



**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**

Sarah Raphaella Rocha de Azevedo Scalercio

Análise imunohistológica e desenvolvimento folicular após auto-transplante de tecido ovariano de macaca de cheiro *Saimiri collinsi*

**Belém
2015**

Sarah Raphaella Rocha de Azevedo Scalercio

Análise imunohistológica e desenvolvimento folicular após auto-transplante de tecido ovariano de macaca de cheiro *Saimiri collinsi*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora.**

Área de concentração: Produção Animal

Orientadora: Profa. Dra. Regiane Rodrigues dos Santos

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

**Belém
2015**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA

Scalercio, Sarah Raphaella Rocha de Azevedo,
1987-

Análise imunohistológica e desenvolvimento folicular
após auto-transplante heterotópico de tecido ovariano de
macaca de cheiro saimiri collinsi / Sarah Raphaella
Rocha de Azevedo Scalercio. - 2014.

Orientadora: Regiane Rodrigues dos
Santos;

Coorientadora: Sheyla Farhayldes Souza
Domingues.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do
Pará, Núcleo de Ciências Agrárias e
Desenvolvimento Rural, Programa de Pós-Graduação
em Ciência Animal, Belém, 2014.

1. Macaco-de-cheiro - Reprodução. 2.
Reprodução animal. I. Título.

CDD 22. ed. 636.089



Parecer de Aprovação Nº 009/2011/CEPAN/IEC/SVS/MS
Protocolo CEPAN - nº 0004/2011

Ananindeua/PA, 10 de maio de 2011.

Projeto: **“Viabilidade celular, expressão gênica e auto-tranplante de tecido cortical ovariano vitrificado de macaco-de-cheiro (*Saimiri sciureus*)”.**

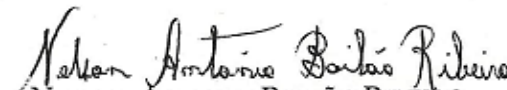
Pesquisador Responsável: **SHEYLA FARHAYLDES SOUZA DOMINGUES**

Conforme decisão do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais-CEPAN do Instituto Evandro Chagas, cientificamos que o projeto acima **foi aprovado**.

Recomendamos ao coordenador responsável que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Os relatórios parciais deverão ser encaminhados a este Comitê, anualmente, a partir do início do projeto.

Atenciosamente,


NELSON ANTONIO BAILÃO RIBEIRO
Coordenador do CEPAN/IEC



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 32632-1	Data da Emissão: 14/02/2012 11:46
Dados do titular	
Nome: Sarah Scalercio	CPF: 850.450.632-00
Título do Projeto: VIABILIDADE CELULAR, EXPRESSÃO GÊNICA E AUTO-TRANSPLANTE DE TECIDO OVARIANO VITRIFICADO DE MACACO-DE-CHEIRO (Saimiri sciureus)	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ	CNPJ: 34.621.748/0001-23

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Análise imunohistoquímica do estroma ovariano e Análise estatística dos resultados	02/2012	02/2013
2	Coleta de biopsias ovarianas e Classificação morfológica e morfométrica de FOPA's	02/2012	02/2013
3	Quantificação de genes relacionados ao estresse oxidativo em ovário	02/2013	02/2014
4	Análise morfológica e ultraestrutural Quantificação de genes relacionados à foliculogênese	02/2013	02/2014
5	Preparação dos animais e avaliação dos valores hormonais e Teste dos protocolos de vitrificação	02/2014	02/2015
6	Coleta de biópsias ovarianas p/ transplante do tecido fresco e criopreservado	02/2014	02/2015
7	Quantificação de expressão gênica em tecido ovariano fresco e criopreservado após transplante	02/2015	02/2016
8	Análise morfológica e ultraestrutural de tecido ovariano fresco e criopreservado após transplante	02/2015	02/2016
9	Dosagem hormonal dos animais submetidos ao auto-transplante	02/2015	02/2016

De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NAO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA n° 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Sheyla Farhaydes Souza Domingues	Orientadora	480.204.273-68	89120020241062 SSP-CE	Brasileira
2	elizabeth nikolak	Estudantes de Mestrado (MV)	363.475.829-53	4041897 segup-PA	Brasileira
3	Regiane Rodrigues dos Santos	Co-Orientadora	730.277.743-87	93002694006 ssp-CE	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 25926312





REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
 MNISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA
 INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE
 E DOS RECURSOS NATURAIS
 RENOVÁVEIS - IBAMA
 SCEN Trecho 2 - Ed. Sede - Caixa Postal nº 08570 - CEP 70818-900 - Brasília-DF



CONVENÇÃO SOBRE O
 COMÉRCIO INTERNACIONAL
 DE ESPÉCIES DA FLORA
 E FAUNA SELVAGEM
 EM PERIGO DE EXTINÇÃO

CONVENTION ON
 INTERNATIONAL TRADE
 IN ENDANGERED SPECIES
 OF WILD FAUNA
 AND FLORA

1) Pag. Nº 1/1
 2) Data Emissão/Issuing Date: 16/01/2013
 3) Válido Até/Valid Until: 16/07/2013

4) Licença n°/Permit n°: 13BR009810/DF	6) Selo n°/Stamp n°: 521492 	8) Controle/Check #: P9SZWY69K6AWXKXT
5) Licença de/Permit for Exportação		9) Autoridade Adm. Emitente/Issuing Management Authority Assinatura/Signature

10) Importador/Importer Sarah Scalercio CHAUSSEE SAINT PIERRE 345 ETTERBEEK - 1040 fone: - Bélgica - BE	11) Exportador(Re-exportador)/Exporter(Re-exporter) Sarah Scalercio Rua Almirante Wandenkolk, Vils Duarte 36 BELEM - 66055220 fone: 9182426682 - sarahscalercio@hotmail.com Brasil - BR
12) País Importador/Country of Import Bélgica - BE	13) País Exportador(Re-exportador)/Country of Export(Re-export) Brasil - BR

14) Objetivo da Operação/Purpose of the transaction
 M - Bio-medical research/Pesquisa biomédica...

15) Condições Especiais/Special Conditions
 For live animals, this permit or certificate is only valid if the transport conditions conform to the Guidelines for Transport and preparation for shipment of live wild animals and plants or, in the case of air transport, to the IATA Live Animals Regulations

16) Dados do Transporte/Transportation Data
 Local/Place: ALF/Al Rio de Janeiro
 Data Provável/Probable Date: 14/01/2013
 ESTA LICENÇA É VÁLIDA SOMENTE PARA UMA OPERAÇÃO/
 THIS PERMIT OR CERTIFICATE IS ONLY VALID FOR ONE SHIPMENT.

17) Item	21) Anexo/Origem Appendix/Source	18) Produto/Product	19) Quantidade-Unidade Medida/Quantity Unit
20) Espécie: nome científico nome vulgar/ Species: scientific name common name		22) Descrição: Parte Quantidade-Unidade-Marcação Description: Part Quantity-Unit-Mark	23) Cód. País de Origem-Comprovante-Data Country of Origin-Permit-Date 24) Cód. País de reexportador-Certificado-Data Country reexportation-Certificate-Date
17) 1		18) ANIMAL MORTO - PARTE/BODY - PIECE	19) - - 60,00 UN - -
20) 1. Saimiri sciureus Macaco-de-cheiro Squirrel-monkey	21) II F	22) tecido/Issue 60,00 UN -	23) - - 24) - -

Fim dos Itens/Items End

"Esta licença não autoriza o uso do material biológico para acessar informações de origem genética, contida no todo ou em parte de espécime vegetal, fúngico, microbiano ou animal; em substâncias provenientes do metabolismo desses seres vivos e de extratos obtidos desses organismos vivos ou mortos, encontrados em condições in situ, inclusive domesticada, ou mantidos em coleções in situ, desde que coletados em condições in situ, no território nacional, na plataforma continental ou na zona econômica exclusiva, visando atividade exploratória para identificar componentes do patrimônio genético e informação sobre o conhecimento tradicional associado, com potencial de uso comercial"
 "This permit does not extend to the use of biological material to access genetic information, contained in the whole or parts of plants, fungus, microorganisms or animals specimens; in substances derived from the metabolism of these living beings or from extracts obtained from live or dead specimens, occurring in situ conditions, including domestic ones, or kept in ex situ collections, if obtained in situ conditions, in national territory, the continental shelf or the exclusive economic zone, aiming at prospecting for identification of components of the genetic patrimony and/or information about associated traditional knowledge with potential commercial use."

25) Endosso da Aduana/Customs Endorsement

Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.
------	-----------	------	-----------	------	-----------	------	-----------	------	-----------	------	-----------	------	-----------	------	-----------

ASSINATURA/SIGNATURE

* Verificar/Verify: <http://ibama.gov.br/cites/verificar> E-mail: cites.sede@ibama.gov.br
 1ª Via - Original - Importador | Exportador - Brasil | Importer | Exporter - Brazil
 2ª Via - Exportador | Importador - Estrangeiro | Exporter | Importer - Other Country
 3ª Via - Aduana / Customs
 4ª Via - IBAMA

Sarah Raphaella Rocha de Azevedo Scalercio

Análise imunohistológica e desenvolvimento folicular após auto-transplante de tecido ovariano de macaca de cheiro *Saimiri collinsi*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora.**

Área de concentração: Produção Animal

Data da aprovação. Belém - PA: 11/12/2014

Banca Examinadora

Profa. Dra. Sheyla Farhayldes S. Domingues
Faculdade de Medicina Veterinária – UFPA
Co-orientadora

Prof. Dr. Otavio Mitio Ohashi
Ciências Biológicas - UFPA
Membro Titular Interno

Prof. Dr. Washington Luiz Assunção Pereira
Instituto de Saúde e Produção Animal - UFPA
Membro Titular Externo

Profa. Dra. Simone do Socorro D. Santos
Ciências Biológicas - UFPA
Membro Titular Interno

Profa. Dra. Bárbara do Nascimento Borges
Instituto Socioambiental e dos Recursos
Hídricos - UFPA
Membro Titular Externo

Aos meus pais:
Heliodoro Crispim de Azevedo Scalercio e
Maria Neide Rocha Moraes.

Com amor
DECICO

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão:

A Deus, fonte da vida, inspiração maior, pelas oportunidades ofertadas e por tudo;

Ao meu Pai e minha Mãe pelos ensinamentos de Amor e lições de vida;

A Universidade Federal do Pará - UFPA;

As Professoras orientadoras Dra. Regiane Rodrigues dos Santos, Sheyla Farhayldes S. Domingues e Christiani Andrade Amorim, pela orientação, ensinamentos, paciência e competência que contribuíram para minha formação, de cada aprendizado durante esta caminhada, muito obrigada;

Aos professores e funcionários do PPGCAN/UFPA que contribuíram de alguma maneira, em especial ao secretário Rodrigo Virgulino, por toda paciência e ajuda prestada;

A professora Doutora Karla Valéria Batista Lima, pela oportunidade de desenvolver o estágio em docência, no curso na disciplina Processos Vitais nos Animais, do curso de Licenciatura Plena em Ciências Naturais da Universidade Estadual do Pará.

A minha família, pela compreensão, amor e apoio nas horas difíceis e em especial minha mãe Maria Neide Rocha Moraes por toda paciência;

A minha Avó Terezinha por toda ajuda;

Aos amigos de caminhada, Roberta Fusco e Romina Batista, pela grande família;

A Karol Oliveira (Kerol), por todos os momentos vivenciados, ajuda e parcerias nas horas “extras” trabalhadas;

A Fernanda Maria, pela ajuda fundamental da fase final da defesa, meu obrigada!

Ao meu amigo, companheiro sempre presente nas noites mais difíceis, a Snoopy, meu filho, obrigada pelo carinho sempre manifestado;

Aos amigos que fazem parte do Laboratório de Biologia e Medicina de Animais Silvestres da Amazônia (BIOMEDAM): Débora, Dani, Stefânia, Danuza, Luana, Márcia, Beth, Adriel e Julianne, sem a participação deles, nada seria possível. Obrigada pelo apoio e amizade;

À toda equipe do Centro Nacional de Primatas (CENP) pela infraestrutura do local e apoio logístico. Aos médicos veterinários, Dr. Muniz e Dr. Paulo Castro, e em especial a minha querida amiga Bike (Aline Imbeloni), seu Osvaldo, Dona Graça, Dona Rosa, seu Miguel e seu Serfatil, Mika, Manu, por todo o apoio prestado nas etapas pré e pós cirurgias e ao Leo, Reginaldo e Everaldo da ASCOM, por toda ajuda na impressão e encadernação da tese.

A todas as macacas da espécie *Saimiri sciures* que participaram dos procedimentos experimentais, os quais todos foram desenvolvidos com muito amor, carinho e respeito a vocês, o meu muito obrigada <3!!

Ao Laboratório de Ginecologia (Lab Gyne) da Universidade Católica de Louvain, sem vocês nem uma imunohistoquímica teria funcionado!! Em especial a Christiani Amorim, por todas as experiências, momentos de alegria e os estresses compartilhados. Ao apoio técnico de Olivier, e Dolores e a Julie, Valerie e Michelle por toda ajuda prestadas fundamentais para minha tese e aos bons momentos vivenciados.

Ao Laboratório de Pesquisa em Estresse Oxidativo (LAPEL) do ICB (UFPA), pela grande colaboração do Prof. Dr. Sandro Percário, das Amandas, Danilo, Michelle e aos demais estudantes que ajudaram de alguma maneira nas dosagens do estresse oxidativo

Ao Laboratório de Toxicologia (LATOX) na faculdade de farmácia (UFPA), em especial o prof. José Luis e ao colega Thiago, pela ajuda nas dosagens do estresse oxidativo.

À Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) pelo fornecimento da bolsa de estudos durante o período do doutorado, especialmente no período do estágio no exterior.

A todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a realização desta tese...

Meu muito obrigada a todos!!

“Em tudo o que a natureza opera, ela nada faz bruscamente”

Lamarck

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar a foliculogênese ovariana de *Saimiri sciureus*. Para tanto, foi avaliada a expressão de fatores intra-ovarianos ligados ao desenvolvimento, inibição folicular e proliferação celular, além da investigação dos efeitos do pré-tratamento com o análogo da vitamina E, Trolox®, sobre a viabilidade e funcionalidade folicular, índice de apoptose, proliferação celular, vascularização e fibrose, após o auto-transplante do tecido ovariano fresco. Foi possível imunolocalizar pela primeira vez a expressão das proteínas: fator crescimento e diferenciação-9 (GDF-9), c-Kit/Kit Ligante e Ki-67 e confirmar a expressão do hormônio anti-mülleriano (AMH) em diferentes fases do desenvolvimento folicular de macaco de cheiro. No que diz respeito a pré-incubação com o antioxidante Trolox®, pôde-se observar uma melhora na sobrevivência folicular após o autotransplante, diminuição da taxa de apoptose em células do estroma, porém, aumento nas áreas de fibrose no tecido. Os nossos resultados sugerem que o tecido ovariano fresco pode ser incubado e enxertado sem grande impacto sobre o crescimento folicular precoce e a morfologia após auto-transplante subcutâneo por curto período. Acreditamos que nossos resultados oferecem uma contribuição importante para a compreensão do processo de foliculogênese em macacos neotropicais. Este conhecimento é uma ferramenta importante para avaliar a viabilidade folicular e funcionalidade após a criopreservação, transplante de tecido ovariano e cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, em especial para os animais com risco de extinção e às mulheres com risco de perda de fertilidade devido à quimioterapia e radioterapia.

Palavras Chaves: Foliculogênese Ovariana. Imunolocalização. Autotransplante. Trolox®. *Saimiri collinsi*.

ABSTRACT

The main objective of the present work was to study ovarian folliculogenesis in *Saimiri sciureus*. Therefore, we evaluated the expression of intra-ovarian factors related with the follicular development, inhibition and cell proliferation, as well as investigation the effects of pretreatment with vitamin E analogue, Trolox, on the viability and follicular function, apoptosis index, cell proliferation, vascularization and fibrosis after auto-transplanted of fresh ovarian tissue. It was possible for the first time imuno localize proteins expressed as: growth and differentiation factor -9 (GDF -9), c- kit/Kit Ligand and Ki-67 and confirm the expression of anti-Mullerian Hormone (AMH) in different stages of follicular development in squirrel monkey ovary. Regarding pre-incubation with the Trolox antioxidant, it can improves follicular survival after autotransplantation, decrease apoptosis rates in stromal cells, although increase areas of fibrosis after graft. Our results suggest that fresh ovarian tissue can be grafted and incubated without major impact on early follicular growth and morphology after subcutaneous autotransplantation for a short-term. We believe that our results provide an important contribution to understanding the process of folliculogenesis in neotropical monkeys. This knowledge is an important tool to evaluate follicular viability and functionality after cryopreservation of ovarian tissue transplantation and in vitro culture of early follicles, especially for animals at risk of extinction and women that are undergoing to chemotherapy and radiation with risk of loss fertility.

Key Words: Ovarian Folliculogenesis. Immunolocalization. Autograft. Trolox®. *Saimiri collinsi*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMH	Hormônio Anti-Mülleriano
BMP	Proteína Morfogenética Óssea
CGs	Células da Granulosa
CGPs	Células Germinativas Primordiais
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FOPAs	Folículos Ovarianos Pré-Antrais
FOX03	“ <i>Forkhead Box 03</i> ”
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GDF-9	Fator de Crescimento e Diferenciação-9
HA	Ácido Hialurônico
GnRH	Hormônio Hipotalâmico Liberador de Gonadotrofinas
IA	Inseminação Artificial
IUCN	União Internacional da Conservação da Natureza
KL	Kit-Ligante
LH	Hormônio Luteinizante
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro
PI3K	Quinase 3 Fosfatidilinositol
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de Embriões
PNH	Primatas Não Humanos
SCF	Stem Cell Fator
TE	Transferência de Embriões
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
VEGF	Vascular endothelial growth factor

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 GERAL.....	17
2.2 ESPECÍFICOS.....	17
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
3.1 O GÊNERO <i>Saimiri</i>	18
3.2 BIOLOGIA REPRODUTIVA DAS FÊMEAS DE <i>Saimiri</i>	19
3.3 O OVÁRIO E SUA ESTRUTURA.....	20
3.4 FOLICULOGÊNESE OVARIANA.....	21
3.4.1 Recrutamento, Seleção e Crescimento Folicular.....	21
3.4.2 Estágios do Desenvolvimento Folicular e Atresia Folicular.....	22
3.4.3 Foliculogênese no Ciclo Ovariano em PNH.....	23
3.5 FATORES DE CRESCIMENTO E HORMÔNIOS NA FOLICULOGÊNESE.....	23
3.5.1 Superfamília de Fator de Crescimento Transformante-β (TGF-β).....	23
3.5.1.1 Fator de Diferenciação e Crescimento 9 (GDF-9).....	24
3.5.1.2 Homônio Anti-Mülleriano (AMH).....	24
3.5.2 c-Kit e Kit Ligante.....	25
3.6 TRANSPLANTE OVARIANO: APLICAÇÕES NA REPRODUÇÃO DE PNH.....	25
3.7 OTIMIZAÇÃO DO TRANSPLANTE DE TECIDO OVARIANO.....	26
4 TRANSPLANTE OVARIANO: DESTAQUES NA REPRODUÇÃO DE PNH.....	29
5 IMMUNOLocalization of Growth, Inhibitory and Proliferative Factors Involved in Initial Ovarian Folliculogenesis from Adult Common Squirrel Monkey (<i>Saimiri collinsi</i>).....	60
6 Trolox enhances follicular survival after ovarian tissue autograft in squirrel monkey (<i>Saimiri collinsi</i>).....	79
7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	109
REFERÊNCIAS.....	110
APENDICE.....	119

1 INTRODUÇÃO

Em decorrência das similaridades anatômicas, fisiológicas e etológicas com a espécie humana, os primatas não humanos (PNH) têm sido amplamente utilizados como modelo experimental para pesquisas biomédicas (HAU; SCHAPIRO, 2006). Mais que isso, de acordo com o último senso (2013) da União Internacional da Conservação da Natureza (IUCN), 40% das espécies neotropicais de PNH estão listadas como vulneráveis, em risco de extinção ou mesmo em estado crítico de extinção, devido à contínua destruição de seu habitat natural.

No que diz respeito às biotécnicas aplicadas à reprodução de PNH, avanços têm sido obtidos em machos, uma vez que o processamento de sêmen seguido da criopreservação foi procedido em diversas espécies de primatas do Velho Mundo como em *Cercopithecus aethiops*, *Erythrocebus patas*, *Macaca speciosa*, *Macaca mulatta*, *Pan troglodytes* (ROUSSEL; AUSTIN, 1967), *Papio anubis* (KRAEMER; VERA CRUZ, 1969), *Macaca fascicularis* (MAHONE; DUKELOW, 1978), *Gorilla gorilla* (LAMBERT et al., 1991), *Macaca thibetana* (CHEN et al., 1994) e *Macaca fuscata* (SANKAI et al., 1997), e em primatas do Novo Mundo como: *Saimiri sciurius* (DENIS et al., 1976), *Callithrix jacchus* (MORRELL et al., 1997) e *Sapajus apella* (OLIVEIRA et al., 2011) tem sido realizado.

Em fêmeas, foi realizada a produção *in vitro* de embriões (PIVE), em primatas do Velho Mundo como em macaco rhesus (WOLF et al., 1989; ZHANG et al., 2004) e em primatas do Novo Mundo, como em macaco prego (LIMA et al., 2013), macaco de cheiro (KUEHL; DUKELOW, 1979; ASAKAWA; DUKELOW, 1982), além da preservação de gametas femininos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (FOPAs) de macaco prego (BRITO et al., 2014). Contudo, existe ainda a necessidade de mais estudos sobre os aspectos morfológicos, bioquímicos e fisiológicos relacionados com a oogênese e foliculogênese de PNH. Além disso, a possibilidade de existência de diferenças espécie-específicas, faz com que seja fundamental adquirir conhecimento sobre a fisiologia reprodutiva desses animais, objetivando otimizar a utilização de técnicas como, inseminação artificial (IA), maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV), transferência de embriões (TE), cultivo de folículos pré-antrais *in vitro*, criopreservação e transplante de tecido ovariano ou de FOPAs.

Em primatas do Novo Mundo, a investigação dos fatores envolvidos na foliculogênese ovariana tem recebido menos atenção, quando comparado com primatas do Velho Mundo e para *Saimiri*, pouco foi descrito. A espécie *Saimiri collinsi* pode ser utilizada como modelo experimental para outras espécies do gênero *Saimiri*, como *S. vanzolinii*, que está sinalizada como candidata a entrar na lista vermelha para risco de extinção (IUCN, 2013).

A criopreservação seguida do transplante de tecido cortical ovariano representa uma alternativa promissora para a preservação de patrimônios genéticos de animais em perigo de

extinção, o que possibilitará posterior utilização em programas de reprodução assistida; viabilizando o sucesso de pesquisas com animais que apresentam dificuldades reprodutivas ou aqueles utilizados como modelo de estudos para as pesquisas biomédicas (SANTOS et al., 2010). Esta técnica também apresenta importantes aplicações para mulheres submetidas a tratamentos de radioterapia ou quimioterapia, uma vez que o auto-transplante após a terapia possibilita o retorno das funções ovarianas (DONNEZ; DOLMANS, 2013). Apesar dos bons resultados desses autores, de 30 nascimentos de prole saudáveis proveniente de mulheres submetidas à criopreservação e auto-transplante do tecido ovariano, em animais silvestres poucos avanços têm sido obtidos, em decorrência do reduzido número de estudos com preservação do cortex ovariano, bem como informações sobre a fisiologia reprodutiva desses animais precisam ser elucidadas.

Em relação a otimização de protocolos de transplante de tecido ovariano, para espécies de PNH ameaçadas de extinção, o presente estudo ajudará a conhecer alguns fatores expressos no tecido ovariano transplantado, e qual o efeito da adição de um anti-oxidante, o análogo solúvel da vitamina E (Trolox®), sobre o estresse oxidativo no tecido transplantado.

Nesse contexto, propõe-se as seguintes hipóteses científicas:

A análise da expressão de fatores de crescimento, inibição e proliferação celular poder ser usada para avaliar a viabilidade e funcionalidade folicular, após o autotransplante de fragmentos fresco do tecido cortical ovariano de *S. collinsi*, a curto prazo; e o pré-tratamento do tecido ovariano com Trolox®, análogo solúvel da vitamina E, melhora a sobrevivência folicular; diminui as taxas de apoptose em células do estroma, e evita a fibrose tecidual, após o autotransplante de fragmentos fresco do tecido cortical ovariano de *S. collinsi*, a curto prazo

Desta forma, os objetivos principais deste trabalho foram caracterizar a expressão de alguns fatores envolvidos na foliculogênese ovariana inicial e avaliar os efeitos da pré-incubação com o análogo solúvel da vitamina E, após auto-transplante heterotópico do tecido ovariano de *S. collinsi* adultos.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

- Avaliar a expressão de GDF-9, AMH, KL, c-kit e Ki67 no tecido cortical ovariano fresco de *S. collinsi* adultos; e
- Avaliar os efeitos da pré-incubação com o análogo solúvel da vitamina E, Trolox® sobre o desenvolvimento folicular e qualidade tecidual, após auto-transplante heterotópico de fragmentos fresco do tecido cortical ovariano de *S. collinsi*.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar o local de expressão das proteínas GDF-9, AMH, KL, c-kit e Ki67 no tecido ovariano fresco de *S. collinsi*;
- Avaliar a morfologia, densidade, proliferação e desenvolvimento folicular após o autotransplante do tecido ovariano fresco, em curto prazo com e sem a presença de Trolox®;
- Avaliar a expressão de o GDF-9, AMH, c-kit e apoptose por dano ao DNA (TUNEL) no tecido ovariano, após o autotransplante do tecido ovariano fresco, em curto prazo com e sem a presença de Trolox®;
- Avaliar e quantificar a qualidade do estroma ovariano e fibrose tecidual, após o autotransplante do tecido ovariano fresco, em curto prazo com e sem a presença de Trolox®; e
- Quantificar a vascularização tecidual, após o autotransplante do tecido ovariano fresco, em curto prazo com e sem a presença de Trolox®.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O GÊNERO *Saimiri*

Entre os primatas neotropicais, o macaco de cheiro, denominação popular dada aos representantes do gênero *Saimiri*, destaca-se como um dos modelos de primatas de experimentação mais utilizados em pesquisas biomédicas (HERSHKOVITZ, 1984). A distribuição geográfica da espécie *S. collinsi* abrange o arquipélago do Marajó e também a região situada ao sul do rio Amazonas, entendendo-se até o Estado do Maranhão, nas matas de transição entre a Amazônia e o Cerrado. Ainda não se tem bem definida qual seria sua limitação ao sul. A porção oeste da distribuição de *S. collinsi* se estende até a margem esquerda do rio Tapajós, sendo o município de Juruti-PA a localidade mais ocidental (MERCÊS, 2015) (Figura 1).

