



**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**

**Danielle Cristina Calado de Brito**

**Expressão Gênica e Viabilidade de Folículos Ovarianos Pré-Antrais de *Sapajus apella*  
Congelados e Cultivados *in vitro***

**Belém  
2012**

**Danielle Cristina Calado de Brito**

**Expressão Gênica e Viabilidade de Folículos Ovarianos Pré-Antrais de *Sapajus apella*  
Congelados e Cultivados *in vitro***

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:

Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup> Regiane Rodrigues dos Santos

Co-orientadora:

Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Sheyla Farhayldes S. Domingues

**Belém  
2012**

**Danielle Cristina Calado de Brito**

**EXPRESSÃO GÊNICA E VIABILIDADE DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-  
ANTRAIS DE *Sapajus apella* CONGELADOS E CULTIVADOS *IN VITRO***

Dissertação apresentada para a 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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regiane Rodrigues dos Santos  
Faculdade de Medicina Veterinária – UU, Holanda  
Orientadora

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sheyla Farhayldes S. Domingues  
Faculdade de Medicina Veterinária – UFPA, Cast  
Co-orientadora

---

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

---

Prof.Dr. Júlio Cesar Pieczarka  
Diretor do Instituto de Ciências Biológicas - UFPA  
Membro Titular Externo

À memória de minha avó, Maria Madalena  
Rodriguês Calado, meu grande e verdadeiro  
amor. Meu exemplo de vida.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por está sempre presente em minha vida. “O dia em que eu ficar com medo, eu, da minha parte, confiarei em ti.” (Salmos 56:3)

À minha família que amo muito, especialmente aos que acompanham de perto tudo em minha vida, minhas primas Bel e Ivana, minha tia Iracilda e Ana e minha dinha que amo, Maria Dantas.

Aos meus queridos pais, Jesuíno Silva de Brito e Maria Antonia Calado de Brito (Mami) pelo grande amor, apoio e respeito. Sou extremamente grata pela educação que tive, pela coragem, humildade, compromisso, responsabilidade, honestidade, enfim... agradeço por estarem sempre comigo, nunca desistindo de acreditar em mim. Dou minha vida por vocês. Obrigada por tudo, os amo demais.

À minha querida avó, segunda mãe, que também contribuiu em tudo na minha vida e nos deixou um grande exemplo de luta, amor e caridade. Uma das pessoas mais belas que conheci e que sempre estará nos nossos corações.

Às minhas orientadoras Dra. Regiane Rodrigues dos Santos e Dra. Sheyla Farhayldes Souza Domingues, primeiramente, pela grande oportunidade de fazer parte desse excelente grupo de pesquisa. Muito obrigada por estarem sempre presentes, pela paciência, pela orientação em todo o momento de elaboração e execução do projeto.

Ao meu grande amigo e companheiro excepcional de projeto, Adriel Behn de Brito, pela sua grande participação e orientação que foram extremamente importantes no trabalho.

Ao Laboratório de Biologia e Medicina de Animais Silvestres da Amazônia (BIOMEDAM) e aos meus amigos que fazem parte dele: Julianne, Karolzinha, Débora, Sarah, Stefânia, Danuza, Luana e o Drico, sem essa equipe seria impossível o término desse projeto no tempo devido, muito obrigada.

À equipe do Centro Nacional de Primatas (CENP) pela disponibilidade do local e apoio. Não esquecendo claro de agradecer aos animais experimentais que ajudaram inconscientemente, sendo assim a base desse trabalho.

À Profa. Dra. Rossineide Martins da Rocha, responsável pelo Laboratório de Ultraestrutura Celular na UFPA, agradeço o ambiente agradável de trabalho, a orientação e de ajuda para o desenvolvimento do experimento. Assim como também os demais integrantes do laboratório, especialmente Jean Neves, Leonardo Paixão, Carol Borges, Carol Montes, Fabrícia Sizo e Liziane Barbosa.

Ao prof. Dr. José Antônio Picanço Diniz Júnior, chefe do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto Evandro Chagas, agradeço a paciência, a orientação e contribuição, assim como também, sou grata ao farmacêutico Fernando Lameira pelo apoio e companheirismo.

Ao Laboratório de Fertilização *in vitro* (LABFIV) pela grande confiança concedida ao grupo BIOMEDAM. Agradeço ao Prof. Dr. Otávio Mitio Ohashi e ao Prof. Dr. Moysés dos Santos Miranda pela contribuição e espaço fornecido para a realização do experimento. Assim como também a ajuda de todos os integrantes, especialmente Nathália Nogueira, Priscila Santana e Veluma Duarte.

Ao Laboratório de Toxicologia (LATOX) na faculdade de farmácia (UFPA) e a grande colaboração do Prof. Dr. Sandro Percário.

À Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) pelo fornecimento da bolsa de estudos durante o mestrado.

E a todos que não citei e que de alguma forma contribuíram para esse projeto.

...meu muito obrigada a todos!

"... Aceite com sabedoria o fato de que o caminho está cheio de contradições. Há momentos de alegria e desespero, confiança e falta de fé, mas vale a pena seguir adiante."

Paulo Coelho

## RESUMO

O objetivo do presente estudo foi desenvolver um protocolo de congelação para a preservação de folículos pré-antrais de *Sapajus apella* (macaco-prego). Para este fim, fragmentos ovarianos foram expostos à diferentes soluções crioprotetoras, adicionadas ou não por antioxidantes (selênio e trolox), congelados e cultivados *in vitro* por 24/horas. Análises morfológicas, ultraestruturais, de viabilidade e estresse oxidativo foram desenvolvidas. A coleta do material foi realizada no Centro Nacional de primatas (CENP) e nove macacos-prego maduras e saudáveis foram usadas. Biopsias ovarianas de 1 mm<sup>3</sup> foram coletadas por laparoscopia exploratória. Os folículos coletados foram classificados de acordo com sua fase de desenvolvimento em primordial, primário ou secundário. A viabilidade folicular foi observada através da utilização de marcadores fluorescentes (Iodeto de propídeo e Hoechst) qRT-PCR foi usado para avaliar a expressão de hormônios e fatores de crescimento. O TEAC foi usado para mensurar o estresse oxidativo no tecido. Os resultados mostraram que a solução congelação contendo trolox não afetou a morfologia folicular e expressão gênica. A criopreservação resultou em elevadas taxas de viabilidade folicular quando o trolox estava presente na solução, porém a expressão de genes codificando BMP4 e KL foi negativamente afetada. Nossos achados mostraram um efeito favorável da adição do trolox à solução de congelação. Entretanto, a viabilidade folicular e expressão gênica foram afetados após cultivo *in vitro*.

Palavras-chave: Folículos pré-antral. Viabilidade. Ultraestrutura. qRT-PCR



## ABSTRACT

The aim of the present study was to develop a freezing protocol for the preservation of preantral follicles from *Sapajus apella* (capuchin monkeys). To this end, ovarian fragments were exposed to different cryoprotectant solutions, added or not by antioxidants (selenium or trolox), frozen and *in vitro* cultured by 24 hours. Morphology, ultrastructure, viability, oxidative stress and molecular analyses were performed. The collection site was in the Primates Nacional Center (CENP) and nine healthy mature female capuchin monkeys were used. Ovarian biopsies of 1 mm<sup>3</sup> were collected by laparoscopy. The follicles were classified accordingly to their developmental phase in primordial, primary or secondary. Follicular viability scored using fluorescent markers (propidium iodide and Hoechst). qRT-PCR was used to evaluate the expression of hormones and growth factors. TEAC was used to measure oxidative stress in the tissue. In cryoprotectant solution containing trolox did not affected follicular morphology and gene expression. Cryopreservation resulted in higher rates of follicular viability when trolox was present in the solution, but expression of genes encoding BMP4 and KL was negatively affected. Our findings show a favorable effect of adding trolox to a cryopreservation solution. However, follicular viability and gene expression was affected after *in vitro* culture.

Key words: Preantral follicles. Viability. Ultrastructure. qRT-PCR

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ABTS</b>	Sal diamônio do ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
<b>ABTS+</b>	2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico
<b>ACP</b>	Agentes Crioprotetor
<b>AMH</b>	Hormônio Anti-Mülleriano
<b>BMPs</b>	Proteínas Morfogenéticas Ósseas
<b>BME</b>	B-mercaptoetanol
<b>CALR</b>	Calreticulina
<b>CAT</b>	Catalase
<b>CTGF</b>	Fator de Crescimento de Tecido Conjuntivo
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EG</b>	Etileno Glicol
<b>ERp29</b>	Proteína do Retículo Endoplasmático 29
<b>ERp60</b>	Proteína do Retículo Endoplasmático 60
<b>FIV</b>	Fertilização <i>in vitro</i>
<b>FOPA</b>	Folículo Ovariano Pré-Antral
<b>FSH</b>	Hormônio Folículo Estimulante
<b>GDF-9</b>	Fator de Crescimento e Diferenciação-9
<b>GLI</b>	Glicerol
<b>GPX</b>	Glutathione Peroxidase
<b>GR</b>	Glutathione Redutase
<b>GSH</b>	Glutathione Reduzida
<b>GSSGX</b>	Glutathione Oxidada
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de Hidrogênio
<b>HO<sub>2</sub></b>	Hidroperoxila
<b>HSP</b>	Proteínas de Choque Térmico
<b>HSP 70</b>	Proteína de Estresse Térmico 70
<b>IA</b>	Inseminação Artificial
<b>ICSI</b>	Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide no Oócito
<b>IGF- 1</b>	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina- Tipo 1
<b>IUCN</b>	União Internacional da Conservação da Natureza
<b>K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub></b>	Persulfato de potássio

<b>KL</b>	Kit-Ligante
<b>LH</b>	Hormônio Luteinizante
<b>LIF</b>	Fator Inibidor de Leucemia
<b>LOO-</b>	Radicais peroxil
<b>LOOH</b>	Hidroperóxido de lipídeo
<b>MET</b>	Microscopia Eletrônica de Transmissão
<b>MIV</b>	Maturação <i>in vitro</i>
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Superóxido
<b>OH</b>	Hidroxila
<b>PA</b>	Ativação Partogenética
<b>PMSG</b>	Gonadotrofina do Soro de Égua Gestante
<b>SOD</b>	Superóxido Dismutase
<b>TEAC</b>	Potencial Antioxidante Equivalente ao Trolox

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	12
<b>2. OBJETIVOS</b>	14
2.1. OBJETIVO GERAL	14
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b>	15
3.1. A ESPÉCIE <i>Sapajus apella</i>	15
3.2. ESTRUTURA FOLICULAR OVARIANA	17
<b>3.2.1. Atresia Folicular</b>	23
3.3. CRIOPRESERVAÇÃO	24
<b>3.3.1. Técnicas Potencias de Criopreservação de tecido ovariano</b>	26
<b>3.3.2. Agentes Crioprotetores (ACPs)</b>	28
<b>3.3.3. Estresse Oxidativo e seus Mecanismos Homeostáticos</b>	29
3.3.3.1. Antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos	33
3.4. MÉTODOS PARA ANÁLISE DO TECIDO CORTICAL OVARIANO	35
3.5. CULTIVO <i>IN VITRO</i>	37
<b>4. TROLOX COMO UM SUPLEMENTO PARA SOLUÇÕES DE VITRIFICAÇÃO E CONGELAÇÃO: AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA, VIABILIDADE, BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE TECIDO OVARIANO DE MACACO-PREGO (<i>Sapajus apella</i>).</b>	38
<b>5. CONCLUSÃO</b>	72
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	73

## 1. INTRODUÇÃO

Primatas não-humanos (PNH) têm sido utilizados como importantes modelos experimentais para investigação biomédica. Porém, em virtude de inúmeros impactos ambientais e diminuição da diversidade genética, há uma preocupação emergencial para desenvolvimento de medidas de conservação de recursos genéticos para restaurar determinadas populações tanto de espécies em cativeiro com dificuldades reprodutivas e ameaçadas de extinção, quanto para animais domésticos de interesse econômico ou de produção (MARQUES et al., 2008; ARAT et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011; LIMA et al., 2012).

Dentro desse contexto, encontram-se alternativas reprodutivas, que também figuram aplicações comparativas com a reprodução humana, abrangendo terapias potenciais e estratégias preventivas. Dentre estas, podem ser citadas a inseminação artificial (IA), fertilização *in vitro* (FIV), injeção intracitoplasmática de espermatozóide no ócito (ICSI), produção *in vitro* de embriões (PIVE) e a criopreservação de material genético que é uma das mais promissoras biotécnicas utilizadas (WOLF et al., 2004; DOMINGUES; CALDAS-BUSSIÈRE, 2006; SANTOS et al., 2008).

A criopreservação é uma tecnologia que consiste na preservação de material biológico – como tecidos, folículos ovarianos, gametas e embriões – para manutenção da viabilidade e funcionalidade celular a baixas temperaturas, geralmente em botijões de nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  (CANDY; WOOD; WHITTINGHAM, 1997; SANTOS et al., 2006a,b; MATSON et al., 2008; SANTOS et al., 2008; BAKHACH, 2009). E, tem permitido a retomada da função reprodutiva e endócrina, principalmente no caso de mulheres submetidas a tratamento de quimio- e radioterapia (DONNEZ et al., 2006; DEMEESTERE et al., 2009; DEPALO; CAVALLINI, 2009; JIN et al., 2010).

Tal técnica pode ser realizada por dois métodos básicos: congelamento convencional ou lento (exposição a baixas concentrações de agente crioprotetor – ACP – e resfriamento lento controlado em “freezers” programáveis) e a vitrificação (altas concentrações de ACP e resfriamento ultra-rápido em nitrogênio líquido); porém, apesar das duas apresentarem variável nível de sucesso, Isachenko et al. (2010) concluíram que a vitrificação pode até garantir estoques de células viáveis, no entanto a congelamento lento é o método mais efetivo.

Jin et al. (2010) demonstraram, em macaco “*rhesus*”, um grande número de folículos ovarianos funcionais com viabilidade confirmada após descongelamento, evitando a

formação de gelo intracelular, pelo seu resfriamento lento. No entanto, a capacidade do material sobreviver depende também da tolerância aos ACPs, que podem provocar estresse osmótico e oxidativo (ÁVILA-PORTILLO et al., 2006; SANTOS et al., 2008). Estudos mostram que a utilização de antioxidantes pode evitar elevados níveis de radicais livres que causam estresse, e com isso danos em sistemas celulares (ABEDELAKHI; SALEHNIA; ALLAMEH, 2008; DISTELMAIE et al., 2009).

Pesquisas voltadas à criopreservação de tecido cortical ovariano têm sido realizadas em bovino (CELESTINO et al., 2007); cabras e ovelhas (FAUSTINO et al., 2010); e em humanos (ISACHENKO et al., 2010). Porém, em PNH é muito restrito, sendo que em primatas neotropicais, como *Sapajus apella*, a criopreservação de tecido cortical ovariano nunca foi documentada. Portanto, estudos são necessários visando primeiramente o desenvolvimento de protocolos eficientes de congelação para a obtenção de oócitos funcionais inclusos em folículos pré-antrais (FOPAs) e assim oferecer embasamento para pesquisas posteriores.

Nesta perspectiva, este estudo visa o desenvolvimento de um protocolo de criopreservação de tecido cortical ovariano de *Sapajus apella* por congelação convencional, utilizando ACPs (Etilenoglicol e Sacarose) e diferentes concentrações de antioxidantes (Selênio ou Trolox). E mais especificamente, os efeitos da técnica serão avaliados por análise morfológica e viabilidade dos folículos pré-antrais do tecido ovariano, utilizando a Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e sondas fluorescentes, respectivamente, assim como pelo desenvolvimento folicular *in vitro*.

A criopreservação também requer uma análise genética do material congelado, visto ser uma técnica que pode causar mudanças bioquímicas e fisiológicas (LOCKE et al., 1990; NOTOLLA et al., 2008). Com isso, este estudo também avalia a expressão gênica de marcadores do estresse oxidativo e fatores de crescimento, utilizando a técnica qRT-PCR em tempo real que pode indicar danos causados pela congelação, bem como a importância da utilização de antioxidantes no meio crioprotetor.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver um protocolo de criopreservação de tecido ovariano de *Sapajus apella* pelo método da congelamento convencional.

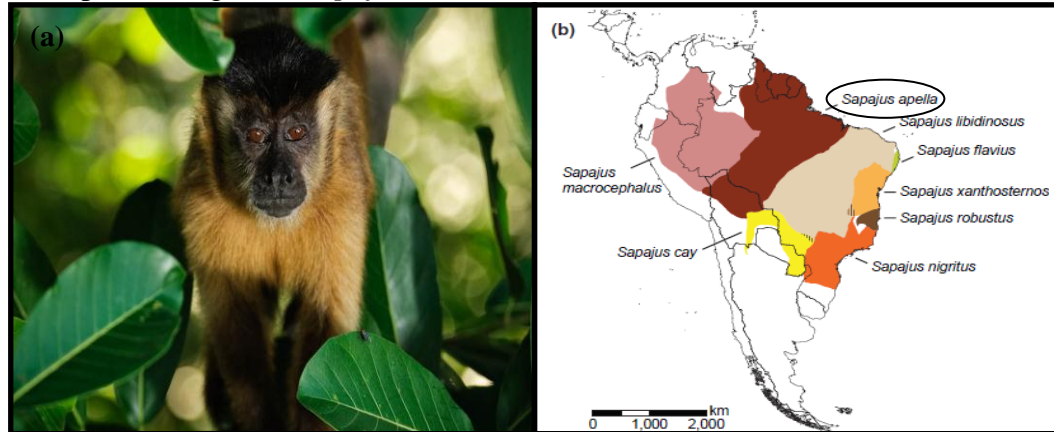
### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a utilização de soluções crioprotetoras intra- e extracelulares em combinação ou não com um agente antioxidante (Selênio ou Trolox), na técnica da congelamento convencional;
- Avaliar o efeito da concentração do agente oxidante na preservação da viabilidade folicular;
- Avaliar a morfologia do tecido ovariano, isto é, folículos pré-antrais e estroma, através de histologia clássica e MET;
- Analisar o estresse oxidativo no tecido ovariano após exposição aos crioprotetores e antioxidantes, através da mensuração dos níveis de TEAC;
- Avaliar a viabilidade dos folículos pré-antrais congelados por sondas fluorescentes (Iodeto de propídio e Hoechst);
- Avaliar e quantificar a expressão de genes relacionados com estresse oxidativo (ERp29, ERp60, HSP70 E SOD1), bem como a sobrevivência e desenvolvimento folicular (AMH, BMP4, BMP15, CTGF, GDF9 e KL).

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 A ESPÉCIE *Sapajus apella*

Fig.01. (a) Representante da espécie *Sapajus apella*. (b) Distribuição aproximada das espécies do gênero *Sapajus*



Fonte: (a) <http://theoribeiro.com/portfolio/nature-and-animals-photography/#ad-image13>; (b) Lynch Alfaro et al., 2012.

Macacos-prego são indivíduos que apresentam uma ampla distribuição geográfica, abrangendo a América Central e Sul (LYNCH ALFARO et al., 2012), vivendo em grupos que variam entre 6 e 30 indivíduos, onde se alimentam de forma generalista (SILVA JR; SILVA; KASECHER, 2008). Esses grupos inicialmente foram separados em dois, por Elliot (1913): Machos com tufo ou cristas na cabeça (grupo A) e machos sem tufo (grupo B). E, posteriormente foi aprovado por Hershkovitz (1949), o qual transformou na divisão dos chamados macacos-prego com tufo e sem tufo, reconhecendo quatro espécies: um com tufo (*Cebus apella*) e três sem tufo [*Cebus albifrons*, *Cebus capucinus* e *Cebus nigrivittatus* (= *Olivaceus*)].

Porém, nessa divisão foi observada algumas controvérsias, como por exemplo, a nem os todos classificados com tufo ou sem tufo apresentam tal característica (LYNCH ALFARO et al., 2012). Por esse fato, o que melhor divide os dois grupos é a sua anatomia, sendo o grupo A mais grácil que o grupo B que é mais robusto na morfologia craniana e pós-craniana, por Silva Jr. (2001), onde foi colocado este último grupo no subgênero *Sapajus* Kerr, 1792, com sete espécies: *Cebus* (*Sapajus*) *macrocephalus* e *C.* (*Sapajus*) *apella* na Amazônia, *C.* (*Sapajus*) *libidinosus* e *C.* (*Sapajus*) *cay* nos habitats da caatinga, cerrado e chaco, e *C.* (*Sapajus*) *xanthosternos*, *C.* (*Sapajus*) *robustus* e *C.* (*Sapajus*) *nigritus* no litoral da Mata Atlântica (Fig. 01b) (LYNCH ALFARO et al., 2012). *Cebus flavius*, um macaco-



prego robusto, foi recentemente redescoberto no nordeste do Brasil (MENDES PONTES et al., 2006; OLIVEIRA; LANGGUTH, 2006).

Contudo, todos os tratamentos baseados na morfologia reconhecem a divisão levando em consideração as formas robustas e gráceis, seguindo a taxonomia de Silva (2001), que na espécie do macaco-prego robusto, utiliza-se o nome de *Sapajus* mais como gênero do que subgênero. Ou seja, os *Cebus* referem-se aos macacos-prego gráceis (ou sem tufo) e *Sapajus* referindo-se aos macacos-prego robustos (ou com tufo) (LYNCH ALFARO; SILVA JR; RYLANDS, 2012; LYNCH ALFARO et al., 2012).

A espécie *Sapajus apella* apresenta como padrão morfológico mais comum um capuz enegrecido, com dois tufo pequenos, eretos, em forma de “chifres”; com garganta e partes ventrais do tronco com coloração marrom-avermelhada; extremidades e superfície lateral dos membros enegrecida, contrastando com a coloração das partes proximais; cauda marrom-enegrecida, com escurecimento gradual da extremidade (Fig. 01a) (SILVA JR, 2001; 2002; SILVA JR; SILVA; KASECHER, 2008).

