tratamento EG apenas ou ao EG suplementado a 10 ng/ml selênio (3 vezes cada) (figura 13).

Figura 15: Gráfico comparativo da expressão gênica dos genes Sod1, Hsp70, Erp29 e Erp60 em tecido ovariano de *S. apella* dos grupos controle, exposto ao TCM apenas, ou exposto ao EG, sozinho ou associado a selênio ou trolox. Valores do controle foram normalizados para 1. ^{a-c} indicam diferença entre os tratamentos ($P < 0,05$).



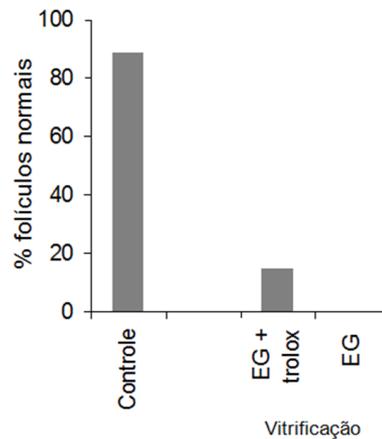
Resultados Fase II

- Vitrificação de FOPA's

Para a etapa de vitrificação dos FOPA's, foram avaliados 293 folículos, com um mínimo de 30 por tratamento, experimentais e controle. Onde os dados percentuais de folículos normais nos fragmentos ovarianos do grupo controle (89%) foi maior ($P < 0,05$) em comparação aos FOPA's criopreservados independentemente da adição de Trolox ao meio. Nas soluções suplementadas com Trolox a 50 μM em sua composição obteve-se uma melhor preservação em comparação ao meio onde o antioxidante estava ausente, situação na qual eram encontrados apenas folículos degenerados. No entanto, mesmo as amostras vitrificadas

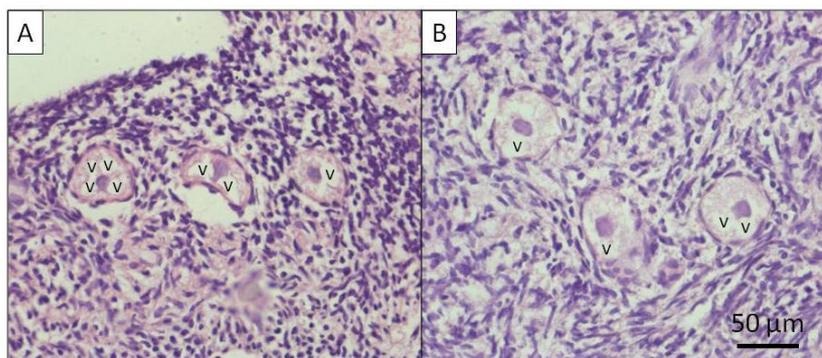
após exposição ao meio acrescido de 50 μM trolox apresentaram um valor de 15% de folículos normais (Figura 14).

Figura 16: Percentual de FOPA's normais antes (controle) e após a criopreservação (Vitrificação) na presença de trolox a 50 μM (EG + trolox) e na ausência de antioxidante (EG).



Foi observado ainda redução ($P < 0,05$) na vacuolização em oócitos submetidos à vitrificação após exposição a meio acrescido de 50 μM de trolox, enquanto na ausência deste crioprotetor as taxas de vacuolização citoplasmática abrangeu 56% dos FOPA's analisados, quando comparadas com os previamente vitrificados na presença de Trolox a 50 μM (21%), de modo que esta redução nas taxas de vacuolização oocitária pode ser apontado como um dos resultados de maior relevância da vitrificação na presença desta concentração de trolox ($P < 0,05$) (Figura 15).

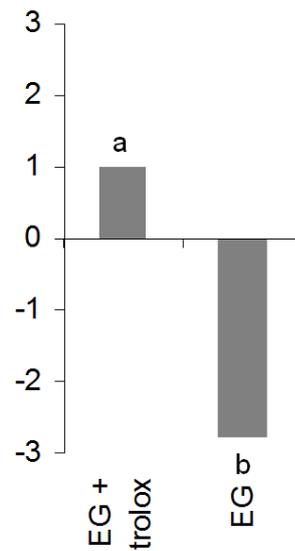
Figura 17: Fotomicrografia de FOPA's vitrificados após o processo de aquecimento corados em HE. Em (A) temos a apresentação de folículos primordiais de um fragmento expostos ao Tratamento 2 (TCM + Sacarose + Etilenoglicol) onde é possível observar a intensa vacuolização do ooplasma. Já na presença do crioprotetor Trolox a 50 μM em (B) os FOPA's exibem uma redução significativa desta alteração após a vitrificação e aquecimento (A e B, escala 50 μm). V, Vacúolo no citoplasma oocitário.



No que se refere à análise bioquímica do estresse oxidativo foi feita a quantificação da capacidade antioxidante presente no tecido das amostras criopreservadas. Os resultados são

apresentados na Figura 16. Tais dados foram calculados em relação aos resultados das amostras criopreservadas na presença de Trolox a 50 μ M. Esta análise demonstrou uma redução na capacidade antioxidante em todos os tecidos criopreservados na ausência de Trolox a 50 μ M.