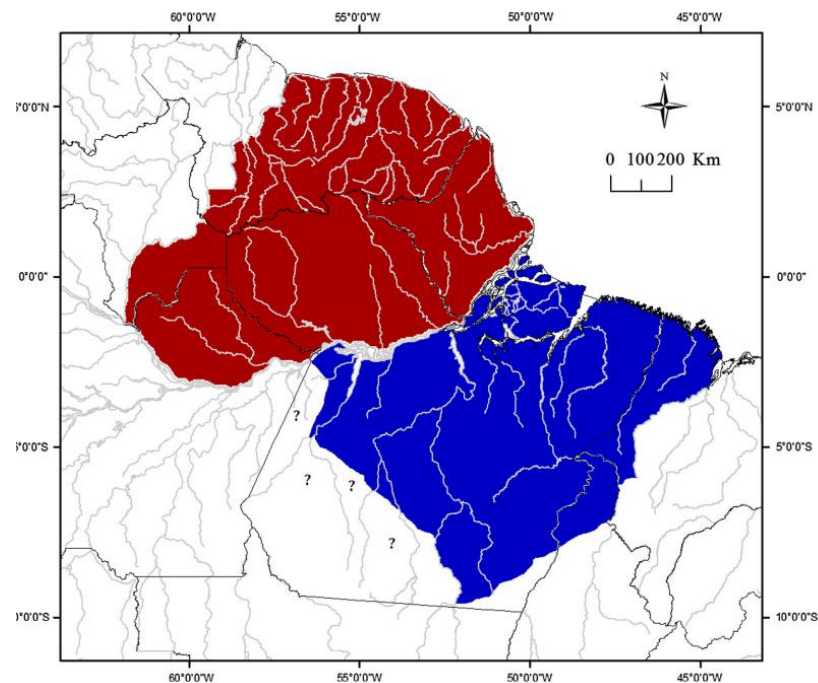


Figura 1- Distribuição geográfica da espécie *Saimiri collinsi*.

Fonte: Mercês, 2015.

São onívoros e em ambiente natural formam grupos grandes, variando de 10 a 35 indivíduos (BOINSKIN et al., 2002). Apresentam pequeno porte, com peso corpóreo do indivíduo adulto oscilando entre 0,700 – 1,200kg. A presença de coloração preta ao redor da boca e máscaras de pêlo branco ao redor dos olhos formando um arco são características marcantes do gênero *Saimiri* (Figura 2). De acordo com a IUCN (2013), a espécie *S. collinsi* é categorizada como sem ameaça de extinção.



Figura 2- Representação de dois indivíduos do gênero *Saimiri*.

Fonte: Luiz Marino-arquivo pessoal, 2011.

3.2 BIOLOGIA REPRODUTIVA DAS FÊMEAS DE *Saimiri*

As fêmeas do gênero *Saimiri* apresentam sazonalidade reprodutiva bem definida (BITTETTI; JANSON, 2000) e seu sistema de acasalamento é poligâmico. Na natureza, a maturidade sexual dos machos inicia-se aos 4,5 anos e das fêmeas entre os 2,5 e 3,5 anos de vida (DUKELOW, 1985; STONE, 2007), podendo permanecer férteis até aproximadamente os 16 anos de idade (MENDOZA, 1999). A gestação dura em média 155 dias (HEARN, 1994) e a amamentação cerca de 180 dias, nascendo um único filhote a cada 2 anos (GARBER; LEIGH, 1997), com intervalo entre gerações de 4 anos (HEARN, 1994).

Apresentam um ciclo estral curto variando de 7 a 12 dias, a concentração sérica de estrógeno (E_2) varia de $81,0 \pm 8,2$ pg/ml a $503,0 \pm 57,5$ pg/ml, se elevando de 8 a 10 dias entre um pico e outro de E_2 (WOLF et al., 1977). A elevação da concentração de E_2 ocorre por volta do 4º dia do ciclo, acompanhada por um pico de hormônio luteinizante (LH). Após os 3-4 dias do pico de E_2 , as concentrações séricas de progestinas atingem valores máximos de $399,0 \pm 27,7$ ng/ml. Modificações no epitélio vaginal são encontradas durante o ciclo ovariano, com presença de células basais, parabasais, intermediárias grandes e pequenas e superficiais, além de leucócitos, eritrócitos e muco que podem ser observados no esfregaço (GHOST et al., 1982).

3.3 O OVÁRIO E SUA ESTRUTURA

O ovário é o órgão reprodutivo primário da fêmea e é constituído por vários tipos de células, incluindo oócito, células da granulosa (CGs), da teca, do estroma e do epitélio da superfície ovariana. Como na maioria das espécies mamíferas, o ovário dos primatas é composto por duas partes distintas, a medula e o córtex, sendo que a região medular está localizada na parte interna do ovário e é constituída por tecido conjuntivo frouxo, fibras musculares lisas, nervos, vasos sanguíneos e linfáticos (Figura 3) responsáveis pela nutrição e sustentação do ovário (BAKER, 1966).

O cortex é encontrado mais externamente, sendo este constituído por tecido conjuntivo frouxo. A túnica albugínea é uma espessa camada de tecido conjuntivo localizado inferiormente ao epitélio superficial, rica em fibras colágenas, desprovida de vasos sanguíneos, sendo abaixo dela o local onde se encontra a grande maioria dos folículos primordiais (DELLMAN; BROWN, 1982).

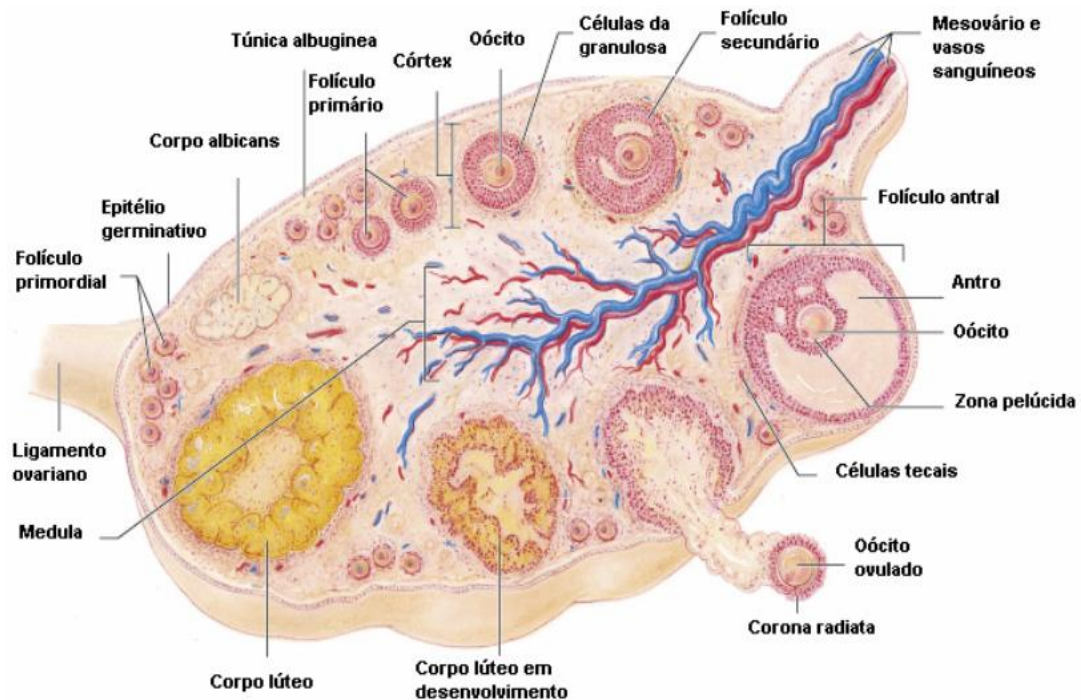


Figura 3- Representação das principais estruturas ovarianas da classe Mammalia.

Fonte: Adaptado de Taleton Sate University, 2014.

3.4 FOLICULOGÊNESE OVARIANA

Em geral, o folículo ovariano de mamíferos é constituído pelo oócito circundado por células foliculares e demarcado por uma membrana basal, que o separa do estroma ovariano. O folículo é a unidade morfo-funcional do ovário, cuja função é proporcionar um ambiente adequado para o crescimento, maturação oocitária e produção de hormônios (CORTVRINDT; SMITZ, 2001).

A foliculogênese ovariana é um processo dinâmico complexo, que começa na vida intrauterina em grande parte das espécies e pode ser definida como o processo de formação, desenvolvimento e maturação folicular, que se inicia com a formação do folículo primordial, ocorrendo o desenvolvimento sinérgico e crescimento folicular até a fase de folículos pré-ovulatórios. Este processo ocorre simultaneamente à oogênese, no momento que o oócito está entre as fases de prófase I e metáfase II, na maioria das espécies (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

Apesar de alguns estudos detalharem o desenvolvimento folicular na fase antral em *S. sciureus* (DUKELOW, 1985) e de um estudo descrever a morfometria dos folículos pré-antrais em macacos de cheiro senil (ALMEIDA et al., 2012), pouco se conhece sobre a foliculogênese inicial do gênero *Saimiri*. Apenas Walker et al. (2009) descreveram a presença de folículos ovarianos primordiais em diferentes fases da vida dessa espécie, i.e. desde o nascimento até a idade senil. Contudo, informações acerca das características morfométricas, morfológicas e funcionais nas diferentes fases do desenvolvimento folicular nessa espécie, ainda precisam ser investigadas.

3.4.1 Recrutamento, Seleção e Crescimento Folicular

Em mamíferos, a exata forma e os mecanismos que controlam e permitem que um folículo saia de seu estado quiescente, iniciando o crescimento folicular, ainda permanecem pouco compreendidos. Acredita-se que o início do recrutamento, seleção e ativação de folículos primordiais para folículos primários seja um processo contínuo, com influência de gonadotrofinas (MCGEE; HSUEH, 2000). Provavelmente, a ativação de folículos primordiais é regulada pelo balanço entre fatores estimulatórios e um fator inibitório presente no próprio ovário, bem como vários fatores de crescimento intra-ovarianos, pertencentes à superfamília de fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) precisam estar expressos em oócitos e células da granulosa (CGs) de folículos, em diferentes fases de desenvolvimento, para funcionarem como reguladores da foliculogênese ovariana em mamíferos (KNIGHT; GLISTER, 2006).

Pesquisas mostram que fatores como o kit ligante (KL), e seu receptor c-kit, fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF), proteínas morfogênicas ósseas (BMP) e hormônio anti-Mulleriano (AMH) representam marcadores-chave na ativação folicular (SKINNER, 2005; VAN DEN HURK; ZHAO, 2005; ADHIKARI; LIU, 2009). No entanto, achados interessantes mostram o envolvimento da via de sinalização da cinase 3 fosfatidilinositol (PI3K) na ativação de folículos primordiais através do fator de transcrição “forkhead box” 03 (FOX03) (REDDY et al., 2008; LI et al., 2010).

3.4.2 Estágios do Desenvolvimento Folicular e Atresia Folicular

A morfologia folicular se altera durante a foliculogênese, uma vez que o oócito cresce e as CGs que o circunda se multiplicam e se diferenciam, passando a apresentar uma capacidade esteroidogênica (HICKEY et al., 2005; BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006). Folículos morfologicamente normais são classificados de acordo com o grau do seu desenvolvimento em primordiais ou em crescimento (primários, secundários e antrais). Os antrais (subordinados e dominantes) compreendem os folículos terciários e pré-ovulatórios, sendo constituídos por um oócito circundado pela corona radiata e células do *cumulus*, que o conectam as células da granulosa, além das células tecais e uma cavidade contendo líquido folicular (GOUGEON, 1986).

Durante toda a vida e em condições fisiologicamente normais, os folículos crescem continuamente ou até o momento em que a reserva de folículos primordiais some. Cerca de 0,1% da população folicular ovariana atingirá a ovulação (NUTTINCK et al., 1993), sendo que os demais serão “perdidos” durante o desenvolvimento do folículo (CARROLL et al., 1990). A atresia folicular é o processo pelo qual os oócitos desaparecem, do ovário por outros meios que não a ovulação, podendo acometer as CGs, os oócitos e as células tecais (KIM et al., 1998), em qualquer fase do crescimento folicular (KIM; TILLY, 2004).

O mecanismo responsável pela atresia folicular é a apoptose, onde o componente central do processo apoptótico é um sistema proteolítico que envolve uma família de proteases chamadas caspases. Estas enzimas participam de uma cascata de ativação que é iniciada em resposta a estímulos pró-apoptóticos (THORNBERRY; LAZEBNIK, 1998), segundos os autores, os eventos morfológicos que caracterizam a apoptose, tais como a condensação celular, destruição do citoesqueleto, degradação do envelope nuclear e fragmentação de DNA, são resultados da clivagem das proteínas que formam o citoesqueleto.

3.4.3 Foliculogênese e Ciclo Ovariano em PNH

De acordo com Hodges (1987), o ciclo ovariano em PNH é caracterizado por uma sequência de eventos que resultam no crescimento folicular, com ovulação de um oócito maduro, seguido da formação do *corpus luteum*. Este autor divide o ciclo ovariano das fêmeas de PNH em três etapas: I) fase folicular, que se inicia com o desenvolvimento do folículo pré-ovulatório, com alto nível de estrogênio, e surgimento das gonadotrofinas, hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH), comandado pelo hormônio hipotalâmico liberador de gonadotrofinas (GnRH); II) fase ovulatória, com pico de LH, que leva à ruptura folicular e extrusão de um oócito maduro; e III) fase luteal, com aumento da progesterona e formação do *corpus luteum*. Adicionalmente, em PNH de ciclo menstrual, existe ainda uma quarta fase, conhecida como menstrual (ASA, 1996), na qual acontece um colapso, com parcial destruição do endométrio e, conseqüente, descamação do mesmo (STRASSMANN, 1996; HERNANDEZ-LÓPEZ et al., 1998).

3.5 FATORES DE CRESCIMENTO E HORMÔNIOS NA FOLICULOGÊNESE

3.5.1 Superfamília de Fator de Crescimento Transformante- β (TGF- β)

Uma variedade de fatores que influenciam o crescimento e desenvolvimento folicular pertence à superfamília TGF- β . Estes fatores encontram-se expressos nas células somáticas ovarianas e nos oócitos, e podem ser considerados como reguladores intra-ovarianos da foliculogênese de mamíferos. Quase todas as 40 proteínas conhecidas pertencentes a essa superfamília apresentam estruturas semelhantes, com presença de 7 resíduos de cisteína em sua estrutura. Esta família está dividida em três grupos: I) TGF- β de fato; II) Ativina e inibina e III) Proteína morfogenética óssea (BMP) (KNIGHT; GLISTER, 2006). Na Figura 4 pode-se visualizar a interação de diferentes fatores expressos no tecido ovariano, durante o desenvolvimento folicular.

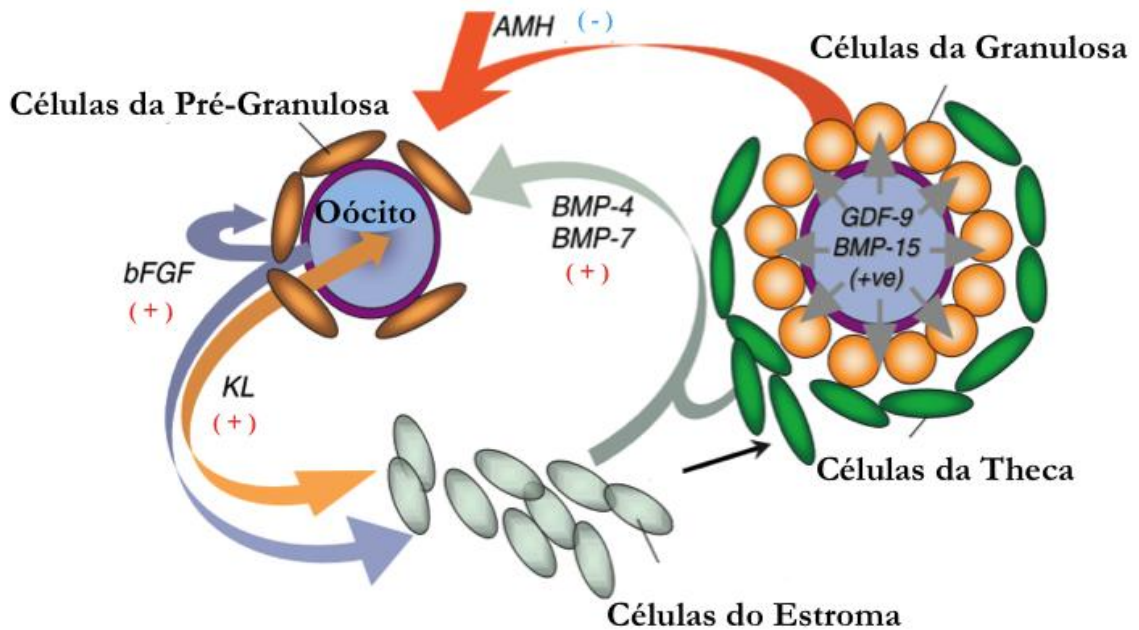


Figura 4- Representação das interações dos diferentes fatores expressos em células somáticas ovarianas e oócitos, durante o desenvolvimento folicular ovariano.

Fonte: Adaptado de Knight e Glistler, 2006.

3.5.1.1 Fator de Diferenciação e Crescimento 9 (GDF-9)

Em PNH, o GDF-9, um membro da superfamília TGF, participa do desenvolvimento folicular, estando envolvido no recrutamento de folículos e na proliferação e diferenciação de CGs de folículos primordiais (DURLINGER et al., 1999). Este fator parece estar presente em diferentes estágios da foliculogênese ovariana de forma espécie-específica. Neste contexto, este fator tem sido usado como marcador para avaliar a função ovariana. Em macaco cynomolgus (*M. fascicularis*), a expressão da proteína GDF-9 foi encontrada em todas as fases de desenvolvimento folicular (GOUGEON; BUSSO, 2000); em macaco rhesus, a proteína e o mRNA (Ácido Ribonucleico mensageiro) de GDF-9 foram observados nas células foliculares periovulatória após estimulação hormonal (DUFFY, 2003); e em babuínos, após vitrificação e auto-transplante de tecido ovariano (AMORIM et al., 2013).

3.5.1.2 Homônio anti-Mulleriano (AMH)

O AMH, também membro da superfamília TGF- β , desempenha um papel inibidor essencial na manutenção do pool de folículos primordiais (WALKER et al., 2009) e a sua expressão também tem sido usada para avaliar a função folicular em algumas espécies de PNH. O AMH é expresso em CGs de folículos em diferentes estágios de desenvolvimento em

ovário de macaco-de-barrete (*Macaca radiata*) (MODI et al., 2006), saguis (THOMAS et al., 2007), macaco-de-cheiro (WALKER et al., 2009) e babuínos (AMORIM et al., 2013).

3.5.2 c-Kit e Kit Ligante

Dentre outros fatores de crescimento, um importante fator identificado em folículos ovarianos é o receptor de tirosina-proteína-cinase Kit (c-Kit, CD117) e o seu ligante Kit Ligante (KL), também conhecido como *stem cell factor* (SCF). O sistema c-Kit/KL desempenha um papel fundamental na viabilidade folicular, recrutamento de folículos primordiais, no desenvolvimento folicular e no crescimento do oócito em espécies de mamíferos (DRIANCOURT et al., 2000).

O receptor c-Kit participa em várias vias de sinalização, entre elas a via do fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K), que está envolvida na regulação e ativação da proliferação, sobrevivência, migração e metabolismo celular (CANTLEY, 2002), sendo elemento chave na ativação de folículos primordiais (ADHIKARI; LIU, 2009). Em humanos, transcritos de KL estão expressos em folículos primários, a proteína c-kit em oócitos, bem como o RNAm de c-Kit encontra-se expresso em oócitos e GCs de folículos pré-ovulatórios (HORIE et al., 1993; TANIKAWA et al., 1998). Em cynomolgus, a expressão da proteína KL foi encontrada em CGs e o receptor c-kit em oócitos de folículos primordiais (GOUGEON; BUSSO, 2000) e em macaco prego, o RNAm de KL foi quantificado em tecido de ovário após cultivo *in vitro* (BRITO et al., 2013).

Desta forma, é possível observar que, quando comparamos PNH neotropicais e PNH do Velho Mundo, a expressão de fatores relacionados com a foliculogênese difere em algumas espécies. Isto pode indicar que a foliculogênese em PNH neotropicais pode ser regulada de uma maneira análoga: como por exemplo, o aumento da expressão de AMH por folículos em crescimento sugere participação funcional contínua no crescimento folicular, e um efeito inibitório sobre recrutamento de folículo primordial (GRUITJERS et al., 2003, KNIGHT; GLISTER, 2006).

3.6 TRANSPLANTE OVARIANO: APLICAÇÕES NA REPRODUÇÃO DE PNH

O transplante de ovário em PNHs tem sido amplamente utilizado, como uma estratégia para o desenvolvimento de modelos experimentais, nas pesquisas biomédicas na área reprodutiva, de maneira comparativa com a espécie humana (AMORIM et al., 2013). Associado a criopreservação, as perspectivas de aplicação desta técnica, vão desde a restauração da fertilidade feminina (DONNEZ et al., 2010) à conservação de animais silvestre em perigo de extinção (SANTOS et al., 2010). No entanto, estudos em PNHs propostos até o

momento, foram desenvolvidos principalmente com tecido ovariano criopreservado, a fim de simular a realidade humana, de modo a obter modelos experimentais adequados para estudos comparativos. Por outro lado, quando se considera a utilização desta biotécnica para conservação de PNHs em risco de extinção, pouco se tem descrito, no que diz respeito à forma como devemos proceder para a implementação desta biotecnologia. No capítulo I será possível encontrar a continuação e o detalhamento deste tópico, onde será mostrado o artigo de revisão produzido, o qual trata de transplante ovariano: aplicações na reprodução de primatas não humanos.

3.7 OTIMIZAÇÃO DO TRANSPLANTE DE TECIDO OVARIANO

Apesar de alguns avanços significativos relatados em tecido ovariano transplantado de ratos (GAO et al. , 2013), a diferença na duração da foliculogênese, bem como a estrutura tecidual devem ser consideradas antes dos testes extrapolarem para grandes mamíferos. A mesma preocupação também se tem para humanos. Desta forma, o uso de primatas não humanos como modelo, se mostra como uma ferramenta adequada para prévias comparações. Tem-se conhecimento que a revascularização após o transplante normalmente é lenta, o que leva à perda folicular em decorrência da isquemia e do estresse oxidativo, que por sua vez é caracterizado por apoptose, alterações fibróticas, além da diminuição na proliferação celular (LIU et al., 2002). A hipóxia também pode causar diminuição no tamanho do enxerto, incluindo alterações fibróticas e perda de até 90% dos folículos primordiais nos primeiros dias após o transplante (KIM et al., 2002). Israely et al. (2004) relataram que a angiogênese tem início no terceiro dia após o enxerto, bem como a perfusão completa no 6º dia. Sabe-se que a revascularização de fragmentos do córtex ovariano de roedores começa dentro de 48h, no mínimo (DISSEN et al. , 1994), já em humanos (VAN EYCK et al. , 2009) e caprinos (SANTOS et al. , 2009) o tecido ovariano permanece hipóxico até 5 e 6 dias pós-transplante, respectivamente.

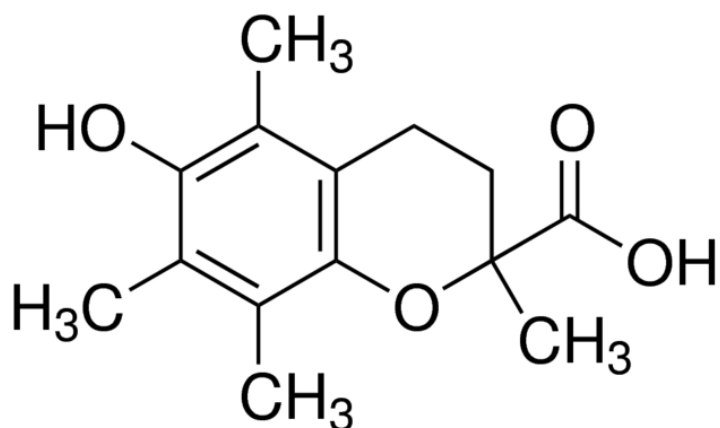
Até o momento, foram descritos métodos para controlar os danos hipóxicos e melhorar a revascularização do transplante, os quais incluem controlar o dano isquêmico por tratamentos anti-oxidantes como a vitamina E (NUGENT et al., 1998; ABIR et al., 2011) e melatonina (SAPMAZ et al., 2003). O processo de angiogênese está interligado com vários componentes, como respostas endoteliais, e a via oxidativa também se mostra como um componente chave durante todo este processo (USHIO-FUKAI; URAO, 2009).

A vitamina E é um sequestrador de radicais livres, com um amplo espectro de atividade antioxidante e função anti- apoptótica (LISSONI, 2007; MOLPECERES et al., 2007; BRIGELIUS-FLOHE, 2009). Nugent et al. (1998) relataram maior sobrevivência

folicular em fragmentos de ovário em ratos xenotransplantados, suplementados com vitamina E, após a cirurgia. O pré-tratamento do tecido com a vitamina E também aparece como um processo adequado para evitar o estresse oxidativo no tecido ovariano. Friedman et al. (2012) demonstraram que o tratamento do enxerto com o *Vascular endothelial growth factor* (VEGF), o óleo de vitamina E e o ácido hialurônico (HA), juntamente com o tratamento do hospedeiro com melatonina melhorou a sobrevivência do enxerto humano transplantado em ratos durante uma semana.