Alguns aspectos da fisiologia reprodutiva da fêmea já foram descritos. Dentre estes, destacam-se o estudo do ciclo menstrual, apresentando duração média de 18 a 21 dias (NAGLE et al., 1979; DOMINGUES et al., 2003); a descrição das fases do seu ciclo obtida por citologia vaginal (WRIGHT; BUSH, 1977; LINN et al., 1995; MARTINS, 2004), por parâmetros comportamentais (LINN et al., 1995), pela determinação das concentrações plasmáticas dos hormônios ovarianos (NAGLE et al., 1979) e pela ultrassonografia (ORTIZ et al., 2005).

Estudos relacionados à biotécnicas da reprodução em *Sapajus apella* como modelo experimental têm sido desenvolvidos, visando com isso o aumento do potencial reprodutivo de fêmeas. Domingues et al. (2010) forneceram aspectos sobre a biologia, que incluem ciclo menstrual facilmente controlado e recuperação oocitária sem estimulação exógena, e sobre a competência meiótica de oócitos *in vitro* da espécie.

Lima et al. (2012) estabeleceram um protocolo de maturação *in vitro* (MIV) por 36 ou 40h para *Sapajus apella* e observaram o efeito do hormônio folículo estimulante (FSH) e do luteinizante (LH) na ativação partenogênica e FIV de oócitos coletados de fêmeas não estimuladas, obtendo 87% de oócitos em metáfase II após 40 MIV e embriões de quatro células após FIV e partenogênese. Contudo, enquanto os métodos de crescimento e maturação folicular são desenvolvidos e aperfeiçoados, os folículos pré-antrais podem ficar estocados em nitrogênio líquido por um período indeterminado, sendo necessário para isso, o

desenvolvimento de um protocolo eficiente de congelação e descongelação de tecido ovariano.

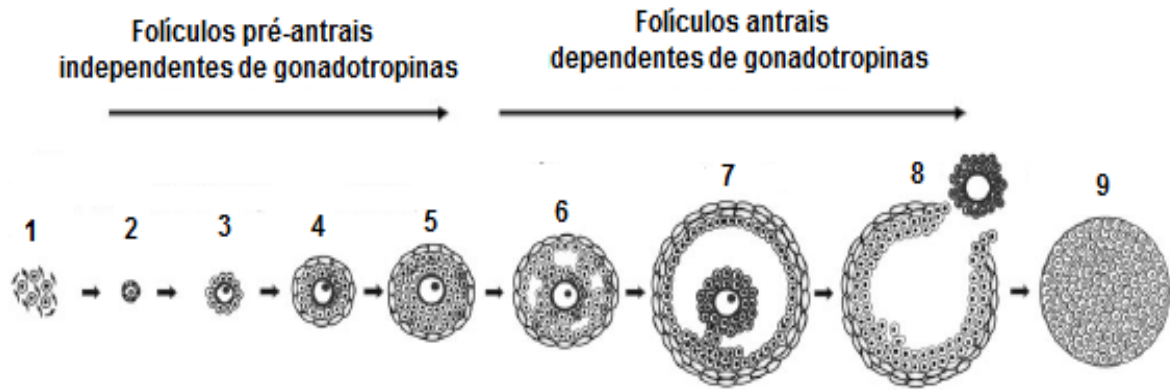
### 3.2 ESTRUTURA FOLICULAR OVARIANA

Em todas as espécies de mamíferos, a gônada feminina é uma estrutura complexa e multi-compartimentada com diversas funções biológicas que incluem a produção de células germinativas competentes para a fertilização (oócitos) e a produção de hormônios, como o estrogênio e progesterona, que são capazes de influenciar a função da maioria de outros órgãos e tecidos do corpo (MOTTA; MAKABE; NOTTOLA, 1997; PEREDA; ZORN; SOTO-SUAZO, 2006; EDSON; NAGARAJA; MATZUK, 2009).

O folículo ovariano é a unidade básica estrutural e funcional do ovário mamífero, pois fornece o ambiente necessário para o crescimento e a maturação oocitária. Sua estrutura é incorporada em um estroma (composto por tecido conjuntivo), no qual se encontra folículos em vários estágios de desenvolvimento ou degeneração, formados durante um processo conhecido como foliculogênese que inicia durante a gestação e culmina na ovulação do indivíduo (MOTTA; MAKABE; NOTTOLA, 1997; McLAREN, 2000; VAN DEN HURK; SANTOS, 2009).

No início da foliculogênese de mamíferos no geral, o folículo primordial formado consiste do oócito (no estágio de diplóteno da meiose I ou vesícula germinativa, onde se observa a primeira interrupção da divisão meiótica) com uma camada de células da pré-granulosa achatadas que estabelecerá um estoque de folículos primordiais, onde alguns começam a crescer e se diferenciam em vários estágios de desenvolvimento, enquanto outros permanecem quiescentes (Fig. 02.) (MOTTA; MAKABE; NOTTOLA, 1997; SANTOS et al., 2008; EDSON; NAGARAJA; MATZUK, 2009; VAN DEN HURK; SANTOS, 2009).

Fig. 02. Classificação dos estágios da foliculogênese de mamíferos. (1) Cisto de células germinativas. Folículos pré-antrais dependentes de fatores de crescimento: (2) Folículo primordial; (3) Folículo primário; (4,5) Secundário (formação da camada tecal - mais externa). Folículos antrais dependentes de gonadotripinas: (6) Terciário; (7) Pré-ovulatório. (8) Ovulação. (9) Corpo lúteo.



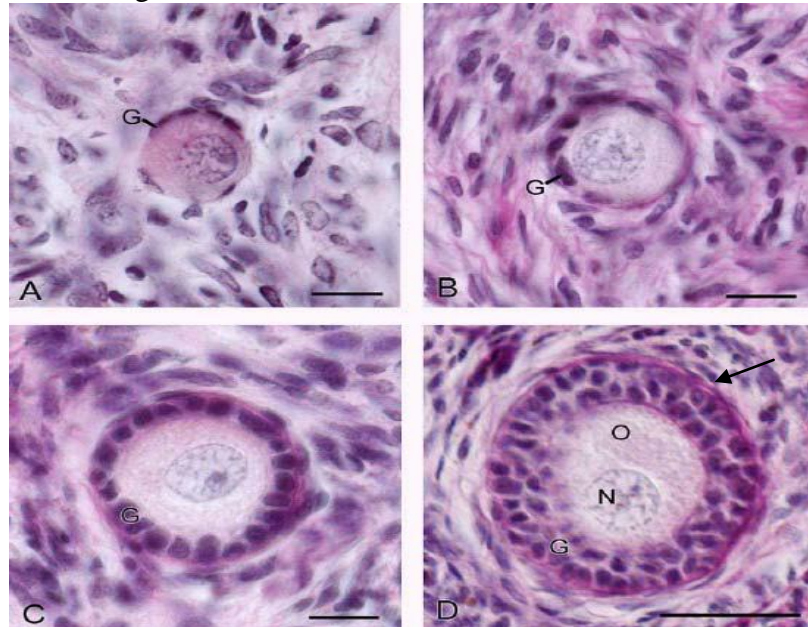
Fonte modificada: Edson, Nagaraja e Matzuk, 2009.

Folículos primordiais, através de fatores de crescimento (como o CTGF, GDF-9, BMPs, KL) diferenciam-se em uma única camada de células da granulosa com núcleo redondo e citoplasma contendo filamentos intermediários de vimentina, associados com mudanças na forma das células da granulosa (plana para cúbicas) (Fig.02; 03), apresentando também uma intensa atividade mitótica, levando ao início da proliferação e diferenciação tanto das células da granulosa quanto do próprio oócito (MOTTA; MAKABE; NOTTOLA, 1997; ERICKSON, 2001; SANTOS et al., 2008; EDSON; NAGARAJA; MATZUK, 2009; VAN DEN HURK; SANTOS, 2009).

Contudo, os folículos podem também ser classificados, como proposto por Lintern-Moore (1974), considerando uma fase de transição folicular, o que foi chamado folículo de transição, que apresenta em sua estrutura os dois formatos de células da granulosa, por causa da transformação que ocorre de células achatada em células da granulosa cubóides (Fig. 03).

Os folículos em crescimento podem ser chamados de primário (apresentando oócito imaturo com uma única camada de células da granulosa cubóides), secundário (oócito imaturo com a zona pelúcida formada – membrana protetora do oócito – contendo mais de duas camadas de células da granulosa, e periféricamente, o começo da formação da camada tecal), terciário (camada tecal desenvolvida, começo da produção do fluido folicular, e com isso formação da cavidade antral) e o pré-ovulatório correspondente ao estágio final do desenvolvimento folicular (Fig. 02; 03) (MOTTA; MAKABE; NOTTOLA, 1997; SANTOS et al., 2008; EDSON; NAGARAJA; MATZUK, 2009; VAN DEN HURK; SANTOS, 2009).

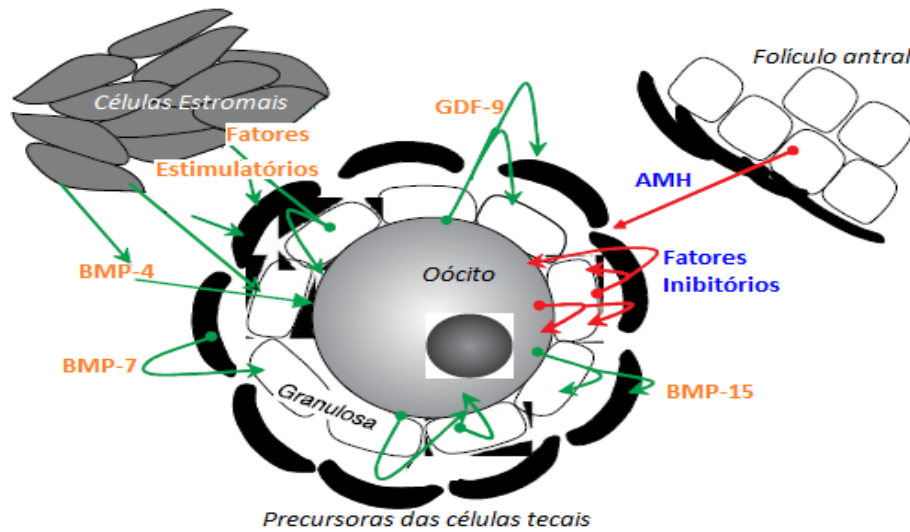
Fig. 03. Estrutura histológica de folículos pré-antrais: (A) Folículo primordial; (B) Folículo de Transição; (C) Folículo Primário; e (D) Folículo Secundário, observa-se o começo da formação da camada tecal (seta). O: oócito; N: núcleo; G: células da granulosa.



Fonte: Silva et al., 2004

Figueiredo (1995 *apud* SANTOS et al., 2008) destaca que dependendo da ausência ou presença da cavidade antral os folículos são classificados como: pré-antrais e antrais (Fig.02). Os folículos pré-antrais representam mais 90% da população folicular presente no ovário mamífero (SAUMANDE, 1981 *apud* SANTOS et al., 2008), e visto que nessa fase a vascularização é pouco desenvolvida pode-se indicar um controle parácrino, ao invés de endócrino, de citocinas e fatores de crescimento (Fig. 04) como o GDF-9, BMPs, AMH, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , LIF, IGF-1, KL, CTGF dentre outros importantes reguladores do estágio inicial do desenvolvimento folicular (MOTTA; MAKABE; NOTTOLA, 1997; MCLAREN, 2000; ERICKSON, 2001; PEREDA; ZORN; SOTO-SUAZO, 2006; SANTOS et al., 2008; EDSON; NAGARAJA; MATZUK, 2009; VAN DEN HURK; SANTOS, 2009).

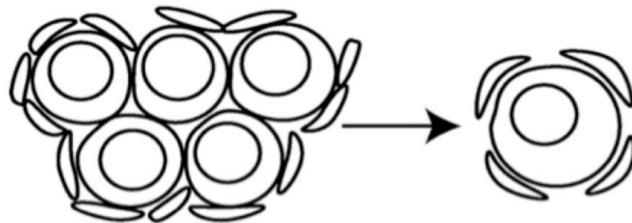
Fig. 04. Representação esquemática de fatores inibitórios (setas vermelhas) e estimulatórios (setas verdes) envolvidos na ativação e transição do folículo primordial para primário.



Fonte modificada: Mclaughlin e McIver, 2009.

A formação dos folículos primordiais é um processo que ocorre quando um “ninho” de oócitos se rompe, por apoptose, para formar um folículo único. Pesquisas mostram a associação do CTGF nessa formação, influenciando também na regulação da síntese de tecido conjuntivo e, com isso, no desenvolvimento folicular, induzido especificamente pelo TGF  $\beta$  -1 (Fig. 05) (SLEE et al 2001; LEASK; ABRAHAM, 2003; NILSSON et al., 2010; SCHINDLER; NILSSON; SKINNER, 2010).

Fig. 05. Desenho esquemático mostrando oócitos em “ninho”, que por apoptose resulta na formação de um folículo primordial



Fonte: Schindler; Nilsson; Skinner, 2010.

O KL (também conhecido como fator de células-tronco) estabelece um papel chave no crescimento oocitário e desenvolvimento estromal e folicular em mamíferos (DRIANCOURT et al, 2000; revisado por SKINNER, 2005). Análise da expressão de KL revela elevado nível em células da granulosa, sugerindo uma importante interação com

oócitos, podendo também influenciar o recrutamento e proliferação das células tecais, sendo, com isso, um fator crítico na transição do folículo primordial para primário e na sobrevivência durante o início da foliculogênese (revisado por SKINNER, 2005; CARLSSON et al. 2006).

Muitos membros da superfamília TGF-  $\beta$  estão envolvidos na via de sinalização extracelular para regular o desenvolvimento folicular também, como o GDF-9 e as BMPs (principalmente BMP-4, -7 e -15 ou GDF9b). O efeito estimulatório na transição do folículo primordial para primário foi demonstrado por BMP (-4 e -7), produzidas por células estromais e tecais. O GDF9 e a BMP15 são secretados pelo oócito e regulam o recrutamento de folículos primordiais, a proliferação das células da granulosa, diferenciação e síntese de esteróides (RODRIGUES et al., 2008; McLAUGHLIN; MCLVER, 2009; SUN et al., 2010). Estudos relatam ainda que essa regulação ocorre também através de folículos vizinhos (EDWARDS et al., 2008). (Fig. 04)

O AMH é o fator de crescimento que leva a regressão do ducto de Müller em indivíduos do sexo masculino, e tem sido bastante citado como responsável pela manutenção do “pool” de folículos primordiais em fêmeas, pois sua produção em células da granulosa, sugere seu papel inibidor na formação de folículos primordiais, tendo com isso uma ação regulatória no processo da foliculogênese (Fig. 04) (revisado por RODRIGUES et al., 2008; McLAUGHLIN; MCLVER, 2009). Estudos mostram que este fator pode diminuir a expressão de fatores pró-ativação e aumentar a expressão de fatores inibitórios (NILSSON; ROGERS; SKINNER, 2007).

Com relação aos folículos antrais (estritamente dependentes de gonadotrofinas), estes são recrutados e selecionados, tornando-se subordinados, dominantes ou pré-ovulatórios dependendo de sua responsividade aos hormônios gonadotróficos (dependente de FSH para responder ao LH) ou podem se degenerar por apoptose (SANTOS et al., 2008; EDSON; NAGARAJA; MATZUK, 2009; VAN DEN HURK; SANTOS, 2009).

Na fase final se observa várias camadas de células da granulosa (Células do mural) e um oócito rodeado por células do *cumulus* que ligam o oócito a parte mural, as quais englobam um fluido antral cercadas por células bem diferenciadas chamadas de teca (Fig. 02). A camada interna da teca é bem vascularizada, possui abundantes células esteroidogênicas distribuídas em um tecido conjuntivo frouxo, e a teca externa consiste principalmente de tecido conjuntivo denso (MOTTA; MAKABE; NOTTOLA, 1997; McLAREN, 2000; ERICKSON, 2001; SANTOS et al., 2008; EDSON; NAGARAJA; MATZUK, 2009; VAN DEN HURK; SANTOS, 2009).

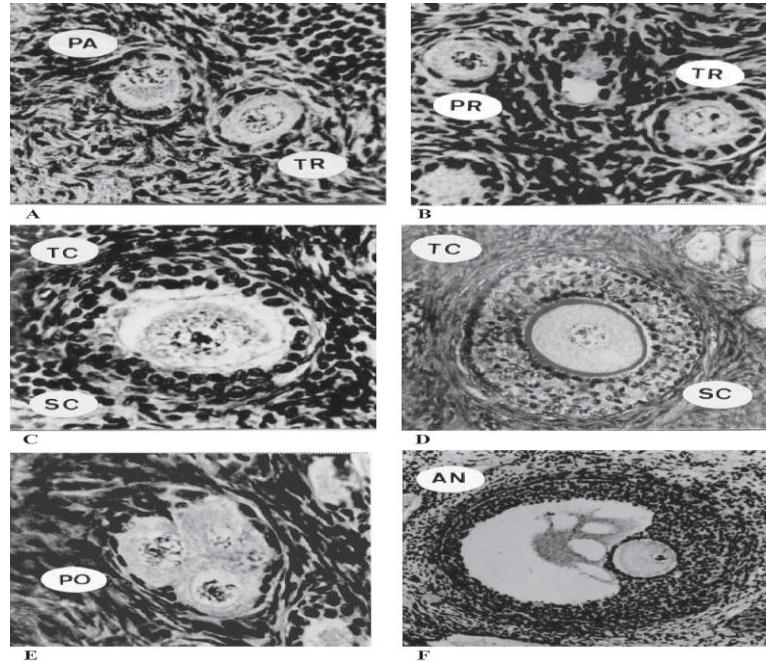
No folículo pré-ovulatório, o oócito reagirá com o pico do LH e irá se maturar (haverá rompimento das junções do oolema e *cumulus*, redistribuição das organelas, migração perinuclear das mitocôndrias e acúmulo de grânulos corticais ao longo do oolema) e ovular (FERREIRA et al., 2008; EDSON; NAGARAJA; MATZUK, 2009; VAN DEN HURK; SANTOS, 2009).

Domingues et al. (2004) estudaram aspectos histológicos de folículos ovarianos de *Sapajus apella* adultas, e mostraram o total médio da população de folículos pré-antrais de ovário direito e esquerdo, 56.938 e 49.133, respectivamente. No mesmo trabalho, verificaram uma percentagem média de folículos de 30, 60, 6 e 4% nos estágios: primordial, transição, primário e secundário, respectivamente.

O desenvolvimento folicular em *Sapajus apella*, assim como em outras espécies de mamíferos, apresenta um aumento significativo do número de células da granulosa em diferentes categorias foliculares. Domingues et al. (2004) observaram que as células cúbicas começam a aparecer quando o folículo apresenta cerca de 11 células na camada da granulosa. As células achatadas ainda estão presentes até o estágio de 15 células foliculares. A transformação completa foi alcançada no estágio de 16 células. A figura 06 ilustra as diferentes categorias de folículos pré-antrais em *Sapajus apella*.

Com relação ao diâmetro médio folicular, Van den Hurk e Santos (2009) destacam uma mensuração entre 30  $\mu$ m de diâmetro de folículos primordiais em mamíferos, e Domingues et al. (2004) encontraram em *Sapajus apella* uma média de 16-47  $\mu$ m (min-max). Em comparação com os pré-ovulatórios, estudos mostram um tamanho de 8-10 mm em ovelhas, 15 a >20 mm em cabras e >20 em humanos (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005), e em *Sapajus apella* pode chegar de 10-12 mm (NAGLE et al., 1980; DOMINGUES et al., 2007).

Fig. 06. Ilustração de folículos ovarianos de *Sapajus apella*, em diferentes categorias morfológicas, analisados histologicamente. A, B, C, D, E (x400) e F (x100). (PR) primordial; (TR) transição; (PA) primário; (SC) Secundário; (PO) poliovular; (AN) antral; (TC) células da teca.



Fonte: Domingues et al., 2004.

Contudo, como já comentado, Domingues et al. (2004) observaram uma maior percentagem de folículos pré-antrais degenerados na categoria de folículos primordiais. E conforme o experimento em vacas de Erickson (1966 *apud* DOMINGUES et al., 2004), com o avanço da idade, o número de folículos primordiais degenerados aumenta, isso pode ser observado também na maioria das fêmeas de mamíferos, inclusive em humano.

### 3.2.1 Atresia Folicular

Dogmas suportam a idéia que a produção de células germinativas na maioria das fêmeas mamíferas é restrita ao nascer ou no início da vida neonatal, cessando durante o período perinatal para formar uma reserva folículos primordiais (KIM; TILLY, 2004). Porém, apesar da enorme população folicular presente no ovário, apenas menos de 1% dos folículos disponíveis ao nascer ovulam, enquanto o resto torna-se atrésicos (ASSELIN et al., 2000; SANTOS et al., 2008; VAN DEN HURK; SANTOS, 2009).

Em uma fêmea adulta, o processo de desenvolvimento folicular e maturação oocitária são continuados ao longo de sua vida reprodutiva, encerrando então quando o



suprimento de oócitos tiver sido esgotado, ocorrendo uma senescência ovariana, que em humanos é chamado de menopausa. Muitos estudos confirmam que este processo ocorre por via apoptótica, conhecida como “morte celular programada” (ASSELIN et al., 2000; KIM; TILLY, 2004; KRISKO et al., 2008; SANTOS et al., 2008).

Apoptose é um processo coordenado e frequente que envolve, na maioria das vezes, a ativação de um grupo de proteases cisteínas, chamadas de caspases, que desencadeia uma complexa cascata de eventos que liga o estímulo inicial ao destino celular. Este processo ocorre naturalmente durante o desenvolvimento e envelhecimento, como um mecanismo homeostático tanto para manutenção de populações celulares (processo fisiológico), quanto para mecanismo de defesa ou células danificadas (processo patológico) (ASSELIN et al., 2000; ELMORE, 2007; KRISKO et al., 2008).