Figura 18: Comparação da capacidade antioxidante relativa em tecido ovariano criopreservado. ^{a,b} Indicam diferença significativa entre o controle e entre os tratamentos ($P < 0,05$).



7. DISCUSSÃO

- Coleta de tecido cortical ovariano

No referente a obtenção de fragmentos de tecido cortical ovariano para a realização dos experimentos sua discussão, assim como como seus resultados, são apresentados no artigo aceito para publicação pelo periódico científico *Zygote* em anexo (SANTANA et al., 2011).

- Fase I

Neste estudo foram realizadas análises quantitativas e qualitativas dos FOPA's de acordo com o percentual de folículos normais/degenerados encontrados e a expressão gênica do tecido cortical ovariano de *S. apella* após a sua exposição aos 8 diferentes tratamentos propostos para vitrificação, os quais incluem 3 concentrações diferentes de trolox e selênio e a presença ou não dos mesmos.

Na análise por microscopia óptica, a vacuolização observada decorrente da exposição do tecido cortical ovariano de *S. apella* as soluções de vitrificação propostas no presente estudo foram encontradas no citoplasma das células estromais, da granulosa e oócito. Este tipo de alteração também foi relatado em 2009 por Keros e colaboradores ao realizar a crioproteção de tecido cortical ovariano humano. Recentemente em um estudo realizado por Wanderley et al., 2012, sobre vitrificação de FOPA's de cutias da espécie *Dasyprocta aguti*, sugere que os danos da crioproteção podem ser consequentes de fatores que incluem a concentração, tempo, temperatura e ação tóxica dos agentes crioprotetores utilizados. Este tipo de alteração foi documentada em outras espécies como ovinos (OSKAM, ASADA e SANTOS, 2010; SANTOS et al., 2006) e bovinos (CELESTINO et al., 2008).

Durante esta análise constatou-se também que o número de FOPA's normais no fragmento controle assemelhou-se apenas à dois dos tratamentos: o TCM (meio base sem crioprotetores) e a VS acrescida de Trolox a 50 μ M. Enquanto os demais tratamentos (VS + 2,5, 5 e 10 ng/ml e VS + Trolox a 25 e 100 μ M) não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si e quando comparados ao tratamento composto de meio base acrescido de ACP's sem nenhum antioxidante (VS), apontado como o pior tratamento. Este fato pode ter ocorrido devido o selênio e as demais concentrações de trolox não terem revertido o quadro de estresse celular consequente do choque osmótico e citotoxicidade provocada pelos ACP's (Revisado por FAHY, 2010).

Além disso, o Selênio mostrou-se ineficiente nas concentrações de de 2,5 e 5 ng/ml e tóxicos na concentração máxima adotada (10 ng/ml). Nas soluções de vitrificação testadas contendo selênio houve um aumento na expressão do gene *Erp29*. Bambang e colaboradores

(2009) afirmam em seus estudos que a regulação da expressão de Erp29 é modulada pela citokeratina 19 (CK19) negativamente, o que pode significar uma redução na expressão de CK19, importante modulador na resposta ao stress do Reticulo Endoplasmático. Além do aumento na expressão de Erp29 pelos fragmentos tratados com solução de vitrificação acrescida de Selênio, houve ainda a diminuição na expressão de Sod1, enzima responsável pela neutralização de radicais superóxido livres intracelulares (MOREIRA, 2010).

Já no fragmento exposto a VS acrescida de Trolox 50 μ M a sua semelhança com o fragmento exposto à TCM, apenas, sugere um potencial de recuperação tecidual, provavelmente devido sua capacidade de inibir os efeitos do nitritos (CHUNG et al., 2006), geralmente produzidos durante o metabolismo de crioprotetores como o etilenoglicol (BRENT, 2009). Somado a isto, nesta concentração, o trolox apresentou um percentual de FOPA's normais maior que o TCM, provavelmente devido o TCM não ter sido capaz de recuperar o tecido do estresse sofrido consequente da isquemia, sugerindo que esta concentração de trolox foi capaz de tal recuperação. Esta superioridade do Trolox 50 μ M entre esses dois tratamentos também foi confirmada durante a análise de expressão gênica; onde foi observado um aumento na expressão da enzima Sod1 e redução da Erp29, reafirmando a eficácia deste tratamento na concentração de Trolox 50 μ M mediante a presença de ACP's e levando à sua escolha para aplicação na Fase II.