De modo semelhante, o análogo hidrossolúvel da vitamina E, Trolox (ácido - 2 - carboxílico , 5,7,8 - tetrametilcroman - 6 -hidroxi- 2) tem sido utilizado com sucesso para preservar a morfologia de folículos pré-antrais, após a suplementação do meio de criopreservação (LUZ et al., 2012), evitando o estresse do retículo endoplasmático no tecido ovariano congelado-descongelado de macaco-prego, após o cultivo *in vitro* (BRITO et al. , 2014), além de estabilizar os lipídeos da membrana celular (BRADFORD et al., 2003).

A principal vantagem do Trolox é o perfil duplo de solubilidade , quando comparado com outros antioxidantes, que normalmente são unicamente lipossolúveis, como a vitamina E. Em decorrência a sua estrutura cromanol, que lhe confere atividade anti-oxidante e o grupo carboxílico, o qual é moderadamente hidrossolúvel, o Trolox® (Figura 5) exerce seu efeito em ambas as fases da bicamada lipídica das biomembranas (BARCLAY et al. , 1995).



Formula molecular: $C_{14}H_{18}O_4$

Massa Molar: 250.29 g mol⁻¹

IUPAC: 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid

Figura 5- Nomenclatura IUPAC, estrutura química, fórmula molecular e massa molar do Trolox®, análogo hidrosolúvel da vitamina E.

Fonte: Adaptado de Sigma Chemical Co., 2014.

4 TRANSPLANTE OVARIANO: DESTAQUES NA REPRODUÇÃO DE PRIMATAS NÃO HUMANOS

Artigo submetido na revista *Acta Scientiae Veterinariae*
(Formatação conforme normas da revista)

Ovarian transplantation: highlight to non-human primates reproduction

Sarah Raphaella Rocha de Azevedo Scalercio^{1,2*}, Luana de Nazaré da Silva Santana³, Sheyla Farhayldes Souza Domingues¹, Christiani Andrade Amorim⁴, Regiane Rodrigues dos Santos^{1,5}

¹Laboratory of Wild Animal Biology and Medicine, Federal University of Pará, Castanhal, Pará, Brazil.

²National Primate Centre, Secretary of Health Policy, Ministry of Health, Ananindeua, Pará, Brazil.

³Laboratory of Experimental Neuroprotection and Neurodegeneration, Federal University of Pará, Castanhal, Pará, Brazil.

⁴Pôle de Recherche en Gynécologie, Institut de Recherche Expérimentale et Clinique, Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium.

⁵Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands.

*Corresponding author: S.R.R.A. Scalercio (sarah.scalercio@cenp.org.br; sarahscalercio@gmail.com) Rodovia BR-316 km 7 s/n, Levilândia, CEP 67030-000, Ananindeua, Pará, Brasil. Tel.: +55 91 32130441; fax: +55 91 32650304.

ABSTRACT

Introduction: Ovarian transplantation in nonhuman primates (NHP) has been used as a strategy for the development of experimental models for biomedical research in the reproductive area. The prospects for application of this technique range from the restoration of female fertility to the conservation of endangered wild animals. However, in NHPs studies were performed mostly with the ovarian transplantation of cryopreserved tissue, in order to simulate the reality of the human species, and in order to obtain experimental models suitable for comparative studies. On the other hand, ovarian transplantation could be applied also in PHN preservation.

Review: According to the last census (2012-2014) of the International Union for Conservation of Nature (IUCN), currently, more than half of the 633 types of primates known around the world are in danger of disappearing forever due to the continued destruction of their natural habitat by human activities. Thus, there is an interest to expose the possible methods of ovarian preservation followed by transplantation that can be employed to promote the conservation of endangered NHP. Despite the positive results obtained with avascular autograft of fresh ovarian tissue in NHP, it is important to bring in mind the significant loss of follicles as a result of this procedure due to ischemia and reperfusion during the first days after grafting. This phenomenon leads to the production of reactive oxygen species (ROS) and subsequent follicular loss. An alternative to avoid the damage caused by ischemia is the whole ovarian transplantation with vascular anastomosis. Therefore, a greater proportion of the pool of follicles survives the procedure and the complete ovary is grafted and not only tissue fragments. However, the vascular microsurgical procedure is complex and, when it is associated with cryopreservation the risks of follicular loss and tissue damage due to improper perfusion are larger. Therefore, graft treatment with antioxidants before transplantation of cortical fragments appears as an alternative. In this context, the aim of this review is to cover

important concepts about ovarian transplantation and its current situation in NHP, showing its importance and its advances to reproduction, especially to preserve those endangered ones.

Conclusion: Despite advances in tissue response to various applications of the ovarian tissue transplantation reported in this review, it is clear that this technique has been used with paucity as a tool for the conservation of species of PNH endangered. The need for optimization of transplantation techniques, so as to reduce the loss of the follicles during the grafting processes and revascularization, determining the ideal location for the graft, the graft longevity and where in the amount of ovarian tissue required to preserve fertility still are points to be clarified. In this sense, research is ongoing and the perspectives are positive not only to use NHP as a model for human, but also for those endangered species.

Keywords: Transplantation, ovarian function, reproduction, primates.

Descritores: Transplante, função ovariana, reprodução, primatas.

*Parte da tese de doutorado intitulada “Análise imunohistológica e desenvolvimento folicular após auto-transplante subcutâneo de tecido ovariano de macaco de cheiro”, elaborada com apoio financeiro da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

I. INTRODUÇÃO

II. AUTOTRANSPLANTE E XENOTRANSPLANTE DE TECIDO OVARIANO

III. MÉTODOS PARA OBTENÇÃO DE AMOSTRAS UTILIZADAS NO TRANSPLANTE OVARIANO

IV. TRANSPLANTE DE TECIDO OVARIANO FRESCO OU CRIOPRESERVADO

V. METODOS PARA OTIMIZAÇÃO DO TRANSPLANTE OVARIANO

VI. METODOS PARA AVALIAÇÃO DO TRANSPLANTE OVARIANO

VII. PRINCIPAIS RESULTADOS EM PRIMATAS

VIII. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

REFERÊNCIAS

I. INTRODUÇÃO

O transplante ovariano em primatas não humanos (PNH) vem sendo utilizado como uma estratégia para o desenvolvimento de modelos experimentais para pesquisas biomédicas na área da reprodução, visando o estudo comparativo com a espécie humana [4]. Associada à criopreservação, as perspectivas para aplicação desta técnica, vão desde a restauração da fertilidade feminina [17] à conservação de animais silvestres em risco de extinção [30, 32, 34].

Apesar dos resultados positivos obtidos com o autotransplante avascular de tecido ovariano fresco em PNH [23], deve ser levado em consideração a perda significativa de folículos [5, 28], em função da isquemia e reperfusão, sofrida pelo tecido enxertado, nos primeiros dias após o procedimento. Durante esse momento, espécies reativas de oxigênio (EROs) são liberadas e radicais como peróxidos, superóxidos e hidroxilas se encontram livres em sua forma reativa [21]. Estes radicais livres são caracterizados por efetuarem a peroxidação lipídica, que por sua vez causam danos à membrana celular [46].

Assim, quanto mais se reduzir danos provenientes do estresse oxidativo devido a isquemia, maior será a proporção de folículos que sobreviverão ao procedimento, levando ao aumento da longevidade e sucesso do transplante ovariano. Dentre as possíveis alternativas que podem ser usadas para evitar os danos celular causados pela isquemia pós-transplante, sugere-se a utilização sistêmica ou local de antioxidantes e vitaminas com capacidade de sequestrar radicais livres. Por exemplo, hospedeiro ou enxerto tem sido tratados com vitamina E [1, 18, 29] ou Trolox® [34].

Uma vez otimizada, a implementação da técnica do transplante para PNH em risco de extinção pode representar uma alternativa para conservação de espécies, principalmente de tecido previamente coletado, criopreservado e mantido em criobancos. Segundo o último senso (2012-2014) da União Internacional da Conservação da Natureza (IUCN) [20], entre os 25 primatas mais ameaçados do mundo, estão dois brasileiros: o macaco-caiarara (*Cebus*

kaapori) encontrado, sobretudo na Amazônia, e o bugio-marrom (*Alouatta guariba guariba*), que vive na Mata Atlântica de Minas Gerais. O continente africano é o que abriga o maior número de espécies de primatas que estão em grave risco de extinção: são 11, sendo que seis delas são endêmicas da Ilha de Madagascar. Em segundo lugar aparece o continente asiático, com nove espécies listadas no relatório da IUCN, seguido pela América do Sul, que tem cinco.

Ainda segundo o estudo, atualmente, mais da metade dos 633 tipos de primatas conhecidos em todo o mundo correm perigo de desaparecer para sempre, devido à contínua destruição de seu habitat natural, por conta de ações humanas, como queima e desmatamento de florestas tropicais, caça para alimentação e comércio ilegal de animais silvestres. Deste modo, existe o interesse de expor as possíveis metodologias de transplante de tecido ovariano que podem ser empregadas, visando a conservação de PNH em risco de extinção.

Neste sentido, na presente revisão traremos informações acerca do transplante ovariano e suas aplicações para a reprodução de PNH, mostrando sua importância e seus avanços nas diferentes espécies de primatas, abordando esta biotécnica como uma ferramenta importante, não só para estudos experimentais, que visem a restauração da fertilidade feminina, mas também como uma alternativa para a conservação de PNH em perigo de extinção.

II. AUTOTRANSPLANTE E XENOTRANSPLANTE DE TECIDO OVARIANO

Os estudos com autotransplante de tecido ovariano em PNH mostram que, tanto para autotransplante heterotópico quanto ortotópico, folículos ovarianos provenientes de tecidos frescos e congelados são capazes de se desenvolver após esse procedimento. Entre os sítios de transplante já utilizados podem ser citados o intraperitoneal [15, 19] e o subcutâneo [23, 36, 34], tendo o último como vantagem a ausência de cirurgias complicadas e anestesia geral, requeridas no caso de transplante na cavidade abdominal, além de permitir o fácil

monitoramento do enxerto [23]. No entanto, no transplante subcutâneo, o risco de baixa irrigação sanguínea aparece como uma desvantagem [11]. Além disso, diferenças entre pressão e temperatura quando a cavidade abdominal e a área subcutânea são comparadas, podem exercer um papel fundamental no desenvolvimento folicular [14]. Lee et al. [23], obtiveram sucesso com nascimento de prole saudável, após transplante heterotópico de fragmentos de ovário fresco. Contudo, em humanos, esse tipo de transplante nunca resultou em nascimento ou não houve relato ocorrido até a presente data.

Com relação ao autotransplante ortotópico de tecido ovariano, esta foi a primeira metodologia empregada, utilizando tecido ovariano fresco de macaco rhesus [37]. Décadas depois, Amorim et al. [4] obtiveram bons resultados em babuínos, após vitrificação seguida de autotransplante ortotópico de tecido ovariano sob a área decorticada, de onde o ovário foi removido.

De maneira geral, observando os trabalhos já desenvolvidos com autotransplante ovariano de PNH (ver Tabela 1), o autotransplante heterotópico de tecido ovariano se mostra como o mais frequentemente realizado, quando comparado com o autotransplante ortotópico. Nas duas situações, os procedimentos foram realizados buscando investigar a função folicular, após protocolos de criopreservação ou não, testando substâncias ou diferentes locais de transplantes, e entre os PNH mais utilizados, destacam-se os do gênero *Macaca* e a espécie *Papio anubis*.

Tabela 1: Autotransplante de tecido ovariano realizado em PNH: principais resultados por espécie.

Espécie	Tipo de enxerto	Espécimes	Resultados
<i>Macaca mulatta</i> [37]	Ortotópico	Ovário inteiro fresco	Ciclicidade ovariana com desenvolvimento folicular e ovulação
<i>Macaca fascicularis</i> [36]	Heterotópico Subcutâneo	Fragmentos de tecido congelados	Ciclicidade ovariana e produção de oócitos maduros
<i>Macaca mulatta</i> [23]	Heterotópico Subcutâneo	Fragmentos de tecido fresco	Desenvolvimento folicular, ICSI ¹ bem sucedida, gravidez com nascimento saudável.
<i>Macaca fascicularis</i> [19]	Heterotópico omento e fossa ilíaca retroperitoneo	Fragmentos de tecido congelados	Ciclicidade ovariana com obtenção de oócitos aptos à FIV ² gerando 5 embriões.
<i>Papio Anubis</i> [15]	Heterotópico omento livre, omento adjacente ao baço, saco de Douglas e parede pélvica dos psoas do músculo	Fragmentos de tecido fresco	Locais omentais proporcionaram melhor sobrevida folicular
<i>Macaca fascicularis</i> [38]	Heterotópico fossa ilíaca retroperitoneo, omento, serosa uterina e mesossalpinge	Fragmentos de tecido vitricado	Desenvolvimento folicular, ICSI com transferência de embriões
<i>Papio Anubis</i> [3]	Ortotópico	Fragmentos de tecido vitricado	Desenvolvimento folicular até fase antral
<i>Saimiri collinsi</i> [34]	Heterotópico	Fragmentos de tecido fresco	Trolox® melhorou a sobrevida de folículos preantrais, protegeu da massiva ativação de folículos primários, reduziu a apoptose dos folículos e estroma.

¹ICSI = Injeção intracitoplasmática de espermatozoides; ²FIV = Fertilização *in vitro*

O xenotransplante consiste em outra possibilidade, na qual são utilizados camundongos imunossuprimidos como receptores do tecido ovariano, com o objetivo de obter oócitos maduros aptos para Fertilização *in vitro* (FIV) e posterior transferência de embriões para uma fêmea PNH.

O xenotransplante, no entanto, em PNH até o momento só foi realizado visando o desenvolvimento de protocolos de criopreservação para humanos, utilizando esse modelo animal para testes comparativos [10, 42, 43, 44].

Apesar disso, esta abordagem representa uma valiosa ferramenta, para utilização em PNH neotropicais em risco ou ameaçados de extinção, uma vez que animais que tenham ido a óbito, podem ter seu tecido ovariano criopreservado e então xenotransplantado em camundongos imunossuprimidos.

Adicionalmente, quando se pensa em amostras de criobancos, o xenotransplante é ainda, a única técnica que se aplica como uma alternativa para a recuperação da biodiversidade genética de material criopreservado de animais já extintos ou em risco de extinção. Apesar de ser uma técnica promissora, interações hormonais e alterações epigenéticas precisam ser consideradas.

É importante ressaltar que a coleta de tecido ovariano de animais ameaçados de extinção provavelmente ocorrerá após a morte destes, sendo indicada a criopreservação do tecido para posterior xenotransplante ou mesmo alotransplante.

Para o alotransplante, faz-se necessária a utilização de testes laboratoriais específicos de compatibilidade entre os indivíduos, como o teste de histocompatibilidade (HLA), necessitando que as amostras de tecido do doador sejam suficientes para a realização desse teste, além da necessidade da terapia para imunossupressão no receptor.

Na Tabela 2 é possível observar de forma resumida os trabalhos já desenvolvidos com xenotransplante ovariano de PNH, onde a espécie *Callithrix jacchus* foi a única utilizada para esse fim.

Tabela 2: Xenotransplante ovariano realizados em PNH, tipos e espécimes clínicos utilizados.

Espécie	Tipo de enxerto	Espécimes	Resultados
<i>Callithrix jacchus</i> [10]	Camundongo imunodeficiente	Fragmentos de tecido fresco e congelados	Desenvolvimento folicular até fase antral
<i>Callithrix jacchus</i> [42]	Camundongo imunodeficiente	Fragmentos de tecido fresco e congelados	Desenvolvimento de folículos secundários e preantrais, pós congelação
<i>Callithrix jacchus</i> [43]	Camundongo imunodeficiente	Fragmentos de tecido fresco e congelados	Eficácia do DMSO ¹ versus PrOH ² em adultos, mas não em pré-púberes
<i>Callithrix jacchus</i> [44]	Camundongo imunodeficiente	Fragmentos de tecido fresco e congelado	Manutenção do <i>pool</i> de folículos primordias, com morfologia normal

¹DMSO = Dimetilsulfóxido; ²PrOH = Propilenoglicol

III. MÉTODOS PARA OBTENÇÃO DE AMOSTRAS UTILIZADAS NO TRANSPLANTE OVARIANO

A ovariectomia, técnica cirúrgica que consiste na remoção total do ovário, está sendo comumente empregada em PNH para obtenção de fragmentos de tecido ovariano a serem transplantados, tendo como foco a obtenção da porção cortical [4, 15, 23, 36, 38, 44]. Neste caso, a ovariectomia simula a esterilidade adquirida, permitindo assim o estudo com modelos de experimentação animal para a espécie humana. Ou seja, testando a situação em pacientes e protocolos a serem empregados para o desenvolvimento e/ou aperfeiçoamento desta biotécnica para as pesquisas biomédicas. Contudo, o animal estudado perde sua capacidade reprodutiva.

A ovariectomia pode ser procedida por cirurgia laparoscópica, onde a cavidade abdominal é acessada por meio de sondas introduzidas por pequenos orifícios realizados cirurgicamente, sendo esta já realizada em PNH [4, 23], ou ainda laparotomia, onde o acesso acontece através da abertura da cavidade abdominal, representando esta, a mais frequente técnica empregada na obtenção de tecido ovariano para utilização em transplante [15, 36, 38, 44].

Para evitar que a fêmea doadora de tecido ovariano torne-se infértil, a remoção de fragmentos de tecido ovariano também tem sido empregada. Além de permitir o uso de material para o desenvolvimento de biotécnicas ligadas à reprodução, essa alternativa tem ainda como vantagem a preservação da estrutura do ovário [30]. Em macacos-prego, por exemplo, a adaptação da técnica “trap door” tem sido proposta como um procedimento ideal para a recuperação de fragmentos de tecido ovariano uma vez que se restringe à remoção da camada cortical do ovário, onde se encontram incrustados os folículos pré-antrais nos seus diversos estágios de desenvolvimento, sem afetar a vida reprodutiva da fêmea [30].

IV. TRANSPLANTE OVARIANO FRESCO OU CRIOPRESERVADO

O transplante de tecido ovariano tem sido realizado em PNH utilizando tecido ovariano fresco ou criopreservado. Inicialmente, Scott et al. [37] obtiveram sucesso após o transplante utilizando o ovário inteiro fresco. Somente anos depois Candy et al. [10] retomaram experimentos de transplante de tecido ovariano fresco e criopreservado em PNH. A partir de então, a utilização de tecido ovariano fresco ou criopreservado, tem sido amplamente empregada em PNH [4, 15, 23, 36, 34, 38, 42, 43, 44].

1. Tecido ovariano fresco

O transplante de tecido ovariano fresco tem sido utilizado de diversas maneiras em PNH. Entre estas aplicações comumente realizadas tem-se: o aprimoramento de técnicas cirúrgicas de transplante, como o estudo de Díaz-García et al. [15], que testa quatro sítios diferentes de autotransplante heterotópico, afim de identificar os locais ideais, para estudar o desenvolvimento folicular pós-transplante; e os testes com substâncias de interesse, para o aperfeiçoamento da técnica, servindo como ferramenta para avaliar o desenvolvimento folicular após o tratamento empregado. Lee et al. [23], por exemplo, administraram hCG em macaco rhesus, após autotransplante subcutâneo e obtiveram oócitos maduros, que através de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) foram fecundados, resultando em gravidez bem sucedida em fêmeas, e o nascimento de uma prole saudável. Recentemente, nosso grupo realizou com sucesso o transplante de tecido ovariano fresco com o intuito de reduzir os danos da isquemia pós-transplante [34].

2. Tecido ovariano criopreservado

Como anteriormente mencionado, os estudos direcionados ao transplante de tecido ovariano criopreservado visam desenvolver ou otimizar protocolos de criopreservação para uso em humanos, para a obtenção do retorno da função ovariana após tratamento do câncer [17], ou em PNHs, com o objetivo de conservação de espécies em risco de extinção.

Na literatura, diferentes protocolos de criopreservação têm sido testados em PNHs. Comparando tecido ovariano fresco e criopreservado, Candy et al. [10] observaram desenvolvimento folicular até a fase antral em macaco sagüi comum, após xenotransplante em camundongos imunossuprimidos. Após autotransplante heterotópico de tecido ovariano fresco e criopreservado, Schnorr et al. [36] obtiveram restauração da função ovariana, ciclicidade menstrual e produção de oócitos maduros em cinomolgos. Na mesma espécie, Igarashi et al. [19], observaram a retomada da função hormonal, do ciclo menstrual, com fecundação *in vitro* bem sucedida, resultando em cinco embriões, após autotransplante heterotópico de tecido congelado; ainda em cinomolgo, Suzuki et al. [38] realizaram a transferência de embriões, após autotransplante heterotópico de tecido vitrificado, seguido da superovulação hormonal induzida, onde o desenvolvimento folicular foi alcançado, procedendo-se com a ICSI seguida da transferência de embriões. Contudo, o nascimento de prole não foi obtido após vitrificação até presente data, sendo ainda necessários mais estudos sobre as condições desta metodologia.

Com saguis pré-púberes, Von Schönfeldt et al. [42] testaram o xenotransplante heterotópico, comparando os resultados encontrados em tecido congelado e fresco, sendo observado o desenvolvimento folicular até a fase antral. Em um segundo momento, Schönfeldt et al. [43], com animais pré-púberes e adultos, testou o efeito de dois crioprotetores diferentes, após xenotransplante heterotópico, e concluíram que em adultos o

crioprotetor dimetilsulfóxido (DMSO) é mais eficaz que o propilenoglicol (PrOH) na criopreservação de tecido ovariano.

O mesmo grupo [44] procedeu com a criopreservação utilizando DMSO, seguida do xenotransplante heterotópico com estimulação hormonal, administrando FSH pós-transplante. Foi possível observar a manutenção do pool de folículos primordiais, com morfologia normal. Em babuínos, Amorim et al. [4], utilizaram fragmentos de tecido vitrificado e obtiveram desenvolvimento folicular até fase antral e corpos lúteos também foram observados, confirmando a ovulação bem sucedida.

V. METODOS PARA OTIMIZAÇÃO DO TRANSPLANTE OVARIANO

Dentre os fatores que influenciam o sucesso do transplante ovariano, pode-se citar o processo de revascularização. Em transplantes avasculares, esse processo é normalmente lento e acarreta a degeneração folicular em decorrência da isquemia tecidual e do estresse oxidativo, caracterizado por apoptose e o desenvolvimento de alterações fibróticas, além da diminuição na proliferação celular [23].

A hipóxia também pode ser responsável pela diminuição no tamanho do enxerto, com presença de fibrose e perda crítica de até 90% dos folículos primordiais nos primeiros dias após o transplante [22]. Vale ainda à pena mencionar que em humanos, a angiogênese de fragmentos do córtex ovariano tem início dentro de, pelo menos, 5 dias pós-transplante [22], sendo necessário 10 dias para uma total vascularização e reoxigenação do transplante [40, 41]. Baseado em estudos realizados em outras espécies mamíferas [33], estima-se que o tempo de revascularização do transplante ovariano em PNH também seja de cerca de uma semana.

Com o objetivo de aperfeiçoar os resultados obtidos no transplante ovariano, diferentes abordagens já foram propostas, desde o tratamento da amostra até do receptor do transplante. A fim de controlar os danos hipóxicos e melhorar a revascularização do

transplante, os quais incluem o controle do dano isquêmico, tratamentos com vitaminas, como a vitamina E [1, 29], têm sido propostos. O processo de neoangiogênese é complexo, com interligação de vários componentes celulares, como as respostas endoteliais e a via oxidativa, que se mostra um componente-chave durante todo o processo [39].

A utilização da vitamina E tem sido realizada devido aos estudos que mostram que ela é um sequestrador de radicais livres, com um amplo espectro de atividade antioxidante e função anti-apoptótica [27]. No entanto, sua função como antioxidante lipofílico ainda é questionada, visto que sua atividade antioxidante *in vivo* ainda não foi comprovada. Por outro lado, novas funções da vitamina E têm sido propostas, incluindo a regulação das enzimas ligadas à membrana ou ativação por recrutamento da membrana e ainda participação em vias de resposta inflamatória e tráfego celular [6]. Deste modo, a vitamina E com seus variados mecanismos de ação, pode então exercer seu papel na proteção celular.

No tecido ovariano, o pré-tratamento com a vitamina E aparece como um processo adequado para evitar o estresse oxidativo no tecido ovariano. Friedman et al. [18] demonstraram que o tratamento do enxerto com fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), óleo de vitamina E e ácido hialurônico (HA), juntamente com o tratamento do receptor com melatonina, melhorou a sobrevivência do enxerto humano xenotransplantado em camundongos durante uma semana.

No que se refere à utilização de antioxidantes, a suplementação do meio de criopreservação com Trolox, um análogo solúvel da vitamina E, resultou em uma maior sobrevivência dos folículos de macaco prego (*Sapajus apella*) [9]. E ainda recentemente, a prévia exposição do tecido ao Trolox, aumentou a sobrevivência folicular após autotransplante subcutâneo de tecido ovariano em macaco de cheiro (*Saimiri collinsi*), impedindo a massiva ativação folicular, e mantendo os percentuais de folículos morfolologicamente normais mais elevados que em enxertos não tratados. A expressão do

hormônio anti-Mulleriano (AMH) em folículos em desenvolvimento foi observado somente nos controles e enxertos tratados com Trolox, bem como, o fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF-9) foi positivo apenas em folículos primordiais de controles e de enxertos tratados com Trolox. Contudo, tratamento do enxerto com esse antioxidante resultou em fibrose tecidual, principalmente devido a um aumento da síntese de colágeno tipo I [35].

Terapias hormonais pós-transplante também têm sido amplamente utilizadas em PNH, uma vez que representam uma alternativa para o sucesso do transplante. Entre estas, podemos citar a administração da gonadotrofina coriônica humana (hCG), objetivando simular a produção placentária fisiológica, estimulando a produção de esteroides, essenciais para desenvolvimento do embrião.

A terapia hormonal utilizando hCG foi uma abordagem utilizada por Lee et al. [23] em macaco rhesus após o autotransplante heterotópico de fragmentos de tecido fresco e resultando no desenvolvimento folicular seguido da ICSI, gravidez e nascimento de um filhote saudável.

A associação de agonista de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) com hormônio folículo-estimulante (FSH), acelerando o desenvolvimento folicular, visando a superovulação, bem como a administração de hCG, que foi realizada por Igarashi et al. [19] após o autotransplante heterotópico de tecido ovariano congelado; foi obtido o retorno da ciclicidade ovariana, com oócitos aptos à fecundação *in vitro* (FIV) gerando 5 embriões.