Aos oócitos sobreviventes de ondas apoptóticas pré- e perinatal, incluso em folículos, seu destino não é diferente, porém o processo é conhecido como atresia folicular, a qual pode ocorrer em qualquer estágio de maturação, com apoptose ou de células da granulosa ou do próprio oócito. O equilíbrio entre os sinais de morte e sobrevivência celular determina o destino dos folículos, que envolve a interação de fatores endócrinos (gonadotrofinas) e reguladores intra-ovarianos (esteróides, fatores de crescimento e citocinas) (ASSELIN et al., 2000; KIM; TILLY, 2004; KRISKO et al., 2008).

### 3.3 CRIOPRESERVAÇÃO

O método bastante empregado na biologia reprodutiva é a criopreservação, servindo tanto para preservar a fertilidade, principalmente de jovens que se submetem à tratamentos para câncer ou com risco de insuficiência ovariana prematura (Donnez et al., 2004; Demeestere et al., 2006; Andersen et al., 2008; Donnez et al., 2010), como também, restaurar populações de animais domésticos e algumas espécies ameaçadas de extinção, objetivando conservar células germinativas, para formação de bancos de germoplasma (Santos et al., 2010; Arat et al., 2011).

Além disso, para evitar a extinção de algumas espécies e/ou conservar células germinativas, pesquisas têm sido realizadas utilizando tal técnica, com o objetivo de constituir bancos de germoplasma (revisado por SANTOS et al., 2010), pois, à temperatura do nitrogênio líquido, a viabilidade durante o armazenamento pode ser estendida por períodos de tempo, com manutenção da estabilidade do material genético (YEOMAN; WOLF; LEE,

2005; JIN et al., 2010).

Polge, Smith e Parkes (1949) obtiveram a primeira criopreservação bem sucedida em espermatozóide humano, utilizando, pela primeira vez, glicerol como crioprotetor. Em 1972, o sucesso publicado foi em embriões de camundongos e desde então vários autores relatam sucesso no congelamento e descongelamento de vários embriões de mamíferos, incluindo os humanos (YEOMAN et al., 2001; LIEBERMANN; TUCKER, 2002; HREDZÁK et al., 2005; BALABAN et al., 2008; RAJU et al., 2009). Porém, há desvantagens na técnica, como o custo de obtenção dos embriões, repetidas estimulações hormonais, poucos números de embriões coletados, dependência de ciclos estrais, e não é uma técnica viável para animais pré-púberes (GOSDEN, 2000; SHAW et al., 2000; RODRIGUES et al., 2004).

A criopreservação de oócitos é muito visada para mulheres adultas solteiras ou para casais com taxas baixas de gravidez. Porém, esta abordagem se assemelha ao congelamento de embriões, apresentando dificuldades parecidas, pois também necessita de várias semanas de estimulação ovariana. Além do mais, a técnica pode causar a liberação prematura do conteúdo dos grânulos corticais e, conseqüentemente, o endurecimento da zona pelúcida (VICENT; PICKERING; JOHNSON, 1990).

Vários estudos mostram a possibilidade de criopreservar oócitos imaturos inclusos em FOPA, e com isso capazes de crescer *in vitro*, como em ratos (CANDY; WOOD; WHITTINGHAN, 1995), humanos (HOVATTA et al., 1996), caprinos (SANTOS et al., 2006<sup>a</sup>), ovinos (SANTOS et al., 2006b; 2007ab). A criopreservação de fragmentos de tecido cortical ovariano também levou a retomada do ciclo reprodutivo após cultivo *in vitro* em ovelhas (CECCONI et al., 2004; MURUVI et al., 2009), cabras (RODRIGUES et al., 2005; 2006), macaco “*rhesus*” (JIN et al., 2010); autotransplantação em humanos (DEMEESTERE et al., 2006; ANDERSEN et al., 2008), ovelhas (SALLE et al, 1998; MASSARDIER et al., 2010), cabras (SANTOS et al., 2009); xenotransplante em humano-camundongo (GOOK et al., 2003; NOTTOLA et al., 2008); e nascimento de indivíduos viáveis em humano (DONNEZ et al., 2004) e macaco rhesus (LEE et al., 2004).

No entanto, a criopreservação também pode causar alterações cromossômicas como a aneuploidia (PAYNTER, 2000) devido à alteração do fuso meiótico (AMAN; PARQUES, 1994) e do citoesqueleto (FABBRI et al, 2000). Porém, estes problemas são menos prováveis quando o armazenamento é de oócitos imaturos, porque eles são menos diferenciados (NUGENT et al., 1997), possuem menos organelas, meiose I incompleta, não

apresentam zona pelúcida e grânulos corticais, e são menos ativos metabolicamente (RODRIGUES et al., 2004; YEOMAN et al., 2005).

Além do mais, estes oócitos imaturos presentes em FOPA, principalmente primordial, formam um reservatório enorme de oócitos, como já exposto anteriormente. Portanto, a exploração e congelação de folículos desse reservatório para obtenção de oócitos, e posterior cultivo in vitro ou (auto) xenotransplantação é a única alternativa possível e viável para preservar a fertilidade de espécies ameaçadas de extinção ou com dificuldades reprodutivas e jovens pacientes com câncer, que se submetem a tratamentos como quimio- e radioterapia.

### 3.3.1 Técnicas Potenciais de Criopreservação de tecido ovariano

A criopreservação pode ser desenvolvida usando uma destas duas técnicas: Congelamento convencional ou a criopreservação do material direto no nitrogênio líquido (então chamado de vitrificação ou congelamento rápida). De acordo com o método escolhido, mudanças podem interferir a função normal do material biológico, pois as células são expostas a diferentes forças (térmicas, químicas e mecânicas), alterações nível de membrana e volume, assim como a formação de cristais de gelo (Revisado por SANTOS et al., 2010).

O método convencional (ou lento), conhecido também como taxa controlada de congelamento, requer a utilização de um equipamento de congelamento programável que pode garantir declínio gradual controlado da temperatura (HREDZÁK et al, 2005), sendo caracterizada pela exposição das células ou tecidos a baixas concentrações de agentes crioprotetores, como em 1,5 mol/l (CECCONI et al., 2004; CELESTINO et al., 2007) e 1,0 mol/l, (SANTOS et al., 2006a; 2009; FAUSTINO et al., 2010) por um período que pode variar de 20 (RODRIGUES et al.,2004; SANTOS et al., 2006a; 2009) a 60 minutos (CANDY; WOOD; WHITTINGHAM, 1997).

Nesse método, o material é resfriado lentamente a uma velocidade de 2°C/min de -4 até -7°C, mantendo-se nesta temperatura por um curto período (10 a 15 min.) para a estabilização térmica e realização do *seeding* (pré-resfriamento em nitrogênio líquido), o qual previne o super-resfriamento e a extrema desidratação celular. Em seguida, a amostra continua sendo resfriada lentamente a uma velocidade de 0,3°C/min. Uma vez que a desidratação celular é suficientemente atingida (entre -30 a -80°C), o material é estocado em nitrogênio líquido (-196°C) (SANTOS et al., 2008).

Oktaý et al. (2004) utilizando protocolos de congelação lenta com DMSO como ACP, conseguiu desenvolver um embrião de 4 células morfológicamente normal, indicando que folículos ovarianos com oócitos funcionais e viáveis podem ser obtidos de tecido ovariano humano criopreservado e transplantado para um local heterotópico. Donnez et al. (2004), relataram um nascimento vivo após transplante ortotópico com sucesso de tecido ovariano criopreservado em uma mulher com linfoma de Hodgkin.

Demeestere et al. (2006) analisaram 6 ciclos espontâneos em uma mulher após a combinação de transplantação orto e heterotópica de tecido cortical ovariano criopreservado, utilizando a técnica da congelação convencional, permitindo pela primeira vez a comparação ao mesmo tempo da atividade folicular em diferentes locais, informando o segundo caso de gestação espontânea após o transplante ortotópico e a evidência de restauração da fertilidade por tecido criopreservado.

O tecido ovariano humano pode ser criopreservado com sucesso utilizando o método da congelação lenta, com DMSO ou EG como ACP, associado ou não com sacarose (Revisado por DONNEZ et al. 2010). Jin et al. (2010) testaram o efeito da congelação de tecido cortical ovariano de PNH (Macaco “*rhesus*”), e concluíram que folículos primordiais mantiveram sua morfologia, bem como marcadores moleculares de desenvolvimento funcional, durante cultivo *in vitro*.

Santos et al. (2009) demonstraram desenvolvimento folicular completo e recuperação da função biológica de tecido cortical ovariano criopreservado e autotransplantado, utilizando o método da congelação tradicional, sendo observado, entre 2 e 3 meses após transplantação, folículos antrais e pré-ovulatórios e corpo lúteo na estrutura ovariana, indicando a capacidade de folículos primordiais chegarem no estágio ovulatório e ovular.

Outros resultados promissores foram obtidos após a criopreservação de tecido ovariano de animais domésticos (gatos, ovelhas, cabras, vacas, porcos, cavalos e coelhos) e selvagens (Elefantes, cangurus, marsupiais, macacos “*rhesus*”) utilizando protocolos de congelamento convencional. Assim como, a sobrevivência de folículos morfológicamente e ultra-estruturalmente normais após o descongelamento; crescimento folicular após o cultivo *in vitro*; recuperação da função reprodutiva e endócrina e formação de folículos antrais após o xenotransplante, dentre outros já descritos (SANTOS et al., 2010).

Entretanto, diferentemente do congelamento, a vitrificação é um método mais rápido, simples e menos oneroso, e foi descrita pela primeira vez por Rall e Fahy (1985).

Durante a vitrificação, há um resfriamento ultra-rápido, sem cristais de gelo (uma das principais causas de danos celulares), ocorrendo uma subsequente formação de um estado vítreo, devido ao grande aumento na viscosidade da solução para um ponto onde as moléculas ficam imobilizadas e a amostra adquire as propriedades de um sólido (HREDZÁK et al, 2005; SANTOS et al., 2007; 2010).

A vitrificação envolve a exposição do material biológico a altas concentrações de ACP (geralmente entre 4 e 6 mol/L) por um variável período de tempo (25 segundos a 45 minutos), dependendo da temperatura de exposição, seguido de um resfriamento ultra-rápido em nitrogênio líquido, não sendo necessária a utilização de equipamentos sofisticados e de alto custo. Porém, estas altas concentrações de ACPs podem aumentar a citotoxicidade e os efeitos deletérios ao material exposto (SANTOS et al., 2008; 2010).

Embora estudos em cada uma dessas técnicas relatem níveis variados de sucesso, os resultados se tornam controversos. Alguns autores afirmaram que não encontraram nenhuma diferença estatística entre os dois métodos, enquanto outros apresentaram melhores resultados na vitrificação (HREDZÁK et al, 2005; YEOMAN et al., 2005). Existem evidências sugerindo que a criopreservação lenta é mais efetiva e produz um maior número de folículos funcionais após a criopreservação (ISACHENKO et al., 2009; JIN et al 2010).

De acordo com Gandolfi et al. (2006), a congelação convencional é o método de escolha para criopreservação de tecidos ovarianos, resultando em uma melhor preservação de todos os tipos de folículos. Outros estudos têm mostrado que a vitrificação pode até garantir o estoque de folículos após o descongelamento, porém o método convencional é mais efetivo (ISACHENKO et al., 2009). E, Isachenko et al. (2010) concluíram ainda que para a criopreservação de tecido ovariano humano, a congelação lenta é mais promissora que a vitrificação.

### **3.3.2 Agentes Crioprotetores (ACPs)**

O sucesso da criopreservação depende, entre outros fatores, de ACPs sendo necessário identificar o mais desejável, com sua concentração adequada para que possa ser utilizado para redução de perdas foliculares que ocorrem normalmente durante os procedimentos de congelação. Portanto, ACPs como o DMSO, EG e PROH promoverão um

efeito de desidratação celular que irá protegê-la durante a sua estocagem em baixas temperaturas (SANTOS et al., 2008; 2010).

Os ACPs protegem as células contra a desidratação, resfriamento e danos causados pela redução extrema de temperatura. No geral, esses agentes podem penetrar nas células (ACP intracelular), substituir moléculas de água; reduzir o ponto de congelação; proteger membranas celulares (ACP extracelular) por meio da sua ligação às cabeças dos grupos fosfolipídicos; aumentando a viscosidade do meio ou diminuindo a concentração de eletrólitos durante a criopreservação, evitando riscos osmóticos (SANTOS, 2007a).

A maioria dos protocolos de preservação de tecido ovariano foram realizados na presença de ACPs intracelulares como o GLI, EG, PROH e DMSO, em concentrações variando de 1,5 a 3,0 M e ACP extracelular como a sacarose, na concentração de 0,5 M. Além de seu efeito crioprotetor, estas substâncias também podem ser tóxicas para as células, principalmente durante o período de exposição (RODRIGUES et al, 2004; 2006; SANTOS et al, 2006a; 2007a; CELESTINO et al, 2007).

Rodrigues et al. (2006) demonstraram que a viabilidade folicular após 5 dias de cultivo de folículos pré-antrais previamente criopreservados foi similar na criopreservação usando DMSO e EG, tanto no fragmento do tecido ovariano quanto nos folículos isolados. Várias pesquisas mostram ambos crioprotetores sendo utilizados com sucesso para criopreservação de tecido ovariano como o DMSO (DONNEZ et al., 2004; DEMEESTERE et al., 2006; MURUVI et al., 2009), o EG (CECCONI et al., 2004; CELESTINO et al., 2007; FAUSTINO et al., 2010; JIN et al., 2010).

No entanto, Santos et al. (2006b) demonstraram que a utilização de EG e sacarose parece ser importante para a manutenção da viabilidade de folículos pré-antrais, sendo o EG mais eficiente que o DMSO, em virtude de seu peso molecular ser mais leve (62.07 kDa) que o DMSO (78.13 kDa), facilitando com isso sua penetração no tecido ovariano. Cecconi et al. (2004) relatam que em procedimentos de congelação o EG preserva de forma mais eficiente folículos ovarianos de ovinos, e no desenvolvimento *in vitro* os folículos mostraram ser mais saudáveis.

### **3.3.3 Estresse Oxidativo e seus mecanismos homeostáticos**

Apesar dos ACPs 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. Com isso, para evitar

essa injúria a concentração ACPs e o tempo de exposição antes do congelamento, devem estar equilibrados alcançando uma desidratação e a penetração suficiente do ACP no tecido, reduzindo danos citotóxicos (AMORIM et al., 2006).

Outro agravante é o estresse oxidativo que durante a criopreservação pode ser gerado através de diferentes mecanismos, como o aumento do metabolismo oxidativo e o próprio estresse osmótico, que podem resultar na alteração da integridade e potencial de membranas celulares. A toxicidade do ACP é um fator fundamental limitante para a criopreservação de sistemas vivos tanto por congelamento quanto vitrificação (Revisado por FAHY, 2010).

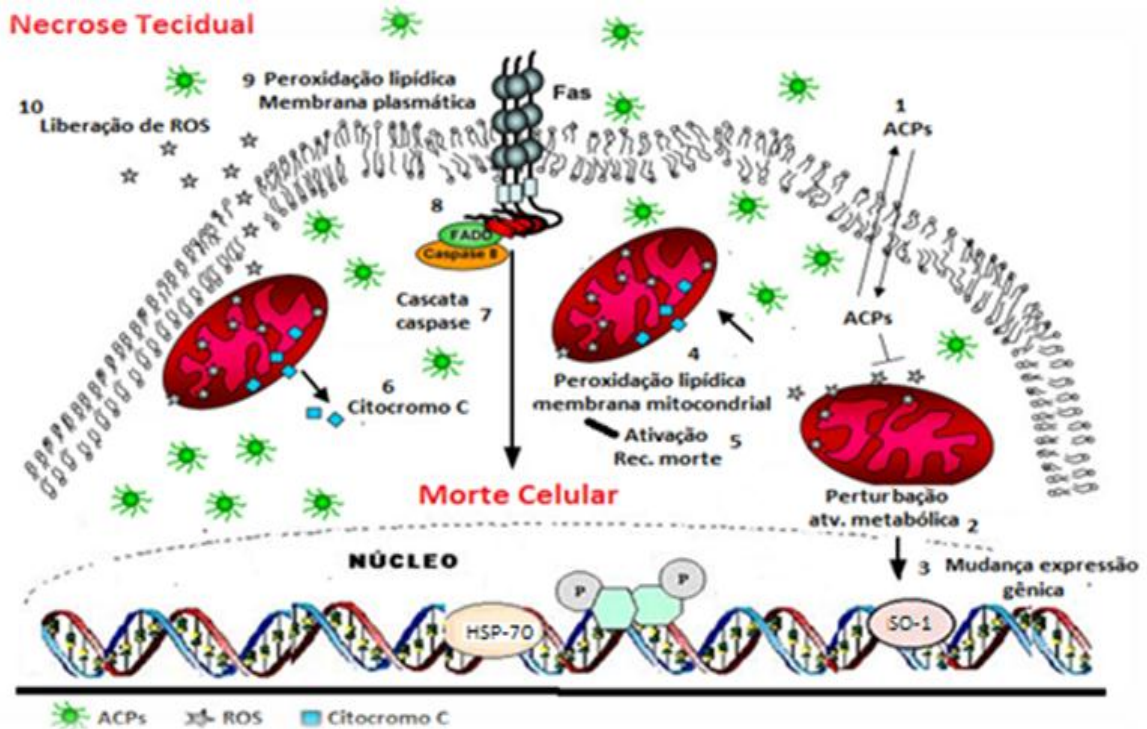
O estresse oxidativo tem sido responsável por diferentes tipos de danos, incluindo a peroxidação lipídica de membranas, a oxidação de aminoácidos e ácidos nucléicos, apoptose e necrose, sendo definido como um desbalanço intracelular entre a produção de ROS (oxidante) e os mecanismos de defesa da célula (antioxidante), favorecendo a formação de peróxidos causando estresse e, conseqüentemente, seqüelas patológicas (HALLIWELL; GUTTERIDGE; CROSS, 1992; LIMA-VERDE et al., 2007).

Metabólitos Reativos do Oxigênio (ROS, do termo em inglês *Reactive Oxygen Species*) se referem a todos radicais livres produzidos como subprodutos de reações de oxidação e redução, sendo estes radicais, átomos ou moléculas que apresentam um ou vários elétrons não pareados que provocam atração de outras moléculas, por isso sua elevada reatividade (RYTER; CHOI, 2005; TATONE et al., 2010).

Os ROS são encontrados em todos os sistemas biológicos, em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio (cadeia respiratória mitocondrial), formando intermediários reativos como os radicais  $O_2^{\cdot -}$ ,  $HO_2$ ,  $OH$  e o  $H_2O_2$  (RYTER; CHOI, 2005; Revisado por TATONE et al., 2010).

Os efeitos de ROS são dose-dependentes, e quimicamente, são substâncias que apresentam número ímpar de elétrons, sendo, portanto, altamente energéticos e instáveis. Em baixos níveis, regulam funções celulares e agem como sinalizadoras através da ativação de fatores específicos de transcrição, mantendo o metabolismo energético. Quando em altos níveis, estas moléculas irão exercer estresse oxidativo nas células e provocar profundas mudanças na expressão gênica (Fig. 07) (RYTER; CHOI, 2005; LIMA-VERDE et al., 2007; TATONE et al., 2010).

Fig 07. Desenho esquemático do possível efeito do desbalanço metabólico provocado pela (1) exposição à ACPs: (2) Perturbação da atividade metabólica, com a produção excessiva de ROS; (3) Mudança na expressão gênica, para a formação de antioxidantes; (4) peroxidação lipídica da membrana mitocondrial, por causa da elevada reatividade de ROS; (5) resultando na ativação de receptores de morte, (6) liberação de citocromo C e o (7) acionamento da cascata das caspases, levando à (8) sinais de morte celular por apoptose. O excesso de ROS intracelular pode provocar a (9) peroxidação lipídica da membrana plasmática, (10) liberação de ROS ao meio extracelular e, com isso, a necrose tecidual.



Fonte modificada: Choi *et al.* 2007.

A regulação da expressão gênica e função de proteínas por ROS, são conhecidos como “reguladores de redox”, que implica uma hipótese de que existe um mecanismo pelo qual uma célula “sente” as concentrações endógenas de ROS/ RNS e “reage” por alterar o perfil de expressão gênica, na manifestação de uma adaptação ou resposta de sobrevivência (Fig. 07) (RYTER; CHOI, 2005).

Quando esse equilíbrio fisiológico está perdido, danos ao DNA (p.ex., radical  $\text{HO}^\cdot$  que pode se ligar a bases do DNA ou abstrair seus átomos de hidrogênio), proteínas e lipídeos podem ocorrer. Ácidos graxos poli-insaturados são, para os oxidantes que reagem com a bicamada lipídica, alvos mais prováveis do que o DNA, alterando membranas (peroxidação lipídica), dentre elas a mitocondrial interna liberando proteínas pró-apoptóticas, como o citocromo C e outros fatores apoptogênicos, ativando a morte celular programada (Fig. 07) (RYTER; CHOI, 2005; ELMORE, 2007; TATONE *et al.*, 2010). Agarwal, Salen e



Bedaiwy (2003) sugerem o envolvimento dos ROS no processo de apoptose no ovário, pela associação do transporte de elétrons (mitocondrial) com a esteroidogênese, principalmente em células da teca em folículos antrais (ORTEGA-CAMARILLO et al., 2009).

Estudos associam também a criopreservação com injúrias como inchaços no retículo endoplasmático de oócitos, assim como também a redução de sua abundância em folículos congelados, que podem estar ligados à mudanças na pressão osmótica e presença de radicais livres. Além do mais, a toxicidade dos crioprotetores podem também induzir a presença de vesículas ligada a membrana plasmática e lisossomos (GUALTIERI et al., 2009; XING et al., 2010).

Muitas condições bioquímicas e fisiológicas estimulam a expressão de proteínas de estresse (LOCKE; NOBLE; ATKINSON, 1990). Estudos evidenciam que ROS poderia participar como sinalizadores na síntese de HSPs, que são fundamentais para a sobrevivência das células. As principais HSPs envolvidas na decisão de controle de qualidade são HSP90 e HSP70, que fazem a triagem de proteínas danificadas, sendo observado que a elevada expressão de HSP70 diminui o nível de proteínas anormais, melhorando a viabilidade celular (MORIMOTO, 1993; ANTUNES NETO et al, 2006; PRATT et al., 2010).