- Fase II

Nesta etapa o tecido cortical ovariano foi submetido ao processo de vitrificação na presença ou não de Trolox 50 μ M para posterior avaliação. Foi encontrada uma notória redução da taxa de FOPA's normais na presença de Trolox 50 μ M, em relação ao controle (sem tratamento algum) (Figura 14), equanto que no tratamento composto de VS (apenas) todos os folículos encontravam-se degenerados. Esta redução no número de folículos normais após a vitrificação/aquecimento também é descrita por Yeoman, Wolf e Lee (2005) ao realizarem um estudo em cynomolgus ou rhesus comparando a congelação e vitrificação lenta, onde obtiveram taxas de sobrevivência de 70.4% \pm 4.8% e 67.3% \pm 1.9%, respectivamente. Sendo os folículos ovarianos primordiais de 30 à 50 μ m a apresentarem maior taxa de sobrevivência.

Esta redução no percentual de FOPA's normais pode estar relacionada com alterações morfológicas no citoplasma e no formato do núcleo em menor ou maior grau, levando a degeneração celular (como apresentado na Figura 15). Neste estudo a vacuolização citoplasmática foi menor na presença de Trolox a 50 μ M (21%), enquanto que em sua ausência a vacuolização abrangeu 56% dos FOPA's analisados após a vitrificação. É descrito

por Zhou e colaboradores, 2010, ao analisarem diferentes soluções de vitrificação em tecido ovariano de seres humanos que estas alterações seriam atribuídas à toxicidade dos crioprotectores com maior concentração e à lesão osmótica causada pela desidratação celular aumentada. Sendo um dos principais desafios da criopreservação o estabelecimento de concentrações ótimas de ACP's.

O presente estudo sugere que o trolox a 50 μ M apresentou um importante papel na manutenção da viabilidade folicular tendo em vista seu papel na neutralização de agentes tóxicos provenientes do metabolismo de ACP's como o etilenoglicol (BRENT, 2009), uma vez que o aumento nas concentrações de ROS levam a peroxidação dos lipídios das membranas, danos ao DNA e morte celular por apoptose ou necrose (LIMA-VERDE et al., 2007). O que justificaria a ausência de FOPA's normais após o aquecimento dos fragmentos tratados com VS apenas. No entanto o prejuízo funcional decorrentes da ação dos ROS não é exclusivo dos oócitos, ele também é documentado por Bucak, Atessahin e Yuce em seus estudos acerca da ação dos mesmos sobre o espermatozóide em carneiros, em que são apontados como a principal causa da perda de motilidade e fertilidade.

8. CONCLUSÃO

A vitrificação é uma biotécnica que permite a criopreservação com manutenção da viabilidade folicular mediante a exposição previa de elevadas concentrações de crioprotetores. A suplementação da solução de vitrificação com 50 μ M trolox resultou em elevadas taxas de sobrevivência folicular após exposição quando comparada com os demais tratamentos propostos neste estudo, e na ausência do mesmo há um aumento nas taxas de folículos degenerados e apresentando vacuolização citoplasmática. Apesar de controlar a vacuolização oocitária, a adição de trolox ao meio de vitrificação não garante a sobrevivência folicular após o aquecimento do tecido.

Os fragmentos de tecido ovariano de *S. apella*, quando expostos ao crioprotetor com 50 μ M trolox, apresentaram uma alta na expressão da enzima antioxidante Sod1. Enquanto na ausência do antioxidante por 5 minutos houve a redução na expressão da enzima antioxidante Sod1 e elevação da expressão da chaperona Erp29.

Além disso, a técnica de biópsia *Trap door* desenvolvida durante o projeto para a obtenção de FOPA's mostrou-se um método eficiente para a coleta de tecido cortical ovariano em *S. apella* sem causar aderências ou fibrose e conseqüentemente de um potencial promissor para a sua aplicabilidade em estudos e desenvolvimento de biotécnicas de MOIFOPA em outras espécies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEE, C.R., Alternative New World Primate Models for Non-AIDS Research. **ILARJ**, v.44, p. 231-35, 2003.
- AGARWALA, A.; SALEH, R.A.; BEDAIWY, M.A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertil Steril**, v. 79, p 829-843. 2003.
- ALFARO, J. W.; SILVA, J. D., JR. e RYLANDS, A. B. How Different Are Robust and Gracile Capuchin Monkeys? An Argument for the Use of Sapajus and Cebus. **Am J Primatol**, v. 74, n. 4, p. 273-286, 2012a.
- ALFARO, J. W. et al. Anointing variation across wild capuchin populations: a review of material preferences, bout frequency and anointing sociality in Cebus and Sapajus. **Am J Primatol**, v. 74, n. 4, p. 299-314, 2012b.
- ALVAREZ, C. A.; MORAES, G. V. Efeitos da selenometionina e a vitamina C sobre o sêmen. **Rev Saúde e Biologia**, v. 1, n. 1, p. 42-51, 2006.
- AMARAL, P. J. et al. Phylogenetic studies of the genus Cebus (Cebidae-Primates) using chromosome painting and G-banding. **BMC Evol Biol**, v. 8, n. p. 169, 2008.
- AMARAL, P. J. S. **Estudos Filogenéticos em Primatas do gênero Cebus (Cebidae-Primates) revelados por Bandeamento Cromossômico e Pintura Cromossômica**. 2008. 149 p. Tese de Doutorado - Universidade Federal do Pará, Belém.
- AMORIM, C.A. et al. Permeability of ovine primordial follicles to different cryoprotectants. **Fertil Steril**, v. 85, p. 1077-1081, 2006.
- AMORIM, C.A.V.M.D. et al. Vitrification of human ovarian tissue: effect of different solutions and procedures. **Fertil Steril**, v. 95, n. 3, p. 1094-1097, 2011.
- AURICHIO, P., Primatas do Brasil. São Paulo: **Terra Brasilis**, 168p, 1995.
- ARAÚJO, L. L. et al. Uso de solução à base de água de côco a 37 °C como diluidor de sêmen de *Cebus apella* (macaco-prego) mantido em cativeiro. **Cienc anim bras**, v. 10, n. 2, p. 588-594, 2009.