A super ovulação utilizando agonista de GnRH recombinante, FSH recombinante, hCG e gonadotrofina sérica de égua prenhe após autotransplante heterotópico de tecido ovariano vitrificado, obtendo o desenvolvimento folicular, seguido da ICSI com transferência de embriões [38].

E também o uso do FSH, utilizado como estimulador da ovulação, após xenotransplante de tecido ovariano de saguis em camundongos, sendo observada a

manutenção do *pool* de folículos primordiais, com morfologia normal, após a transplante tecido ovariano criopreservado [44]. O resumo dos variados sítios de transplante e tratamentos utilizados para o sucesso do transplante em PNH pode ser visualizado na Tabela 3.

Tabela 3: Transplante ovariano em PNH e alternativas utilizadas para o sucesso da técnica.

Espécie	Sítio do enxerto	Tratamento utilizado	Resultados
<i>Macaca mulatta</i> [37]	Anastomose vascular direta do ovário	-	Ciclicidade ovariana com desenvolvimento folicular e ovulação
<i>Callithrix jacchus</i> [10]	Embaixo da cápsula renai	-	Desenvolvimento folicular até fase antral
<i>Macaca fascicularis</i> [36]	Subcutâneo	VEGF ¹	Ciclicidade ovariana e produção de oócitos maduros
<i>Macaca mulatta</i> [23]	Subcutâneo	hCG ²	Desenvolvimento folicular, ICSI ⁷ bem sucedida, gravidez com nascimento saudável.
<i>Macaca fascicularis</i> [19]	Omento e fossa ilíaca retroperitoneo	Agonista de GnRH ³ , FSH ⁴ recombinante e hCG,	Ciclicidade ovariana com obtenção de oócitos aptos à FIV ⁸ gerando 5 embriões.
<i>Papio Anubis</i> [15]	Omento livre, omento adjacente ao baço; no saco de Douglas e na parede pélvica dos psaos do músculo	-	Locais omentais proporcionaram melhor sobrevida folicular
<i>Macaca fascicularis</i> [38]	Fossa ilíaca retroperitoneal, omento, serosa uterina e mesossalpinge	Agonista de GnRH, gonadotrofina sérica de égua prenhe, FSH recombinante e hCG	Desenvolvimento folicular, ICSI ⁸ com transferência de embriões
<i>Callithrix jacchus</i> [42]	Subcutâneo	-	Desenvolvimento folicular até fase antral
<i>Callithrix jacchus</i> [43]	Subcutâneo	DMSO ⁵ e PrOH ⁶	Eficácia do DMSO versus PrOH em adultos, mas não em pré-púberes
<i>Callithrix jacchus</i> [44]	Subcutâneo	FSH	Manutenção do <i>pool</i> de folículos primordiais, com morfologia normal
<i>Papio anubis</i> [3]	Área decorticada ovariana	-	Desenvolvimento folicular até fase antral
<i>Saimiri collinsi</i> [34]	Subcutâneo	Trolox®	

¹VEGF = *Vascular endothelial growth factor* ; ² hCG = Gonadotrofina coriônica humana; ³GnRH = Hormônio liberador de gonadotrofina; ⁴FSH = Hormônio folículo estimulante; ⁵DMSO = Dimetilsulfóxido; ⁶PrOH = Propilenoglicol; ⁷ICSI = Injeção intracitoplasmática de espermatozoides; ⁸FIV = Fertilização *in vitro*;

VI. MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DO TRANSPLANTE OVARIANO

Na avaliação do sucesso do transplante ovariano, a análise da morfologia folicular é imprescindível. Marcadores de funcionalidade folicular são importantes ferramentas para investigar a função ovariana pós-transplante, assim como marcadores de viabilidade celular [12, 13]. Mais do que isso, o tecido ovariano enxertado também deve ser investigado como um todo. As células estromais devem ser avaliadas, conforme sua organização e se há presença de células com núcleos picnóticos. As alterações fibróticas, a viabilidade tecidual e o estudo da angiogênese são indispensáveis para avaliar o sucesso do transplante [4].

1. Análises realizadas em PNH

Entre as variadas metodologias utilizadas para avaliar o sucesso do transplante de tecido ovariano, a histologia clássica, com lâminas coradas pela hematoxilina-eosina (HE), se mostra como ferramenta prática, fácil, preliminar e indispensável, possibilitando a avaliação da qualidade dos folículos, através de sua morfologia normal, que é baseada na densidade das células da granulosa, presença ou ausência de corpos picnóticos e integridade do oócito [4]. Contudo, somente a morfologia folicular isolada não se mostra suficiente para identificar a viabilidade, ultraestrutura e funcionalidade folicular após o transplante.

Já as análises imuno-histoquímicas estão voltadas para investigar fatores expressos no tecido ovariano, relacionados com a funcionalidade e viabilidade folicular. Em PNH, os fatores relacionados com a funcionalidade folicular têm sido investigados. Em tecido ovariano fresco de macaco de cheiro (*Saimiri collinsi*), sabe-se que fatores como AMH [45], GDF-9, Kit ligante (KL), c-kit e ki 67 estão presentes em folículos ovarianos, e podem ser utilizados como marcadores de função ovariana e qualidade folicular [35]. Em tecido ovariano transplantado, também foi investigada a marcação para GDF-9 e AMH em babuínos, após vitrificação e autransplante ortotópico [4], e em macaco de cheiro, no tecido ovariano fresco

transplantado, com e sem a exposição ao antioxidante trolox® foram utilizados AMH, GDF-9 e c-kit como marcações de funcionalidade folicular [34].

Com relação a viabilidade e ativação folicular, já se tem descrito a utilização dos seguintes marcadores para tal função: PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) para avaliar a proliferação celular e ativação de folículos, por marcação das células da granulosa de folículos em desenvolvimento, uma vez que este representa fator essencial para a replicação de DNA e crescimento celular, e foi investigado após transplante heterotópico em camundongos imunossuprimidos, de tecido ovariano fresco e congelado de saguis comum [43]; Ki-67, assim como o PCNA foi utilizado para investigar a proliferação celular e ativação folicular com positividade em células da granulosa de folículos em crescimento, em tecido ovariano fresco transplantado, com e sem a exposição ao antioxidante trolox® em macaco de cheiro [34]; e caspase-3 que foi empregada como ferramenta para avaliar a apoptose, pela ausência ou presença da marcação em células da granulosa e oócito, após vitrificação e transplante de tecido ovariano de babuínos [4].

Outras marcações específicas se mostram importantes, para avaliar o tecido ovariano transplantado, como a quantificação de vasos, utilizando a positividade para CD31 (*cluster of differentiation 31*), uma vez que a neoangiogênese do tecido transplantado é indispensável à sobrevivência do tecido transplantado, além da análise da proporção de fibrose tecidual, que representa importante predição da regeneração e cicatrização tecidual após o transplante, sendo estas utilizadas em babuínos, após vitrificação e transplante de tecido ovariano [4] e em macaco de cheiro após transplante de tecido ovariano fresco, com e sem a exposição ao trolox® [34].

O monitoramento, antes e após o transplante, dos níveis de esteroides sexuais foi empregado objetiva verificar a ciclicidade ovariana em humanos [17]; em macaco rhesus, após o autotransplante subcutâneo de tecido ovariano fresco, com administração de hCG [23];

em babuínos, após o autotransplante heterotópico de tecido ovariano fresco [15]; em macaco cinomolgo por Igarashi et al. [19] e Suzuki et al. [38], após autotransplante heterotópico de tecido congelado e vitrificado respectivamente, seguido da associação hormonal para super ovulação.

Adicionalmente, métodos de investigação por imagem vêm sendo empregados no acompanhamento do transplante de tecido ovariano de PNH, entre eles a ultrassonografia realizada por Lee et al. [23] e tomografia computadorizada (TC) utilizada por Suzuki et al. [38], que permitem o avaliar do processo de angiogênese, através da visualização de vasos sanguíneos, confirmando a sobrevivência do enxerto e representam metodologias relevantes para o monitoramento de transplante ovariano.

2. Análises realizadas em humanos

Em humanos, as metodologias empregadas na avaliação do transplante ovariano seguem a mesma linha de investigação das utilizadas em PNH. Todavia, o número de estudos é mais representativo. As principais análises empregadas foram: histologia clássica [3], imuno-histoquímica com marcação de fatores expressos no tecido ovariano relacionados com a regulação do desenvolvimento folicular inicial, tais como GDF-9, AMH [13, 26], c-kit [12] e KL [12, 13], é um método eficaz para avaliar a funcionalidade folicular pós-transplante [3].

Além da análise dos folículos, também é essencial avaliar o tecido ovariano em si, uma vez que ele tem importância primordial na sobrevivência e desenvolvimento foliculares. Nesse sentido, assim como em PNH [4], a investigação da apoptose por dano ao DNA, a proliferação celular e a quantificação da fibrose pela coloração de tricromo de Masson têm sido utilizados como métodos de avaliação da qualidade tecidual em humanos [3].

VII. PRINCIPAIS RESULTADOS EM PRIMATAS

A maior parte dos estudos de transplante ovariano realizados em PNH foi direcionada para aplicação desta técnica para estudos de aperfeiçoamento e utilização como modelo experimental para humano, utilizando principalmente espécies do Velho Mundo, como babuínos - *Papio Anúbis* [4, 15], macaco cinomolgo - *Macaca fascicularis* [19, 36, 38] e macaco rhesus - *Macaca mulatta* [23].

O autotransplante ortotópico foi realizado por Scott et al. [37] em macaco rhesus a partir do ovário inteiro fresco e com a anastomose vascular direto do ovário. Os autores observaram retorno da ciclicidade ovariana com desenvolvimento folicular e ovulação.

O desenvolvimento folicular até fase antral foi obtido por Schnorr et al. [36], após autotransplante subcutâneo de 120 dias, de fragmentos de tecido ovariano fresco e congelado de macaco-cinomolgo (*Macaca fascicularis*), tratados com fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). Díaz-García et al. [15] concluíram que a região do omento proporcionou melhor sobrevida folicular, quando comparado com a parede pélvica e saco de Douglas, após autotransplante heterotópico de tecido fresco em babuínos.

Já em cinomolgos, Suzuki et al. [38] obtiveram embriões a partir de fragmentos de tecido ovariano que foram vitrificados e autotransplantados heterotopicamente. Os oócitos foram coletados, após associação hormonal para superovulação, fertilizados através de ICSI e os embriões obtidos foram transferidos. Também com fragmentos de tecido vitrificado, porém em babuínos e sem terapia hormonal, Amorim et al. [4] obtiveram desenvolvimento folicular até fase antral, com presença de corpos lúteos, confirmando a ovulação bem sucedida, além da presença de folículos ativamente funcionais, evidenciada pela positividade aos marcadores de funcionalidade e viabilidade folicular, indicado pela presença das proteínas GDF-9, AMH, e Ki67, após vitrificação e autotransplante ortotópico do tecido ovariano. A qualidade do tecido estromal não se mostrou afetada, no que diz respeito a vascularização, onde não foi observada

diferença entre o número de vasos no tecido vitrificado e transplantado, quando comparado com tecido fresco usado como controle, e da mesma forma para a fibrose tecidual, na qual as proporções de áreas fibróticas encontradas foram semelhantes as encontradas no tecido do ovário controle.

Pode-se considerar como melhor resultado o nascimento de prole saudável em macacas obtido por Lee et al. [23], porém é importante ressaltar que o autotransplante se deu a partir de tecido ovariano fresco. Já com tecido criopreservado convencionalmente destaca-se Igarashi et al. [19], que demonstraram a retomada da função hormonal, do ciclo menstrual e o fornecimento de oócitos aptos à fecundação *in vitro*, os quais resultaram em cinco embriões, após a superovulação e autotransplante heterotópico em cinomolgo.

Diferentemente de PNH do velho mundo, em espécies do novo mundo (neotropicais), os estudos relacionados à reprodução da fêmea ainda estão relacionados ao conhecimento da morfofisiologia ovariana e expressão gênica [2, 7], caracterização da maturação oocitária [16, 24] ou cultivos *in vitro* por curto período de tecido ovariano [8].

No que se refere ao transplante, é possível encontrar apenas estudos de xenotransplante ou transplante de tecido fresco. Von Schönfeldt et al. [44], por exemplo, testaram a criopreservação de tecido ovariano de saguis (*Callithrix jacchus*). Esses autores observaram que uma ou duas semanas, após o xenotransplante em camundongos, o tratamento com FSH reduziu a depleção do pool de folículos primordiais com morfologia normal, tanto no tecido fresco, quanto no congelado e descongelado enxertado. Com um desenho experimental similar, Candy et al. [10] verificaram desenvolvimento de folículos secundários e preantrais. Apesar desses autores não terem observado o desenvolvimento de oócitos fertilizáveis, a manutenção da estrutura folicular por si só já pode ser considerada um resultado promissor do transplante. De grande importância, recentemente conseguimos evitar a ativação massiva de folículos primordiais em transplantes [34]. Ou seja, o “burnout” que

ocorre comumente após o enxerto não ocorreu quando o tecido foi pre-tratado com um antioxidante.

VIII. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Apesar dos avanços obtidos, em relação à resposta tecidual às variadas situações e aplicações do transplante de tecido ovariano relatados nesta revisão, fica claro que pouco se tem direcionado para utilização dessa técnica como ferramenta para conservação de espécies de PNH em risco de extinção. A necessidade da otimização das técnicas de transplante, para que se reduza a perda dos folículos durante os processos de enxertia e de revascularização, a determinação do local ideal para enxerto, longevidade do enxerto e qual a quantidade de tecido ovariana necessária para preservar a fertilidade ainda são pontos a serem esclarecidos.

Neste sentido, além do uso de técnicas histológicas, moleculares e simulações com adição de substâncias que participem da foliculogênese e diminuam o estresse oxidativo no tecido, é necessário compreender o mecanismo de transplante no seu nível molecular atentando para alterações epigenéticas, bem como considerando reguladores inflamatórios durante a revascularização do tecido. Assim, a aplicação desta técnica não somente contribuirá para estudos comparativos com humanos, mas também para preservação de PNH em risco de extinção.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

Acknowledgements. Agradecemos à CAPES pela concessão de bolsa de doutorado sandwich para Sarah Raphaella Rocha de Azevedo Scalercio, processo no. 0503-12-6/2012.

REFERÊNCIAS

- 1 **Abir R., Fisch B., Jessel S., Felz C., Ben-Haroush A. & Orvieto R. 2011.** Improving posttransplantation survival of human ovarian tissue by treating the host and graft. *Fertility and Sterility*. 95(4): 1205-1210.
- 2 **Almeida D.V., Santos R.R., Scalercio S.R., Leão D.L., Haritova A., Oskam I.C. & Domingues S.F. 2012.** Morphological and morphometrical characterization, and estimation of population of preantral ovarian follicles from senile common squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Animal Reproduction Science*. 134(3-4): 210-215. **F.I. =1.581.**
- 3 **Amorim A.C., Jacobs S., Devireddy R.V., Langendonckt A.V., Vanacker J., Jaeger J, Luyckx V., Donnez J. & Dolmans M.M. 2013.** Successful vitrification and autografting of baboon (*Papio anubis*) ovarian tissue. *Human Reproduction*. 28(8): 2146-2156. **F.I.= 4.585.**
- 4 **Amorim C.A., Dolmans M.M., David A., Jaeger J., Vanacker J., Camboni A., Donnez J. & Van Langendonckt A. 2012.** Vitrification and xenografting of human ovarian tissue. *Fertility and Sterility*. 98(5): 1291-1298. **F.I. =4.295.**
- 5 **Baird D.T., Webb R., Campbell B.K., Harkness L.M. & Gosden R.G. 1999.** Long-term ovarian function in sheep after ovariectomy and transplantation of autografts stored at -196 C. *Endocrinology*. 140(1): 462-471.
- 6 **Brigelius-Flohe R. 2009.** Vitamin E: the shrew waiting to be tamed. *Free Radical Biology & Medicine*. 46(5): 543-554.
- 7 **Brito A.B., Lima J.S., Brito D.C., Santana L.N., Costa N.N., Miranda M.S., Ohashi O.M., Santos R.R. & Domingues S.F. 2013a.** Validation of reference genes for ovarian tissue from capuchin monkeys (*Cebus apella*). *Zygote*. 21(2): 167-171. **F.I.= 1.323.**
- 8 **Brito A.B., Santos R.R., van den Hurk R., Lima J.S., Miranda M.S., Ohashi O.M. & Domingues S.F. 2013b.** Short-term culture of ovarian cortical strips from capuchin monkeys

- (*Sapajus apella*): a morphological, viability, and molecular study of preantral follicular development in vitro. *Reproductive Sciences*. 20(8): 990-997. **F.I.= 2.179.**
- 9 Brito D.C., Brito A.B., Scalercio S.R., Percário S., Miranda M.S., Rocha R.M., Diniz J.A., Oskam I.C., Van den Hurk R., Paris M.C., Domingues S.F. & Santos R.R. 2014.** Vitamin E-analog Trolox prevents endoplasmic reticulum stress in frozen-thawed ovarian tissue of capuchin monkey (*Sapajus apella*). *Cell and Tissue Research*. 355(2): 471-480. **F.I.= 3.333.**
- 10 Candy C.J., Wood M.J. & Whittingham D.G. 1995.** Follicular development in cryopreserved marmoset ovarian tissue after transplantation. *Human Reproduction*. 10(9): 2334-2338.
- 11 Dath C., Van Eyck A.S., Dolmans M.M., Romeu L., DelleVigne L., Donnez J. & Van Langendonckt A. 2010.** Xenotransplantation of human ovarian tissue to nude mice: comparison between four grafting sites. *Reproductive biology*. 25(7): 1734-1743.
- 12 David A., Dolmans M.M., Van Langendonckt A., Donnez J. & Amorim C. 2011.** Immunohistochemical localization of growth factors after cryopreservation and 3 weeks' xenotransplantation of human ovarian tissue. *Fertility and Sterility*. 95(4): 1241-1246. **F.I.=4.295.**
- 13 David A., Van Langendonckt A., Gilliaux S., Dolmans M.M., Donnez J., & Amorim C.A. 2012.** Effect of cryopreservation and transplantation on the expression of kit ligand and anti-Mullerian hormone in human ovarian tissue. *Human Reproduction*. 27(4): 1088-1095. **F.I.= 4.585.**
- 14 Demeestere I., Simon P., Emiliani S., Delbaere A. & Englert Y. 2009.** Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation. *Human Reproduction Update*. 15(6): 649-665.

- 15 **Díaz-García C., Milenkovic M., Groth K., Dahm-Kähler P., Olausson M. & Brännström M. 2011.** Ovarian cortex transplantation in the baboon: comparison of four different intra-abdominal transplantation sites. *Human Reproduction*. 26(12): 3303-3311.
- 16 **Domingues S.F., Caldas-Bussiere M.C., Petreski M.D., Ohashi O.M., Lima J.S., Santos R.R., Cordeiro M.S. & Gomes de Castro P.H. 2010.** Effects of follicular phase and oocyte-cumulus complexes quality on the protein profile and in vitro oocyte meiosis competence in *Cebus apella*. *Fertility and Sterility*. 93(5): 1662-1667. **F.I. =4.295.**
- 17 **Donnez J., Dolmans M.M., Demylle D., Jadoul P., Pirard C., Squifflet J., Martinez-Madrid B. & Van Langendonck A. 2004.** Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet*. 364(9443): 1405-1410.
- 18 **Friedman O., Orvieto R., Fisch B., Felz C., Freud E., Haroush A.B. & Abir R. 2012.** Possible improvements in human ovarian tissue grafting by various host and graft treatments. *Human Reproduction*. 27(2): 474-482.
- 19 **Igarashi S. Suzuki N., Hashimoto S., Takae S., Takenoshita M., Hosoi Y., Morimoto Y. & Ishizuka B. 2010.** Heterotopic autotransplantation of ovarian cortex in cynomolgus monkeys. *Human Cell*. 23(1): 26-34.
- 20 **IUCN 2012/2014.** IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acessado em 03/04/1987.
- 21 **Karaca M., Odabasoglu F., Kumtepe Y., Albayrak A., Cadirci E. & Keles O.N. 2009.** Protective effects of erythropoietin on ischemia/reperfusion injury of rat ovary. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 144(2): 157-162.
- 22 **Kim S.S., Soules M.R. & Battaglia D.E. 2002.** Follicular development, ovulation, and corpus luteum formation in cryopreserved human ovarian tissue after xenotransplantation. *Fertility and Sterility*. 78(1): 77-82.

- 23 **Lee D.M., Yeoman R.R., Battaglia D.E., Stouffer R.L., Zelinski-Wooten M.B., Fanton J.W. & Wolf D.P. 2004.** Live birth after ovarian tissue transplant. *Nature*. 428(6979): 137-138.
- 24 **Lima J.S., Leão D.L., Sampaio R.V., Brito A.B., Santos R.R., Miranda M.S., Ohashi O.M. & Domingues S.F. 2013.** Embryo production by parthenogenetic activation and fertilization of in vitro matured oocytes from *Cebus apella*. *Zygote*. 21(2): 162-166. **F.I.=1.323.**
- 25 **Liu J., Van Der Elst J., Van Den Broecke R. & Dhont M. 2002.** Early massive follicle loss and apoptosis in heterotopically grafted newborn mouse ovaries. *Human Reproduction*. 17(3): 605-611.
- 26 **Luyckx V., Scalercio S., Jadoul P., Amorim C.A., Soares M., Donnez J. & Dolmans M.M. 2013a.** Evaluation of cryopreserved ovarian tissue from prepubertal patients after long-term xenografting and exogenous stimulation. *Fertility and Sterility*. 100(5): 1350-1357. **F.I.=4.295.**
- 27 **Molpeceres V., Mauriz J.I., Garcia-Mediavilla M., Gonzalez P., Barrio J. & Gonzalez-Gallego J. 2007.** Melatonin is able to reduce the apoptotic liver changes induced by aging via inhibition of the intrinsic pathway of apoptosis. *Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. 62A(7): 687-695.
- 28 **Nisolle M., Casanas-Roux F., Qu J., Motta P. & Donnez J. 2000.** Histologic and ultrastructural evaluation of fresh and frozen-thawed human ovarian xenografts in nude mice. *Fertility and Sterility*. 74(1): 122-129.
- 29 **Nugent D., Newton, H., Gallivan, L. & Gosden, R.G. 1998.** Protective effect of vitamin E on ischaemia-reperfusion injury in ovarian grafts. *Journal of Reproduction and Fertility*. 114(1): 341-346.

- 30 Santana L.N., Brito A.B., Brito D.C., Lima J.S., Domingues S.F. & Santos R.R. 2012b.** Adaptation of a trap door technique for the recovery of ovarian cortical biopsies from *Cebus apella* (capuchin monkey). *Zygote*. 21(2): 158-161. **F.I.= 1.323.**
- 31 Santana L.N., van denHurk R., Oskam I.C., Brito A.B., Brito D.C., Domingues S.F. & Santos R.R. 2012a.** Vitrification of ovarian tissue from primates and domestic ruminants: an overview. *Zygote*. 10(3): 288-294. **F.I.= 1.323.**
- 32 Santos R.R., Amorim C., Cecconi S., Fassbender M., Imhof M., Lornage J., Paris M., Schoenfeldt V. & Martinez-Madrid B. 2010.** Cryopreservation of ovarian tissue: An emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. *Animal Reproduction Science*. 122(3-4): 151-163. **F.I.= 1.413.**
- 33 Santos R.R., Knijn H.M., Vos P., Oei, C., Van L.T., Colenbrander B., Gadella B.M., Van Den Hurk R. & Roelen B.A.J. 2009.** Complete follicular development and recovery of ovarian function of frozen-thawed, autotransplanted caprine ovarian cortex. *Fertility and Sterility*. 91(4): 1455-1458. **F.I. =4.295.**
- 34 Scalercio R.R.A, Amorim C.A.Brito D.C., Percário S., Oskam I.C., Domingues S.F.S. & Santos R.R. 2015a.** Trolox enhances follicular survival after ovarian tissue autograft in squirrel monkey (*Saimiri collinsi*). *Reproduction, Fertility and Development*. <http://dx.doi.org/10.1071/RD14454>. **F.I.= 2.577.**
- 35 Scalercio R.R.A., Brito A.B., Domingues S.F.S., Santos R.R. & Amorim C.A. 2015b.** Immunolocalization of growth, inhibitory and proliferative factors involved in initial ovarian folliculogenesis from adult common squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Reproductive Sciences*. 22(1): 68-74. **F.I.=2.179.**
- 36 Schnorr J., Oehninger S., Toner J., Hsiu J., Lanzendorf S., Williams R. & Hodgen G. 2002.** Functional studies of subcutaneous ovarian transplants in non-human primates:

steroidogenesis, endometrial development, ovulation, menstrual patterns and gamete morphology. *Human Reproduction*. 17(3): 612-619.

- 37 Scott J.R., Keye W.R., Poulson A.M. & Reynolds W.A. 1981.** Microsurgical ovarian transplantation in the primate. *Fertility and Sterility*. 36(4): 512-5.
- 38 Suzuki N., Hashimoto S., Igarashi S., Takae S., Yamanaka M., Yamochi T., Takenoshita M., Hosoi Y., Morimoto Y. & Ishizuka B. 2012.** Assessment of long-term function of heterotopic transplants of vitrified ovarian tissue in cynomolgus monkeys. *Human Reproduction*. 27(8): 2420-2429.
- 39 Ushio-Fukai M. & Urao N. 2009.** Novel role of NADPH oxidase in angiogenesis and stem/progenitor cell function. *Antioxid Redox Signal*. 11(10): 2517-2533.
- 40 Van Eyck A.S., A.S., Feron O., Bouzin C., Romeu L., Van Langendonck A., Donnez J. & Dolmans M.M. 2010.** Both host and graft vessels contribute to revascularization of xenografted human ovarian tissue in a murine model. *Fertility and Sterility*. 93(5): 1676-1685.
- 41 Van Eyck A.S., Jordan B.F., Gallez B., Heilier J.F., Van Langendonck A. & Donnez J. 2009.** Electron paramagnetic resonance as a tool to evaluate human ovarian tissue reoxygenation after xenografting. *Fertility and Sterility*. 92(1): 374-381.
- 42 von Schonfeldt V., Chandolia R., Kiesel L., Nieschlag E., Schlatt S. & Sonntag B. 2011a.** Assessment of follicular development in cryopreserved primate ovarian tissue by xenografting: prepubertal tissues are less sensitive to the choice of cryoprotectant. *Reproduction*. 141(4): 481-490.
- 43 von Schonfeldt V., Chandolia R., Kiesel L., Nieschlag E., Schlatt S. & Sonntag B. 2011b.** Advanced follicle development in xenografted prepubertal ovarian tissue: the common marmoset as a nonhuman primate model for ovarian tissue transplantation. *Fertility and Sterility*. 95(4): 1428-1434.