Em sistemas celulares, o  $\text{Ca}^{2+}$  pode ser também um sinal de vida e morte na célula, sendo importantes na regulação da proliferação, diferenciação e também na morte celular natural, e as concentrações intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  têm um importante papel nestes fenômenos. Tais efeitos refletem o reconhecimento preciso de seus sinais, que depende da sua liberação controlada por organelas citoplasmáticas (ARNAUDEAU et al, 2002).

O ERp60 (conhecido como calreticulina) é uma proteína multifuncional que age como ligante de cálcio para estoque no lúmen do RE (JEFFERY; PETERS; RAGHAVAN, 2011). Arnaudeau et al. (2002) relatam que a expressão diferencial de ERp60 no lúmen afeta a homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$  nos diversos compartimentos celulares, sendo observados no RE, citosol membrana plasmática e mitocôndria. E, que a maioria dos efeitos predominantes da expressão elevada de ERp60 ocorre no RE, resultando no aumento da quantidade total do armazenamento do  $\text{Ca}^{2+}$ .

Outra reticuloplasmina muito importante é a ERp29 que é uma molécula que facilita o processamento e transporte de proteínas, participando em fases iniciais de síntese de proteínas secretoras (HUBBARD; MCHUGH; CARNE, 2000; SHNYDER; HUBBARD, 2002). Stockwin et al. 2007 sugerem que o ERp29 auxilia no enovelamento de proteínas e secreção em associação com outras do RE. (HERMANN; CUTFIELD; HUBBARD, 2005). Além disso, estudos têm mostrado uma associação dessa proteína com resistência ao estresse

oxidativo e a radiação, Qi et al. (2011) concluíram que a super expressão de ERp29 reduz a apoptose em células expostas à radiação.

### 3.3.3.1 Antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos

Sistemas celulares de proteção neutralizam os danos ocasionados pelas ROS. Os antioxidantes enzimáticos são compostos pelas enzimas SOD, CAT, PRX, GSH, GR e GPX (mais importante na remoção de peróxidos na célula). O SOD, presente nas células em isoformas de cobre/zinco-dependente (Cu/Zn-SOD) e manganês-dependente (Mn-SOD), catalisam a dismutação do radical superóxido, convertendo-o em peróxido de hidrogênio. A CAT destrói o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, convertendo-o em água e oxigênio (RYTER; CHOI, 2005; LIMA-VERDE et al., 2007; TATONE et al., 2010).

A GPX ocorre em duas formas protéicas: selênio-dependente (Se-GPX) e selênio independente, sendo que ambas catalisam a redução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e hidroperóxidos orgânicos, utilizando GSH como doador de elétrons, com formação da GSSG e água. A GR catalisa a reação reversa de GSH a GSSG com elétrons fornecidos pelo ciclo das pentoses (NADPH<sub>2</sub>) (FLOHÉ; GUNZLER, 1984).

Adicionalmente, os antioxidantes não enzimáticos representam um grande número de compostos de baixo peso molecular (maioria provido por meio de dietas), que incluem as vitaminas C (ácido ascórbico) e E (tocoferol), diferentes compostos de selênio, ubiquinonas (coenzima Q), ácido úrico e ácido lipóico, que participam bloqueando a ação dos radicais livres (LIMA-VERDE et al., 2007; TATONE et al., 2010).

O selênio, particularmente, é um antioxidante essencial para a manutenção de vários processos fisiológicos, sendo incorporado para dentro do sítios catalíticos de enzimas antioxidantes, como por exemplo a GPX, e também está envolvido no crescimento e desenvolvimento celular pela proteção contra a toxicidade e efeitos danosos de ROS (YOON et al., 2002; ABEDELAHI; SALEHNIA; ALLAMEH, 2008; ABEDELAHI et al., 2010).

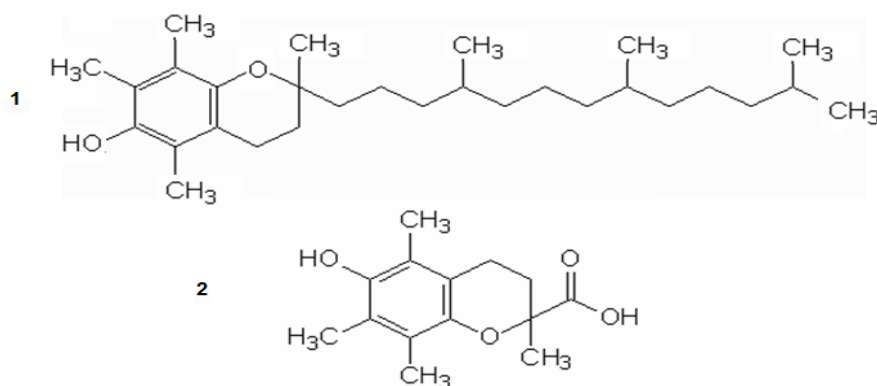
Lima-Verde et al. (2007) destacam que, assim como o ferro presente na catalase, o Selênio contido na glutathiona peroxidase é responsável pela remoção do peróxido de hidrogênio dos sistemas biológicos. Seoungsoo e Nohyoung (2000), mostraram que quando se utilizou o selênio em suas amostras estudadas, obtiveram melhoras na viabilidade e motilidade espermática destas.

Abedelahi, Salehnia e Allameh (2008) demonstraram que o selenito de sódio em concentrações de 10ng/ml no meio suplementado com soro fetal bovino (FBS) aumenta as taxas de maturação de folículos pré-antrais de ratos *in vitro*. Abdelahi et al. (2010) concluíram que cultivos *in vitro* de folículos pré-antrais de camundongos na presença de selenito de sódio aumentou os níveis da capacidade total antioxidante folicular e atividades de Se-GPX, diminuindo níveis de ROS.

Outro antioxidante não enzimático é o O 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-ácido carboxílico, posteriormente designado com o nome de Trolox (CORT *et al.*, 1975), que é um análogo hidrossolúvel do tocoferol, que foi sintetizado por Scott e sua equipe em 1974 e indicado como antioxidante para a preservação de óleos e gorduras (LIMA-VERDE et al., 2007).

O mecanismo de ação do Trolox é semelhante ao da vitamina E, ou seja, envolve o OH fenólico (responsável por sua atividade antioxidante) e a remoção de radicais peróxil ( $\text{LOO}^\cdot$ ) (ALBERTINI; ABUJA, 1999). Sua estrutura é composta por um núcleo cromanol (com átomo de oxigênio), semelhante ao do  $\alpha$ -tocoferol, e um grupo ácido carboxílico no carbono 2 (Fig. 08). O OH rapidamente reage com  $\text{LOO}^\cdot$ , transferindo seu átomo de H, convertendo em hidroperóxido de lipídeo ( $\text{LOOH}$ ), que é um produto não radical (FERREIRA, 2008).

Fig. 08. Estrutura molecular (1) da vitamina E ( $\alpha$ - Tocoferol) e (2) do Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-ácido carboxílico).



Fonte: Ferreira (2008).

Segundo Barclay et al. (1995), o Trolox tem vantagem sobre os outros antioxidantes que são apenas lipossolúveis, como a vitamina E. Devido a sua estrutura cromanol, que lhe dá atividade antioxidante, e ao grupo carboxila, que tem moderado efeito

hidrossolúvel, o Trolox é distribuído em ambas fases da bicamada de lipídios das biomembranas, tornando-se um excelente protetor contra a lipoperoxidação.

Wu et al. (1990) observaram que o Trolox protegeu miócitos, hepatócitos e eritrócitos contra radicais de oxigênio gerados artificialmente. Usando hepatócitos humanos como modelo, os autores exploraram seu mecanismo de ação e sugeriram que foi consistente com o esperado para um antioxidante: reduziu o nível de dienos conjugados (produto da lipoperoxidação, marcador de dano oxidativo em hepatócitos humanos) enquanto prolongava a sobrevivência da célula apesar da presença de radicais de oxigênio altamente reativos. Ou seja, atuou como removedor de ROS.

### 3.4 MÉTODOS DE ANÁLISE DO TECIDO CORTICAL OVARIANO

As técnicas de avaliação da qualidade folicular e oocitária de tecido ovariano permitem o monitoramento de alterações ocorridas antes e depois do processo de congelação e descongelação sendo, portanto, de grande importância para a avaliação de diferentes aspectos do tecido recuperado, incluindo a densidade, a viabilidade folicular, conhecimento morfológico e ultraestrutural de folículos ovarianos, principalmente os pré-antrais, e com isso a melhoria dos protocolos de criopreservação.

A histologia é uma técnica clássica amplamente utilizada para avaliação morfológica dos folículos ovarianos, sendo a mais usada e mais rápida para análise morfológica e quantitativa da passagem das células da granulosa de achatadas para cúbicas (DOMINGUES et al., 2004), e alterações indicativas de atresia podem ser observadas, como por exemplo a picnose nuclear (WOOD; MONTALI; WILDT, 1997). Essa técnica pode ser realizada tanto em folículos isolados quanto inclusos no tecido ovariano, sendo combinada com outras técnicas que avaliam a viabilidade folicular, como a imunohistoquímica (CECCONI et al., 2004; GANDOLF et al., 2006; DEPALO et al., 2009; FAUSTINO et al., 2010).

Entretanto, a histologia básica não permite a avaliação da integridade das organelas citoplasmáticas, e Gosden (2000) relatou que é relativamente pouco precisa, se realizada imediatamente após a descongelação do tecido ovariano, justamente por causa de alterações a nível ultraestrutural que ocorre após o processo. Com isso, para uma análise mais apurada, a MET é a mais indicada, pois permite a detecção da integridade das mitocôndrias e retículo endoplasmático, bem como vacuolização celular (RODRIGUES et al., 2004a,b;

CELESTINO et al., 2007; MATOS et al., 2007 ; FAUQUE et al., 2007; SANTOS et al., 2006a; 2008).

Estudos mostram a caracterização morfológica e estrutural intacta de folículos pre-antrais inclusos em tecido cortical ovariano criopreservado e cultivado *in vitro*, mostrando que a MET é uma ferramenta reconhecida para a avaliação de folículos ovarianos, assumindo uma grande importância no desenvolvimento de protocolos de biotecnologias reprodutivas, especialmente aquelas folículos pré-antrais (NOTTOLA et al., 2011; LOPES et al, 2006; SANTOS et al. 2006a). Silva et al. (2001) relataram os primeiros sinais de degeneração em folículos pré-antrais em caprinas: mitocôndria com inchaço extensivo e desaparecimento de suas cristas, assim como o aumento de volume do retículo endoplasmático, aparecimento de inúmeras vesículas e oócito extremamente vacuolizado.

Contudo, para uma melhor avaliação da integridade folicular, marcadores fluorescentes de viabilidade são utilizados em folículos pré-antrais isolados. O corante Hoescht penetra em células e tem sido largamente utilizado, como um marcador nuclear (MATOS et al., 2007). Brito et al. (dados não publicados) utilizaram o corante Hoescht juntamente com a exclusão com o PI (corante de ácidos nucléicos) para detectar a viabilidade de folículos ovarianos pré-antrais de *Sapajus apella*, cultivados *in vitro* por 24 horas, e foram classificados como degenerados se a cromatina estivesse corada com PI (Cor vermelha).

Entretanto, como a análise morfológica da célula não é suficiente para avaliar o processo de criopreservação, pois não está sempre correlacionada em nível de expressão gênica, e visto que o processo de criopreservação pode modificar o metabolismo celular, a investigação da quantificação do nível de RNA pode ser um biomarcador para qualidade de tecidos ovarianos corticais frescos em comparação com criopreservados, através da técnica qRT-PCR em tempo real (DEPALO et al., 2009; MURUVI et al., 2009).

No entanto, o potencial antioxidante do material criopreservado antes e depois do cultivo podem ser determinado segundo a sua equivalência ao antioxidante Trolox, técnica chamada de TEAC, que avalia as atividades antioxidantes relativas de diferentes amostras biológicas (BRAGA et al., 2010; CAO; PRIOR, 1999). É uma técnica colorimétrica baseada, de acordo com Re et al. (1999), na reação entre o ABTS com  $K_2S_2O_8$  produzindo o radical cátion  $ABTS^{+\bullet}$ , cromóforo de coloração verde/azul, e que pode reduzir novamente a ABTS com a adição de antioxidantes. Esse método é mensurado por espectrofotometria, pela observação da mudança na absorbância lida a 734nm (MOREIRA, 2010).

### 3.5 CULTIVO *IN VITRO*

Uma das tecnologias que tem atraído uma atenção especial é o cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais, que pode agir como fonte de oócitos viáveis para aplicações em biotécnicas de reprodução assistida. Cecconi et al. (2004) confirmam a importância do cultivo *in vitro* como uma ferramenta para avaliar o processo de congelamento de folículos na fase inicial, sendo ainda uma alternativa para preservar a fertilidade e obter oócitos maduros a partir de folículos pequenos isolados de tecido criopreservado (CECCONI et al., 2004; SANTOS et al., 2006). É o método mais preciso e muito estudado para avaliar a sobrevivência e o desenvolvimento folicular (SANTOS et al., 2010; CECCONI et al., 2004).

Apesar do progresso restrito observado em cultivos para crescimento de folículos primordiais ou primários (Ovelhas, CECCONI et al., 2004; cabras, RODRIGUES et al 2005; 2006; macaco rhesus, JIN et al., 2010;), a ativação e crescimento inicial de folículos primordiais ou primários inclusos no tecido ovariano podem ser utilizados para avaliar se folículos congelados\descongelados estão aptos a desenvolverem. Castro et al. (2011) mostraram em seu trabalho a viabilidade e ultraestrutura folicular mantida de tecido ovariano congelado de espécie caprina contendo DMSO e soro fetal bovino, após 48h de cultivo *in vitro*.

Muruvi et al. (2009) demonstraram em seu estudo que oócitos de folículos primários de ovinos isolados de tecido ovariano neonatal criopreservado podem ser cultivados com sucesso *in vitro*, e os tamanhos atingidos pelos oócitos dos folículos primários e as mudanças na expressão de mRNA nas células da granulosa dão suporte a tal transição *in vitro*. Resultados como esses representam um passo importante para alcançar um crescimento e desenvolvimento completo do oócito *in vitro*.

#### 4. TROLOX COMO UM SUPLEMENTO PARA SOLUÇÕES DE VITRIFICAÇÃO E CONGELAÇÃO: AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA, VIABILIDADE, BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE TECIDO OVARIANO DE MACACO-PREGO (*Sapajus apela*)

D.C. Brito <sup>a,b</sup>, L.N. Santana<sup>a,b</sup>, A.B. Brito<sup>a,b</sup>, S.R. Scalercio <sup>a,b</sup>, S. Percário <sup>c</sup>, M.S. Miranda<sup>d</sup>, R.M. Rocha<sup>d</sup>, J.A.P. Diniz<sup>i</sup>, R. van den Hurk <sup>e</sup>, M.C.J Paris <sup>g,h</sup>, S.F.S. Domingues<sup>a,b</sup>, R.R. Santos<sup>a,b,e\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Biologia e Medicina de Animais da Amazônia, Universidade Federal do Pará, Brasil; <sup>b</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Pará, Brasil; <sup>c</sup>Faculdade de; <sup>d</sup> Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Brasil; <sup>e</sup>Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Utrecht, Utrecht, Holanda; <sup>f</sup>Faculdade de; <sup>g</sup> Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Brasil; <sup>e</sup> Instituto de Reprodução de Mamíferos africanos raros e ameaçados de extinção (IBREAM), Edimburgo, Reino Unido; <sup>h</sup>Escola de Biologia animal, Universidade da Austrália Ocidental, Perth, Austrália; <sup>i</sup>Instituto Evandro Chagas, Laboratório de microscopia eletrônica, Brasil.

\*Correspondência para Regiane R Santos

Faculdade de Medicina Veterinária

Yalelaan 104, 3584 CM, Utrecht, Holanda.

Tel.: +31 30 2531078;

fax: +31 30 2534125

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

## Resumo

Nosso objetivo foi determinar se a adição dos folículos pré-antrais expostos à soluções de vitrificação e congelamento. Para isso, dois experimentos foram realizados. No experimento 1, fragmentos ovarianos de cada ovário foram expostos à TCM somente, ou a uma FS ou VS com ou sem a adição de Selênio (2.5, 5.0 ou 10 ng/ml) ou Trolox (25, 50 ou 100  $\mu$ M), e então submetido à análise morfológica e qRT-PCR. No experimento 2, fragmentos ovarianos de cada ovário (n=10) foram vitrificados ou congelados em uma solução com ou sem a suplementação de 50  $\mu$ M Trolox, e então submetido a análise de viabilidade, bioquímica e qRT-PCR. A avaliação foi também realizada após 24 horas de cultivo *in vitro* do tecido ovariano fresco e congelado. O tecido ovariano controle e aqueles expostos à VS ou FS adicionados com 50  $\mu$ M Trolox exibiram percentagens similares (76% e 79%, respectivamente) dos folículos pré-antrais normais quando comparados ao controle (81%). A elevada regulação de SOD1, ERp29 e ERp60 foi observado em tecido ovariano exposto ao FS adicionado por 10 ng/ml de selênio. Cultivo de tecido ovariano que foi congelado na presença de trolox resultou em altas taxas de folículos viáveis (40%) e reduziu os efeitos deletérios na congelamento na expressão de proteínas relacionadas ao estresse oxidativo e desenvolvimento folicular. Concluímos que Trolox pode evitar o estresse oxidativo em tecido ovariano congelado de macaco-prego.

*Palavras-chave:* Vitrificação; Congelamento; *Sapajus apella*; Estresse Oxidativo



## **Introdução**

Criopreservação de tecido ovariano é um método atrativo para preservação de folículos pré-antrais. Entretanto, a exposição de tecido ovariano à agentes crioprotetores antes da criopreservação consiste em uma etapa crucial. Como os efeitos deletérios de soluções de criopreservação têm sido relacionado ao estresse oxidativo (Fahy 2010), a suplementação dessas misturas com agentes antioxidantes é suscetível à melhoras na sobrevivência folicular e viabilidade tecidual. Estudos anteriores mostram a utilização de ácido ascórbico como agente antioxidante (Melo et al. 2011), porém, não há informações relacionadas à suplementação de soluções de criopreservação com outros eliminadores de radicais livres para a preservação do tecido ovariano. De fato, a maioria dos protocolos de criopreservação usando antioxidantes como aditivos tem sido desenvolvidos para uso em sêmen (Siegel et al. 1980; Maia et al. 2010; Thuwanut et al. 2011). Nesse estudo, selênio (Siegel et al. 1980) e Trolox (Maia et al. 2010; Thuwanut et al. 2011) foram frequentemente usados.

O primeiro biomarcador testado para mensurar o estresse oxidativo na vitrificação foi o superóxido dismutase (SOD) (Boonkusol et al. 2006; Turathum et al. 2010), que é responsável pela inativação de radicais superóxido (Matzuk et al. 1998). Embora não haja nenhuma informação disponível referente à expressão de RNAm de SOD em tecido ovariano expostos à soluções de vitrificação, tem sido mostrado que essa enzima protege oócitos contra a toxicidade de crioprotetores (Dinara et al. 2001). É para ser esperado que não somente os oócitos eclodidos no tecido ovariano, mas também as células do estroma possam ser afetadas pelos crioprotetores, relacionando tal efeito ao estresse oxidativo. Em adição, células estromais estabelecem um papel na sobrevivência folicular e desenvolvimento após a criopreservação de tecido ovariano (Faustino et al. 2010). O estresse oxidativo pode ser mensurado com testes bioquímicos, tal como a Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC), porém sem dá informações específicas na via do estresse. Portanto,

quantificação de genes que codificam proteínas relacionadas ao estresse pode oferecer uma ferramenta adequada que prevê a qualidade folicular após a exposição á soluções de criopreservação, assim como após a criopreservação. Tanto quanto sabemos, nenhuma informação existe concernente ao efeito de soluções de criopreservação na expressão gênica em tecido ovariano.

Alterações na fase da membrana causadas pelos crioprotetores (Spindler; Wolkers 2011) podem levar a um estresse de membrana e, subsequentemente, à ativação de chaperonas. Proteínas de choque térmico 70 (HSp70) podem ser usadas como biomarcador imediato de estresse intracelular grave; níveis de HSp70 são elevados 6-12 min após agravamento em embriões produzidos *in vitro*, originados de tecido ovariano submetido a hipoxia (Wang et al. 2011). Expressão de RNAm HSp70 tem sido estudado em embriões de murine vitrificados (Boonkusol et al. 2006) e oócitos caninos (Turathum et al. 2010), porém não em tecido ovariano exposto à soluções de vitrificação e congelação.

Vacuolização citoplasmática é um dos mais comuns sinais de danos em oócitos (Nottola et al. 2009) e tecido ovariano (Oskam et al. 2011) submetido à criopreservação. Silva et al. (2000) tem sugerido que danos ao retículo endoplasmático rugoso (ER) levam à vacuolização. Portanto, quantificar a expressão de genes que codificam chaperonas que residem no ER pode esclarecer o mecanismo envolvendo a morte de células ovarianas durante a exposição a soluções de criopreservação. Como Biomarcadores potenciais, ER Proteína 29 (ERp29) e ERp60 (ou calreticulina) são chaperonas envolvidas no estresse do ER (Banjerdpongchai et al. 2010).

A criopreservação pode também afetar a sobrevivência do tecido ovariano. Portanto, avaliação de folículos e células estromais após descongelação consiste em uma importante ferramenta para determinar o sucesso da criopreservação. Adicionado a isso, cultivo *in vitro* de curto período é indicado como um implemento para avaliar tecido ovariano saudável após

descongelamento. Como marcadores chaves para funcionalidade de folículo pré-antral, fatores de crescimento envolvidos na ativação e crescimentos de folículos pré-antrais tem sido usados, tais como fator de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF), fator de diferenciação-9 (GDF9), várias proteínas morfogenéticas ósseas (BMP's), hormônio anti-Mülleriano (AMH) e fator de células-tronco ou c-Kit ligante (KL) (Van den Hurk and Zhao 2005).