ARNAUDEAU et al. Calreticulin Differentially Modulates Calcium Uptake and Release in the Endoplasmic Reticulum and Mitochondria. **J biol chem**, v. 277, n. 48, p. 46696–46705, 2002.

ASSELIN, E. et al. Mammalian Follicular Development and Atresia: Role of Apoptosis. **Biol signals recept**, v. 9, p. 87–95, 2000.

BAMBANG, I. F. et al. Cytokeratin 19 regulates endoplasmic reticulum stress and inhibits ERp29 expression via p38 MAPK/XBP-1 signaling in breast cancer cells. **Exp Cell Res**, v. 315, n. 11, p. 1964-1974, 2009.

BAO, R. M. et al. Development of vitrified bovine secondary and primordial follicles in xenografts. **Theriogenology**, n.74, p. 817-827, 2010.

BARCLAY, L.R.C.; ARTZ, J.D.; MOWAT, J.J. Partitioning and antioxidant action of the water-soluble antioxidant, Trolox, between the aqueous and lipid phases of phosphatidylcholine membranes: ¹⁴C tracer and product studies. **Biochim biophys acta**, v.1237, p.77-85, 1995.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim Nova**. v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BETTERIDGE, K. J. et al. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes in vitro. **J Reprod Fertil Suppl**, v. 38, n. p. 87-98, 1989.

BORDES, A. et al. Normal gestations and live births after orthotopic autograft of vitrified-warmed hemi-ovaries into ewes. **Hum. reprod.**, v. 20, n. 10, p. 2745-2748, 2005.

BOUBLI, J. P. et al. Cebus phylogenetic relationships: a preliminary reassessment of the diversity of the untufted capuchin monkeys. **Am J Primatol**, v. 74, n. 4, p. 381-393, 2012

BRAW-TAL, R. e YOSSEFI, S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. **J Reprod Fertil**, v. 109, n. 1, p. 165-171, 1997.

BRENT, J., Fomepizole for ethylene glycol and methanol poisoning. **New Eng J Med**, v. 360, p. 2216-2223, 2009.

BRITO A.B. et al. Validation of reference genes for ovarian tissue from capuchin monkeys (*Cebus apella*). **Zygote**. 2011; [Epub ahead of print] 2012

BRITO, D. C. C. **Expressão gênica e viabilidade de folículos ovarianos pré-antrais de *Cebus (Sapajus) apella* congelados e cultivados in vitro**. 2012. p. 75. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pará. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

BUCAK, M. N.; ATESSAHIN, A.; YUCE, A. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze–thawing process. **Small rumin res.** v. 75, p. 128–134, 2008.

CASTRO, .et al. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Small rumin res**, v. 39, n. 2, p. 957, 2011

CARRÌ, M. T.; COZZOLINO, M. SOD1 and mitochondria in ALS: a dangerous liaison. **J Bioenerg Biomembr**, v. 43, p. 593–599, 2011.

CELESTINO, J. J. et al. Preservation of bovine preantral follicle viability and ultra-structure after cooling and freezing of ovarian tissue. **Anim Reprod Sci**, v. 108, n. 3-4, p. 309-318, 2008.

CELESTINO, J. J. et al. Vitrification of bovine ovarian tissue applying the SSV method. **Biopreserv Biobank**, v. 8, p. 219-221, 2010.

CHEN, Q. et al. Selenium increases expression of HSP70 and antioxidant enzymes to lessen oxidative damage in Fincoal-type fluorosis. **J Toxicol Sci**, v.34, p. 399-405, 2009.

CHUNG, M. J.; WALKER, P. A.; HOGSTRAND, C., Dietary phenolic antioxidants, caffeic acid and trolox, protect rainbow trout gill cells from nitric oxide-induced apoptosis. **Aquat toxicol**, v.30, p. 321-328, 2006.

COURBIERE, B. et al. Follicular viability and histological assessment after cryopreservation of whole sheep ovaries with vascular pedicle by vitrification. **Fertil Steril**, v. 84, p. 1065-1071, 2005.