- 44 von Schonfeldt V., Chandolia R., Ochsenkühn R., Nieschlag E., Kiesel L. & Sonntag B. 2012.** FSH prevents depletion of the resting follicle pool by promoting follicular number and morphology in fresh and cryopreserved primate ovarian tissues following xenografting. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 10(1): 98.
- 45 Walker M.L., Anderson D.C., Herndon J.G. & Walker L.C. 2009.** Ovarian aging in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *Reproduction*. 138(5): 793-799.
- 46 Zweier J.L. & Talukder M.A. 2006.** The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovascular Research*. 70(2): 181-90.

5 IMMUNOLOCALIZATION OF GROWTH, INHIBITORY AND PROLIFERATIVE FACTORS INVOLVED IN INITIAL OVARIAN FOLLICULOGENESIS FROM ADULT COMMON SQUIRREL MONKEY (*Saimiri collinsii*)

Artigo publicado na revista *Reproductive Sciences*, v. 22,n. 1, p. 68-74, 2015.

(Formatação conforme normas da revista)

S.R.R.A. Scalercio^{a,b,c*}, A.B. Brito^{a,b}, S.F.S. Domingues^{a,b},

R.R. Santos^{a,b,d}, C.A. Amorim^e

^aLaboratory of Wild Animal Biology and Medicine, Federal University of Pará, Castanhal, Pará, Brazil.

^bAnimal Sciences PhD Program, Federal University of Pará, Belém, Pará, Brazil

^cNational Primate Centre, Secretary of Health Policy, Ministry of Health, Ananindeua, Pará, Brazil

^dFaculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands

^ePôle de Recherche en Gynécologie, Institut de Recherche Expérimentale et Clinique, Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium

*Corresponding author: Rodovia BR-316 km 7 s/n, Levilândia, CEP 67030-000, Ananindeua, Pará, Brasil. Tel.: +55 91 32130441; fax: +55 91 32650304

E-mail address: sarah.scalercio@cenp.org.br; sarahscalercio@gmail.com

Abstract

We performed an immunohistochemical (IHC) study to determine the follicular expression of growth differentiation factor-9 (GDF-9), anti-Müllerian hormone (AMH), Kit Ligand (KL) and c-Kit in squirrel monkey ovary. Ovarian tissue fragments from four squirrel monkeys were collected by laparotomy and processed for classical histology and IHC. Additionally, follicle development was assessed by Ki67 immunostaining to evaluate proliferative status of granulosa cells. A total of 4025 follicles were examined (1475 for classical histology and 2550 for immunohistochemistry). More than 80% of the evaluated follicles were morphologically normal. GDF-9 protein was detectable in oocyte cytoplasm from primordial (100%), primary (99.1%) and secondary (100%) follicles. AMH was not expressed in primordial follicles, but just in few primary follicles (13.8%). On the other hand, it was highly expressed in granulosa cells from secondary follicles (67.9%). c-Kit, KL receptor was found in the oolemma of primordial (100%), primary (100%) and secondary (100%) follicles. KL expression was observed in oocytes and granulosa cells from primordial (94.9%), primary (91.6%) and secondary follicles (100%). Ki67 immunostaining was observed in granulosa cells from primary (5.7%) and secondary (54.8%) follicles, but not in primordial follicles. In conclusion, we described the localization of GDF-9, KL, c-Kit and Ki67 proteins and confirmed the presence of AMH protein in preantral follicles from squirrel monkey. Our results offer contribution for understanding of folliculogenesis in Neotropical NHP. Moreover, these markers can be used to assess follicular viability and functionality after cryopreservation, transplantation or *in vitro* culture of ovarian tissue.

Keywords: Neotropical Primate; Immunohistochemistry; Ovarian tissue; Cell Proliferation; Preantral follicles.

Introduction

Non-Human Primates (NHP) have been largely used as model for biomedical research,¹ including human reproduction.² Regrettably, 40% of Neotropical NHP species are listed as vulnerable, endangered or critically endangered due to the continuous destruction of their natural habitats.³ However, information on key markers controlling ovarian folliculogenesis process in NHP is scarce. Besides, knowledge on the expression of strategic factors in different preantral follicles categories (primordial, primary and secondary) supports the advances in reproductive technologies. For example, ovarian tissue cryopreservation is considered a success when follicles remain morphologically normal and are able to develop under *in vitro* culture conditions or after transplantation. Though, the assessment of synchronic expression of growth factors and proper follicular activation and its subsequent development is decisive to determine the appropriateness of a technique. In this context, immunolocalization of growth, inhibitory and proliferative factors involved in ovarian folliculogenesis is essential for understanding mechanisms of ovarian follicle development regulation and to support analyses methods of captive breeding and preservation programs of endangered Neotropical NHP.

Ovarian folliculogenesis is a complex and dynamic process in which the follicular development happens through the recruitment of the primordial follicles, with synergetic development of growing follicles until ovulation occurs. The regulation of cell proliferation, differentiation and atresia associated with folliculogenesis is regulated by interaction of autocrine and paracrine signals, together with internal signaling pathways.^{4,5} Several intra-ovarian growth factors belonging to the superfamily of transforming growth factor- β (TGF- β) are expressed in oocytes and granulosa cells from follicles at different stages of development, functioning as key regulators of ovarian folliculogenesis in mammals.⁶

In different NHP species, for instance, the TGF member growth differentiation factor 9 (GDF-9) is involved in ovarian follicular development, participating in recruitment of primordial follicles and proliferation and differentiation of granulosa cells.⁷ Moreover, GDF-9 appears to be present in different stages of ovarian follicle development in a species-specific manner. In cynomolgus monkey, GDF-9 protein expression was found in all stages of follicular development;⁸ in rhesus monkeys, it was observed in preovulatory follicular cells;⁹ in baboons, in primordial, primary and secondary follicles.¹⁰ Anti-Müllerian hormone (AMH) is another member of the TGF- β superfamily playing an essential inhibitory role in the maintenance of the primordial follicles pool.² AMH protein is expressed in granulosa cells from follicles at different stages of development in squirrel monkeys,² baboons,¹¹ bonnet monkey ovary¹¹ and marmoset.¹² Another important growth factor identified in the ovarian follicle is the receptor tyrosine-protein kinase Kit (c-Kit, CD117) and its ligand KL. The c-Kit/KL system plays an indispensable role in the follicular viability, primordial follicle recruitment, follicular development and oocyte growth in mammal species.¹³ The activated c-Kit receptor participates in various signaling pathways including the regulation of cell proliferation, survival, migration, and cellular metabolism,¹⁴ as well as participates in the activation of primordial follicles.¹⁵ In human ovaries, KL mRNA has been expressed at the primary follicular stage, and c-Kit protein can be present in oocytes and c-Kit mRNA in oocytes and granulosa cells from preovulatory follicles.^{16,17} In cynomolgus monkey, KL protein expression was found in granulosa cells, and c-Kit receptor at the oocyte cell surface from primordial follicles,⁸ and in capuchin monkeys, KL mRNA was quantified in ovarian tissue.¹⁸

Although species-specific differences are evident, studies on the dynamics of follicular development, and the relationship between growth factors, the recruitment of primordial follicles, and preantral follicles growth in Neotropical NHP are not available. Such

information can help to optimize protocols of reproductive technology, serving as a tool to evaluate follicular viability and functionality. Hence, we aimed to immunolocalize the proteins GDF-9, AMH, c-Kit/KL and Ki67 (a cell proliferation marker) at different stages of preantral follicular development in the ovaries from the Neotropical squirrel monkeys.

Material and methods

Chemicals

Unless mentioned otherwise, the chemicals used in the present study were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, USA).

Animals

Our study was approved by the local Ethical Committee on Animal Research from the Evandro Chagas Institute (IEC/CEU no. 0009/2011) and by the Brazilian Institute for Wildlife and Environment (SISBIO/IBAMA no. 32632-1/2012) and followed the guidelines of the National Council of Control Animal Experimentation of Brazil. Four healthy and sexually mature squirrel monkey females (2.5 - 5 years old, weight range: 0.4 – 0.7 Kg) born in captivity at National Primate Center, Pará, Brazil, were selected for our study. The females were kept indoors under a natural photoperiod and housed individually in cages (80 x 90 x 80 cm) at the National Primate Center. Their daily diet consisted of fresh fruits, vegetables and commercial monkey pellets (MEGAZOO® P18, Betim, Brazil). Tap water was available *ad libitum*.

Ovarian tissue collection

All procedures were performed under general anaesthesia. Each animal was anesthetized with ketamine hydrochloride (Ketamine 10 mg/kg; IM; Köning S.A., Avellaneda, Argentina) and xylazine hydrochloride (Anasedan 1 mg/kg; IM; Köning S.A.). Anesthesia was maintained with 2% halothane (Tanohalo; Cristália, São Paulo, Brazil). The

females were placed in dorsal recumbence and ovarian biopsies were collected by exploratory laparotomy. For this, a ventral midline skin incision was made to reach the ovaries, as described by Domingues et al.¹⁹ One right ovary from each female was completely removed, cut into halves and immediately fixed in paraformaldehyde for further histological and immunohistochemical analyses. After surgery, the animals received antibiotics for 1 week (Chemitril; Chemitec, São Paulo, Brazil), and ibuprofen (Ketofen; Merial Saúde Animal Ltda, São Paulo, Brazil) was used to control the pain, in the two days following surgery.

Histological analysis

After overnight fixation in 4% paraformaldehyde (pH 7.2) at 4°C, the ovarian fragments were dehydrated in ethanol, clarified in xylene and embedded in paraffin wax. Serial sections (5 µm) of ovarian tissue were cut and every tenth section was mounted on glass slides and stained with hematoxylin-eosin (Merck, Darmstadt, Germany). Preantral follicles with an oocyte surrounded by one layer of flattened granulosa cells were classified as primordial, while primary follicles presented one layer of cuboidal granulosa cells surrounding an oocyte, and secondary follicles presented two or more layers of granulosa cells surrounding the oocyte.²⁰ Just follicles with a visible nucleus were taken into account to avoid counting a follicle more than once. Histological sections were used to classify and count ovarian follicles that could be found in the following slides for immunohistochemical analyses, and extra sections were mounted in Superfrost® Plus slides (Menzel-Glaser, Braunschweig, Germany) and submitted to immunohistochemical analysis. All sections were examined by using a light microscope (Olympus, Tokyo, Japan) at a magnification of ×400.

Immunohistochemistry

Paraffin sections were deparaffinized with Xylene (Xylene, Sigma-Aldrich, USA) and rehydrated in alcohol series. The endogenous peroxidase activity was blocked with 3% H₂O₂ diluted in methanol (for AMH and KL staining) or in deionized water (for GDF-9). 0.3%

H₂O₂ was diluted in deionized water was used to block peroxidase activity during Ki67 and c-Kit staining. A demasking step was performed for 75 min at 98°C with citrate buffer and 20% Triton X100 before sections being subjected to antigen retrieval step. Antigen retrieval steps, antibody dilutions and incubation conditions are summarized in Table 1. In brief, the slides were incubated for 60 min at room temperature with anti-rabbit for GDF-9 and c-Kit, anti-mouse for AMH, biotinylated rabbit anti-mouse for KL and goat anti-mouse for Ki67 (Dako) secondary antibodies. For KL staining, streptavidin-HRP conjugate was also used, according to the streptavidin biotin method. Diaminobenzidine was used as a chromogen (SK4100, Vector Laboratories, Peterborough, UK). Hematoxylin was used for counterstaining, and rapid mounting medium to mount the slides (Entellan new, Merck, Germany). Negative controls consisted of the dilution solution without any primary antibody and the following positive controls were used: hepatic carcinoma for GDF-9, human antral follicles for AMH, testicular germ cell tumor tissue for c-Kit, kidney carcinoma tissue was used for KL and proliferative endometrium for Ki67. For quantitative analysis of GDF-9, AMH, KL and c-Kit protein expression, primordial, primary and secondary follicles were evaluated in all animals. Follicles were considered GDF-9-positive when the oocyte cytoplasm was immunostained; AMH-positive when at least one granulosa cell was immunostained; KL-positive when cytoplasm and cell membrane of oocytes and granulosa cells were immunostained; and for c-Kit when the oolemma of follicles showed stains. Ki67 staining was used to attest the growing status of follicles and to ensure that follicles classified as primordial were indeed at resting stage. Follicles containing at least one Ki67-positive granulosa cell were considered as belonging to the growing pool (primary or secondary follicles).

Results

A total of 1475 preantral follicles was examined by classical histology and the majority of them was morphologically normal (>80%).

The percentages of follicles positively stained for AMH, GDF-9, c-Kit, KL and Ki67, at the different developmental stages (primordial, primary and secondary) are detailed in Table 2. All negative controls failed to show DAB-positive immunostaining, attesting the specificity of the markers.

GDF-9 protein expression

A total of 394 follicles (87 primordial, 235 primary and 72 secondary follicles) were investigated and the results of immunohistochemistry showed that GDF-9 protein was detectable by staining in oocytes cytoplasm from primordial (100%, 87/87), primary (99.1% \pm 0.5%, 233/235) and secondary follicles (100%, 72/72). The staining intensity ranged from faint (primordial and primary follicles) to strong (secondary follicles). Granulosa cells also expressed GDF-9 (Fig 1A).

AMH protein expression

AMH staining varied according to the follicular stage of development. For this immunostaining, 382 follicles were counted (168 primordial, 109 primary and 105 secondary). The granulosa cells from primary (13.8 \pm 12.1%, 7/109) and secondary (67.9 \pm 23.6%, 96/105) follicles were marked for AMH, and no primordial follicles showed staining for AMH (Fig 1B-C).

Cell Proliferation (Ki67 staining)

Cell proliferation was evaluated in 280 preantral follicles (133 primordial, 95 primary and 52 secondary follicles) using Ki67 immunostaining. Some granulosa cells from primary (5.7% \pm 5.7%, 5/95) and secondary (54.8% \pm 21.8%, 25/52) follicles showed staining for Ki67, while all follicles classified as primordial showed no staining (Fig 1D-E).

c-Kit and KL expression

Immunostaining was performed to localize c-Kit and KL protein expression. A total of 391 follicles were analyzed, and the oolemma of primordial (100%, 112/112), primary (100%, 242/242) and secondary (100%, 37/37) follicles were found strongly stained for c-Kit (Fig 2A,B). In KL staining, 1103 follicles were evaluated and the KL protein was expressed in oocytes and granulosa cells of primordial ($94.9\% \pm 2.4\%$, 762/814), primary ($91.6\% \pm 4.2\%$, 217/243) and secondary (100%, 46/46) follicles. A faint staining was present in cytoplasm and cell membrane (Fig 2C,D). Interestingly, KL staining was also observed in cells from epithelial surface.

Discussion

Initial folliculogenesis in Neotropical NHP, genus *Saimiri*, has been poorly described. We know that primordial follicles can be found from birth until senile age, when this follicular population is depleted, leading to natural menopause.² A morphometric study of preantral follicles in senile monkeys²⁰ and a detailed study on the antral follicles development in this species were also performed.²¹

In the present study, we showed that ovarian follicles from squirrel monkey express GDF-9, c-Kit and KL protein in all stages of follicular development (primordial, primary and secondary). On the other hand, AMH staining only appears after primary stage. To the best of our knowledge, except for one mRNA expression study,¹⁸ the expression of GDF-9 protein in ovarian tissue has not been investigated in Neotropical NHP as yet. GDF-9 has a fundamental function in early folliculogenesis,²² being involved in the recruitment of primordial follicles and proliferation and differentiation of granulosa cells.⁷ GDF-9 protein expression may vary according to the primate species. In squirrel monkeys, we observed that GDF-9 staining is present in oocytes and granulosa cells from follicles at all stages development. Similarly, in

baboons, GDF-9 protein was also expressed in cytoplasm of oocytes from primordial, primary and secondary and in the granulosa cells.¹⁰ In cynomolgus monkey, moderate GDF-9 expression was found only in oocytes from preantral and antral follicles, while granulosa cells were not stained.⁸ In rhesus monkeys, GDF-9 expression was observed in granulosa cells from preovulatory follicles,⁹ and in humans its expression was encountered in oocytes of primary and secondary follicles,²³ but not from primordial follicles.²⁴ Although GDF-9 is a so-called oocyte-secreted factor,⁷ our findings corroborate with fact that different GDF-9 expression in primates is species-specific when oocytes and granulosa cells from follicles at different developmental stages are evaluated. Several studies have demonstrated that GDF-9 exerts a critical role in oocyte viability,²⁵ follicular growth,²⁶ and thecal cell recruitment.²⁷ Attempts to understand such species-specific differences in GDF-9 expression and its role on folliculogenesis are, hence, necessary.

AMH plays an essential inhibitory role to maintain the reserve of ovarian follicles throughout reproductive lifespan² by inhibiting primordial follicle activation.²⁸ Expression of AMH has been also reported in some NHP species. AMH protein is expressed in granulosa cells from follicles at different stages of development in squirrel monkeys,² baboons,¹⁰ bonnet monkey¹¹ and marmoset¹² ovaries. As previously reported, AMH is expressed in granulosa cells of growing follicles, but not in primordial follicles from squirrel monkeys,² marmoset monkeys¹² and human.²⁹ Differently, AMH expression in granulosa cells from ovarian follicles at all stages of development, including primordial follicles, has been reported in baboons.¹⁰

For the first time in a Neotropical NHP, the KL/c-Kit system has been identified in ovarian follicles. The interaction between KL and its receptor c-Kit is essential for the differentiation and development of ovarian follicles in different species.³⁰ In our study, c-Kit immunostaining in oolemma and KL protein were found in oocytes and granulosa cells from

preantral follicles. Similar findings were described in cryopreserved human ovarian follicles after xenotransplantation.²³ Brito et al.¹⁸ evaluated KL mRNA expression in ovarian tissue from capuchin monkeys after *in vitro* culture, but the study these later authors did not describe KL protein localization at different stages of follicular development. Abir et al.³¹ reported the expression of KL and c-Kit proteins only in oocytes of primordial stages onward, in both fetal and adult ovaries. The c-Kit/KL system can assume important role in ovarian folliculogenesis in squirrel monkey, similarly with other mammal species. In the communication between the oocytes and granulosa cells, c-Kit/KL signaling may regulate the follicular viability, primordial follicle recruitment, follicular development and oocyte growth in mammal species.¹³

Follicular growth activity was confirmed by proliferation of granulosa cells, as identified by Ki67 immunostaining at all stages of follicular development, except primordial follicles. Ki67 expression in primary and secondary follicles demonstrates that growing follicles are able to continue their development, and may assume a healthy follicular status.

In this study, we have immunolocalized for the first time GDF-9, KL/c-Kit and Ki67 proteins, as well as confirmed the expression of AMH protein in ovarian tissue from squirrel monkey. We believe that our results offer an important contribution for the understanding of folliculogenesis process in Neotropical monkeys. This knowledge is an important tool to assess follicular viability and functionality after cryopreservation, transplantation of ovarian tissue and *in vitro* culture of early follicles. Furthermore, species-specific differences among primates open a window to future studies on follicular development and its mechanisms in human and non-human primates.

Declaration of Conflicting Interests

The authors declare no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

Sarah R R A Scalercio is a recipient of a grant from CAPES (Brazil) and participated of Internship Program of Doctoral Sandwich Abroad in Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium.

Acknowledgements

The authors thank Dolores Gonzalez, Olivier van Kerk and Osvaldo Leal dos Santos Filho for their technical assistance, and the National Primate Center for the logistical support.

References

1. Hau J, Schapiro SJ. Non-human primates in biomedical research. *Scand J Lab Anim Sci.* 2006;36:77-85.
2. Walker ML, Anderson DC, Herndon JG, Walker LC. Ovarian aging in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *Reproduction.* 2009;138:793–799.
3. IUCN Species Survival Commission, 2013. IUCN Red List Categories and Criteria, Version 2013.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on January 17, 2014.
4. Fortune JE, Cushman RA, Wahl CM, Kito S. The primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol.* 2000;163:53–60.
5. Suh CS, Sonntag B, Erickson GF. The ovarian life cycle: a contemporary view. *Rev Endocr Metab Disord.* 2002;3:5–12.

6. Knight PG, Glister C. TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*. 2006;132:191–206.
7. Paulini F, Melo EO. The role of oocyte-secreted factors GDF9 and BMP15 in follicular development and oogenesis. *Reprod Domest Anim*. 2011;46:354–361.
8. Gougeon A, Busso D. Morphologic and functional determinants of primordial and primary follicles in the monkey ovary. *Mol Cell Endocrinol*. 2000;163:33–41.
9. Duffy DM. Growth differentiation factor-9 is expressed by the primate follicle throughout the periovulatory interval. *Biol Reprod*. 2003;69:725–732.
10. Amorim AC, Jacobs S, Devireddy RV, et al. Successful vitrification and autografting of baboon (*Papio anubis*) ovarian tissue. *Hum Reprod*. 2013;28:2146–2156.
11. Modi D, Bhartiya D, Puri C. Developmental expression and cellular distribution of Müllerian inhibiting substance in the primate ovary. *Reproduction*. 2006;132:443–453.
12. Thomas FH, Telfer EE, Fraser HM. Expression of anti-Müllerian hormone protein during early follicular development in the primate ovary in vivo is influenced by suppression of gonadotropin secretion and inhibition of vascular endothelial growth factor. *Endocrinology*. 2007;148:2273–2281.
13. Driancourt MA, Reynaud K, Cortvrindt R, Smits J. Roles of Kit and Kit Ligand in ovarian function. *Rev Reprod*. 2000;5:143–152.
14. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*. 2002;296:1655–1657.
15. Adhikari D, Liu K. Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocr Rev*. 2009;30:438–464.
16. Horie K, Fujita J, Takakura K, et al. The expression of c-Kit protein in human adult and fetal tissues. *Hum Reprod*. 1993;8:1955–1962.

17. Tanikawa M, Harada T, Mitsunari M, Onohara Y, Iwabe T, Terakawa N. Expression of c-Kit messenger ribonucleic acid in human oocyte and presence of soluble c-Kit in follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:1239–1242.
18. Brito AB, Santos RR, Van den Hurk R, et al. Short-term culture of ovarian cortical strips from capuchin monkeys (*Sapajus apella*): a morphological, viability, and molecular study of preantral follicular development *in vitro*. *Reprod Sci.* 2013;20:990-997.
19. Domingues SFS, Caldas-Bussiere MC, Martins ND, Carvalho RA. Ultrasonographic imaging of the reproductive tract and surgical recovery of oocytes in *Cebus apella* (capuchin monkeys). *Theriogenology.* 2007;68:1251-1259.
20. Almeida DV, Santos RR, Scalercio SR, et al. Morphological and morphometrical characterization, and estimation of population of preantral ovarian follicles from senile common squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Anim Reprod Sci.* 2012;134:210-215.
21. Dukelow WR. Reproductive cyclicity and breeding in the squirrel monkey. In: Rosenblum LA, Coe CL, eds. *Handbook of squirrel monkey research*. New York, Inc:1985:169-190.
22. Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature.* 1996;383:531–535.
23. David A, Dolmans MM, Van Langendonck A, Donnez J, Amorim CA. Immunohistochemical localization of growth factors after cryopreservation and 3 weeks' xenotransplantation of human ovarian tissue. *Fertil Steril.* 2011;95:1241–1246.
24. Aaltonen J, Laitinen MP, Vuojolainen K, et al. Human growth differentiation factor 9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:2744–2750.

25. Carabatsos MJ, Elvin J, Matzuk MM, Albertini DF. Characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor-9-deficient mice. *Dev Biol.* 1998;204:373–84.
26. Hreinsson JG, Scott JE, Rasmussen C, Swahn ML, Hsueh AJ, Hovatta O. Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:316–21.
27. Elvin JA, Yan C, Wang P, Nishimori K, Matzuk MM. Molecular characterization of the follicle defects in the growth differentiation factor-9-deficient ovary. *Mol Endocrinol.* 1999;13:1018–1034.
28. Appt SE, Clarkson TB, Chen H, et al. Serum antimüllerian hormone predicts ovarian reserve in a monkey model. *Menopause.* 2009;16:597-601.
29. Weenen C, Laven JS, Von Bergh, et al. Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod.* 2004;27:77-83.
30. Carlsson IB, Laitinen MP, Scott JE, 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.* 2006;131:641-649.
31. Abir R, Fisch B, Jin S, Barnnet M, Kessler-Icekson G, Ao A. Expression of stem cell factor and its receptor in human fetal and adult ovaries. *Fertil Steril.* 2004;82:1235–1243.

Legends captions

Table 1. Antibodies dilutions used in the present study.

Antigen	Antibody	Dilution	Incubation
<i>GDF-9</i>	Rabbit polyclonal IgG	1:5000	4° C O/N
<i>AMH</i>	Mouse monoclonal IgG	1:30	4° C O/N
<i>Ki67</i>	Mouse monoclonal	1:50	4° C O/N
<i>c-Kit</i>	Rabbit polyclonal	1:1500	4° C O/N
<i>KL</i>	Mouse monoclonal IgG	1:25	4° C O/N

Table 2. Summary of the expression of GDF-9, AMH, kit ligand, c-kit and Ki76 protein in ovarian tissue of four squirrel monkeys.