Nosso objetivo foi descrever os efeitos da exposição de tecido ovariano de macaco-prego a soluções de criopreservação com ou sem suplementação de antioxidantes (selênio ou Trolox), seguidos por criopreservação (congelação convencional ou vitrificação). Aqui, nós não somente descrevemos alterações morfológicas em folículos pré-antrais, assim como também alterações a nível molecular no tecido ovariano. A expressão relativa de genes que codificam uma enzima antioxidante (SOD1) e chaperonas (HSp70, ERp29 e ERp60), e sua ligação com estresse celular devido à exposição à soluções crioprotetoras, foi mensurado por qRT-PCR. Um cultivo *in vitro* foi realizado para avaliar a qualidade do tecido ovariano após o descongelamento.

## **Material e Métodos**

### Fonte e preparação do tecido ovariano

Nosso estudo foi aprovado pelo Comitê Ético em Pesquisa Animal local (no.029/2009/CEPAN/IEC/SVS/MS) e pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Este estudo foi composto por dois delineamentos experimentais. Para cada experimento, biópsias ovarianas de macaco-prego (*Sapajus apella*) maduras e sexualmente saudáveis foram obtidas por laparoscopia exploratória (Santana et al. 2012). As biópsias removidas foram sujeitas à fragmentação em pedaços corticais de 1 mm<sup>3</sup>,

que foram utilizados para todo o experimento. Fragmentos ovarianos selecionados foram distribuídos aleatoriamente ao longo dos experimentos. Todos os fragmentos contendo números suficientes de folículos pré-antrais (mais de 30), e nenhuma diferença óbvia nos números de folículos pré-antrais foram observadas.

## Delineamento experimental

### *Experimento I: Exposição do tecido ovariano à soluções de vitrificação e congelamento*

Depois de coletar biópsias de quatro pares de ovários, 34 fragmentos de 1 mm<sup>3</sup> foram submetidos ao experimento 1. Dois fragmentos foram selecionados aleatoriamente como controle; um fragmento foi imediatamente fixado para análise microscópica e ultraestrutural dos FOPAs, e o outro foi estocado a -80 °C até a extração do RNA. Os 32 fragmentos restantes foram submetidos à 5 min (grupo controle solução de vitrificação) ou 20 min (grupo controle solução de congelamento) em meio de cultura de tecido 199 (TCM 199) somente, adicionado com 4M etileno glicol + 0.5 M sacarose (Solução de Vitrificação - VS), ou com 1M etileno glicol + 0.5 M sacarose (Solução de Congelamento 'Freezing' - FS). Ambos VS e FS foram ou não suplementados com selênio (2.5, 5 or 10 ng/ml) ou Trolox (25 µM, 50 µM or 100 µM). Após exposição, todos os fragmentos foram submetidos à remoção do crioprotetor. Para isso, soluções de remoção do crioprotetor (CR) foram preparadas antes do uso. CR-1 composto de TCM com 0.250 M sacarose, CR-2 composto de TCM com 0.125 M sacarose, e CR-3 somente com TCM. Cada fragmento foi imerso em CR-1 a 37 °C em um banho-maria por 3 min seguido por CR-2 (5 min) e CR-3 (7 min). Tecido exposto a TCM foi submetido à lavagens em TCM somente a 37 °C. Após lavagens, fragmentos de cada grupo foram submetidos à análise morfológica e ultraestrutural, e qRT-PCR.

*Experimento II: vitrificação e congelação do tecido ovariano*

Protocolos previamente descritos foram aplicados para realização da vitrificação (Santos et al. 2007) e congelação (Santos et al. 2006a) de tecido ovariano. Para vitrificação, uma modificação do método superfície sólida foi realizada. Em resumo, fragmentos corticais foram submetidos à exposição na solução de vitrificação contendo TCM 199 suplementado com 0.5 M sacarose e 1.0 M EG somente ou em combinação com 50  $\mu$ M Trolox. Após cinco minutos de exposição, fragmentos foram submetidos ao procedimento modificado SSV. Para isso, fragmentos expostos ao crioprotetor foram colocados em uma superfície fria consistindo de uma caixa feita de alumínio inoxidável parcialmente imerso em nitrogênio líquido e grampeada na parede da caixa de isopor (Figure 1); contato com o nitrogênio líquido foi evitado. Os fragmentos vitrificados foram transferidos em criotubos, usando pinças congeladas no nitrogênio, para o estoque na fase líquida de um tanque de nitrogênio líquido. Fragmentos ovarianos vitrificados foram mantidos em criostoque em pelo menos um mês. Para lavagem e remoção do crioprotetor, os criotubos foram tratados como descrito acima para palhetas. Para congelação, fragmentos ovarianos foram individualmente colocados em palhetas (0.5 ml) e equilibrados em um freezer programável de taxa controlada (Planer Kryo 10 Series II, Cryotech Benelux, Schagen, The Netherlands) por 20 min a 20°C em 0.5 ml TCM 199 suplementado com 0.5 M sacarose e 1.0 M EG sozinhos ou em combinação com 50  $\mu$ M Trolox. Palhetas foram seladas, e congeladas a 2°C/min de 20°C a -7°C; indução do gelo (seeding) foi realizada manualmente por tocar nas palhetas com pinças pré-congeladas no nitrogênio líquido. Após “seeding”, as amostras foram mantidas nesta temperatura (-7°C) por 10 min e depois congelada a 0.3°C/min para -30°C, depois as palhetas foram mergulhadas imediatamente no nitrogênio líquido (-196°C) e estocadas pelo menos um mês. Quando necessário, as palhetas foram descongeladas no ar por um min a temperatura ambiente

(~25°C) e então imersas num banho Maria a 37°C até o meio de criopreservação ter sido completamente derretido. O crioprotetor foi então removido como descrito no Experimento I. Após a remoção do crioprotetor, os fragmentos ovarianos criopreservados foram submetidos ao cultivo *in vitro*, análise da viabilidade, medição de TEAC e qRT-PCR.

#### Morfologia de tecido ovariano exposto à soluções de vitrificação e congelação

Biópsias de tecido ovariano controle e de tratamento foram fixados em 2% paraformaldeído e 2.5% glutaraldeído em 0.1 M tampão cacodilato de sódio (pH 7.2) por 3 horas. Secções semi-finas de 1 µm de espessura foram coradas com azul de toluidina. FOPAs foram definidos como folículos sem um antro. Qualidade folicular foi avaliada baseada na integridade morfológica dos oócitos, células da granulosa e membrana basal, como descrito previamente (Santos et al., 2006b). Para evitar a contagem de um folículo mais de uma vez, FOPAs foram contados nas secções onde o núcleo do oócito foi observado. Todas as secções foram examinadas pelo uso de um microscópio óptico (Olympus, Tokyo, Japan) a uma magnificação de 400x.

#### Ultraestrutura do tecido ovariano exposto à soluções de vitrificação e congelação

Para melhor avaliação da morfologia folicular, estudos ultraestruturais foram realizados em fragmentos de ovário controle e ovários que foram criopreservados na presença de EG + sacarose suplementado ou não com 50 µM Trolox, esta concentração pareceu ser a melhor em manter a imagem histológica dos folículos. Para isso, secções ultra-finas (60–70 nm) foram contrastadas com acetate de uranila e citrato de chumbo, e examinadas sob um microscópio

eletrônico de transmissão Jeol JEM 100C, do laboratório de microscopia eletrônica do Instituto Evandro Chagas.

#### Análise da viabilidade folicular

Fragmentos ovarianos frescos e criopreservados foram submetidos à isolamento folicular pela aplicação de um procedimento mecânico para o isolamento de FOPAs de macaco-prego (Domingues et al., 2003). Pequenos FOPAs de 100  $\mu\text{m}$  foram coletados sob um estereomicroscópio de dissecação (SZ-ST5, Olympus, Tokyo, Japan) e transferido a TCM 199. Folículos isolados foram incubados nesse meio por 10 min a 37°C em uma mistura de 1,5  $\mu\text{M}$  iodeto de propídeo (Molecular Probes Europe, Leiden, The Netherlands), e 10  $\mu\text{M}$  Hoechst 33342 (Sigma) para detectar a integridade da membrana e para permitir a contagem do núcleo, respectivamente. Após serem rotulados, folículos corados foram lavados três vezes em TCM 199, montados em uma lâmina de vidro para microscopia e finalmente examinados pelo microscópio de epifluorescência (BH2-RFCA microscope, Olympus, Tokyo, Japan) equipado com uma câmera digital (Coolpix900, Nikon Instruments Europe, Badhoevedorp, The Netherlands). Os sinais de fluorescência emitidos de iodeto de propídeo e Hoechst foram coletados a 490/635nm e 472nm, respectivamente. Oócitos e células da granulosa foram classificados como viáveis se ooplasma não foi marcado com o iodeto de propídeo (Fig. 1). Folículos com um oócito viável rodeado por  $\geq 90\%$  de células da granulosa viáveis foram considerados normais (Santos et al., 2006b).

### Cultivo *in vitro* de tecido ovariano criopreservado

Cultivo *in vitro* de tecido ovariano foi realizado como previamente descrito por Brito et al. (2012). Em resumo, fragmentos ovarianos foram colocados em 500  $\mu$ L de meio de cultivo em uma placa de 24 poços por 24 h. O meio de cultivo básico consistia de TCM-199 (pH 7.2 – 7.4) suplementado com 10% FCS, 100 ng/mL EGF, 10  $\mu$ M BME, 100 ng/mL BMP4 e 25 IU PMSG. Após o Cultivo *in vitro*, todos os fragmentos foram divididos em duas partes iguais e submetido à análise da viabilidade ou qRT-PCR.

### Capacidade antioxidante equivalente a Trolox (TEAC)

Tecido Ovariano foi homogeneizado em PBS usando um mixer. O volume final (15 – 20  $\mu$ L) foi submetido a determinação do TEAC. Para esse fim, um protocolo já descrito (Miller et al. 1993) foi utilizado. Uma técnica colorimétrica foi usada, em que a reação entre ABTS e  $K_2S_2O_8$  foi mensurada, usando espectrofotômetro, em comprimento de onda de 734nm.

### Extração de RNA e síntese de cDNA

RNA total foi isolado do tecido ovariano homogeneizado no reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) como descrito por Nilsson e Skinner (2003). A concentração de RNA foi estimada pela leitura da absorbância a 260 nm e foi verificado para pureza a 280 nm em um espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000 and ND-8000 8-Sample, NanoDrop, Wilmington, DE). Para cada amostra, A concentração de RNA foi ajustada a 45 ng/ml e usada para síntese cDNA. A transcrição reversa foi realizada em um volume total de 20  $\mu$ l composto de 10  $\mu$ l de amostra de RNA, 3.2  $\mu$ l de água ultra-pura, 2  $\mu$ l tampão da transcriptase reversa (High



Capacity Reverse Transcription kit, Applied Biosystems, Foster City, CA), 0.8 µl dNTP Mix (10mM), 2 µl random primers, 1 µl transcriptase reversa MultiScribe e 1 µl inibidor de RNase (High Capacity Reverse Transcription kit, Applied Biosystems, Foster City, CA). A mistura foi incubada a 42 °C por 1 h, subsequentemente a 80 °C por 5 min, e finalmente estocado a -20 °C. o controle negativo foi preparado sob as mesmas condições, porém sem adição do ácido nucléico.

#### qRT-PCR

qRT-PCR foi realizado usando o termociclador (ABI PRISM 7500 Real Time PCR system, Applied Biosystems). Os primers, escolhidos para realizar a amplificação dos diferentes candidates de genes referents, são mostrados na Tabela 1. A eficiência da amplificação foi determinada por placa usando LinRegPCR (Ruijter et al. 2009). Dados foram analisados usando o método eficiente de correlação Delta-Delta-Ct (Pfaffl 2001). Os valores de expressão dos genes codificados Amh, Ctgf, Bmp4, Bmp15, ERp29, ERp60, Hsp70, Kl, Gdf9 e Sod1 foram normalizados utilizando a média geométrica dos valores de expressão de dois genes de referência: hipoxantina fosforibosiltransferase 1 (Hprt1) e proteína ligante *TATA box* (Tbp).

#### Análise estatística

Dados foram analisados com software Prism 4 (GraphPad). Para dados morfológicos, valores *P* foram calculados usando one-way ANOVA e test-t não paramétrico. A viabilidade dos oócitos e células da granulosa foi analisada pelo teste do qui-quadrado, e os números de núcleo total por folículo foram comparados por one-way ANOVA. Percentagens de folículos

primordiais e em desenvolvimento, assim como dados moleculares foram calculados usando one-way ANOVA e test-t não paramétrico. Para análise estatística da expressão de genes diferentes, um método empírico Bayes foi usado para moderar os erros padrões das mudanças de expressão. Uma correção Benjamini-Hochberg foi aplicada à valores de  $P$  das mudanças de expressão para corrigir testes múltiplos (Benjamini and Hochberg 1995). Todas as barras de erro refere-se à SEM e diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0.05$ .

## **Resultados**

### *Experimento I: exposição de tecido ovariano à soluções de vitrificação e congelamento*

No total, 2143 folículos pré-antrais (pelo menos 100 por tratamento) foram examinados histologicamente no tecido controle e no exposto à VS ou FS com ou sem a adição de selênio (2.5, 5 ou 10 ng/ml) ou Trolox (25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M ou 100  $\mu$ M). A percentagem de folículos morfolologicamente normais no fragmento ovariano controle (83%) não foi diferente ( $P > 0.05$ ) do observado após a exposição ao TCM por 5 min (59%), à VS+50Tr (76%), ou à FS+50Tr (79%). Entretanto, os outros tratamentos tiveram uma redução ( $P < 0.05$ ) na percentagem de folículos pré-antrais morfolologicamente normais, e os menores percentuais foram observados após a exposição à VS (18%), VS + 2.5Sel (21%) e FS + 10Sel (20%) (Fig. 2).

Os folículos pré-antrais degenerados expostos à VS e FS geralmente exibiram vacuolização oocitária, enquanto que o grupo controle ou exposto ao TCM apresentaram principalmente núcleo picnótico e retração citoplasmática. Embora o meio de suplementação com 50  $\mu$ M Trolox reduziu a vacuolização no estroma ovariano e no oócito, o meio de suplementação com selênio, não o fez (Fig. 3). Para melhor caracterizar a degeneração

folicular causada pela VS e FS adicionada ou não por 50  $\mu$ M Trolox, nós realizamos a análise ultraestrutural. Folículos pré-antrais normais apresentaram oócitos com grande e bem delimitado núcleo pleiomórfico; grandes mitocôndrias, com cristas irregulares e membrana mitocondrial contínua, e mitocôndria alongada com cristas paralelas. Esses folículos, além disso, não apresentaram vacuolização. Células da granulosa rodeando esses oócitos apresentam núcleos com formato irregular. Quando o tecido ovariano foi exposto à FS somente, vacuolização citoplasmática foi observada. A adição de 50  $\mu$ M trolox à FS, no entanto, fez reduzir a vacuolização no ooplasma porém o desprendimento do oócito da camada da granulosa não foi evitado. Características similares foram observadas em folículos pré-antrais exposto à VS somente ou adicionado de 50  $\mu$ M trolox (Fig. 4).

A expressão relativa de genes que codificam HSP70, SOD1, ERp29 e ERp60 em tecido ovariano de macaco-prego após a exposição à TCM e soluções de criopreservação estão representadas na Fig 5. Nenhuma diferença pode ser vista em relação à expressão de RNAm de HSp70. A expressão do RNAm de SOD1, ERp29 e ERp60 não foi alterada após a exposição do tecido ovariano por 5 min ao TCM ou soluções de vitrificação. Tecido ovariano exposto à FS + 10Sel apresentou elevada regulação de SOD1 (28-vezes), ERp29 (5-vezes) and ERp60 (8-vezes). Não como observado no tecido ovariano exposto à FS + 10Sel, a exposição do tecido ovariano por 20 min ao TCM ou soluções de congelamento também levaram à alta regulação de SOD1. Essa alta regulação foi menos observada quando 2.5 ou 5 ng/ml Selênio, ou 25 ou 50  $\mu$ M Trolox foram adicionados na solução de congelamento.

## *Experimento II: vitrificação e congelamento de tecido ovariano*

Baseado nos dados morfológicos e ultraestruturais do experimento 1, temos tecido ovariano vitrificado e congelado na presença de VS ou FS, respectivamente, ambas soluções sozinhas ou suplementadas com 50  $\mu\text{M}$  trolox.

Avaliação da capacidade antioxidante do tecido ovariano após a criopreservação foi também testado e calculado em relação ao TEAC nas amostras criopreservadas na presença de 50  $\mu\text{M}$  trolox. Foi observado uma diminuição significativa no TEAC do tecido criopreservado na ausência de 50  $\mu\text{M}$  trolox, principalmente quando tecido ovariano foi submetido à congelamento.

Para a avaliação da qualidade folicular, tecido ovariano vitrificado e congelado foram também cultivados *in vitro* por 24 horas. No total, 293 folículos pré-antrais (pelo menos 30 por tratamento) foram examinados. A percentagem de folículos pré-antrais normais foram diminuídos significativamente após a criopreservação (congelamento ou vitrificação) quando comparados aos fragmentos ovarianos controle (89%). No entanto, a suplementação da FS com Trolox resultou em maiores taxas de folículos viáveis (67%) quando comparado ao FS somente. Cada efeito foi observado mesmo após o cultivo *in vitro* em que 61% dos folículos foram viáveis após a criopreservação na presença de Trolox. Vitrificação resultou em taxas mais baixas (15%) de folículos normais mesmo quando o Trolox foi adicionado à solução. Ausência do trolox resultou em 100% de degeneração folicular (ver Fig. 6). Portanto, nenhum cultivo *in vitro* foi realizado em material vitrificado. A eficiência de trolox foi observado depois da análise TEAC (Fig. 7).

A expressão relativa dos genes que codificam HSP70, SOD1, ERp29 e ERp60 em tecido ovariano de macaco-prego após vitrificação e congelamento (seguido ou não por cultivo *in vitro*) são representados na Fig. 8. Quando a avaliação foi realizada imediatamente após o

descongelamento, nenhuma mudança na expressão do RNAm foi observado. Entretanto, após o cultivo *in vitro* do tecido ovariano congelado houve uma baixa regulação de todos os genes relacionados ao estresse, especialmente na ausência de Trolox. Com relação à expressão do RNAm testado para fatores de crescimento, exceto por AMH, baixa regulação de todos os genes foi observada após o descongelamento. Uma vez que, cada baixa regulação foi proeminente em tecido ovariano congelado na ausência de trolox (Fig. 9).

## **Discussão**

O presente estudo foi designado para investigar a influência da exposição do tecido ovariano a diferentes soluções de criopreservação (Corrigir), com ou sem adição de Selênio ou Trolox, e avaliar a qualidade de folículos pré-antrais e estresse oxidativo do tecido ovariano após a criopreservação (congelação ou vitrificação).

Tecido ovariano exposto à soluções de congelação e vitrificação resultou no aumento da degeneração folicular, exceto quando 50 uM Trolox foi adicionada ao meio de exposição, e que impediu a vacuolização no ooplasma e estroma ovariano. Similarmente, o controle da vacuolização celular foi observado também em rins de ratos tratados com trolox (Wongmekiat et al. 2007). Oócitos vacuolizados foram previamente relatados após criopreservação de tecido ovariano em ovino (Santos et al., 2006b; Oskam et al. 2010), bovino (Celestino et al. 2008) e em humanos (Marsella et al. 2008). Silva et al. (2000) sugeriram que vacuolização oocitária pode ser o resultado de danos no ER. Através de análises ultraestruturais de tecido ovariano criopreservados em ovinos, foi possível descrever vacuolização oocitária junto com uma diminuição extrema, ou mesmo ausência total, na quantidade de ER rugoso e liso (Oskam et al., 2010).

Vacuolização celular está relacionada não somente ao estresse oxidativo, mas também ao estresse no ER. Nenhuma mudança na expressão do RNAm foi observado após a exposição do tecido ovariano à soluções de vitrificação. Isso pode ser explicado pelo curto tempo de exposição (5 minutos) antes da análise. Após a exposição do tecido ovariano por 20 minutos à solução de congelamento, foi possível identificar a elevada regulação de SOD1, ERp29 e ERp60 quando o meio de congelamento foi suplementado com 10 ng/ml de selênio. O meio de congelamento suplementado com 50 uM trolox não resultou na alta regulação de marcadores de estresse ER (ERp29 e ERp60), e foi reduzido a expressão de SOD1. A elevada regulação da enzima antioxidante SOD1 na exposição do tecido ovariano confirma que as células estavam respondendo contra o estresse oxidativo. A elevada regulação dessa enzima é como uma compensação do estresse oxidativo (Mahoney et al. 2006), que parece ser reforçada pelo meio de suplementação com 10 ng/ml selênio, sugerindo que nessa concentração, ele se torna um composto tóxico. Na verdade, Uguz et al. (2009) têm mostrado que células incubadas com selênio em concentração tão elevadas como 1 mM conduz a um estresse no ER, suportando nossas descobertas. O aumento na expressão de ERp29 e ERp60 no tecido ovariano, também indica a ativação dessas chaperonas em resposta ao estresse celular, mais especificamente ao estresse no ER. Tem sido demonstrado que ERp29 foi induzido à altos níveis em células hepatomas sob estresse metabólico (Mkrtchian et al. 1998). ERp60 desempenha um importante papel em células sob estresse osmótico, estando envolvido na homeostasia do cálcio sob estresse osmótico (Bibi et al. 2011). Expressão relativa do RNAm de HSp70 não foi afetado pela exposição ao FS no tecido ovariano, ou tratamento da criopreservação, provavelmente porque essa chaperona não é regulada por desidratação ou reidratação do tecido ovariano (Lopez-Martinez et al. 2009). Devido à ineficiência da vitrificação, somente tecido ovariano congelado foi cultivado *in vitro*. Efeito da congelamento na expressão do RNAm de genes que codificam marcadores de estresse oxidativo foi observado

somente após 24 horas de cultivo *in vitro*, e na presença de 50  $\mu$ M Trolox no meio de congelação. Cultivo *in vitro* pode ser eficientemente usado à revelar danos induzidos da criopreservação em folículos ovarianos (Ting et al. 2011). Isso confirma nossos resultados que mostrou uma baixa regulação de todos os genes relacionados ao estresse após o cultivo *in vitro* do tecido congelado; tais regulações baixas eram menos expressas quando Trolox estava presente no meio de congelação. Embora o estresse possa levar à elevada regulação de genes relacionados, nós sugerimos que essa diminuição da expressão está relacionada à morte celular. O mesmo padrão foi observado quando fatores de crescimento foram avaliados após cultivo *in vitro* de tecido ovariano de tecido ovariano a fresco e congelado. Os achados mostram que folículos congelados cultivados livres de trolox, dos quais 40% foram avaliados como viáveis, podem sofrer diminuição da funcionalidade, o que foi destaque durante o cultivo *in vitro*. Tais danos, conforme observado pela análise de TEAC, foi causado principalmente pelo estresse oxidativo.