COURBIERE, B. et al. Cryopreservation of the ovary by vitrification as an alternative to slow-cooling protocols. **Fertil Steril**, v. 86, p. 1243-1251, 2006.

COURBIERE, B. et al. Difficulties improving ovarian functional recovery by microvascular transplantation and whole ovary vitrification. **Fertil Steril**, v. 91, n. 6, p. 2697-2706, 2009.

CUNHA, F. A. Registro de Ocorrência de *Cebus kaapori* (Cebidae: Primates) na APA Lago de Tucuruí. **Neotrop primates** v. 14, p. 2, 2007.

DE FELICI, M., Germ stem cells in the mammalian adult ovary: considerations by a fan of the primordial germ cells. **M H R**, v. 16, n. 9, p. 632–636, 2010.

DELMAN, H.D.; BROWN, E.M. **Histologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1982. 397 p.

DEPALO, R. et al. Assessment of estrogen receptors and apoptotic factors in cryopreserved human ovarian cortex. **Syst Biol Reprod Med**, v. 55, n. 5-6, p. 236-243, 2009.

DOMINGUES, S.F.S. et al. Mechanical isolation of capuchin monkey (*Cebus apella*) preantral ovarian follicles. **Arq Brás Méd Vet Zootec**, v. 55, p. 301-308, 2003.

DOMINGUES, S.F.S. et al. Histological study of capuchin monkey (*Cebus apella*) ovarian follicles. **Acta amazon**, v. 34, n. 3, p. 495 – 501, 2004.

DOMINGUES, S.F.S. et al. A fêmea de Macaco-prego (*Cebus apella*, Linnaeus, 1758). **Rev Ciênc Agrar Supl**, v. 43, p.1-9, 2005.

DOMINGUES, S.F.S. et al. Ultrasonographic imaging of the reproductive tract and surgical recovery of oocytes in *Cebus apella* (capuchin monkeys). **Theriogenology**, v. 68, p. 1251-1259, 2007.

DOMINGUES, S.F.S. et al. Effects of follicular phase and oocyte–cumulus complexes quality on the protein profile and in vitro oocyte meiosis competence in *Cebus paella*. **Fertil Steril**, v. 93, n. 5, 2010.

DONNEZ, J.; DOLMANS, M.M. Cryopreservation and Transplantation of Ovarian Tissue. **Clin obstet gynecol**, v. 53, n. 4, p. 787–796, 2010.

DURRANT, B. S. et al. Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles. **Theriogenology**. v. 49, p. 917-32, 1998.

- DURUKAN, A.; TATLISUMAK, T. Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. **Pharm Biochem Beh**, v. 87, p. 179–197, 2007.
- EDSON, M.A.; NAGARAJA, A.K.; MATZUK, M.M., The Mammalian Ovary from Genesis to Revelation. **Endocr rev**, v. 30, n. 6, p. 624–71, 2009.
- EGITO, A.A.; MARIANTE, A.S.; ALBUQUERQUE, M.S.M. Programa Brasileiro de Conservação de Recursos Genéticos Animais. **Arch Zootec** v. 51, p. 39-52, 2002.
- EGITO, A.A. et al., Situação atual do banco de DNA de recursos Genéticos animais no Brasil. **Arch Zootec**, v. 54, p. 283-288, 2005.
- FAHY, G.M. Vitrification: a new approach to organ cryopreservation. **Prog Clin Biol Res**, v. 224, p. 305-335, 1986.
- FAHY, G.M. Vitrification: a new approach to organ cryopreservation. **Prog Clin Biol Res**, v. 224, p. 305-335, 1986
- FAIR, T. et al. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. **Anat Embryol (Berl)**, v. 195, n. 4, p. 327-336, 1997.
- FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Anim Reprod Sci**, v. 78, n. 3-4, p. 203-216, 2003.
- FATHI, R. et al. Sheep ovarian tissue vitrification by two different dehydration protocols and needle immersing methods. **Cryo-Lett**, v. 32, p. 51-56, 2011.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Assoc Med Bras**, v.43, n.1, p.1-16, 1997.
- FERRI, et al. Familial ALS-superoxide dismutases associate with mitochondria and shift their redox potentials. **PNAS**, v. 103, n. 37, 2006.
- FIGUEIREDO, J.R. et al. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção in vitro de embriões em larga escala. **Rev bras reprod anim**, v. 31, n. 2, p. 143-152, 2007.

FREESE, C. H.; OPPENHEIMER, J. R. The capuchin monkeys, genus *Cebus*, In: COIMBRA-FILHO, A. F., MITTERMEIER, R. A. **Ecology and behavior of Neotropical primates**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, v. 1, p. 331-389, 1981.

GORDON, I. Prenatal development of the bovine ovário. In: _____. **Laboratory production of cattle embryos**. Cambridge, UK: CAB International, Raven Press, 1994. p.4349.

HASHIMOTO, S. et al. Effects of vitrification solutions and equilibration times on the morphology of cynomolgus ovarian tissues. **Reprod Biomed Online**, v. 21, p. 501-509, 2010.