Factors	Animal 1 n (% stained)	Animal 2 n (% stained)	Animal 3 n (% stained)	Animal 4 n (% stained)	Total n (mean % ± SEM)
GDF-9					
Primordial follicles Oocytes (cytoplasm)	9 follicles (100%)	64 follicles (100%)	NFTS	14 follicles (100%)	87 (100 ± 0)
Primary follicles Oocytes (cytoplasm)	95 follicles (100%)	75 follicles (98.7%)	NFTS	65 follicles (98.5%)	235 (99.1 ± 0.5)
Secondary follicles Oocytes (cytoplasm)	10 follicles (100%)	48 follicles (100%)	NFTS	14 follicles (100%)	72 (100 ± 0)
AMH					
Primordial follicles Granulosa cells	15 follicles (0%)	29 follicles (0%)	124 follicles (0%)	NFTS	168 (0 ± 0)
Primary follicles Granulosa cells	73 follicles (0%)	19 follicles (5.3%)	12 follicles (50%)	5 follicles (0%)	109 (13.8 ± 12.1)
Secondary follicles Granulosa cells	14 follicles (71.4%)	18 follicles (100%)	68 follicles (100%)	5 follicles (0%)	105 (67.9 ± 23.6)
Ki67					
Stromal cells	stained	stained	stained	stained	
Primordial follicles Granulosa cells	42 follicles (0%)	38 follicles (0%)	5 follicles (0%)	48 follicles (0%)	133 (0 ± 0)
Primary follicles Granulosa cells	39 follicles (0%)	29 follicles (0%)	5 follicles (0%)	22 follicles (22.7%)	95 (5.7 ± 5.7)
Secondary follicles Granulosa cells	33 follicles (42.4%)	5 follicles (0%)	1 follicles (100%)	13 follicles (76.9%)	52 (54.8 ± 21.8)
c-kit					
Primordial follicles Oocytes (oolema)	42 follicles (100%)	5 follicles (100%)	65 follicles (100%)	NFTS	112 (100 ± 0)
Primary follicles Oocytes (oolema)	117 follicles (100%)	12 follicles (100%)	113 follicles (100%)	NFTS	242 (100 ± 0)
Secondary follicles Oocytes (oolema)	21 follicles (100%)	2 follicles (100%)	14 follicles (100%)	NFTS	37 (100 ± 0)
KL					
Primordial follicles Oocytes/granulosa cells	424 follicles (90.3%)	194 follicles (98.4%)	196 follicles (95.9%)	NFTS	814 (94.9% ± 2.4)
Primary follicles Oocytes/granulosa cells	130 follicles (83.8%)	58 follicles (98.2%)	55 follicles (92.7%)	NFTS	243 (91.6 ± 4.2)
Secondary follicles Oocytes/granulosa cells	16 follicles (100%)	6 follicles (100%)	24 follicles (100%)	NFTS	46 (100 ± 0)

* NFTS – No follicles in the tissue sections

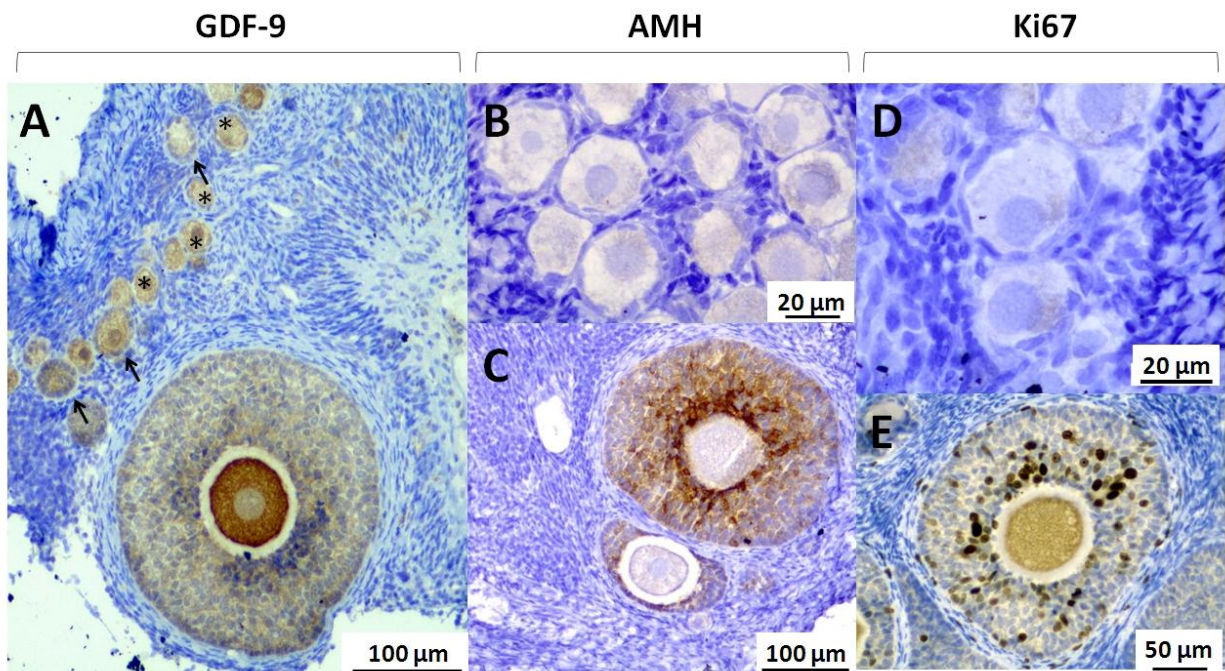


Figure 1. Identification of the growth factors in oocytes and granulosa cells. (A) Immunohistochemical staining for GDF-9 in primordial (asterisk), primary (arrow) and secondary follicles; (B) Immunohistochemical staining for AMH, where primordial follicles are unstained, while (C) secondary follicles are positively stained; (D) Immunohistochemical staining for the cell proliferation marker Ki67 showing unstained primordial follicles and (E) stained granulosa cells from secondary follicles in ovarian tissue from squirrel monkey.

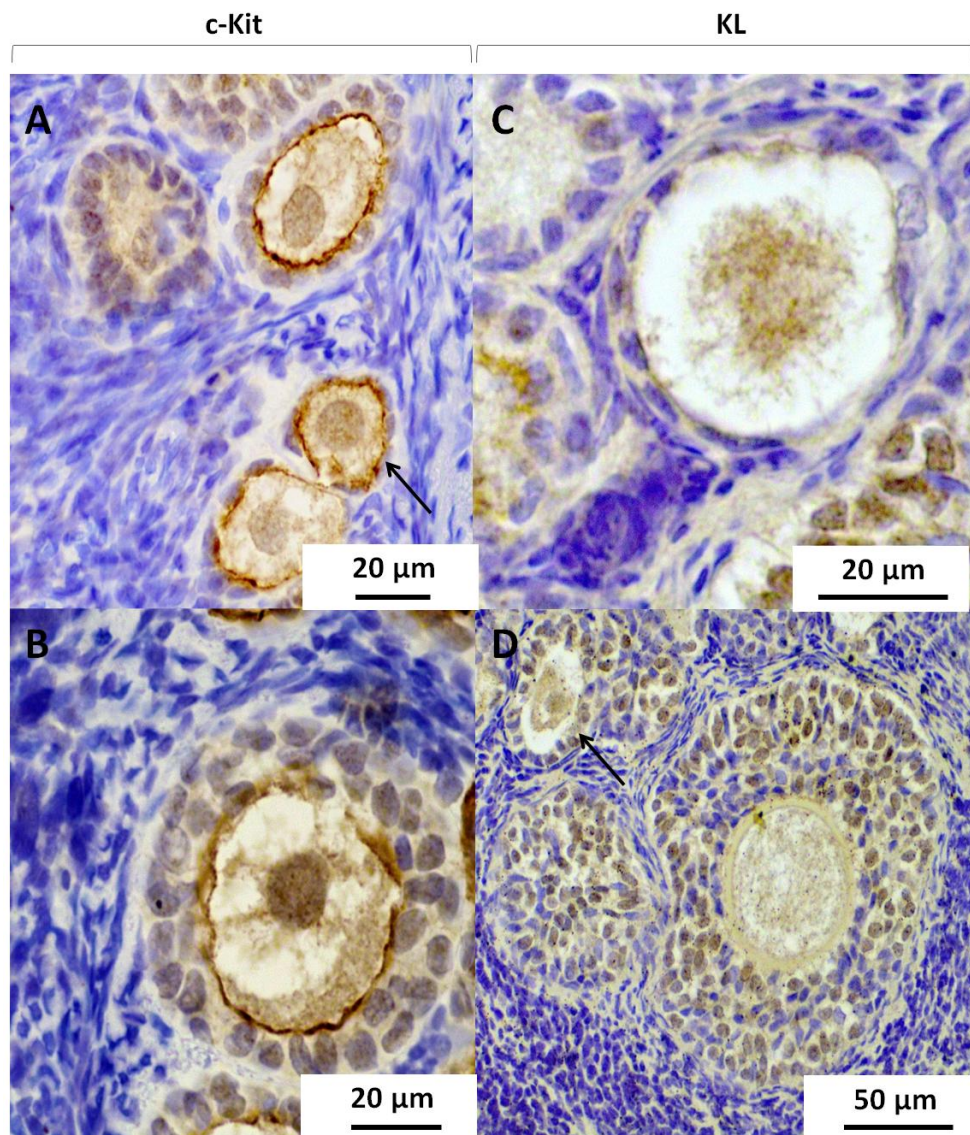


Figure 2. Immunohistochemical staining for c-Kit and kit ligand in preantral follicles at different stages of development. (A) Oolema of primordial (see arrow), primary and (B) secondary follicles stained for c-Kit. Dispersed KL immunostaining was observed in oocytes and granulosa cells from (C) primordial, (D) primary (see arrow) and secondary follicles.

6 TROLOX ENHANCES FOLLICULAR SURVIVAL AFTER OVARIAN TISSUE AUTOGRAFT IN SQUIRREL MONKEY (*Saimiri collinsi*)

Artigo publicado na revista *Reproduction, Fertility and Development*, doi:

<http://dx.doi.org/10.1071/RD14454>

(Formatação conforme normas da revista)

S.R. Scalercio^{A,B}, C.A. Amorim^C, D.C. Brito^A, S. Percário^D,

I.C. Oskam^E, S.F.S. Domingues^A, R.R. Santos^{A,F}

^ALaboratory of Wild Animal Biology and Medicine, Federal University of Pará, Castanhal, Pará, Brazil; ^BNational Primate Centre, Secretary of Health Policy, Ministry of Health, Ananindeua, Pará, Brazil; ^CPôle de Recherche en Gynécologie, Institut de Recherche Expérimentale et Clinique, Université Catholique de Louvain, Brussels, Brussels, Belgium; ^DOxidative Stress Research Laboratory, Federal University of Pará, Belém, Pará, Brazil; ^EFaculty of Veterinary Medicine, Oslo, Norway; ^FFaculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands.

*Correspondence to Regiane R. Santos

Faculty of Veterinary Medicine

Yalelaan 104, 3584 CM, Utrecht, The Netherlands.

Fax: +31 30 2534125

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

Abstract

We aimed to evaluate ovarian tissue pre-treatment with 50 μ M Trolox followed by heterotopic transplantation in squirrel monkeys (*Saimiri collinsi*) and to assess tissue functionality via immunohistochemical analysis of the stroma and ovarian follicles. Five healthy and sexually mature squirrel monkey (*Saimiri collinsi*) females were used. Heterotopic autografting of fresh ovarian tissue with or without previous exposure to the antioxidant Trolox was performed and grafts were recovered for analysis seven days later. Tissue vascularization was confirmed by both macroscopic inspection and CD31 staining. Trolox prevented massive follicular activation and kept the percentages of morphologically normal follicles higher than in untreated grafts. Expression of AMH in developing follicles was observed only in controls and Trolox-treated grafts. Also, immunostaining for GDF-9 was positive only in primordial follicles from controls and from Trolox-treated grafts. Although Trolox improved follicular quality and avoided apoptosis in stromal cells, ovarian tissue fibrosis was increased in Trolox-treated grafts, mainly due to an increase in collagen type I synthesis.

Keywords: Grafting; preantral follicles; fibrosis; apoptosis; vascularization.

Introduction

Different strategies to preserve female fertility and endangered species are in development with the help of animal models (Santos et al. 2010; von Schönfeldt et al. 2012; Vanacker et al. 2012; Luyckx et al. 2013). Among the approaches, cryopreservation of ovarian tissue is a promising alternative to store the large number of female gametes enclosed in preantral follicles. Indeed, after thawing and grafting, these follicles are able to survive and resume their growth (Santos et al. 2009; Amorim et al. 2011, 2013; Ting et al. 2013).

Despite the successful results obtained with cryopreservation and autotransplantation of ovarian tissue, it is important to highlight the large follicle loss resulting from the latter procedure (Candy et al. 1997; Aubard et al. 1999; Baird et al. 1999). This is probably due to the avascular transplantation of the ovarian tissue, which leads to ischemic-reperfusion injury in the first days after grafting through the production of reactive oxygen species (ROS), such as hydrogen peroxide and hydroxyl radical (Karaca et al. 2009). These free radicals cause lipid peroxidation, which is followed by cell membrane damage, and neutrophil chemotaxis blocking microvasculature by white cell clogging (Zweier and Talukder 2006). Oxidative stress leads not only to cell damage and death, but also to massive activation of primordial follicles and subsequent burnout of the follicular reserve in the ovarian tissue (Sobinoff et al., 2012; Gavish et al., 2014).

One of the approaches to prevent ischemic damage is the systemic or local delivery of free radical scavengers and vitamins. For this, host or grafts have been treated with vitamin E (Nugent et al., 1998; Abir et al. 2011; Friedman et al., 2012). Nugent et al. (1998) reported a higher follicle survival in ovarian xenografts from mice supplemented with vitamin E for seven days after surgery, but no information on follicular activation was given. These authors showed the importance of tissue analysis seven days post-transplantation and indicated chilling the tissue before transplantation and during tissue treatment to minimize the lipid peroxidation. Abir et al.

(2011) showed that administration of vitamin E (dry form; alpha-tocopheryl succinate) and gonadotropins to immunodeficient mice before and after xenografting decreased apoptotic rate in follicles from human ovarian tissue. Noteworthy, granulosa cells from most follicles were positive to proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining (Abir et al., 2011), a reliable marker to determine cell proliferation and, consequently, follicular activation (Wang et al., 2013a). Friedman et al. (2012) showed that graft treatment with VEGF, vitamin E (oil form) and hyaluronic acid-rich biological glue together with host treatment with melatonin improved human ovarian tissue survival grafted in mice for one week. Though, no effect against accelerated follicular activation was reported.

Although an antioxidant activity is alleged for vitamin E, such a role is questioned (Sylvester, 2007; Brigelius-Flohe, 2009). The commonly used vitamin E is found as alpha-tocopherol, its first recognized and most abundant isomer in mammalian tissue. However, there are eight chemically different isomers recognized as vitamin E; four are saturated (alpha-, beta-, gamma- and delta-tocopherols) and four are unsaturated (alpha-, beta-, gamma- and delta-tocotrienols) forms (Ahsan et al., 2014). All of these isoforms meet the requirements to be classified as antioxidants, but their biological role was observed *in vitro* without evidence of *in vivo* antioxidant activity (Brigelius-Flohe., 2009). Furthermore, the metabolites of this not single agent are sometimes more active than its precursors and present different effects including anti-inflammatory (Jiang et al., 2008), as well as ambiguous properties such as pro- or anti-apoptotic (Birringer et al., 2010; Abir et al., 2011).

Due to the absence of soluble fractions, the vitamin E isomer α -tocopherol can act as an antioxidant only in lipid phases, but not when reactive hydroxyl or alkoxy radicals are taken in account (Brigelius-Flohe., 2009). Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), an analogue of vitamin E, is hydro- and liposoluble due to a carboxyl group and able to inhibit protein damage by hydroxyl radicals (Miura et al., 1993). In a complete

physicochemical study, Alberto et al. (2013) demonstrated that trolox is a potent scavenger of hydroxyl and alkoxy (a product of hydroperoxide decomposition) radicals regardless the reaction condition, i.e. aqueous or lipid solution, and peroxy radicals more efficiently at aqueous solution. Furthermore, while trolox aqueous solubility allows rapid delivery to the grafted tissue (Tan et al. 1996), lipid solubility facilitates membrane permeation (Barclay et al. 1995; Tan et al. 1996). Trolox (50 μ M) has been used to preserve the morphology of caprine preantral follicles from cryopreserved ovarian tissue (Luz et al. 2012) and to prevent endoplasmic reticulum stress in frozen-thawed ovarian tissue of capuchin monkey after *in vitro* culture (Brito et al. 2014). Therefore, we hypothesized that Trolox might maintain follicular survival after grafting, as well as avoid exaggerated follicular activation.

Tissue analysis was performed seven days after transplantation, a crucial time point for tissue re-vascularization in large mammals (Santos et al., 2009; Dath et al., 2010; Friedman et al., 2012 ; Wang et al., 2013a), encompassing the critical hypoxic period post-transplant (Nugent et al., 1998; Dath et al., 2010). Also, as suggested by Nugent et al. (1998), tissue was kept at low temperature (4 °C) to minimize the oxidative stress before grafting. A time exposure of 30 minutes was chosen to simulate the time necessary for ovarian tissue transport and preparation before grafting.

Hence, our aim in the present study was to evaluate the effect of Trolox on the follicle survival after heterotopic autotransplantation, as well as the ability of this antioxidant to inhibit or minimize massive primordial follicle activation. Follicular survival was evaluated considering morphology, activation, immunolocalization of growth markers and apoptosis detection, while ovarian stroma quality gained special attention to tissue vascularization, proliferation, apoptosis and fibrosis.

Materials and Methods

Chemicals

Unless mentioned otherwise, the chemicals used in the present study were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, USA).

Animals

Our study was approved by the local Ethical Committee on Animal Research from the Evandro Chagas Institute (IEC/CEU no. 0009/2011) and by the Brazilian Institute for Wildlife and Environment (SISBIO/IBAMA no. 32632-1/2012) and followed the guidelines of the National Council of Control Animal Experimentation of Brazil. Five healthy and sexually mature squirrel monkey females (2.5 - 5 years old, weight range: 0.4 – 0.7 Kg) born in captivity at National Primate Center, Pará, Brazil, were selected for our study. Females were selected from the reproductive group, kept indoors under a natural photoperiod and housed individually in cages (80 x 90 x 80 cm), for a proper management and to avoid fights among them during recovery from surgery. Their daily diet consisted of fresh fruits, vegetables and commercial monkey pellets (MEGAZOO® P18, Betim, Brazil). Tap water was available *ad libitum*. At the end of experiments, females returned to their reproductive groups.

Ovarian tissue collection and exposure to Trolox

All procedures were performed under general anaesthesia. Each animal was anesthetized with ketamine hydrochloride (Ketamine 10 mg/kg; IM; Köning S.A., Avellaneda, Argentina) and xylazine hydrochloride (Anasedan 1 mg/kg; IM; Köning S.A.). Anaesthesia was maintained with 2% halothane (Tanohalo; Cristália, São Paulo, Brazil). The females were placed in dorsal recumbence and one ovary was collected by exploratory laparotomy. For this, a ventral midline skin incision was made to reach the ovaries, as described by Domingues et al. (2007). The right ovary from each female was completely

removed, cut into halves and the medulla was removed. The remaining cortical tissue was then cut into strips (13 pieces of ~4x4x1 mm) in a Petri dish containing minimal essential medium (MEM) modified with 25 mM HEPES (Gibco, Carlsbad, CA, USA). One fragment was immediately fixed in 4% paraformaldehyde for histological and immunohistochemical analyses (fresh control), while the other 12 fragments were kept at 4°C for 30 minutes in MEM modified with 25 mM HEPES supplemented with Trolox (6 fragments) or not (6 fragments). A concentration of 50 µM Trolox was used based on a previous study (Brito et al. 2014). After exposure, cortical fragments were submitted to autografting (details below). After surgery, the animals received antibiotics for 1 week (Chemitril; Chemitec, São Paulo, Brazil), and ibuprofen (Ketofen; Merial Saúde Animal Ltda, São Paulo, Brazil) was used to treat the pain, in the two days following surgery.

Ovarian tissue autografting

Under anaesthesia, grafting of ovarian tissue was performed subcutaneously in the dorsal region. Before re-implantation, ovarian strips were stitched using non-absorbable sutures (6/0 Prolene; Ethicon, Johnson & Johnson International, Diegem, Belgium). Each animal received six non-treated (right side) and six trolox-treated (left side) grafts. After one week, the animals were anesthetized, as described above, grafts were recovered and fixed in 4% paraformaldehyde for histological and immunohistochemical analyses.

Analyses

Histological analysis

After overnight fixation in 4% paraformaldehyde (pH 7.2) at 4°C, ovarian fragments were dehydrated in ethanol, clarified with xylene and embedded in paraffin wax. Serial sections (5 µm) of ovarian tissue were cut and every tenth section was mounted on glass slides and stained with haematoxylin-eosin (Merck, Darmstadt, Germany). Follicle quality was evaluated based on the morphological integrity of the oocyte, granulosa cells and

basement membrane as previously described (Santos et al. 2006). To avoid counting a follicle more than once, preantral follicles were counted in the sections where their oocyte nucleus was observed. Extra sections were mounted in Superfrost® Plus slides (Menzel-Glaser, Braunschweig, Germany) and prepared to immunohistochemical analysis. All sections were examined by using a light microscope (Olympus, Tokyo, Japan) at a magnification of $\times 400$.

Preantral follicular density

Follicular density was estimated by counting the ovarian preantral follicles of each sample per repetition of the studied groups were evaluated. For this, sections were scanned using a Mirax Scan (Zeiss, Jena, Germany) and pictures were taken at a magnification of $\times 100$. With the help of the image processing and analysis program Image J (National Institutes of Health, USA), primordial, primary and secondary follicles were counted and density calculated per 1 mm².

Immunohistochemistry

The following markers were selected to assess cell proliferation, follicle growth and function, stromal cell apoptosis and graft vascularization: Ki67, anti-Müllerian hormone (AMH), growth differentiation factor-9 (GDF-9), c-kit, and cluster of differentiation 31 (CD31). Paraffin sections were deparaffinised with Histosafe (Yvsolab SA, Beerse, Belgium) and rehydrated in alcohol series. After blocking endogenous peroxidase activity with 3% H₂O₂ diluted in methanol, a demasking step was performed for 75 min at 98°C with citrate buffer and Triton X100 before the sections were subjected to an antigen retrieval step. Antigen retrieval steps, antibody dilutions and incubation conditions were performed as previously described (Scalercio et al. 2014). Diaminobenzidine was used as a chromogenic (SK 4100, Vector Laboratories, Peterborough, UK). The slides were then counterstained with haematoxylin and mounted with DPX neutral mounting medium (Prosan, Merelbeke, Belgium). Negative controls consisted of the dilution solution without any primary antibody

and the following positive controls were used: hepatic carcinoma for GDF-9, human antral follicles for AMH, testicular germ cell tumour tissue for c-kit, human uterus for CD31 and proliferative endometrium for Ki67. All positive controls were processed as the tested tissues. For quantitative analysis of GDF-9, AMH, c-kit and Ki67 protein expression, primordial, primary and secondary follicles were evaluated in all animals. Follicles were considered GDF-9-positive when the oocyte cytoplasm was immunostained; AMH-positive follicles presented at least one granulosa cell immunostained; Ki67 staining was used to attest the growing status of follicles and to ensure if follicles classified as primordial were indeed at resting stage or being activated. Follicles containing at least one Ki67-positive granulosa cell were considered as belonging to the growing pool. Ki67 was also used to detect stromal cells proliferation by counting positive cells in random areas of 100 mm² in every tissue section applying Image J software. For CD31 immunostaining, depending on the size of the graft, between 3 – 5 slides were scanned by Mirax Scan (Zeiss) and visualized using the Mirax Viewer software. The area around each ovarian tissue graft was defined and all vessels present in the grafts were counted.

Fibrosis

Relative areas of fibrosis were evaluated using Masson's trichrome-stained. Fibrotic areas were characterized by poor cellularity, as evidenced by a low number of cell nuclei and collagen deposits as previously described (Dath et al. 2010). Masson's trichrome staining turns the tissue green showing that it has been replaced with collagenous connective tissue, becoming fibrotic areas easily recognizable. Sections were scanned by Mirax Scan (Zeiss), and fibrotic areas and total section areas were delimited with the freehand tool and then measured using the Mirax Viewer program. Fibrosis was determined by calculating the percentage of fibrotic areas per analysed area.

Analysis of DNA Strand Breaks for the detection of apoptotic cells (TUNEL staining)

Apoptosis was analysed by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labelling (TUNEL) to detect DNA fragmentation. Paraffin sections were deparaffinised with Histosafe (Yvsolab SA), rehydrated in alcohol series and washed in running de-ionized water. The slides were subsequently pre-treated with 20 µg/mL of proteinase K working solution (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) in 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) for 30 minutes at 37 °C in a humidified chamber. DNA fragmentation was detected by means of the In Situ Cell Death Detection Kit, POD (Roche Applied Science, Mannheim, BW, Germany), according to manufacturer's instructions and analysis was performed as described previously (Martinez-Madrid et al. 2007). Human tonsil tissue was used as a positive control, and negative control sections were incubated with label solution without enzyme solution. Follicles with $\geq 49\%$ of their granulosa cells staining positive for TUNEL were considered to be atretic, as were those follicles with TUNEL-positive oocytes. The population of stromal cells was analysed in a 100 mm² area randomly assigned in the sections.

Statistical analyses

All data are presented as mean \pm standard error (SEM) and the follicle, vessels or the stromal cells were the unit of analysis. The results were analysed using the GraphPad Prism 6.04 software and compared with two-way ANOVA. Values of at least $P < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Graft harvesting

One week after transplantation, all grafted fragments were recovered from the five squirrel monkeys. They had the same size and shape of the tissue before transplantation and

were connected to the surrounding tissue through numerous vessels. No antral follicle neither corpus luteum was seen. All females were cycling after the study.

Ovarian follicles analyses

Morphology and density of preantral follicles

A total of 1066 preantral follicles were evaluated: 689 from control tissue, 162 from tissue grafted without Trolox exposure and 215 from Trolox-treated graft. The percentages of morphologically normal primordial, primary and secondary follicles in control ovarian tissue were $72.6 \pm 9.1\%$, $21.4 \pm 7.2\%$ and $6.0 \pm 2.0\%$ respectively. Similar proportions were observed in Trolox-treated grafts, i.e. $72.7 \pm 8.9\%$, $24.8 \pm 7.3\%$ and $2.5 \pm 2.0\%$ of primordial, primary and secondary follicles, respectively. When compared to control, grafts without Trolox pre-treatment presented a significant decrease in the proportion of morphological normal primordial follicles ($49.9 \pm 5.1\%$), with a concomitant significant increase in the proportion of primary ones ($47.4 \pm 4.9\%$); rates of secondary follicles were similar to control ($2.7 \pm 2.0\%$) (Fig. 1). Independently on the Trolox treatment, grafting resulted in a significant decrease in the density of primordial follicles when compared to control (Fig 1.).