O efeito da exposição do tecido ovariano e criopreservação na ausência e presença de agentes antioxidantes foram analisados a nível morfológico, bioquímico e molecular, e o efeito positivo foi observado na concentração de 50  $\mu$ M Trolox. Embora a expressão gênica tenha permanecido inalterada após a exposição, foi observado que depois da congelação e cultivo *in vitro* a baixa regulação de genes importantes, assim como ERp29 e o ERp60. Adicionalmente, folículos não foram capazes de expressar genes relacionados ao desenvolvimento folicular *in vitro*: BMP15 e GDF9.

## Agradecimentos

Esse estudo foi financiado pelo projeto N°. 483439/2009-6 do CNPq, Brasil. Os autores agradecem ao CENP, ao laboratório de Fertilização *in vitro*, de ultraestrutura celular e de estresse oxidativo, assim como ao laboratório de microscopia eletrônica do IEC pelo apóio logístico.

## Referências

- Banjerdpongchai R, Kongtawelert P, Khantamat O, Srisomsap C, Chokchaichamnankit D, Subhasitanont P, Svasti J (2010) Mitochondrial and endoplasmic reticulum stress pathways cooperate in zearalenone-induced apoptosis of human leukemic cells. *J Hematol Oncol* 3:50
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach for multiple testing. *J R Statist Soc B* 57:289-300
- Bibi A, Agarwal NK, Dihazi GH, Eltoweissy M, Van Nguyen P, Mueller GA, Dihazi H (2011) Calreticulin is crucial for calcium homeostasis mediated adaptation and survival of thick ascending limb of Henle's loop cells under osmotic stress. *Int J Biochem Cell Biol* 43:1187-1197
- Boonkusol D, Gal AB, Bodo S, Gorchony B, Kitiyanant Y, Dinnyes A (2006) Gene expression profiles and in vitro development following vitrification of pronuclear and 8-cell stage mouse embryos. *Mol Reprod Dev* 73:700-708
- Brito AB, Lima JS, Brito DC, Santana LN, Costa NN, Miranda MS, Ohashi OM, Santos RR, Domingues SFS (2011) Validation of reference genes for ovarian tissue from capuchin monkeys (*Cebus apella*). *Zygote* [Epub ahead of print]



- Celestino JJH, Santos RR, Lopes CAP, Martins FS, Matos MHT, Melo MAP, Bao SN, Rodrigues APR, Silva JRV, Figueiredo JR (2008) Preservation of bovine preantral follicle viability and ultra-structure after cooling and freezing of ovarian tissue. *Anim Reprod Sci* 108:309–318
- Dinara S, Sengoku K, Tamate K, Horikawa M, Ishikawa M (2001) Effects of supplementation with free radical scavengers on the survival and fertilization rates of mouse cryopreserved oocytes. *Hum Reprod* 16:1976-1981
- Domingues SFS, Ferreira HS, Muniz JAPC, Lima AKF, Ohashi OM, Figueiredo JR, Silva LDM (2003) Mechanical isolation of capuchin monkey (*Cebus apella*) preantral follicles. *Arq Bras Med Vet Zootec* 55:301-308
- Fahy GM (2010) Cryoprotectant toxicity neutralization. *Cryobiology* 60:45–53
- Faustino LR, Santos RR, Silva CM, Pinho LC, Celestino JJ, Campello CC, Figueiredo JR, Rodrigues AP (2010) Goat and sheep ovarian tissue cryopreservation: effects on the morphology and development of primordial follicles and density of stroma cells. *Anim Reprod Sci* 122:90-97
- Lopez-Martinez G, Benoit JB, Rinehart JP, Elnitsky MA, Lee RE Jr., Denlinger DL (2009) Dehydration, rehydration, and overhydration alter patterns of gene expression in the Antarctic midge, *Belgica antarctica*. *J Comp Physiol B* 179:481-491
- Maia M da S, Bicudo SD, Sicherle CC, Rodello L, Gallego IC (2010) Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extenders with antioxidants. *Anim Reprod Sci* 122:118-123
- Mkrtchian S, Fang C, Hellman U, Ingelman-Sundberg M. (1998) A stress-inducible rat liver endoplasmic reticulum protein, ERp29. *Eur J Biochem* 251:304-313

- Marsella T, Sena P, Xella S, La Marca A, Giulini S, De Pol A, Volpe A, Marzona L (2008) Human ovarian tissue cryopreservation: effect of sucrose concentration on morphological features after thawing. *Reprod Biomed Online* 16:257-267
- Matzuk MM, Dionne L, Guo Q, Kumar TR, Lebovitz RM (1998) Ovarian function in superoxide dismutase 1 and 2 knockout mice. *Endocrinology* 139:4008-4011
- Melo MA, Oskam IC, Celestino JJ, Carvalho AA, Castro SV, Figueiredo JR, Rodrigues AP, Santos RR (2011) Adding ascorbic acid to vitrification and IVC medium influences preantral follicle morphology, but not viability. *Reprod Domest Anim* 46:742-745
- Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A (1993) A novel model for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci* 84:407-412
- Nilsson EE, Skinner MK (2003) Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. *Biol Reprod* 69:1265–1272
- Nottola SA, Coticchio G, Sciajno R, Gambardella A, Maione M, Scaravelli G, Bianchi S, Macchiarelli G, Borini A (2009) Ultrastructural markers of quality in human mature oocytes vitrified using cryoleaf and cryoloop. *Reprod Biomed Online* 19:17-27
- Oskam IC, Asadi BA, Santos RR (2010) Histologic and ultrastructural features of cryopreserved ovine ovarian tissue: deleterious effect of 1,2-propanediol applying different thawing protocols. *Fertil Steril* 93:2764-2766
- Oskam I, Lund T, Santos R (2011) Irreversible damage in ovine ovarian tissue after cryopreservation in propanediol: analyses after in vitro culture and xenotransplantation. *Reprod Domest Anim* 46:793-799
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45

- Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WM, Karlen Y, Bakker O, Van den Hoff MJ, et al. (2009) Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative qPCR. *Nucleic Acids Res* 37:e45
- Santana LN, Brito AB, Brito DC, Lima JS, Domingues SFS, Santos RR (2012) Adaptation of a *trap door* technique for the recovery of ovarian cortical biopsies from *Cebus apella* (capuchin monkey). *Zygote* [Epub ahead of print]
- Santos RR, Tharasanit T, Van Haeften T, Figueiredo JR, Silva JR, Van den Hurk R. (2007) Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods. *Cell Tissue Res* 327:167-176
- Santos RR, Tharasanit T, Figueiredo JR, Van Haeften T, Van den Hurk R. (2006a) Preservation of caprine preantral follicle viability after cryopreservation in sucrose and ethylene glycol. *Cell Tissue Res* 325:523-531
- Santos RR, Rodrigues AP, Costa SH, Silva JR, Matos MH, Lucci CM, Bao SN, Van den Hurk R, Figueiredo JR (2006b) Histological and ultrastructural analysis of cryopreserved sheep preantral follicles. *Anim Reprod Sci* 91:249-263
- Siegel RB, Murray FA, Julien WE, Moxon AL, Conrad HR (1980) Effect of in vitro selenium supplementation on bovine sperm motility. *Theriogenology* 13:357-367
- Silva JR, Lucci CM, Carvalho FC, Bao SN, Costa SH, Santos RR, Figueiredo JR (2000) Effect of coconut water and Braun-Collins solutions at different temperatures and incubation times on the morphology of goat preantral follicles preserved in vitro. *Theriogenology* 54:809-822
- Spindler R, Wolkers WF, Glasmacher B (2011) Dimethyl sulfoxide and ethylene glycol promote membrane phase change during cryopreservation. *Cryo Letters* 32:148-157

Ting AY, Yeoman RR, Lawson MS, Zelinski MB (2011) In vitro development of secondary follicles from cryopreserved rhesus macaque ovarian tissue after slow-rate freeze or vitrification. *Hum Reprod* 26(9):2461-2472

Thuwanut P, Chatdarong K, Bergqvist AS, Söderquist L, Thiangtum K, Tongthainan D, Axnér E (2011) The effects of antioxidants on semen traits and in vitro fertilizing ability of sperm from the flat-headed cat (*Prionailurus planiceps*). *Theriogenology* 76:115-125

Turathum B, Saikhun K, Sangsuwan P, Kitiyanant Y (2010) Effects of vitrification on nuclear maturation, ultrastructural changes and gene expression of canine oocytes. *Reprod Biol Endocrinol* 8:70

Uğuz AC, Naziroğlu M, Espino J, Bejarano I, González D, Rodríguez AB, Pariente JA (2009) Selenium modulates oxidative stress-induced cell apoptosis in human myeloid HL-60 cells through regulation of calcium release and caspase-3 and -9 activities. *J Membr Biol* 232:15-23

Van den Hurk, R.; Zhao, J (2005) Formation of mammalian oocytes and their growth differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, 63:1717-175

Wang YS, Zhao X, Su JM, An ZX, Xiong XR, Wang LJ, Liu J, Quan FS, Hua S, Zhang Y (2011) Lowering storage temperature during ovary transport is beneficial to the developmental competence of bovine oocytes used for somatic cell nuclear transfer. *Anim Reprod Sci* 124:48-54

### **Legendas das figuras**

**Figura 1.** Imagens representativas de folículos pré-antrais viáveis e não viáveis. Ausência da coloração de propídeo (vermelha) indica sua viabilidade.

**Figura 2.** Percentagem de folículos pré-antrais morfologicamente normais em fragmento ovariano controle e em fragmentos expostos à TCM, assim como a VS suplementado ou não com selênio (2.5, 5 or 10 ng/ml) ou Trolox (25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M or 100  $\mu$ M). <sup>a,b</sup> Diferentes letras minúsculas difere significativamente entre os tratamentos ( $P < 0.05$ ).

**Figura 3.** Secções semi-fino representando folículos pré-antrais normal (a) e degenerado (b-d). folículos normais apresentam um núcleo (Nu) central, ooplasma (Oo) intacto e células da granulosa (GC) normais. Folículos degenerados apresentam núcleo picnótico (PN), células da granulosa desorganizadas (dGC), acompanhadas ou não pela presença de vacúolos (Vc).

**Figura 4.** Imagens ultraestruturais de folículos pré-antrais normal (a) e degenerado (b-d). Folículos normais apresentam um núcleo (Nu) central, ooplasma (Oo) intacto e células da granulosa (GC) normais. Folículos degenerados apresentam núcleos picnóticos (PN), células da granulosa desorganizadas (dGC), acompanhadas ou não pela presença de vacúolos (Vc).

**Figura 5.** Comparação da média da expressão relativa de SOD1, HSp70, ERp29 e ERp60 em tecido ovariano do grupo controle, exposto ao TCM somente, ou exposto ao VS ou FS adicionados ou não por Selênio ou Trolox.

**Figura 6.** Percentagens de folículos pré-antrais viáveis em fragmentos ovarianos controle e em fragmentos congelados ou vitrificados suplementados ou não com 50  $\mu$ M Trolox e seguido por IVC. <sup>a-c</sup> Diferentes letras minúsculas difere significativamente entre os tratamentos ( $P < 0.05$ ).

**Figura 7.** TEAC em tecido ovariano congelado e vitrificado na presença ou ausência de trolox.

**Figura 8.** Comparação da média da expressão relativa de SOD1, HSp70, ERp29 e ERp60 em tecido ovariano do grupo controle, exposto ao TCM somente, ou exposto ao VS ou FS adicionados ou não por Selênio ou Trolox.

**Figura 9.** Comparação da média da expressão relativa de AMH, BMP4, BMP15, CTGF, GDF9 e KL em tecido ovariano do grupo controle, exposto ao TCM somente, ou exposto ao VS ou FS adicionados ou não por Selênio ou Trolox.

**Tabela 1.** Pares de primers usados em qRT-PCR para quantificação de genes de referência e alvos no tecido ovariano de macaco-prego.

Gene	Accession no.	Sequência	Tamanho Fragmento (bp)	Primer position	Reference
HPRT1	S43335.1	5'- TTATGGACAGGACTGAACGTCTTGCT 3'- TCCAGCAGGTCAGCAAAGAATTTATAGC	107	59	Brito et al., 2011
TBP	AB178959.1	5'- TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA 3'- CACATCACAGCTCCCCACCA	132	889	Brito et al., 2011
AMH	XM_002761553.1	5'- CTGCTGCGTGCCCACCGCCTA 3'- CAGCCACACTCGGTGGCCAC	106	1575	This paper
BMP4	XM_002805069.1	5'- CGAGAGAGACGCAGACGCAGA 3'- AATGGCTCCATGTTCCCGAG	82	56	This paper
BMP15	XM_001083980.2	5'- GCCACTGTGGTTTACCGCCA 3'-GGGAAGGTTTTGAGGAATCTCCTTC	130	446	This paper
CTGF	NM_001901.2	5'- TGCATCTTCGGTGGCACG GT 3'- ATGCTGCACAGGGGCATGCA	110	513	This paper
ERp29	NM_001195735.1	5'- GCCCTTCCCCTGGATACGGTCA 3'- CATCCTGCTTCTCACCGTAGGGGT	103	55	This paper
ERp60	NM_004343.3	5'- GCCCGCCATGCTGCTATCCG 3'- AGTCCACCCGTCTCCGTCCA	108	74	This paper
GDF9	NM_001168763.1	5'- GCCTTCCCAGGGTCCTGACCA 3'- TGACCTCTGCGGTGACGGTGA	105	861	This paper
HSp70	NM_001193708.1	5'- TGACCCTCCTGTTGGCTGGCT 3'- CCAACGGAACAATAGGTGGTGCC	100	52	This paper
KL	NM_003994.5	5'- GCCTTCCCAGGGTCCTGACCA 3'- TGACCTCTGCGGTGACGGTGA	112	72	This paper
SOD1	AB220492.1	5'- GCCGCACATTGGTGGTCCATGAA 3'- AAGCCAGACGACCTCCAGCGT	96	425	This paper

Fig 1.