HEARN, J. New word primates for research in human reproduction health. **Am. j. primatol.**, v. 34, p. 11-17, 1994.

HIRSCH, A. et al. Database of Georeferenced Occurrence Localities of Neotropical Primates (BDGEOPRIM). **Department of Zoology, Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais**, v. 2, p. 13-33, 2008.

HIRSHFIELD AN. Development of follicles in the mammalian ovary. **Int Rev Cytol**, v. 124, p. 43-101, 1991.

HSUEH, A. J.; EISENHAUER, K.; CHUN, S. Y.; HSU, S. Y. e BILLIG, H. Gonadal cell apoptosis. **Recent Prog Horm Res**, v. 51, n. p. 433-455; discussion 455-436, 1996.

ISACHENKO, E. et al. Cryopreservation of human ovarian tissue by direct plunging into liquid nitrogen. **Elsev Scienc irel**, v. 108, p. 186-193, 2003.

KAGAWA, N. et al. Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue. **Reprod Biomed Online**, v. 18, p. 568-577, 2009.

KARTHA, K.K. **Cryopreservation of plant cells and organs**. Florida: Boca Raton: CRC press. 1985. 115-134p.

KEROS, V. et al. Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. **Hum Reprod**, v. 24, n. 7, p. 1670-1683, 2009.

LEE, J.; MIYANO, T. e MOOR, R. M. Localisation of phosphorylated MAP kinase during the transition from meiosis I to meiosis II in pig oocytes. **Zygote**, v. 8, n. 2, p. 119-125, 2000.

- LI et al. Regulation of Vascular Endothelial Cell Polarization and Migration by Hsp70/Hsp90-Organizing Protein. **PLoS ONE**, v. 7, issue 4, 2012.
- LIMA, J. S. et al. Embryo production by parthenogenetic activation and fertilization of in vitro matured oocytes from *Cebus apella*. **Zygote**, v. n. p. 1-5, 2012.
- LIMA-VERDE, I. B. et al. Implicações do estresse oxidativo no ovário e ao embrião mamífero. **Med Veterinária**, Recife, v. 1, n. 1, p. 81-88, 2007.
- LINN, G. S.; MASE, D.; LAFRANCOIS, R.T.; KEEFFE, O., LIFSHITZ, K., Social and menstrual cycle phase influence on the behavior of group – housed *Cebus apella*. **Am J Primat**, v.35, p. 41 –57, 1995.
- MACIEL, B. A. **Mosaicos de unidades de conservação: uma estratégia de conservação para Mata Atlântica**. 2007. 182 p Dissertação de Mestrado - Universidade de Brasília. Centro de Desenvolvimento Sustentável – CDS, Brasília.
- MARTINS, N.D., **Análises preliminares do ciclo reprodutivo de fêmeas de macaco-prego (*Cebus apella* LINNAEUS, 1758) criadas em cativeiro através do estudo colpocitológico diário utilizando dois métodos de coloração: Panóptico Rápido e Papanicolau**. 2004. p. 35. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Pará, Pará.
- MARTINS, F.S. et al. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Ver Bras Reprod Anim** v. 32, n.1. p. 36-49, 2008.
- MATAYOSHI, T. et al. Heterocromatic variation in *Cebus apella* (Cebidae: Platyrrhini) of different geographic regions. **Cytogen cell gen.** p. 5, 1987.
- MATSUDA-MINEHATA, F. et al. The Regulation of Ovarian Granulosa Cell Death by Pró- and Anti-apoptotic Molecules. **J reprod dev**, v. 52, n. 6, p. 695-705, 2006.
- MCLAREN, A. Germ and somatic cell lineages in the developing gonad. **Mol Cell Endocrinol**, v. 163, n. 1-2, p. 3-9, 2000.
- McLAUGHLIN, E.A.; McIVER, S.C. Awakening the oocyte: controlling primordial follicle development. **Reproduction**, v. 137, p. 1–11, 2009.
- MILLER, J. K.; BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E. e MADSEN, F. C. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. **J Dairy Sci**, v. 76, n. 9, p. 2812-2823, 1993.

- MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V. **Início do Desenvolvimento Humano**. In: Moore, K.L.; Persaud, T.V.N. Embriologia clínica. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. P. 13-38.
- MOREIRA, D. R. **Perfil oxidativo na malária experimental**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pará. Patologia das doenças tropicais, 2010.
- NAGLE, C. A. et al. Temporal relationship between follicular development, ovulation, and ovarian hormonal profile in the capuchin monkey (*Cebus apella*). **Biol Reprod**, v. 23, n. 3, p. 629-635, 1980.
- NAGLE, C.A.; DENARI, J.H., The Cebus Monkey (*Cebus apella*). In: Hearn, J. P. **Reprod N W Primat**, Boston: MT Press, Lancaster, p. 41-67, 1983.
- NETO, J. M. F. A.; SILVA, L. P.; MACEDO, D. V. Proteínas de estresse “hsp70” atuam como marcadoras de estresse oxidativo em ratos “wistar” submetidos a treinamento intermitente de corrida para indução de overreaching. **Braz J Biomot**, p. 160-75, 2008.
- NOWAK, R.M.; PARADISO, J.L., Walker’s Mammals of the World. **Baltimore and London: Johns Hopkins University Press**. 4 ed. v. 1. p. 43-49, 1983.
- ORTEGA-CAMARILO, C. et al. Changes in the glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in granulosa cells during follicular atresia in ewes. **Reproduction**, v. 137, p. 979–986, 2009.
- ORTIZ, R.E. et al. Cytologic, hormonal, and ultrasonographic correlates of the menstrual cycle of the new world monkey *Cebus apella*. **Am j primatol**, v. 66, p. 233-244, 2005.
- OSKAM, I. C.; ASADI, B. A. e SANTOS, R. R. Histologic and ultrastructural features of cryopreserved ovine ovarian tissue: deleterious effect of 1,2-propanediol applying different thawing protocols. **Fertil Steril**, v. 93, n. 8, p. 2764-2766, 2010.
- PAYNTER, S.J. Current status of the cryopreservation of human unfertilized oocytes. **Hum Reprod Updated**, v. 6, p. 449-456, 2000.
- PEPLING, M. E. From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. **Genesis**, v. 44, n. 12, p. 622-632, 2006

PEREDA, J.; ZORN, T.; SOTO-SUAZO, M., Migration of Human and Mouse Primordial Germ Cells and Colonization of the Developing Ovary: An Ultrastructural and Cytochemical Study. **Microsc res tech**, v. 69, p. 386–395, 2006.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res**, v. 29, n. 9, p. e45, 2001.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Rad Biol Med**. v.26, p.1231-1237, 1999.

REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; ANDRADE, F. R. **Primatas Brasileiros**. Londrina: Universidade Estadual de Londrina; Editora Technical Books. 2008.

WANG, Y. S. et al. Lowering storage temperature during ovary transport is beneficial to the developmental competence of bovine oocytes used for somatic cell nuclear transfer. **Anim Reprod Sci**, v. 124, p. 48-54, 2011.

RYTER, S. W. e CHOI, A. M. Heme oxygenase-1: redox regulation of a stress protein in lung and cell culture models. **Antioxid Redox Signal**, v. 7, n. 1-2, p. 80-91, 2005.

SADEU, J. C. et al. Morphological and ultrastructural evaluation of cultured frozen-thawed human fetal ovarian tissue. **Fertil Steril**, v. 85 Suppl 1, n. p. 1130-1141, 2006

SANTANA L.N. et al. Adaptation of a *trap door* technique for the recovery of ovarian cortical biopsies from *Cebus apella* (capuchin monkey). **Zygote**, 2012.

SANTOS, R. R. et al. Histological and ultrastructural analysis of cryopreserved sheep preantral follicles. **Anim Reprod Sci**, v. 91, n. 3-4, p. 249-263, 2006.

SANTOS, R.R. et al. Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methodsCell. **Tissue Res**, v. 327, p. 167–176, 2007.

SANTOS, R.R. et al. Cryopreservation of ovarian tissue: an emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. **Anim Reprod Sci**, v. 122, n. 151-163, 2010.

SILVA, J.R.V. et al. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during in vitro culture of caprine ovarian cortical tissue. **Theriogenology**, v. 61, p. 1691–1704, 2004.

SILVA, C.R. Registro de Alimentação Noturna em Macaco-Prego (*Cebus apella*). **Neotropical Primates**. v. 14, n. 2, 2007.

SILVA, J. S. Jr. **Especiação nos macacos-prego e caiararas, gênero *Cebus* Erxleben, 1777 (Primates, Cebidae)**. 2001. Doctoral Thesis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

SILVA, J.S. Jr. Taxonomy of capuchin monkey, *Cebus* Erxleben, 1777. **Neotrop primat.**, v. 10, n. 1, p. 29, 2002.

STACHECKI, J. J. e COHEN, J. An overview of oocyte cryopreservation. **Reprod Biomed Online**, v. 9, n. 2, p. 152-163, 2004.

SUGIMOTO, M. et al. Follicle survival in neonatal rat ovaries cryopreserved by vitrification successful vitrification of bovine and human ovarian tissue. **Cryo-Lett**, v. 17, p. 93-98, 1996.

TING, A. Y. et al. In vitro development of secondary follicles from cryopreserved rhesus macaque ovarian tissue after slow-rate freeze or vitrification. **Hum Reprod**, v. 26, p. 2461-2472, 2011.

VIARO, R. S.; VIARO, M. S.; FLECK, J. Importância bioquímica do selênio para o organismo humano. **Discip. Sci.**, v.2, n.1, p.17-21, 2001

WANDERLEY, L. S. et al. Ultrastructural features of agouti (*Dasyprocta aguti*) preantral follicles cryopreserved using dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propanediol. **Theriogenology**, v. 77, n. 2, p. 260-267, 2012

WILSON, D. E.; REEDER, D. M. **Mammal species of the world**. 3 ed. Baltimore, MD: The Johns Hopkins University Press, p 111–184, 2005.