Follicle survival, growth and function

The proportion of apoptotic primary and secondary follicles was significantly higher in grafted tissue without Trolox pre-treatment than in all the other groups (Fig 2.). Follicle growth after grafting was confirmed by Ki67 immunostaining. The population of recruited primordial follicles, e.g. containing Ki67-positive granulosa cells in untreated grafts was significantly higher compared to control, where none of the primordial follicles were positive to Ki67. No differences were observed when the percentages of proliferating granulosa cells in primordial follicles from treated-Trolox grafts were compared with control ones or with untreated grafts. The percentage of primary and secondary follicles with Ki67-positive

granulosa cells was superior in the group that was not supplemented with Trolox, but this difference was not significant (Fig. 2).

AMH staining was absent in primordial follicles, independently on the treatment. Primary and secondary follicles from control expressed AMH, while those from untreated grafts did not. Trolox-treated grafts, however, presented secondary follicles positively stained for AMH. GDF-9 staining ranged from faint (primordial and primary follicles) to strong (secondary follicles) and it was observed in the oocyte cytoplasm and granulosa cells. All primordial, primary and secondary follicles from control were positively stained. Similarly, follicles from grafts, either or not treated with Trolox, were positive for GDF-9, except for the primordial ones that were not stained. Immunostaining was performed to identify c-kit protein in the oolemma of preantral follicles. In all treatments, c-kit immunostaining was found to be positive in primordial, primary and secondary follicles. Images of immunostaining are depicted in Fig. 3C.

Ovarian tissue analyses

Tissue vascularization after grafting

Tissue vascularization was confirmed by counting the number of vessels per mm^2 in the histological sections. The mean number of vessels per mm^2 in the sections identified in the ovarian tissue grafted without (0.43 ± 0.16) and with Trolox (3.35 ± 2.54) did not differ significantly from the number of vessels found in control (0.41 ± 0.22) (Fig 4A). Representative immunostaining images for CD31 in control and after grafting of tissue pre-treated with Trolox are shown in Fig. 4 (B, C).

Stromal cell survival and proliferation

Grafting did not result in increased apoptosis, but exposure to Trolox significantly decreased the percentage of apoptotic stromal cells. While control tissue and non Trolox-pre-

treated grafts presented mean percentages of $14.13 \pm 2.96\%$ and $12.50 \pm 2.84\%$ of apoptotic cells respectively, exposure tissue to Trolox resulted in $1.15 \pm 0.39\%$ apoptotic cells (Fig. 4, D-F).

After grafting, cell proliferation was significantly increased compared to control ($0.47 \pm 0.20\%$ Ki67-positive stromal cells). In untreated grafts, the percentage of Ki67-positive stromal cells was $1.99 \pm 0.50\%$, and in Trolox treated graft, $1.37 \pm 0.25\%$ of the stromal cells were Ki67-positive (Fig. 4, G-I). However, cell density was not significantly increased. While in control tissue there were 55.6 ± 8.3 stromal cells/ mm^2 , grafts without and with Trolox pre-treatment presented 81.8 ± 18.5 stromal cells/ mm^2 and 74.5 ± 6.3 stromal cells/ mm^2 , respectively.

Quantification of ovarian tissue fibrosis

Fibrosis was expressed as fibrotic area, visible after Masson's trichrome or Picrosirius staining. Total evaluated areas measured $3282 \pm 1573 \text{ mm}^2$, $3161 \pm 495 \text{ mm}^2$ and $2371 \pm 496 \text{ mm}^2$ in control, untreated graft and Trolox-treated graft, respectively. Based on Masson's trichrome, fibrotic areas increased significantly in Trolox-treated grafts ($31.1 \pm 1.5 \%$) when compared with control ($3.3 \pm 0.7 \%$) or untreated grafts ($15.5 \pm 4.7 \%$) (Fig. 4, J-L).

Picrosirius staining revealed that area with fibres increased in grafted tissue without ($30.8 \pm 2.1 \%$) and with ($26.5 \pm 1.7 \%$) pre-treatment with Trolox-treated grafts when compared with control ($18.5 \pm 2.8 \%$). When distribution of collagen types I and III was evaluated, grafts pre-treated with Trolox presented significant higher levels of collagen I ($7.5 \pm 1.2 \%$) than in untreated grafts ($1.4 \pm 0.4 \%$) or control ($0.6 \pm 0.1 \%$). No differences were observed when levels of collagen type III were evaluated (Fig. 4, M-O).

Discussion

In the present study we have shown the importance of ovarian tissue treatment with Trolox, before grafting. As the initial moment of grafting survival is decisive to follicular survival, we evaluated both follicular and stromal quality after seven days transplantation. It is imperative to inform that, in a pilot (data not shown), ovarian fragments (~4x4x1 mm) were collected for the evaluation of follicular quality immediately after tissue collection and exposure to medium, i.e. before grafting. As no differences on the percentages of morphologically normal follicles were observed from control, complete data analyses herein presented are focused on the effect of tissue pre-incubation with trolox followed by grafting.

No particular changes were observed in the grafts at the moment of harvesting, e.g. no tissue losses or shape changes, neither absence of vascularization. Not surprisingly, no antral follicles were found in the transplants. Loss of follicles in more advantage stages is common because of their greater susceptibility to ischemia than primordial follicles (Demeestere et al. 2009).

Although primordial, primary and secondary follicles were found in the recovered transplants, their density was decreased in the grafts as previously reported in fresh transplants of ovaries from mice (Liu et al. 2008), sheep (Salle et al., 1999), goats (Santos et al. 2009), cows (Gavish et al. 2014) and women (Oktay et al. 1998). All these authors agree that follicular loss is a result of ischemia before revascularization of the graft. However, this is not the single source of follicular depletion, but also the massive recruitment of primordial follicles (Gavish et al. 2014). Comparably to these latter authors, we also observed that grafting resulted in a decrease in the population of primordial follicles with an associated increase in the number of primary follicles. In the present study, recruitment of a large number of primordial follicles in the untreated grafts was confirmed by the Ki67 immunostaining of their granulosa cells. Loss of follicles after transplantation can be partially

due to the lipid peroxidation, which leads to ischemia-reperfusion injury (Liu et al., 2002). When tissue was treated with Trolox before grafting, no extreme follicular activation was observed. As Trolox has a protective effect on cells through inhibition of peroxidation (Du et al., 2014), it probably had a positive effect avoiding the exaggerated activation of primordial follicles caused by the ischemia-reperfusion and oxidative stress (Baird et al., 1999; Kim et al., 2004; Soleimani et al., 2011; Friedman et al., 2012). Oxidative stress not only leads to uncontrolled activation of primordial follicles in grafts, but also is related to follicular apoptosis (Tilly and Tilly, 1995). This is in line with our study, once we also observed increased apoptotic rates in primary and secondary follicles from grafts not treated with the antioxidant Trolox, which works on the apoptosis pathway (Forrest et al., 1994; Salgo & Pryor, 1996; Quintanilla et al. 2005).

We investigated follicle function using AMH, GDF-9 and c-kit, as they are expressed by granulosa cells, and oocytes cytoplasm and oolema, respectively, in follicles from squirrel monkeys, and play an indispensable role at the folliculogenesis process (Scalercio et al., 2014). AMH is a member of the transforming growth factor β (TGF β) superfamily, known to have an inhibitory effect on primordial follicle activation (Visser et al., 2006). Absence of AMH expression in primordial follicles from squirrel monkeys was expected, once it was recently reported (Scalercio et al., 2014). A low AMH level, normally produced by the pool of developing follicles in intact ovaries and after ovarian tissue transplantation, promotes massive follicular recruitment (Visser and Themmen, 2005). In the present study, growing follicles from untreated grafts were negative for AMH immunostaining. Based on this, we can suggest that the lower population of primordial follicles found in the untreated group was probably due to the absence in AMH expression by growing follicles. GDF-9, another member of the TGF β superfamily, has a fundamental function in early folliculogenesis process (Dong et al., 1996), participating in recruitment of primordial follicles and

proliferation of granulosa cells (Paulini and Melo, 2011). Except primordial follicles from untreated and Trolox-treated grafts, the most primary and secondary follicles from both groups were positive for GDF-9 staining. In a previous study, Wang et al. (2013a) demonstrated absence of GDF-9 expression in primordial follicles from transplanted mouse ovaries, which was probably an indicator of low quality of follicles with a possible subsequent retarded development. c-Kit immunostaining was observed at all stages of follicle development after grafting in both groups, with similar pattern of expression of this factor when compared with control ovarian tissue. Like in our results, David et al. (2011) evidenced c-kit expression in the oolemma of preantral follicles, and the pattern of expression of c-kit after cryopreservation and transplantation similar with fresh ovarian tissue. However, is important to bear in mind that expression of c-kit was investigated only in morphologically normal follicles, so we cannot assert if any alteration in c-kit expression would have played a role in the death of follicles after grafting (Jin et al., 2004).

No difference was found in the number of vessels between control and grafts, treated or untreated ones. Although Trolox did not exert any effect on tissue revascularization, its combination with angiogenic factors appears suitable as a strategy for the next procedures of ovarian tissue grafting. Schnorr et al. (2002) suggested that treatment of cryopreserved grafts with VEGF improved the tissue vascularization, but not the tissue viability. In a six-week study, human fresh grafts were xenotransplanted to rabbits. Both tissue and hosts were treated with a combination of VEGF and bFGF resulting in increased tissue vascularization and survival, but follicular loss was inevitable (Wang et al. 2013b). These later authors also observed that graft treatment decreased apoptotic rates, even when compared to control tissue. Similarly, in the present study, Trolox was also responsible to decrease apoptosis not only in ovarian follicles but also in stromal cells, due to its antiapoptotic effect (Forrest et al., 1994; Salgo & Pryor, 1996; Quintanilla et al. 2005). Independently on the pre-treatment with

Trolox, grafts presented an increased rate of stromal cell proliferation when compared to control, probably related with the no effect of Trolox on vascularization. Studying xenografts, Soleimani et al. (2011) showed a positive correlation between ovarian stromal cells proliferation and tissue vascularization. Although we have observed increased proliferation in the graft stromal cells, cell density was decreased. Improving vascularization, therefore, may also improve stromal cell survival, as shown by Dath et al (2011).

An inquiring finding in the present study was the significant increase in fibrotic tissue after exposure to Trolox followed by grafting. Oxidative stress plays an important role in the development of fibrotic responses. Although the anti-oxidant Trolox is claimed to be an anti-fibrotic agent (Galicia-Moreno et al. 2008; 2011), it is well known that antioxidant vitamins, mainly E and C, increase collagen turnover (Archile-Contreras et al., 2011) and protect collagen against damage (Plessinger et al., 2000). This was confirmed in the present study after picrosirius staining, where although the levels of collagen type III were unchanged in the grafts, grafts exposed to Trolox presented a significant increase in the synthesis of collagen type I. Fibrosis may also indicate damage in the ovarian structure and, consequently, loss of ovarian follicles including the primordial ones (Meirow et al. 2007). However, in the present study, follicular survival was increased in the presence of Trolox and massive activation was avoided. Likewise, Nisolle et al (2000) showed that ovarian tissue fibrosis does not affect the population of healthy primordial and primary follicles. However, we assume that concerns should be taken in account when considering further development of these follicles.

In conclusion, this study shows that graft pre-incubation with Trolox improves survival of preantral follicles, protects primordial follicles from massive activation, decrease apoptosis rates in ovarian follicles and stromal cells, but also increases the fibrotic areas in the tissue, which might affect follicle density in the tissue. As Trolox did not improve tissue revascularization, its combined use with angiogenic factors, might improve cell density after

grafting. Moreover, the beneficial influence of graft tissue pre-treatment with Trolox needs to be confirmed after long-term grafting.

Acknowledgements

The authors thank Dolores Gonzalez, Olivier van Kerk and Osvaldo Leal dos Santos Filho for their technical assistance, and the National Primate Center for the logistical support. SRRAS is a recipient of a grant from CAPES (Brazil) and participated in the Internship Program of Doctoral Sandwich Abroad at Université Catholique de Louvain, Brussels.

References

- Abir, R., Fisch, B., Jessel, S., Felz, C., Ben-Haroush, A., Orvieto, R. (2011). Improving posttransplantation survival of human ovarian tissue by treating the host and graft. *Fertil. Steril.* **15**, 1205-1210.
- Amorim, C.A., David, A., Dolmans, M.M., Camboni, A., Donnez, J., Van Langendonck, A. (2011). Impact of freezing and thawing of human ovarian tissue on follicular growth after long-term xenotransplantation. *J. Assist. Reprod. Genet.* **28**, 1157-1165.
- Amorim, A.C., Jacobs, S., Devireddy, R.V., Langendonck, A.V., Vanacker, J., Jaeger, J., Luyckx, V., Donnez, J., Dolmans, M.M. (2013) Successful vitrification and autografting of baboon (*Papio anubis*) ovarian tissue. *Hum. Reprod.* **28**, 2146-2156.
- Archile-Contreras, A.C., Cha, M.C., Mandell, I.B., Miller, S.P., Purslow, P.P. (2011). Vitamins E and C may increase collagen turnover by intramuscular fibroblasts. Potential for improved meat quality. *J. Agric. Food Chem.* **26**, 608-614.
- Aubard, Y., Piver, P., Congnié, Y., Fermeaux, V., Poulin, N., Driancourt, M.A. (1999). Orthotopic and heterotopic autografts of frozen-thawed ovarian cortex in sheep. *Hum. Reprod.* **14**, 2149-2154.

- Baird, D.T., Webb, R., Campbell, B.K., Harkness, L.M., Gosden, R.G. (1999). Long-term ovarian function in sheep after ovariectomy and transplantation of autografts stored at -196. *Endocrinology* **140**, 462-471.
- Barclay, L.R.C., Artz, J.D., Mowat, J.J. (1995). Partitioning and antioxidant action of the water-soluble antioxidant, Trolox, between the aqueous and lipid phases of phosphatidylcholine membranes: ¹⁴C tracer and product studies. *Biochim. Biophys. Acta.* **1237**, 77-85.
- Brigelius-Flohe, R. (2009). Vitamin E: the shrew waiting to be tamed. *Free Radic. Biol. Med.* **46**, 543-554.
- Brito, D.C., Brito, A.B., Scalercio, S.R., Percário, S., Miranda, M.S., Rocha, R.M., Diniz, J.A., Oskam, I.C., van den Hurk, R., Paris, M.C., Domingues, S.F.S., Santos, R.R. (2014). Vitamin E-analog Trolox prevents endoplasmic reticulum stress in frozen-thawed ovarian tissue of capuchin monkey (*Sapajus apella*). *Cell Tissue Res.* **355**, 471-480.
- Candy, C.J., Wood, M.J., Whittingham, D.G. (1997). Effect of cryoprotectants on the survival of follicles in frozen mouse ovaries. *J. Reprod. Fertil.* **110**, 11-19.
- Dath, C., Van Eyck, A.S., Dolmans, M.M., Romeu, L., Delle Vigne, L., Donnez, J., van Langendonckt, A. (2010). Xenotransplantation of human ovarian tissue to nude mice: comparison between four grafting sites. *Hum. Reprod.* **25**, 1734-1743.
- Dath, C., Dethy, A., van Langendonckt, A., Van Eyck, A.S., Amorim, C.A., Donnez, J., Dolmans, M.M. (2011). Endothelial cells are essential for ovarian stromal tissue restructuring after xenotransplantation of isolated ovarian stromal cells. *Hum. Reprod.* **26**, 1431-1439.
- David, A., Dolmans, M.M., Van Langendonckt, A., Donnez, J., Amorim, C.A. (2011). Immunohistochemical localization of growth factors after cryopreservation and 3 weeks' xenotransplantation of human ovarian tissue. *Fertil. Steril.* **95**, 1241-1246.

- Demeestere, I., Simon, P., Emiliani, S., Delbaere, A., Englert, Y. (2009). Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation. *Hum. Reprod. Update* **15**, 649-665.
- Domingues, S.F.S., Caldas-Bussiere, M.C., Martins, N.D., Carvalho, R.A. (2007). Ultrasonographic imaging of the reproductive tract and surgical recovery of oocytes in *Cebus apella* (capuchin monkeys). *Theriogenology* **68**, 1251-1259.
- Dong, J., Albertini, D.F., Nishimori, K., Kumar, T.R., Lu, N., Matzuk, M.M. (1996). Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* **383**, 531-535.
- Du, L., Miao, X., Gao, Y., Jia, H., Liu, K., Liu, Y. (2014). The protective effects of Trolox-loaded chitosan nanoparticles against hypoxia-mediated cell apoptosis. *Nanomedicine* **10**, 1411-1420.
- Forrest, V.J., Kang, Y.H., McClain, D.E., Robinson, D.H., Ramakrishnan, N. (1994). Oxidative stress-induced apoptosis prevented by Trolox. *Free Radic. Biol. Med.* **16**, 675-684.
- Friedman, O., Orvieto, R., Fisch, B., Felz, C., Freud, E., Ben-Haroush, A., Abir, R. (2012). Possible improvements in human ovarian tissue grafting by various host and graft treatments. *Hum. Reprod.* **27**, 474-482.
- Galicia-Moreno, M., Rodríguez-Rivera, A., Reyes-Gordillo, K., Segovia, J., Shibayana, M., Tsutsumi, V., Vergara, P., Moreno, M.G., Fernández-Martinez, E., Pérez-Alvarez, V.M., Muriel, P. (2008). Trolox down-regulates transforming growth factor-beta and prevents experimental cirrhosis. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **103**, 476-481.
- Galicia-Moreno, M., Favari, L., Muriel, P. (2011). Trolox mitigates fibrosis in a bile duct ligation model. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **27**, 308-318.
- Gavish, Z., Peer, G., Hadassa, R., Yoram, C., Meirow, D. (2014). Follicle activation and 'burn-out' contribute to post-transplantation follicle loss in ovarian tissue grafts: the effect of graft thickness. *Hum. Reprod.* **29**, 989-996.

- Jin, X., Han, C.S., Yu, F.Q., Wei, P., Hu, Z.Y., Liu, Y.X. (2004). Antiapoptotic action of stem cell factor on oocytes in primordial follicles and its signal transduction. *Mol. Reprod. Dev.* **70**, 82–90.
- Karaca, M., Odabasoglu, F., Kumtepe, Y., Albayrak An Cadirci, E., Keles, O.N. (2009). Protective effects of erythropoietin on ischemia/reperfusion injury of rat ovary. *Eur J Obstet Gynecol. Reprod. Biol.* **144**, 157-162.
- Kim, S.S., Yang, H.W., Kang, H.G., Lee, H.H., Lee, H.C., Ko, D.S., Gosden, R.G. (2004). Quantitative assessment of ischemic tissue damage in ovarian cortical tissue with or without antioxidant (ascorbic acid) treatment. *Fertil. Steril.* **82**, 679-685.
- Liu, J., Van der Elst, J., Van den Broecke, R., Dhont, M. (2002). Early massive follicle loss and apoptosis in heterotopically grafted newborn mouse ovaries. *Hum. Reprod.* **17**, 605-611.
- Liu, L., Wood, G.A., Morikawa, L., Ayearst, R., Fleming, C., McKerlie, C. (2008). Restoration of fertility by orthotopic transplantation of frozen adult mouse ovaries. *Hum. Reprod.* **23**, 122-128.
- Luyckx, V., Dolmans, M.M., Vanacker, J., Scalercio, S.R., Donnez, J., Amorim, C. (2013). First step in developing a 3D biodegradable fibrin scaffold for an artificial ovary. *J. Ovarian Res.* **6**, 83.
- Luz, H.K.M., Santos, R.R., Wanderley, L.S., Faustino, L.R., Silva, C.M.G., Carvalho, A.A., Campello, C.C., Santos, F.W., Figueiredo, J.R., Rodrigues, A.P.R. (2012). Catalase prevents lipid peroxidation and enhances survival of caprine preantral follicles cryopreserved in a 1,2-propanediol-freezing medium. *Biopreserv. Biobank.* **10**, 338-342.
- Martinez-Madrid, B., Camboni, A., Dolmans, M.M., Nottola, S., Van Langendonck, A., Donnez, J. (2007). Apoptosis and ultrastructural assessment after cryopreservation of whole human ovaries with their vascular pedicle. *Fertil. Steril.* **87**, 1153-1165.

- Meirow, D., Dor, J., Kaufman, B., Shrim, A., Rabinovici, J., Schiff, E., Raanani, H., Levron, J., Fridman, E. (2007). Cortical fibrosis and blood-vessels damage in human ovaries exposed to chemotherapy. Potential mechanisms of ovarian injury. *Hum. Reprod.* **22**, 1626-1633.
- Nisolle, M., Casanas-Roux, F., Qu, J., Motta, P., Donnez, J. (2000). Histologic and ultrastructural evaluation of fresh and frozen-thawed human ovarian xenografts in nude mice. *Fertil. Steril.* **74**, 122-129.
- Nugent, D., Newton, H., Gallivan, L., Gosden, R.G. (1998). Protective effect of vitamin E on ischaemia-reperfusion injury in ovarian grafts. *J. Reprod. Fertil.* **114**, 341-346.
- Oktay, K., Newton, H., Mullan, J., Gosden, R.G. (1998). Development of human primordial follicles to antral stages in SCID/hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone. *Hum. Reprod.* **13**, 1133-1138.
- Paulini, F., Melo, E.O. (2011). The role of oocyte-secreted factors GDF9 and BMP15 in follicular development and oogenesis. *Reprod. Domest. Anim.* **46**, 354-361.
- Plessinger, M.A., Woods, J.R., Jr. Miller, R.K. (2000). Pretreatment of human amnion-chorion with vitamins C and E prevents hypochlorous acid-induced damage. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **183**, 979-985.
- Quintanilla, R.A., Muñoz, F.J., Metcalfe, M.J., Hitshfeld, M., Olivares, G., Godoy, J.A., Inestrosa, N.C. (2005). Trolox and 17 beta-estradiol protect against amyloid beta-peptide neurotoxicity by a mechanism that involves modulation of the Wnt signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **280**, 11615-11625.
- Rich, L., Whittaker, P. (2005). Collagen and picrosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. *Braz. J. Morphol. Sci.* **22**, 97-104.
- Salgo, M.G., Pryor, W.A. (1996). Trolox inhibits peroxynitrite-mediated oxidative stress and apoptosis in rat thymocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **333**, 482-488.

- Salle, B., Lornage, J., Demirci, B., Vaudoyer, F., Poirel, M.T., Franck, M., Rudigoz, R.C., Guerin, J.F. (1999). Restoration of ovarian steroid secretion and histologic assessment after freezing, thawing, and autograft of a hemi-ovary in sheep. *Fertil. Steril.* **72**, 366-370.
- Santos, R.R., Rodrigues, A.P., Costa, S.H., Silva, J.R., Matos, M.H., Lucci, C.M., Bao, S.N., van den Hurk, R., Figueiredo, R. (2006). Histological and ultrastructural analysis of cryopreserved sheep preantral follicles. *Anim. Reprod. Sci.* **91**, 249-263.
- Santos, R.R., Knijn, H.M., Vos, P.L., Oei, C.H., van Loon, T., Colenbrander, B., Gadella, B.M., van den Hurk, R., Roelen, B.A.J. (2009). Complete follicular development and recovery of ovarian function of frozen-thawed, autotransplanted caprine ovarian cortex. *Fertil. Steril.* **91**, 1455-1458.
- Santos, R.R., Amorim, C., Cecconi, S., Fassbender, M., Imhof, M., Lornage, J., Paris, M., Schoenfeldt, V., Martinez-Madrid, B. (2010). Cryopreservation of ovarian tissue: An emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. *Anim. Reprod. Sci.* **122**, 151-163.
- Scalercio, R.R.A., Brito, A.B., Domingues, S.F.S., Santos, R.R., Amorim, C.A. (2014). Immunolocalization of growth, inhibitory and proliferative factors involved in initial ovarian folliculogenesis from adult common squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Reprod. Sci.* in press.
- Schnorr, J., Oehninger, S., Toner, J., Hsiu, J., Lanzendorf, S., Williams, R., Hodgen, G. (2002). Functional studies of subcutaneous ovarian transplants in non-human primates: steroidogenesis, endometrial development, ovulation, menstrual patterns and gamete morphology. *Hum. Reprod.* **17**, 612-619.
- Soleimani, R., Heytens, E., Oktay, K. (2011). Enhancement of neoangiogenesis and follicle survival by sphingosine-1-phosphate in human ovarian tissue xenotransplants. *PLoS ONE* **6**, e19475.
- Sylvester, P.W. (2007). Vitamin E and apoptosis. *Vitam. Horm.* **76**, 329-356.

- Tan, S., Liu, Y.Y., Nielsen, V.G., Skinner, K., Kirk, K.A., Baldwin, S.T., Parks, D.A. (1996). Maternal infusion of antioxidants (Trolox and ascorbic acid) protects the fetal heart in rabbit fetal hypoxia. *Pediatr. Res.* **39**, 499-503.
- Tilly, J.L., Tilly, K.L. (1995). Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. *Endocrinology* **136**, 242-252.
- Ting, A.Y., Yeoman, R.R., Campos, J.R., Lawson, M.S., Mullen, S.F., Fahy, G.M., Zelinski, M.B. (2013). Morphological and functional preservation of pre-antral follicles after vitrification of macaque ovarian tissue in a closed system. *Hum. Reprod.* **28**, 1267-1279.
- Vanacker, J., Luyckx, V., Dolmans, M.M., Des Rieux, A., Jaeger, J., Van Langendonck, A., Donnez, J., Amorim, C.A. (2012). Transplantation of an alginate-matrigel matrix containing isolated ovarian cells: first step in developing a biodegradable scaffold to transplant isolated preantral follicles and ovarian cells. *Biomaterials* **33**, 6079–6085.
- Visser, J.A., Themmen, A.P. (2005). Anti-Müllerian hormone and folliculogenesis. *Mol. Cell Endocrinol.* **29**, 81-86.
- Visser, J.A., de Jong, F.H., Laven, J.S., Themmen, A.P. (2006). Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction* **131**, 1-9.
- von Schönfeldt, V., Chandolia, R., Ochsenkühn, R., Nieschlag, E., Kiesel, L., Sonntag, B. (2012). FSH prevents depletion of the resting follicle pool by promoting follicular number and morphology in fresh and cryopreserved primate ovarian tissues following xenografting. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **10**, 98.
- Wang, S., Yang, S., Lay, Z., Ding, T., Shen, W., Shi, L., Jiang, J., Ma, L., Tian, Y., Du, X., Luo, A., Wang, S. (2013a). Effects of culture and transplantation on follicle activation and early follicular growth in neonatal mouse ovaries. *Cell. Tissue. Res.* **354**, 609-621.