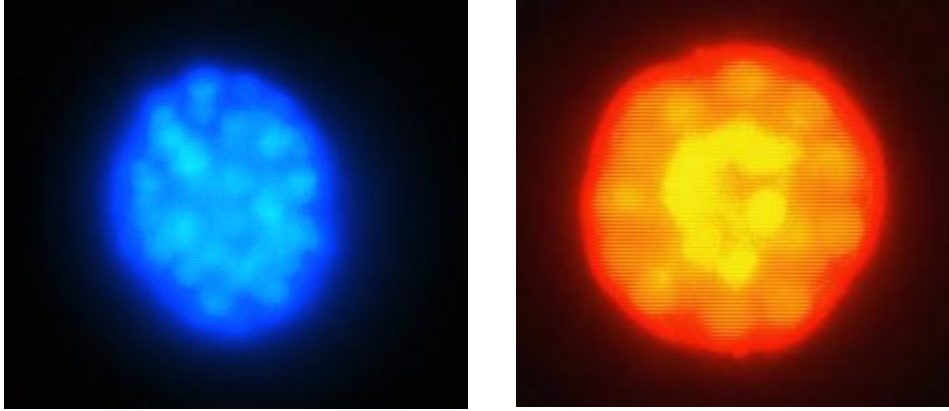




Fig. 2

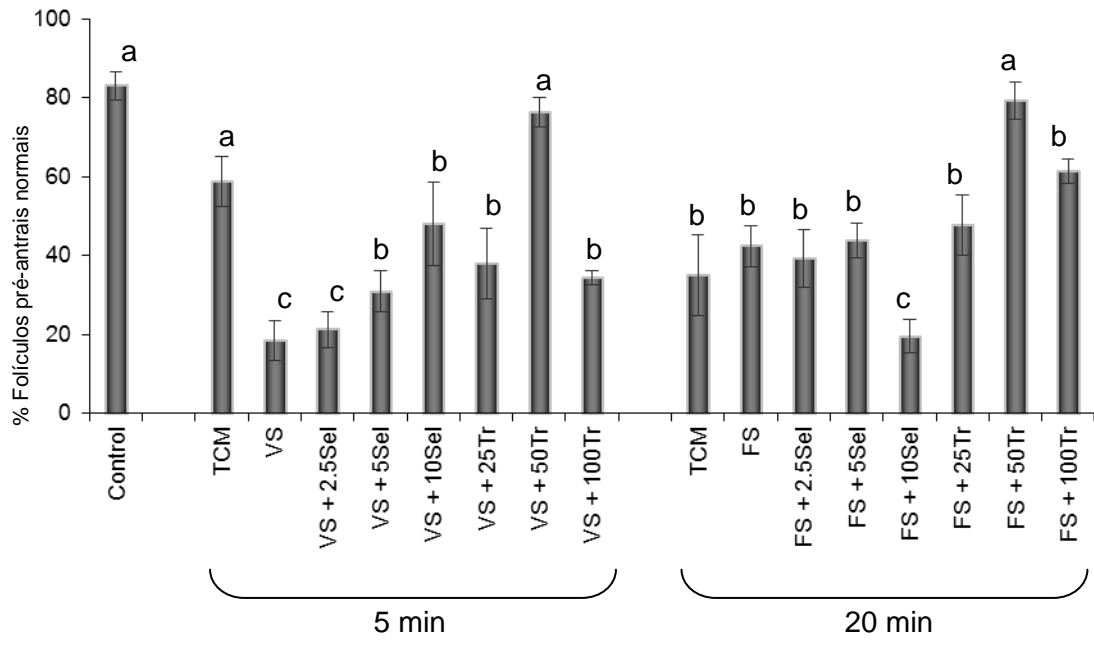


Fig. 3

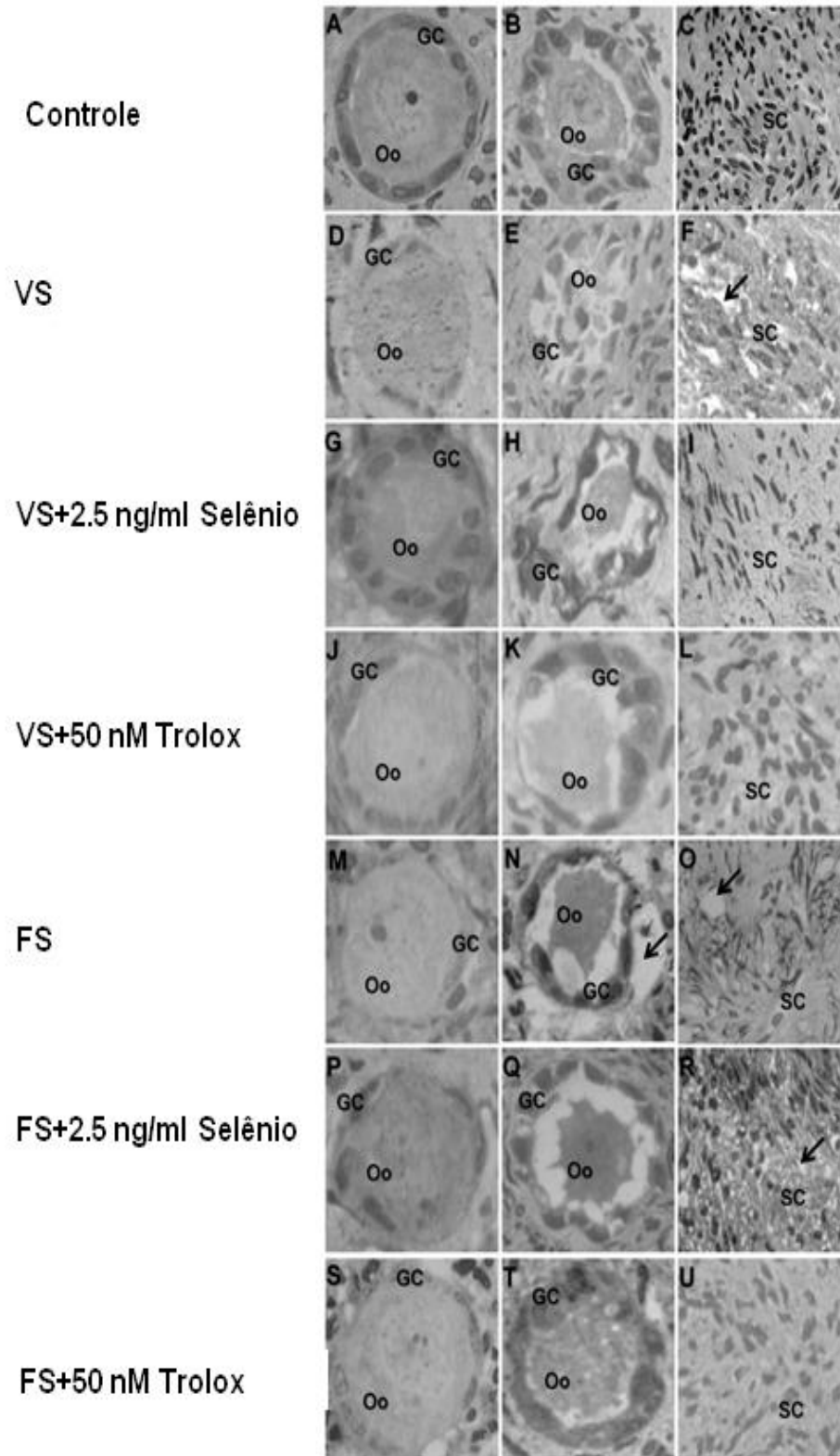


Fig. 4

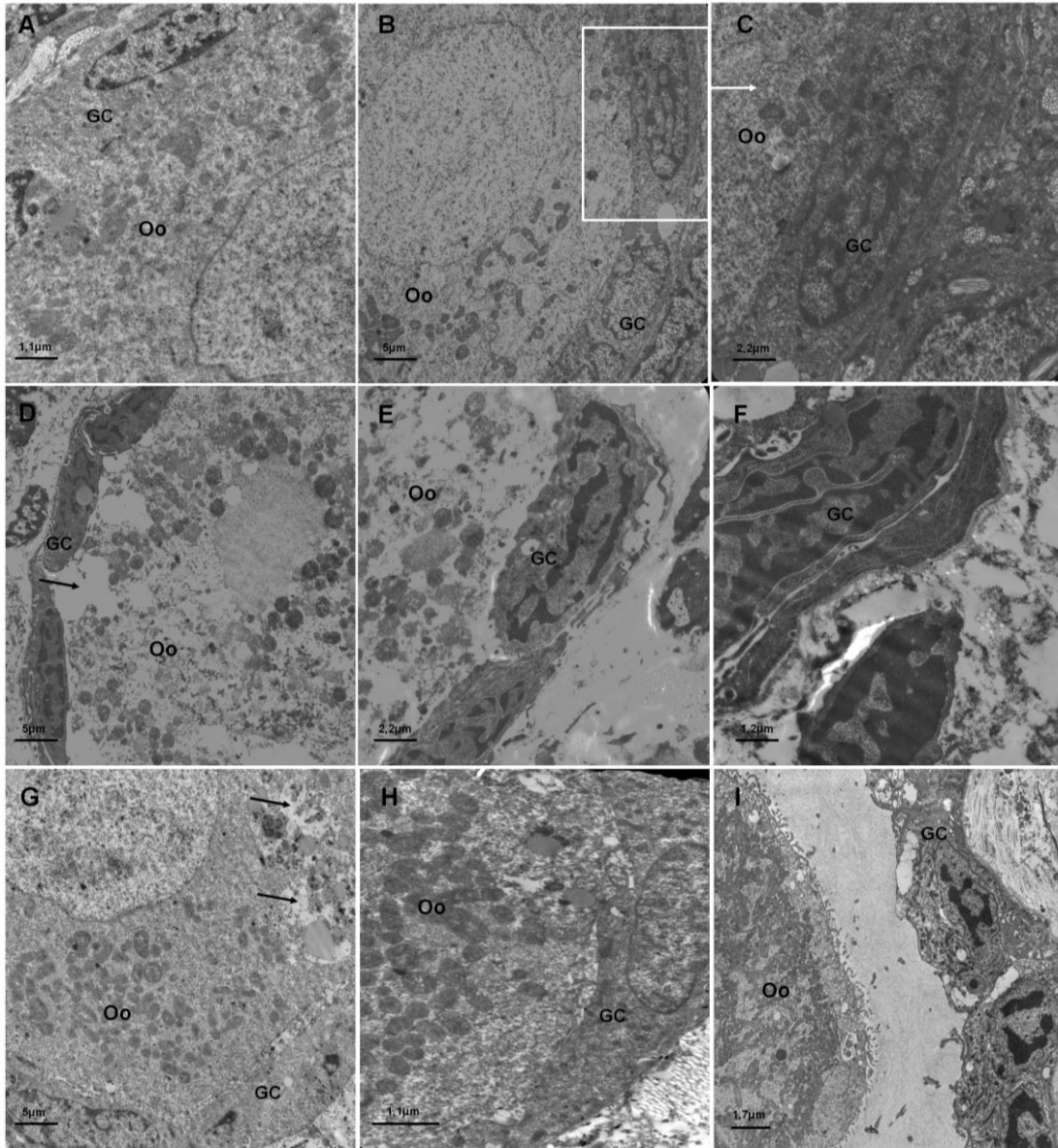


Fig. 5

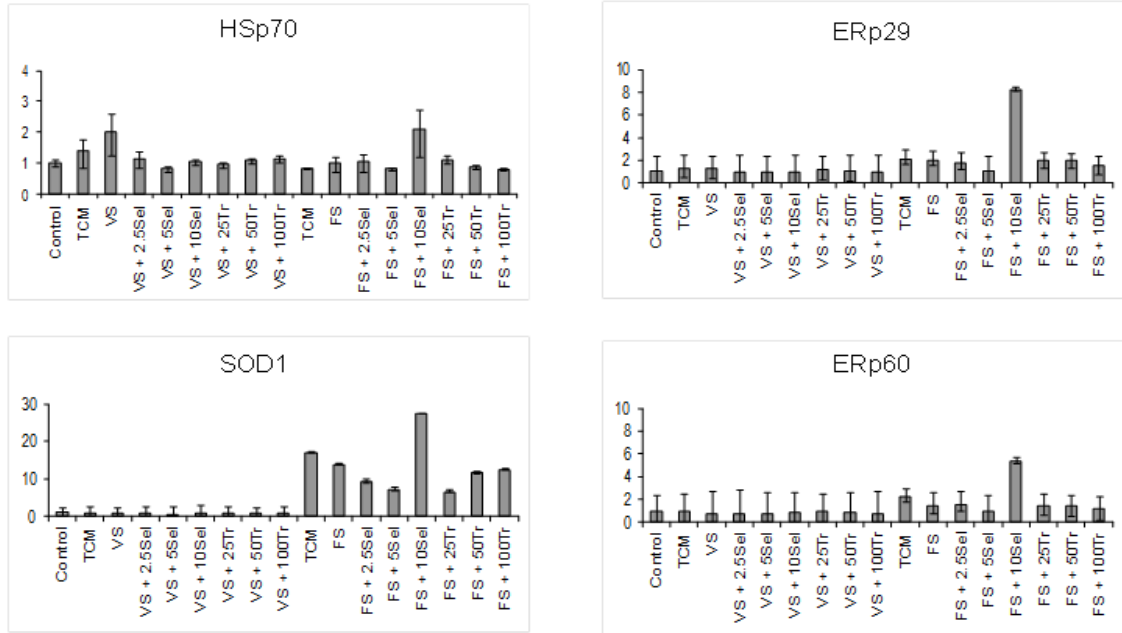


Fig. 6

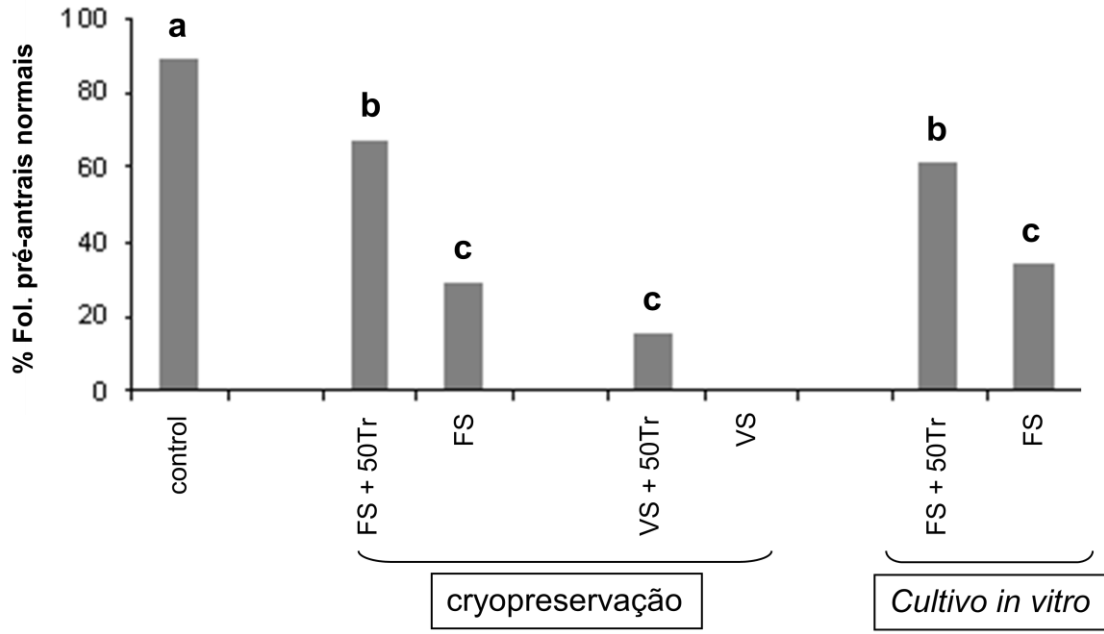


Fig. 7

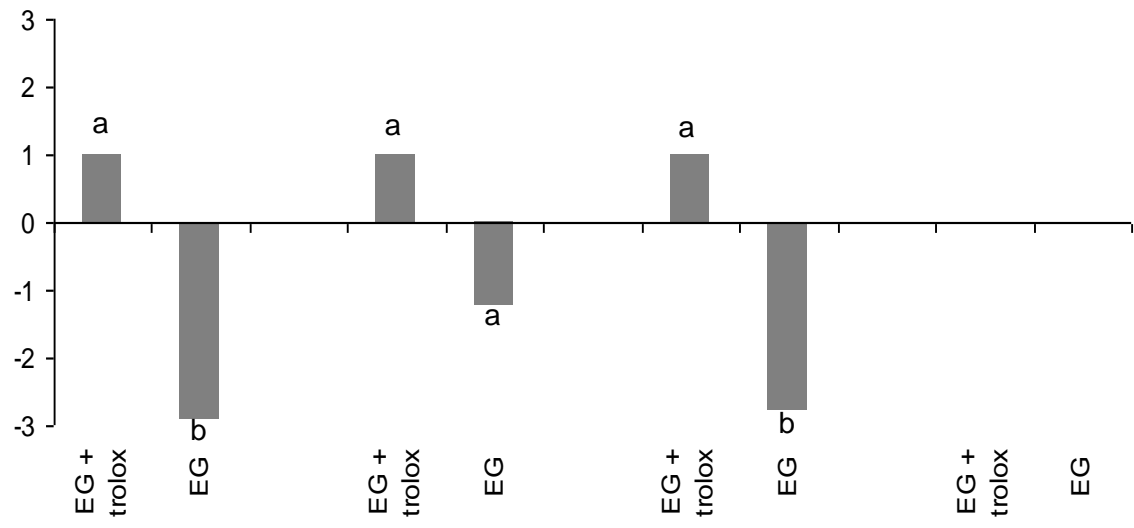


Fig. 8

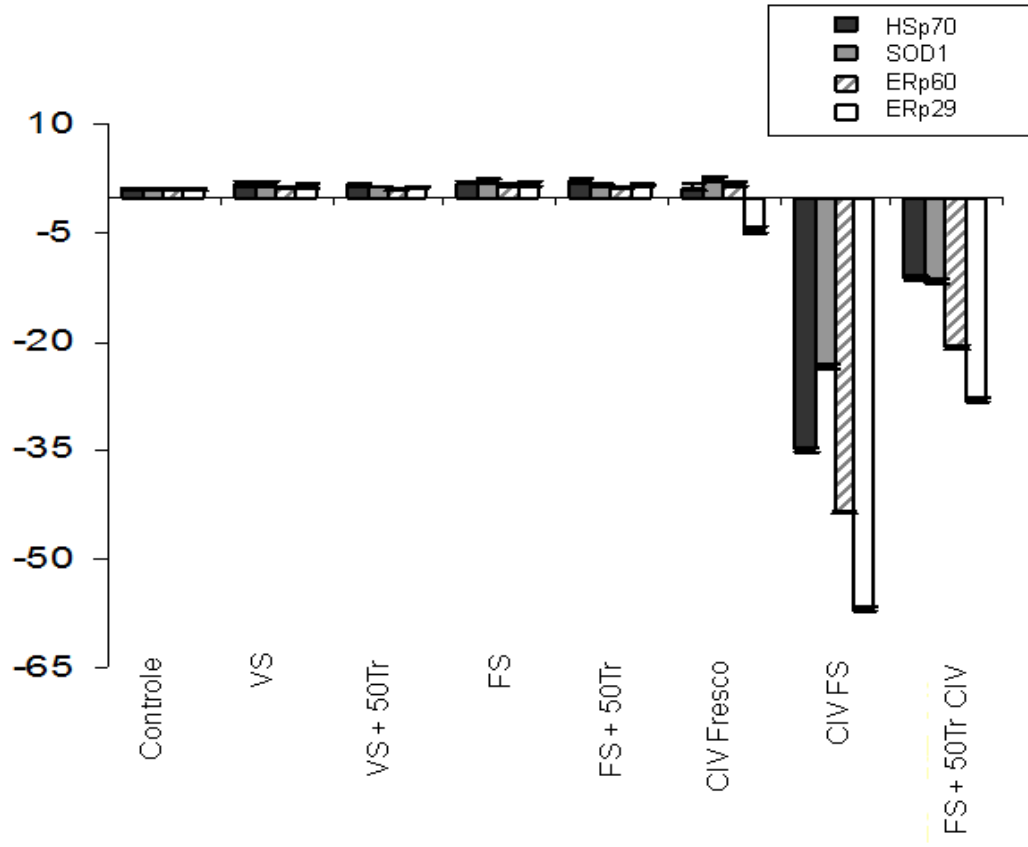
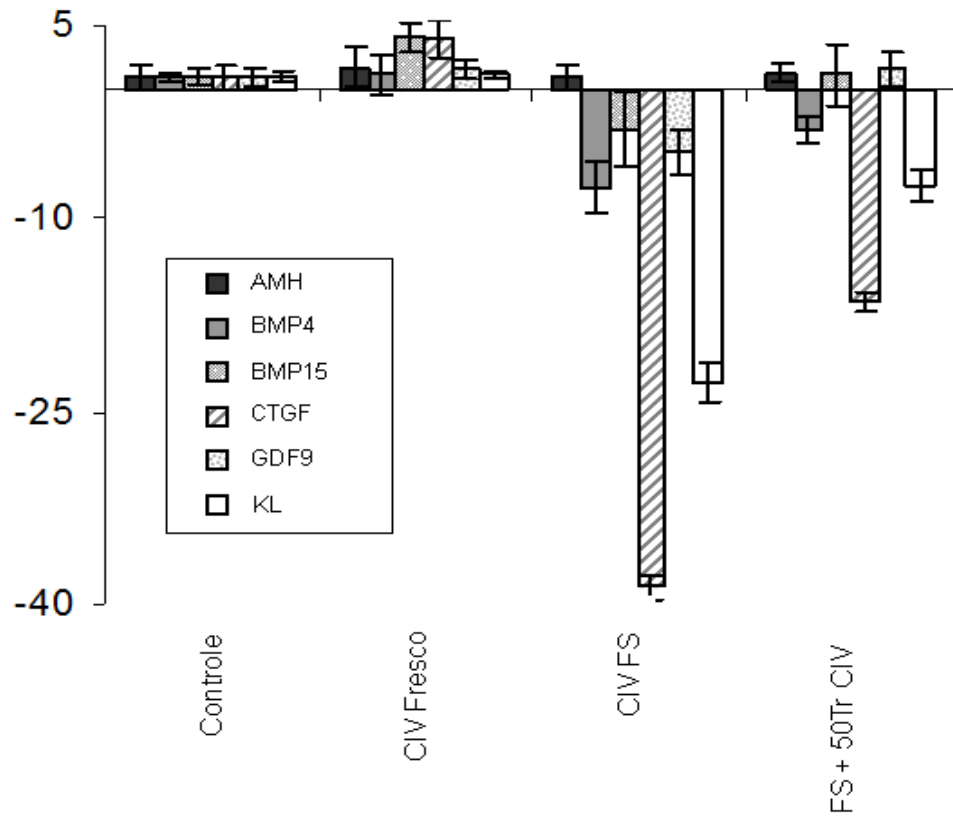


Fig. 9





## 5. CONCLUSÃO

Os efeitos da exposição e criopreservação de tecido ovariano na ausência ou presença de agentes antioxidantes foram avaliados a nível morfológico, bioquímico e molecular e o resultado positivo foi observado na exposição do material com o antioxidante Trolox na concentração de 50  $\mu\text{M}$ . Com relação à expressão gênica, apesar de ter permanecido quase inalterada após a exposição, foi observada uma baixa expressão, depois da congelação e cultivo *in vitro*, de genes importantes como o ERp29 e ERp60. Além disso, os folículos não foram capazes de expressar genes relacionados ao desenvolvimento *in vitro*, como BMP15 e GDF9. Contudo, antes da aplicação clínica de tecido ovariano congelado, estudos moleculares serão necessários para que se descubram possíveis efeitos secundários provenientes do processo de criopreservação, uma vez que é crítico que as informações relacionadas à viabilidade do tecido ovariano, transpõem análises morfológicas e bioquímicas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEDELAAHI, A.; SALEHNIA, M.; ALLAMEH, A.A. The effects of different concentrations of sodium selenite on the in vitro maturation of preantral follicles in serum-free and serum supplemented media. **Journal Assisted Reproduction and Genetics**, v.25, p. 483–488, 2008.
- ABEDELAAHI, A. et al. Sodium selenite improves the in vitro follicular development by reducing the reactive oxygen species level and increasing the total antioxidant capacity and glutathione peroxidase activity. **Human Reproduction**, v.0, p. 1–9, 2010.
- AGARWAL, A.; SALEN, R.A.; BEDAIWY, M.A. Role of reactive species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility and Sterility**, v.79, p. 829–843, 2003.
- ALBERTINI, R.; ABUJA, P.M. Prooxidant and antioxidant properties of Trolox C, analogue of vitamin E, in oxidation of low-density lipoprotein. **Free Radical Research**, v.30, n.3, p. 181-188, 1999.
- AMAN, R.R.; PARKS, E.J. Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of in vitro-matured bovine oocytes. **Biology Reproductive**, v.50, p. 103–110, 1994.
- AMORIM, C.A. et al. Permeability of ovine primordial follicles to different cryoprotectants. **Fertility and Sterility**, v.85, p. 1077-1081, 2006.
- ANDERSEN, C.Y. et al. Two successful pregnancies following autotransplantation of frozen/thawed ovarian tissue. **Human Reproduction**, v.23, n.10, p. 2266–2272, 2008.
- ANTUNES NETO, J. M F. et al. Circulating leukocyte heat shock protein 70(HSP70) and oxidative stress markers in rats after a bout of exhaustive exercise. **Stress**, v. 9, p. 107–115, 2006.
- ARAT S. et al. Using cell banks as a tool in conservation programmes of native domestic breeds: the production of the first cloned Anatolian Grey cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v.23, n.8, p. 1012-1023, 2011.
- ARNAUDEAU, S. et al. Calreticulin Differentially Modulates Calcium Uptake and Release in the Endoplasmic Reticulum and Mitochondria. **The journal of biological chemistry**, v. 277, n.48, p. 46696–46705, 2002.
- ASSELIN, E. et al. Mammalian Follicular Development and Atresia: Role of Apoptosis. **Biological Signals and Receptors**, v.9, p. 87–95, 2000.
- ÁVILA-PORTILLO, L.M. et al. Fundamentos de criopreservación. **Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología**, v.57, n.4, p. 291-300, 2006.
- BAKHACH, J. The cryopreservation of composite tissues: Principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues. **Organogenesis**, v.5, n.3, p. 119-126, 2009.

BALABAN, B. et al. A randomized controlled study of human Day 3 embryo cryopreservation by slow freezing or vitrification: vitrification is associated with higher survival, metabolism and blastocyst formation. **Human Reproduction**, v.23, n.9, p. 1976-82, 2008.

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:  $^{14}\text{C}$  tracer and product studies. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1237, p. 77-85, 1995.

BRAGA, A.C.C. et al. Atividade antioxidante e quantificação de compostos bioativos dos frutos de abricó (*Mammea americana*). **Alimentos e Nutrição**, v.21, n.1, p. 31-36, 2010.

BRITO et al. *In vitro* development of preantral from capuchin monkeys (*Cebus apella*): A morphological, viability and molecular study (dados não publicados)

CANDY, C.J.; WOOD, M.J.; WHITTINGHAM, D.G. Follicular development in cryopreserved marmoset ovarian tissue after transplantation. **Human Reproduction**, v.9, p. 2334–2338, 1995.

CANDY, C.J.; WOOD, M.J.; WHITTINGHAM, D.G. Effect of cryoprotectants on the survival of follicles in frozen mouse ovaries. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.110, p. 11-19, 1997.

CAO, G.; PRIOR, R.L. Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. **Methods Enzimology**, v.299, p. 50-62, 1999.

CARLSSON, I.B. et al. Kit ligand and c-Kit are expressed during early human ovarian follicular development and their interaction is required for the survival of follicles in long-term culture. **Reproduction**, v.131, p. 641–649, 2006.

CASTRO, S.V. et al. Freezing solution containing dimethylsulfoxide and fetal calf serum maintains survival and ultrastructure of goat preantral follicles after cryopreservation and *in vitro* culture of ovarian tissue. **Cell and Tissue Research**, v.346, n.2, p. 283-92, 2011.

CECCONI, S. et al. *In Vitro* Growth of Preantral Follicles Isolated from Cryopreserved Ovine Ovarian Tissue. **Biology of Reproduction**, v.70, p. 12–17, 2004.

CELESTINO, J.J.H. et al. Preservation of bovine preantral follicle viability and ultrastructure after cooling and freezing of ovarian tissue. **Animal Reproduction Science**, v.108, p. 309–318, 2007.