WRIGHT, K. The relationship between Locomotor Behaviour and Limb Morphology in Brown (*Cebus apella*) and Weeper (*Cebus olivaceus*) Capuchins. **Wiley Interscience**. V. 69, p. 1-22, 2006.

YEOMAN, R. R.; WOLF, D. P.; LEE, D. M. Coculture of monkey ovarian tissue increases survival after vitrification and slow rate freezing. **Fertil Steril**, v. 83, p. 1248-1254, 2005.

ZHANG, D. e RICHARDSON, D. R. Endoplasmic reticulum protein 29 (ERp29): An emerging role in cancer. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 43, n. 1, p. 33-36, 2011.

ZHANG, J. M. et al. Cryopreservation of whole ovaries with vascular pedicles: vitrification or conventional freezing? **J Assist Reprod Genet**, v. 28, p. 445-452, 2011.

ZHOU, X. H. et al. Cryopreservation of human ovarian tissue: comparison of novel direct cover vitrification and conventional vitrification. **Cryobiology**, v. 60, p. 101-105, 2010.

ANEXOS

Anexo A – Protocolos de preparo das soluções com e sem antioxidantes de vitrificação utilizadas em ambas as fases no experimento.

Preparação da solução de vitrificação para exposição

Para 50 ml de solução de vitrificação (SV):

SV1 (Preparo em temperatura ambiente):

Em um tubo falcon colocar:

- 40 ml TCM Hepes + 10 ml etilenoglicol + 8.6 g sacarose (sem soro);
- Homogeneizar até diluir a sacarose;
- Armazenar em geladeira (4-8 graus Celsius).

SV2 (Preparo em temperatura ambiente):

Em um tubo falcon colocar:

- 30 ml TCM Hepes + 20 ml etilenoglicol + 8.6 g sacarose (sem soro)
- Homogeneizar até diluir a sacarose;
- Armazenar em geladeira (4-8 graus Celsius)

Soluções com Antioxidantes

- Selênio

- **Estoque:** 30 mg de Selênio em 10 ml de DMSO = 3 mg/ml (**Selenio A**).
- Misturar 100 µl de **Selênio A** em 29.900 µl DMSO (29,70 ml DMSO) = 10 µg/ml (**Selênio B**);
- Concentração desejada de 10 ng/ml ;
- Assim, adicionar 30 µl de **Selênio B** a 29,97 ml de **SV1 = 10 ng/ml (LS1)**;
- Para obter a concentração de 5 ng/ml, misturar 15 ml de **LS1** + 15 ml de **SV (LS2)**;
- Para obter a concentração de 2.5 ng/ml, misturar 15 ml de **LS2** + 15 ml de **SV1 (LS3)**;

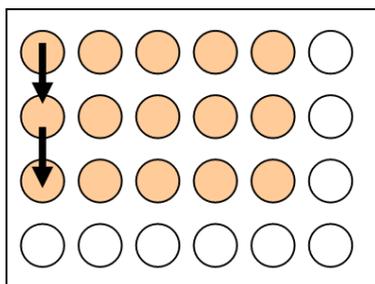
- Assim, adicionar 30 μl de **Selênio B** a 29,97 ml de **SV2 = 10 ng/ml (LLS1)**;
- Para obter a concentração de 5 ng/ml, misturar 15 ml de **LLS1** + 15 ml de **SV2 (LLS2)**;
- Para obter a concentração de 2.5 ng/ml, misturar 15 ml de **LLS2** + 15 ml de **SV2 (LLS3)**.

- Trolox

- Estoque: 50 mg de trolox em 19,98 ml de DMSO = 10 mM = 10 000 μM **Trolox A**;
- Misturar 150 μl **Trolox A** em 14850 μl SV1= 100 μM Trolox (**LT1**)
- Para obter a concentração de 50 μM , misturar 7.5 ml de **LT1** + 7.5 ml de **SV1 (LT2)**;
- Para obter a concentração de 25 μM , misturar 7.5 ml de **LT2** + 7.5 ml de **SV1 (LT3)**;
- Misturar 150 μl **Trolox A** em 14850 μl SV2= 100 μM Trolox (**LLT1**);
- Para obter a concentração de 50 μM , misturar 7.5 ml de **LLT1** + 7.5 ml de **SV2 (LLT2)**;
- Para obter a concentração de 25 μM , misturar 7.5 ml de **LLT2** + 7.5 ml de **SV2 (LLT3)**.

- Após a exposição foi feita a remoção do crioprotetor conforme a figura abaixo:

Placa com meio a 37°C



Banho 1: 3 min TCM-Hepes + 4.3 g sacarose

Banho 2: 5 min TCM-Hepes + 2.1 g sacarose

Banho 3: 7 min TCM-Hepes