CHOI, A.O. et al. Quantum dot-induced cell death involves Fas upregulation and lipid peroxidation in human neuroblastoma cells. **Journal of Nanobiotechnology**, v.5, n.1, 2007.

CORT, W.M. et al. Antioxidant activity and stability of 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v.52, n.6, p. 174-178, 1975.

DEMEESTERE, I. et al. Ovarian function and spontaneous pregnancy after combined heterotopic and orthotopic cryopreserved ovarian tissue transplantation in a patient previously treated with bone marrow transplantation: Case Report. **Human Reproduction**, v.21, n.8, p. 2010–2014, 2006.

DEMEESTERE, I. et al. Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation. **Human Reproduction**, v.15, n.6, p. 649–665, 2009.

DEPALO, R.; CAVALLINI, A. Assessment of Estrogen Receptors and Apoptotic Factors in Cryopreserved Human Ovarian Cortex. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v.55, p. 236–243, 2009.

DISTELMAIE, F. et al. The antioxidant Trolox restores mitochondrial membrane potential and Ca<sup>2+</sup>-stimulated ATP production in human complex I deficiency. **Journal of Molecular Medicine**, v.87, p. 515–522, 2009.

DOMINGUES, S.F.S. et al. Mechanical isolation of capuchin monkey (*Cebus apella*) preantral ovarian follicles. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.3, 2003.

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

DOMINGUES, S.F.S.; CALDAS-BUSSIÈRE, M.C. Fisiologia e biotécnicas da reprodução desenvolvidas em fêmeas de Primatas Neotropicais importantes para a pesquisa biomédica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.30, n.1/2, p. 57-71, 2006.

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 apella*. **Fertility and Sterility**, v.93, n.5, 2010.

DONNEZ, J. et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. **The Lancet**, v.364, p. 1405–1410, 2004.

DONNEZ J. et al. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review. **Human Reproduction Update**, v.12, p. 519-535, 2006.

DONNEZ, J. et al. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation in cancer patients. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v.24, p. 87–100, 2010.

EDSON, M. A.; NAGARAJA, A.K.; MATZUK, M. M. The Mammalian Ovary from Genesis to Revelation. **Endocrine Reviews**, v.30, p. 624–712, 2009.

EDWARDS, S.J. et al. The cooperative effect of growth and differentiation factor-9 and bone morphogenetic protein (BMP)-15 on granulosa cell function is modulated primarily

through BMP receptor II. **Endocrinology**, v.149, n.3, p. 1026–1030, 2008.

ELLIOT, D.G. **Review of the Primates**. New York: American Museum of Natural History, , 1913. (Monograph series, v.2)

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v.35, n.4, p. 495–516, 2007.

ERICKSON, G.F. Role of Growth Factors in Ovary Organogenesis. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v.8, S13, 2001.

FABBRI, R. et al. Technical aspects of oocyte cryopreservation. **Molecular Cell Endocrinology**, v.169, p. 39–42, 2000.

FAHY, G.M. Cryoprotectant toxicity neutralization. **Cryobiology**, v.60, p. S45–S53, 2010.

FAUQUE, P. et al. Use of trypan blue staining to assess the quality of ovarian cryopreservation. **Fertility and Sterility**, v.87, n.5, 2007.

FAUSTINO, L.R. et al. Goat and sheep ovarian tissue cryopreservation: Effects on the morphology and development of primordial follicles and density of stromal cell. **Animal Reproduction Science**, v.122, p. 90–97, 2010.

FERREIRA, E.M. et al. Maturação citoplasmática de oócitos bovinos: aquisição de competência para o desenvolvimento. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.32, n.3, p. 172-181, 2008.

FERREIRA, R.M. **Efeito da adição de antioxidante (trolox®) ao meio de manutenção de embriões bovinos produzidos *in vivo* e ao meio de transporte de oócitos bovinos aspirados de ovários provenientes de abatedouro**. 2008. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W.A. Assays of glutathione peroxidase. In: SIES, H (Ed.). **Methods in Enzymology**, New York, Academic, p. 114-121, 1984.

GANDOLF, F. et al. Efficiency of equilibrium cooling and vitrification procedures for the cryopreservation of ovarian tissue: comparative analysis between human and animal models. **Fertility and Sterility**, v.85, n.1, 2006.

GOOK, D.A. et al. Oocyte maturation, follicle rupture and luteinization in human cryopreserved ovarian tissue following xenografting. **Human Reproduction**, v.18, n.9, p. 1772-1781, 2003.

GOSDEN, R.G. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. **Molecular Cell Endocrinology**, v.63, p. 125–129, 2000.

GUALTIERE, M. et al. Winter fine particulate matter from Milan induces morphological and functional alterations in human pulmonary epithelial cells (A549). **Toxicology**, v.188, n.1, p. 52-62, 2009.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE J.M.C; CROSS, C.E. Review article: free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.119, p. 598–620, 1992.

HERMANN, V.M.; CUTFIELD, J.F.;HUBBARD, M.J. Biophysical Characterization of ERp29: evidence for a key structural role of cysteine 125. **The journal of biological chemistry**, v.280, n.14, p. 13529–13537, 2005.

HERSHKOVITZ, P. Mammals of northern Colombia. Preliminary report No. 4: Monkeys (Primates) with taxonomic revisions of some forms. **Proceedings of the United States National Museum**, v.98, p. 323–427, 1949.

HOVATTA, O. et al. Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol–sucrose as cryoprotectant. **Human Reproduction**, v.11, p. 1268–1272, 1996.

HREDZAK, R. et al. Influence of Slow-rate Freezing and Vitrification on Mouse Embryos. **Acta Veterinária Brno**, v.74, p. 23–27, 2005.

HUBBARD, M.J.; MCHUGH, N.J.; CARNE, D.L. Isolation of ERp29, a novel endoplasmic reticulum protein, from rat enamel cells: Evidence for a unique role in secretory-protein synthesis. **European Journal Biochemistry**, v.267, p. 1945±1956, 2000.

ISACHENKO, V. et al. Human ovarian tissue vitrification versus conventional freezing: morphological, endocrinological, and molecular biological evaluation. **Reproduction**, v.138, p. 319–327, 2009.

ISACHENKO, V. et al. Human ovarian tissue cryopreservation: quality of follicles as a criteria of effectiveness. **Reproductive BioMedicine Online**, v.20, p. 441-442, 2010.

JEFFERY, E.; PETERS, L.R.; RAGHAVAN, M. The Polypeptide Binding Conformation of Calreticulin Facilitates Its Cell-surface Expression under Conditions of Endoplasmic Reticulum Stress. **The journal of biological chemistry**, v.286, n.4, p. 2402–2415, January 28, 2011.

JIN, S. et al. Markers of growth and development in primate primordial follicles are preserved after slow cryopreservation. **Fertility and Sterility**, p. 1-6, 2010.

KIM, M.; TILLY, J.L. Current concepts in Bcl-2 family member regulation of female germ cell development and survival. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1644, p. 205–210, 2004.

KRYSKO, D.V. et al. Life and death of female gametes during oogenesis and folliculogenesis. **Apoptosis**, v.13, p. 1065–108, 2008.

LEASK. A., ABRAHAM, D.J. The role of connective tissue growth factor, a multifunctional matricellular protein, in fibroblast biology. **Biochemistry Cell Biology**, v.81, p. 355–363, 2003.

LEE, D.M. et al. Live birth after ovarian tissue transplant. **Nature**, v.428, 2004.

LIEBERMANN, J.; TUCKER, M.J. Effect of carrier system on the yield of human oocytes and embryos as assessed by survival and developmental potential after vitrification. **Reproduction**, v.124, n.4, p. 483-489, 2002.

LIMA, J.S. et al. Embryo production by parthenogenetic activation and fertilization of in vitro matured oocytes from *Cebus apella*. **Zygote**, p. 1-5, 2012.

LIMA-VERDE, I.B. et al. Implicações do estresse oxidativo no ovário e ao embrião mamífero. **Medicine Veterinaria Recife**, v.1, n.1, p. 81-88, 2007.

LINN, G.S. et al. Social and menstrual cycle phase influence on the behavior of group-housed *Cebus apella*. **American Journal of Primatology**, v.35, n.4, p. 1-57, 1995.

LINTERN-MOORE, S. et al. Follicular development in the infant human ovary. **Journal Reproduction and Fertility**, v.20, p. 773- 778, 1974.

LOCKE, M.; NOBLE, E. G.; ATKINSON, B. G. Exercising mammals synthesize stress proteins. **American Journal of Physiology**, v. 258, p. C723-C729, 1990.

LOPES, L.H.R. et al. Light Microscopical and Ultrastructural Characterization of Black Howler Monkey (*Alouatta caraya*) Ovarian Follicles. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v.35, p. 196-201, 2006.

LYNCH ALFARO, J.W.; SILVA JR, J. S.; RYLANDS, A.B. How Different Are Robust and Gracile Capuchin Monkeys? An Argument for the Use of *Sapajus* and *Cebus*. **American Journal of Primatology**, v.0, p. 1-14, 2012.

LYNCH ALFARO et al., Explosive Pleistocene range expansion leads to widespread Amazonian sympatry between robust and gracile capuchin monkeys. **Journal of Biogeography** (J. Biogeogr.), n.39, p. 272-288, 2012.

MARQUES, J.R.F. et al. Conservação e melhoramento dos recursos genéticos animais da Amazônia brasileira. In: X Congresso Internacional de Zootecnia - ZOOTECA 2008, 2008, João Pessoa. **Anais do X Congresso Internacional de Zootecnia - ZOOTECA 2008**. João Pessoa: ABZ - UFPB/CCA - EMBRAPA CAPRINOS, v. 1, p. 1-14. 2008.

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: Panótico Rápido e Pappanicolau [Colpocytology study by Panoptic and Pappanicolau stains in *Cebus apella* female]**. 2004. Monografia (Conclusão de Curso) – Universidade Federal do Pará Belém, PA, Brasil, 2004.

MASSARDIER, J. et al. Technical Aspects of Laparoscopic Ovarian Autograft in Ewes After Cryopreservation by Slow-Cooling Protocol. **Reproduction Domestic Animal**, v.45, p 8-12, 2010.

MATOS, M.H.T. et al. Técnicas para avaliação da qualidade de folículos ovarianos pré-antrais cultivados *in vitro*. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.4, p.433-442, 2007.

MATSON, P.; KAPPELLE, W.; WEBB, S. Maximum rates of cooling by three programmable freezers, and the potential relevance to sperm cryopreservation. **Reproductive Biology**, v.8, n.1, p. 69-73, 2008.

McLAREN, A. Germ and somatic cell lineages in the developing gonad. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.163, p. 3–9, 2000.

McLAUGHLIN, E.A.; MCLVER, S.C. Awakening the oocyte: controlling primordial follicle development. **Reproduction**, v.137, p. 1–11, 2009.

MENDES PONTES, A.R., MALTA, A.; ASFORA, P.H. A new species of capuchin monkey, genus *Cebus* Erxleben (Cebidae, Primates): found at the very brink of extinction in the Pernambuco endemism centre. **Zootaxa**, v.1200, p. 1–12, 2006.

MOREIRA, D.R. **Perfil oxidativo na malária experimental**, 2010. Dissertação (Mestrado em Agentes Infecciosos e Parasitários). Universidade Federal do Pará, Belém-Pará, 2010.

MORIMOTO, R. I. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. **Science**, v.259, p. 1409-1410, 1993.

MOTTA, P.M.; MAKABE, S.; NOTTOLA, S.A. The Ultrastructure of human reproduction. I. The natural history of the female germ cell: origin, migration and differentiation inside the developing ovary. **Human Reproduction Update**, v.3, n.3, p. 281-295, 1997.

MURUVI, W. et al. In vitro growth and differentiation of primary follicles isolated from cryopreserved sheep ovarian tissue. **Animal Reproduction Science**, v.112, p. 36–50, 2009.

NAGLE, C. A. et. Al. The plasma pattern of ovarian steroids during the menstrual cycle in capuchin monkeys (*Cebus apella*). **Biology of Reproduction**. v. 21, p. 979-983, 1979.

NAGLE C. A. et. Al. Temporal relationship between follicular development, ovulation, and ovarian hormonal profile in the capuchin monkey (*Cebus apella*). **Biology of Reproduction**, v. 23, p. 629-635, 1980.

NILSSON, E.; ROGERS, N.; SKINNER, M.K. Actions of anti-Mullerian hormone on the ovarian transcriptome to inhibit primordial to primary follicle transition. **Reproduction**, v.134, p. 209–221, 2007.

NILSSON, E.E. et al. Gene Bionetwork Analysis of Ovarian Primordial Follicle Development. **PLoS ONE**, v.5, n.7, 2010.

NOTTOLA, S.A. et al. Cryopreservation and xenotransplantation of human ovarian tissue: an ultrastructural study. **Fertility and Sterility**, v.90, n.1, 2008.



NOTTOLA, S.A. et al. Ultrastructure of isolated mouse ovarian follicles cultured in vitro. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.9, n.3, 2011.

NUGENT, D. et al. Transplantation in reproductive medicine: previous experience, present knowledge and future prospects. **Human Reproduction Update**, v.3, p. 267–280, 1997.

OKTAY, K. et al. Embryo development after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. **The Lancet Online**, 2004.

OLIVEIRA, M.M.; LANGGUTH, A. Rediscovery of Marcgrave's capuchin monkey and designation of a neotype for *Simia flavia* Schreber, 1774 (Primates, Cebidae). **Boletim do Museu Nacional**, Rio de Janeiro: Zoologia, v.523, p. 1–16, 2006.

OLIVEIRA K.G. et al. Semen coagulum liquefaction; sperm activation and cryopreservation of capuchin monkey (*Cebus apella*) semen in coconut water solution (CWS) and TES-TRIS. **Animal Reproduction Science**, v.123, p. 75-80, 2011.

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*. **American Journal of Primatology**, v.66, p. 233–44, 2005.

PAYNTER, S.J. Current status of the cryopreservation of human unfertilized oocytes. **Human Reproduction Update**, v.6, p. 449–456. 2000.

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. **Microscopy Research and Technique**, v.69, p. 386–395, 2006.

POLGE, C., SMITH, A.V., PARKES, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v.164, p. 666, 1949.

PRATT W.B. et al. Proposal for a role of the Hsp90/Hsp70-based chaperone machinery in making triage decisions when proteins undergo oxidative and toxic damage. **Experimental Biology and Medicine** (Maywood), v.235, p. 278–289, 2010.

QI, L. et al. Inhibiting ERp29 expression enhances radiosensitivity in human nasopharyngeal carcinoma cell lines. **Medicine Oncology**, 2011.

RAJU, G.A. et al. Vitrification of human early cavitating and deflated expanded blastocysts: clinical outcome of 474 cycles. **Journal of Assisted Reproduction Genetics**, v.26, n.9-10, p. 523-529, 2009.

RALL, W.F.; FAHY, G.M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. **Nature**, v.313, p. 573-575, 1985.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v.26, p. 1231-1237, 1999.

RIBEIRO, THEO. **Theo Ribeiro – Photographer**: WordPress and the Thematic Theme Framework, 2009. Disponível em < <http://theoribeiro.com/portfolio/nature-and-animals-photography/#ad-image13>>. Acesso em: 27 fev. 2012.

RODRIGUES, P. et al. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol. **Animal Reproduction Science**, v.84, p. 211–227, 2004.

RODRIGUES, P. et al. Cryopreservation and short-term culture of isolated caprine primordial follicles. **Small Ruminant Research**, v.56, p. 103–111, 2005.

RODRIGUES, P. et al. *In Vitro* Culture of Cryopreserved Caprine Ovarian Tissue Pieces and Isolated Follicles. **Cell Preservation Technology**, v.4, n.4, 2006.

RODRIGUES, P. et al. Oogenesis: Prospects and Challenges for the Future. **Journal of Cellular Physiology**, v.216, p. 355–365, 2008.

RYTER, S.W.; CHOI, A.M.K. Heme Oxygenase-1: Redox Regulation of a Stress Protein in Lung and Cell Culture Models. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.7, n.1 & 2, 2005.

SALLE, B. et al. Freezing, thawing, and autograft of ovarian fragments in sheep: preliminary experiments and histologic assessment. **Fertility and Sterility**, v.70, n.1, 1998.

SANTOS, R.R. et al. Histological and ultrastructural analysis of cryopreserved sheep preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v.91, p. 249–263, 2006a.

SANTOS, R.R. et al. Preservation of caprine preantral follicle viability after cryopreservation in sucrose and ethylene glycol. **Cell Tissue and Research**, v.325, p. 523–53, 2006b.

SANTOS, R.R. **Cryopreservation of caprine ovarian tissue: recovery of gonadal function after auto-transplantation**. 2007. 144f. Tese (Doutorado) - Utrecht University, Utrecht, The Netherlands, 2007a.

SANTOS, R.R. et al. Effect of cryopreservation on viability, activation and growth of in situ and isolated ovine early-stage follicles. **Animal Reproduction Science**, v.99, p. 53–64, 2007b.

SANTOS, R.R. et al. Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de animais domésticos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, n.1, p. 9-15, 2008.

SANTOS, R.R. et al. Complete follicular development and recovery of ovarian function of frozen-thawed, autotransplanted caprine ovarian cortex. **Fertility and Sterility**, v.91, n.4, p. 1455-1458, 2009.

SANTOS, R.R. et al. Cryopreservation of ovarian tissue: An emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. **Animal Reproduction Science**, v.122, n.3-4, p. 151-163, 2010.

SCHINDLER, R.; NILSSON, E.; SKINNER, M.K. Induction of Ovarian Primordial Follicle Assembly by Connective Tissue Growth Factor CTGF. **PLoS ONE**, v.5, n.9, 2010.

SEOUNGSOO, L., NOHYOUNG, P. Effects of selenium and vitamin E administration on sêmen characteristics in Hanwoo Young bulls. Korean **Journal Veterinary Research**, v.40, n.2, p. 403-414, 2000.

SHAW, J.M. et al. Evaluation of the long-term function of cryopreserved ovarian grafts in the mouse, implications for human applications. **Molecular Cell Endocrinology**, v.161, p. 103–110, 2000.

SHNYDER, S.D.; Hubbard, M.J. ERp29 Is a Ubiquitous Resident of the Endoplasmic Reticulum with a Distinct Role in Secretory Protein Production **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v.50, n.4, p. 557–566, 2002.

SILVA, J.R. et al. Morphological and ultrastructural changes occurring during degeneration of goat preantral follicles preserved *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v.66, n.3-4, p. 209-223, 2001.

SILVA, J.R.V. et al. Survival and growth of goat primordial follicles after *in vitro* culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. **Animal Reproduction Science**, v.81, p. 273-286, 2004.

SILVA, J.S. Jr. **Especiação em macacos-prego e caiararas, gênero Cebus Erxleben, 1777 (Primates, Cebidae)**. Rio de Janeiro (Brazil): Universidade Federal do Rio de Janeiro. p. 377, 2001.

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

SILVA, J.S. Jr; SILVA, C.R.; KASECKER, T.P. **Primatas do Amapá: Guia de identificação de Bolso**. Panamérica Editorial Ltda, Bogotá, Colombia, 2008.

SKINNER, MICHEL K. Regulation of primordial follicle assembly and development. **Human Reproduction Update**, v.11, n.5, p. 461–471, 2005.

SLEE, R.B. et al. Differentiation-dependent expression of connective tissue growth factor and lysyl oxidase messenger ribonucleic acids in rat granulosa cells. **Endocrinology**, v.142, p. 1082–1089, 2001.

STOCKWIN, L.H. et al. Proteomic Analysis Identifies Oxidative Stress Induction by Adaphostin. **Clinical Cancer Research**, v.13, n.12, 2007.

SUN, R.Z. et al. Expression of GDF-9, BMP-15 and their receptors in mammalian ovary follicles. **Journal Molecular Histology**, v.41, p. 325-332, 2010.

TATONE, C. et al. Cryopreservation and oxidative stress in reproductive cells. **Gynecological Endocrinology**, v.26, n.8, p. 563–567, 2010.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, n.63, p. 1717-175, 2005.

VAN DEN HURK, R.; SANTOS, R.. Development of fresh and cryopreserved early-stage ovarian follicles, with special attention to ruminants. **Animal Reproduction**, v.6, n.1, p. 72-95, 2009.

VICENT, C.; PICKERING, S.J.; JOHNSON, M.H. The hardening effect of dimethyl sulphoxide on the mouse zona pellucida requires the presence of an oocyte and is associated with a reduction in the number of cortical granules present. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.89, p. 253-259, 1990.

WOLF, D.P. et al. Use of Assisted Reproductive Technologies in the Propagation of Rhesus Macaque Offspring. **Biology of Reproduction**, v.71, p. 486–493, 2004.

WOOD, T.C.; MONTALI, R.J.; WILDT, D.E. Follicle-oocyte atresia and temporal taphonomy in cold-stored domestic cat ovaries. **Molecular Reproduction Development**, v.46, p. 190-200, 1997.

WRIGHT, E. M.; BUSH, D. E. The reproductive cycle of the Capuchin (*Cebus apella*). **Laboratory Animal Science**, v.5, p. 651-654, 1977.

WU, T-W. et al. The cytoprotective effect of Trolox demonstrated with three types of human cells. **Biochemical Cell Biology**, v.68, p. 1189-1194, 1990.

XING, W. *et al.* Solid-surface vitrification is an appropriate and convenient method for cryopreservation of isolated rat follicles. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.8, n.42, 2010.

YEOMAN, R.R. et al. Cryoloop vitrification yields superior survival of Rhesus monkey blastocysts. **Human Reproduction**, v.16, n.9, p. 1965-1969, 2001.

YEOMAN, R.R.; WOLF, D.P.; LEE, D.M. Coculture of monkey ovarian tissue increases survival after vitrification and slow-rate freezing. **Fertility and Sterility**, v.83, n.1, p. 1248-1254. 2005.

YOON, S.O. et al. Selenite suppresses hydrogen peroxide-induced cell apoptosis through inhibition of ASK1/JNK and activation of PI3-K/Akt pathways. **The FASEB Journal**, v.16, p. 111–113, 2002.