- Wang, L., Ying, Y.F., Ouyang, Y.L., Wang, J.F., Xu, J. (2013b). VEGF and bFGF increase survival of xenografted human ovarian tissue in an experimental rabbit model. *J. Assist. Reprod. Genet.* **30**, 1301-1311.
- Zweier, J.L., Talukder, M.A.H. (2006). The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* **70**, 181-190.
- Jiang, Q., Yin, X., Lill, M.A., Danielson, M.L., Freiser, H., Huang, J. (2008). Long-chain carboxychromanols, metabolites of vitamin E, are potent inhibitors of cyclooxygenases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **105**, 20464–20469.
- Birringer, M., Lington, D., Vertuani, S., Manfredini, S., Scharlau, D., Gleib, M., Ristow, M. 2010. Proapoptotic effects of long-chain vitamin E metabolites in HepG2 cell are mediated by oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **49**, 1315-1322.
- Miura, T., Muraoka, S., Oqiso, T. 1993. Inhibition of hydroxyl radical-induced protein damages by trolox. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **31**:125-133.
- Alberto, M.E., Russo, N., Grand, A., Galano, A. 2013. A physicochemical examination of the free radical scavenging activity of Trolox: mechanism, kinetics and influence of the environment. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15**:4642-4650.
- Sobinoff, A.P., Pye, V., Nixon, B., Roman, S.D., McLaughlin, E.A. 2012. Jumping the gun: smoking constituent BaP causes premature primordial follicle activation and impairs oocyte fusibility through oxidative stress. *Toxicol. Appl. Pharmacol* **260**:70-80.

Figure legends

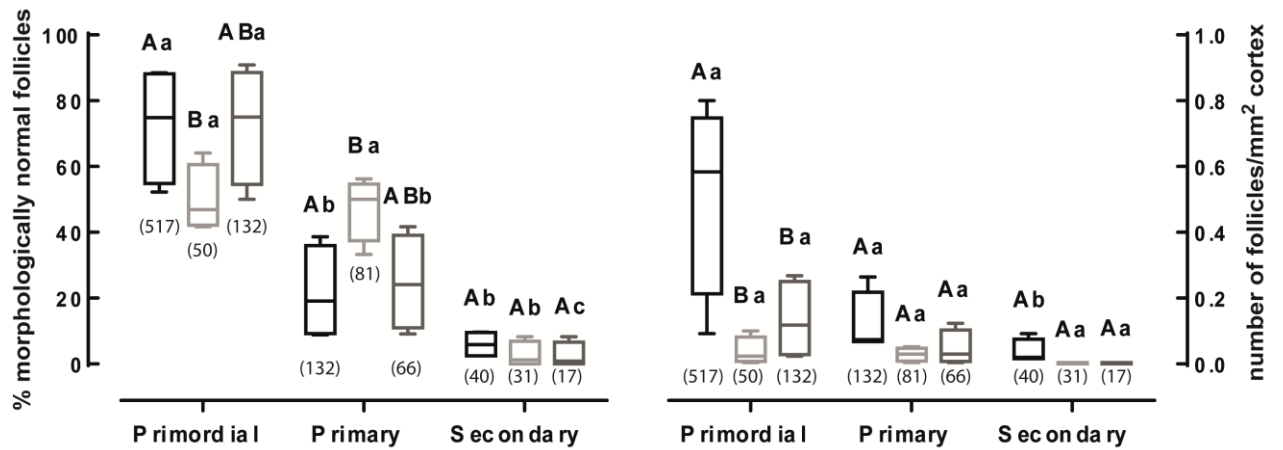


Fig. 1 Percentages of morphologically normal follicles (primordial, primary and secondary) in control tissue (black box), and after grafting without (light grey box) or with (dark grey box) Trolox pre-treatment (left panel), and density of follicles (primordial, primary and secondary) (number/mm²) in control tissue (black box), and after grafting without (light grey box) or with (dark grey box) Trolox pre-treatment (right panel); the number of evaluated follicles per class is given within the brackets under each box plot. Different upper-case letters (A,B) indicate significant differences between groups within the same follicular class. Different lower-case letters (a-c) indicate significant differences between follicular classes within the same treatment group.

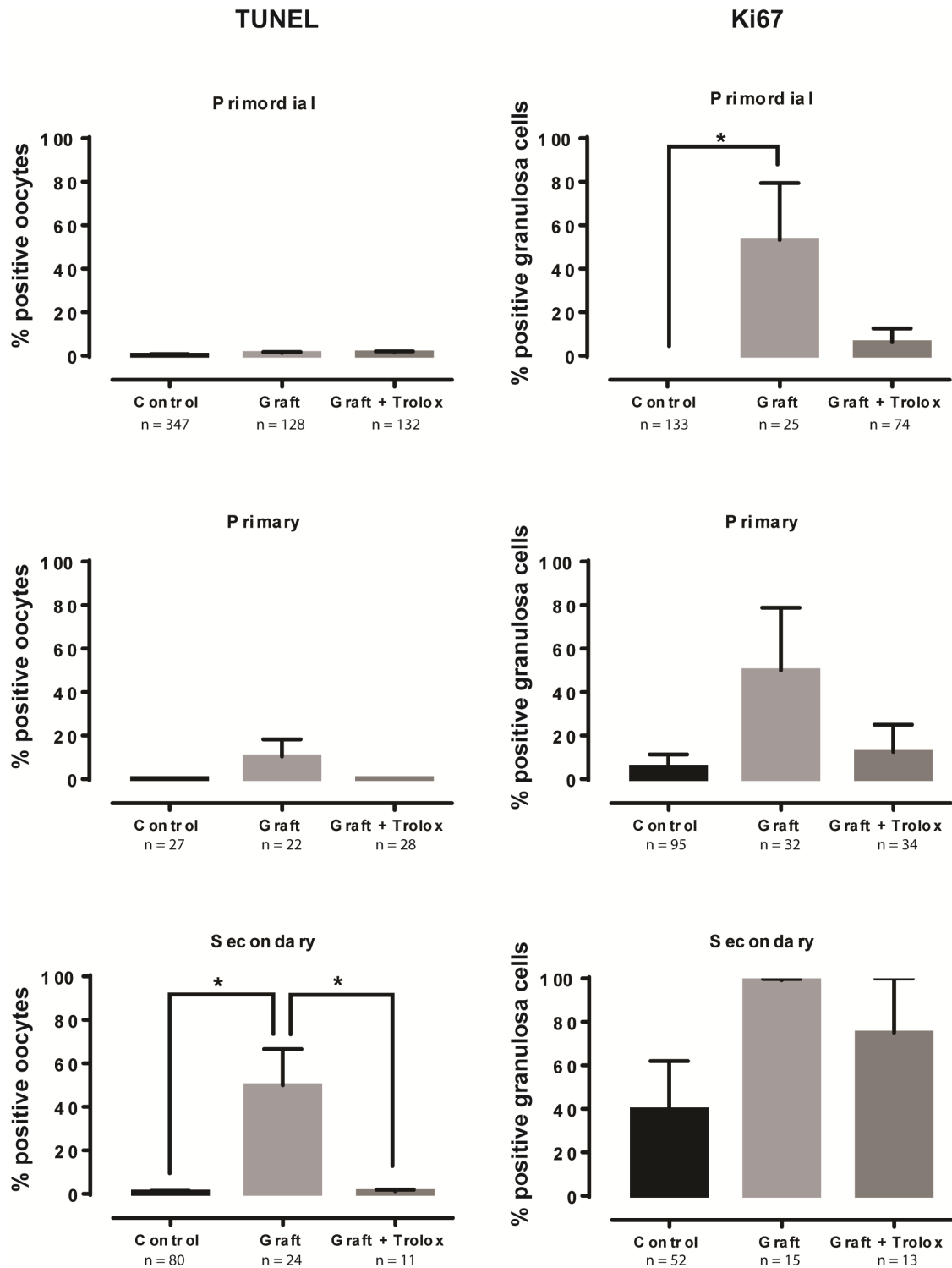


Fig. 2 Proportion of follicles with apoptotic oocytes after TUNEL immunostaining (left panel) and proportion of follicles with Ki67-positive granulosa cells (right panel). * indicates significant differences ($P < 0.05$) between treatment groups within the same follicular class.

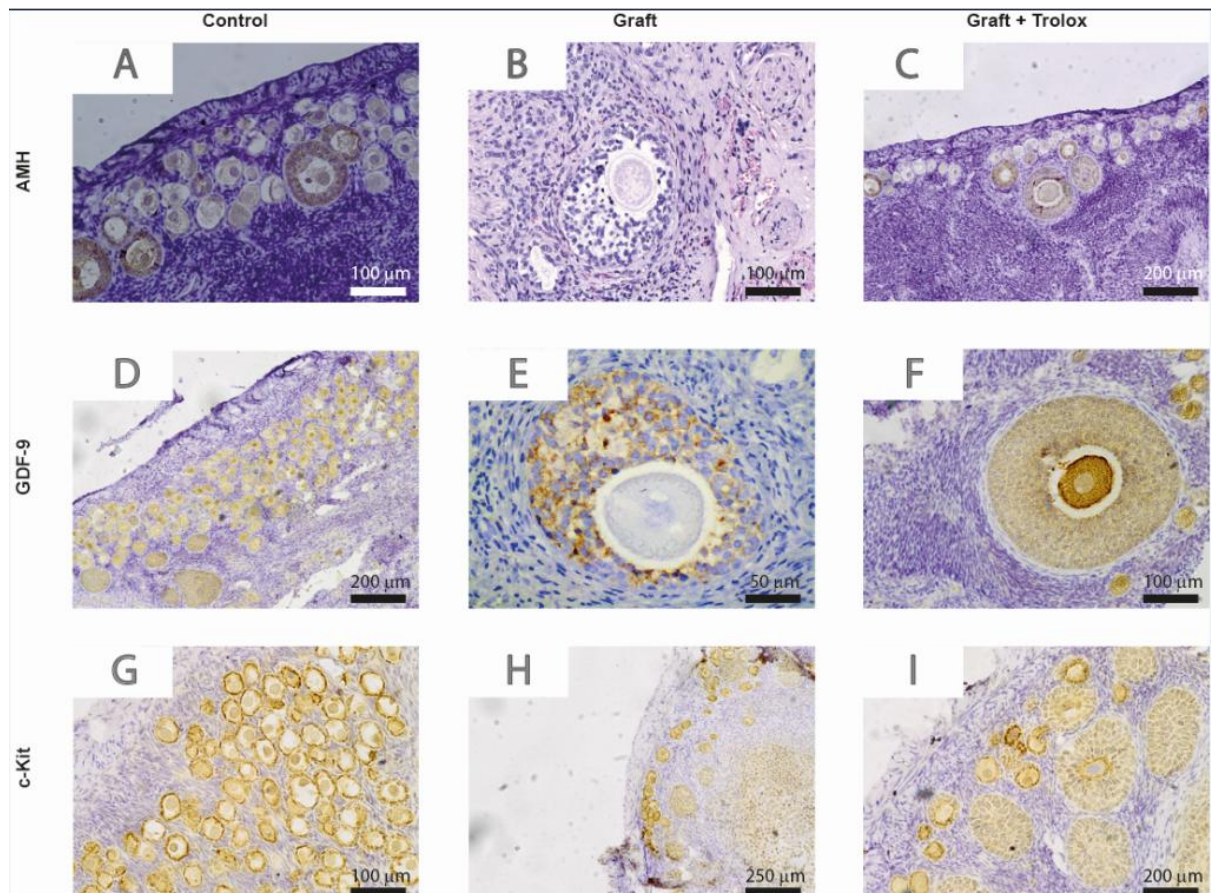


Fig. 3 Immunohistochemical staining for AMH (A – C) in granulosa cells of secondary follicles in control (A), grafted tissue without (B) and with previous exposure to Trolox (C). Immunohistochemical staining for GDF-9 (D – F) in oocytes and granulosa cells in secondary follicles in control (D), grafted tissue without (E) and with previous exposure to Trolox (F). Immunohistochemical staining for c-kit (G – I).

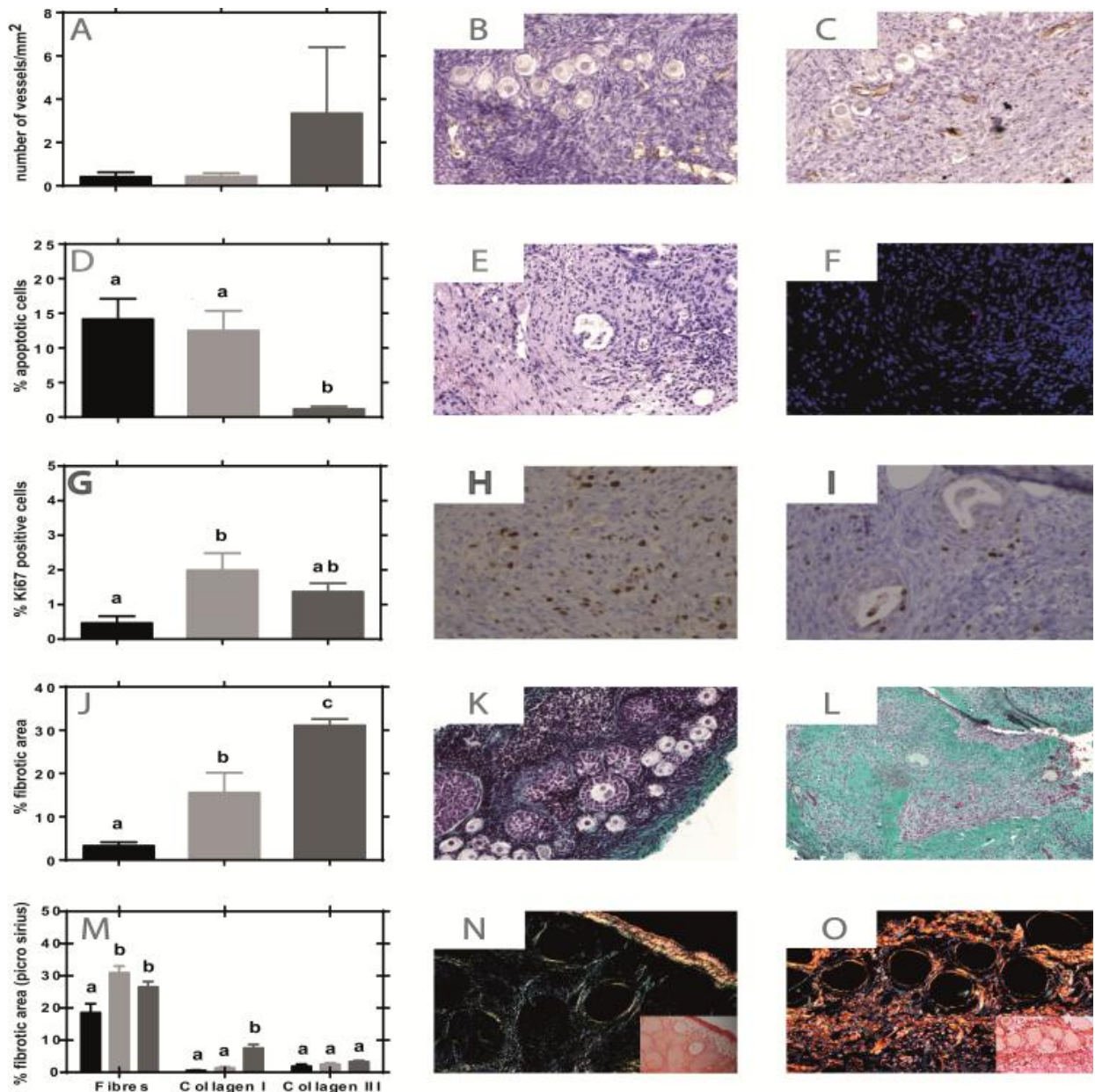


Fig. 4 Mean (\pm SEM) number of A: vessels per mm², and percentages of D: apoptotic cells, G: proliferating cells, J: fibrotic area in control tissues as well as after grafting and M: detailed fibres staining with picrosirius to detect fibers and collagen types I and III. Representative immunostaining images for B: CD31 in control and after C: grafting of tissue pre-treated with Trolox, graft previously exposed to Trolox, showing E: stromal cells stained with hematoxylin-eosin and F: TUNEL staining to detect apoptotic cells; DAPI counterstaining (cells in blue) and TUNEL staining (cells in red) are merged. Representative images of ki67 positively stained (brown) stromal cells in H: control and in I: Trolox-treated graft, and

fibrotic tissue evidenced by Masson's trichrome staining in K: control and in L: Trolox-treated graft; green staining is a marker for fibres. Picrosirius staining of N: control and O: trolox treated graft is shown (images were obtained after polarization and small boxes indicate staining without polarization). Different lower-case letters (a-c) indicate significant differences between treatment groups.

7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Em conclusão, este trabalho mostrou que fatores de crescimento, inibição e proliferação celular expressos no tecido ovariano, podem ser usados para avaliar a viabilidade e funcionalidade folicular. A pré-incubação do tecido ovariano com Trolox®, melhorou a sobrevivência de folículos pré-antrais, protegeu folículos primordiais de ativação maciça, diminuiu as taxas de apoptose em folículos ovarianos e células do estroma, mas também aumentou as áreas de fibrose no tecido e não melhorou a revascularização do tecido, após o autotransplante de fragmentos fresco do tecido cortical ovariano de *S. collinsi*, a curto prazo.

Adicionalmente este trabalho resultou em publicações científicas em revistas indexadas, resumos em anais de eventos científicos, bem como apresentações em congressos (Apendice A).

Apesar dos avanços obtidos, na resposta tecidual às variadas situações de transplantes de tecido ovariano, fica claro que ainda existe a necessidade da investigação de diferentes fatores teciduais envolvidos no desenvolvimento folicular após o transplante. Entre eles, a otimização das técnicas de transplante, para que se reduza a perda dos folículos durante os processos de enxertia e de revascularização, a determinação do local ideal para enxerto, longevidade do enxerto e qual quantidade tecidual necessária para preservar a fertilidade ainda são pontos a serem esclarecidos. Neste sentido, a continua investigação de espécimes, locais e técnicas cirúrgicas ideais para o transplante, além de ferramentas empregadas para avaliar e teste de protocolos ainda são necessários para auxiliar no entendimento de mecanismos indispensáveis para viabilidade e funcionalidade do desenvolvimento folicular após o transplante, visando especialmente a aplicação desta técnica para conservação de espécies com risco de extinção e para estudos comparativos com humanos.

REFERÊNCIAS

ABIR, R. et al. Improving posttransplantation survival of human ovarian tissue by treating the host and graft. **Fertility and Sterility**, v. 15, p. 1205-1210, 2011.

ADHIKARI, D.; LIU, K. Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. **Endocrine Reviews**, v. 30, n. 5, p. 438-464, 2009.

ALMEIDA, D.V. et al. Morphological and morphometrical characterization, and estimation of population of preantral ovarian follicles from senile common squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). **Animal Reproduction Science**, v. 34, p. 210-215, 2012.

AMORIM, A.C. et al. Successful vitrification and autografting of baboon (*Papio anubis*) ovarian tissue. **Human Reproduction**, v. 28, n.8, p. 2146-56, Aug, 2013.

ASA, C.S. Reproductive physiology. In: Kleiman DG, Allen ME, Thompson KV, Lumpkin S, Harris H (Ed.). **Wild mammals in captivity**. Chicago: The University of Chicago Press, 1996, p. 390-417.

ASAKAWA, T.; DUKELOW, W.R. Chromosomal analyses after in vitro fertilization of squirrel monkey (*Saimiri sciureus*) oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 26, p. 579-583, 1982.

BAKER, T. G. A quantitative and cytological study of oogenesis in the rhesus monkey. **Journal of Anatomy**, v. 100, p. 761-766, 1966.

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

BITETTI, M.S.; JANSON, C.H. When will the stork arrive? Patterns of birth seasonality in Neotropical Primates. **American Journal of Primatology**, v. 50, p. 109-130, 2000.

BOINSKIN, S. et al. An expanded test of the ecological model of primate social evolution: competitive regimes and female bonding in three species of squirrel monkeys (*Saimiri oerstedii*, *S. boliviensis*, and *S. sciureus*). **Behaviour**, v. 139, p. 227-61, 2002.

BRADFORD A. et al.. The effect of vitamin E on the structure of membrane lipid assemblies. **The Journal of Lipid Research**, v. 44, p. 1940-1945, 2003.

BRIGELIUS-FLOHE R. Vitamin E: the shrew waiting to be tamed. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 46, p. 543-554, 2009.

BRISTOL-GOULD, S.; WOODRUFF, T.K. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). **Theriogenology**, v. 66, p. 5-13, 2006.

BRITO, A.B. et al. Short-Term Culture of Ovarian Cortical Strips From Capuchin Monkeys (*Sapajus apella*): A morphological, viability, and molecular study of preantral follicular development in vitro. **Reproductive Sciences**, v. 20, p. 990-997, 2013.

BRITO D.C. et al. Vitamin E-analog Trolox prevents endoplasmic reticulum stress in frozen-thawed ovarian tissue of capuchin monkey (*Sapajus apella*). **Cell and Tissue Research**, v. 355, p. 471-480, 2014.

CANTLEY, L.C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. **Science**, v. 296, p.1655-1657, 2002.

CARROLL, J. et al. Extra-ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 90, p. 321-327, 1990.

CHEN, J.C. et al. Semen cryopreservation in the Tibetan macaque (*Macaca thibetana*)-comparison of different cooling programs and freezing media. **Acta Zoologica Sinica**, v. 40, p. 174-181, 1994.

CORTVRINDT, R.; SMITZ, J.E.J. In vitrofollicle growth: Achievements in mammalian species. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, p. 3-9, 2001.

DELLMAN, H.D.; BROWN, E.M. **Histologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1982. p. 397.

DENIS, L. T. et al. Freeze preservation of squirrel monkey sperm for use in timed fertilization studies. **Fertility and Sterility**, v. 27, p. 723-729, 1976.

DISSEN, G. A. et al. Immature rat ovaries become revascularized rapidly after auto-transplantation and show a gonadotropin-dependent increase in angiogenic factor gene expression. **Endocrinology**, v. 134, p. 1146-1154, 1994.

DONNEZ, J.; DOLMANS, M.M. Cryopreservation and transplantation of ovarian tissue. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 53, p. 787-96, 2010.

DONNEZ, J.; DOLMANS, M.M. Fertility preservation in women. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 9, p. 735-749, 2013.

DRIANCOURT, M.A. et al. Roles of Kit and Kit Ligand in ovarian function. **Reviews of Reproduction**, v. 5, p. 143-152, 2000.

DUFFY, D.M. Growth differentiation factor-9 is expressed by the primate follicle throughout the periovulatory interval. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 725-732, 2003.

DUKELOW, W.R. Reproductive cyclicity and breeding in the squirrel monkey. In: Rosenblum LA, Coe CL (eds). **Handbook of squirrel monkey research**. Plenum, New York, 1985, p. 169-190.

DURLINGER, A.L.L. et al. Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. **Endocrinology**, v. 140, p. 5789-5796, 1999.

GAO, J.M. et al. Improvement in the quality of heterotopic allotransplanted mouse ovarian tissues with basic fibroblast growth factor and fibrin hydrogel. **Human Reproduction**, v. 28, p. 2784-2793, 2013.

FRIEDMAN, O. et al. Possible improvements in human ovarian tissue grafting by various host and graft treatments. **Human Reproduction**, v. 27, p. 474-482, 2012.

GARBER, P.A.; LEIGH, S. R. Ontogenetic variations in small-bodied new world primates: implications for patterns of reproduction and infant care. **Folia Primatologica**, v. 68, p. 1-22, 1997.

GHOST, M.; HUTZ, R.J.; DUKELOW, W.R. Serum estradiol 17 β , progesterone and relative LH levels in *Saimiri sciureus* : cyclic variations and the effect of laparoscopy and follicular aspiration. **Journal of Medical Primatology**, v. 11, p. 312-318, 1982.

GOUGEON A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. **Human Reproduction**, v.1, p. 81-87, 1986.

GOUGEON, A.; BUSSO, D. Morphologic and functional determinants of primordial and primary follicles in the monkey ovary. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 163, p. 33-41, 2000.

GRUIJTERS, M. J. G. et al. Anti-Müllerian hormone and its role in ovarian function. **Endocrinology**, v.211, n.1-2, p. 85-90, 2003.

HAU, J.; SCHAPIRO, S.J. Non-human Primates in Biomedical Research. **Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science**, v. 33, n. 1, p. 9-12, 2006.

HEARN, J. New world primates for research in human reproductive health. **American Journal of Primatology**, v. 34, p. 11-17, 1994.

HERNÁNDEZ-LÓPEZ, L. et al. The menstrual cycle of the spider monkey (*Ateles geoffroyi*). **American Journal of Primatology**, v. 44, p. 183-195, 1998.

HERSHKOVITZ, P. Taxonomy of squirrel monkeys genus *Saimiri* (Cebidae, Platyrrhini): a preliminary report with description of a hitherto unnamed form. **American Journal of Primatology**, v. 7, p. 155-210, 1984.

HICKEY, T.E. et al., Androgens augment the mitogenic effects of oocyte-secreted factors and growth differentiation factor-9 on porcine granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v. 73, p. 825-832, 2005.

HODGES, J.K. The ovarian cycle and control of ovulation. **Journal of Zoology (London)**, v. 213, p. 383-393, 1987.

HORIE, K. et al. The expression of c-Kit protein in human adult and fetal tissues. **Human Reproduction**, v. 8, p. 1955–1962, 1993. -

ISRAELY, T. et al. Angiogenesis in ectopic ovarian xenotransplantation: multiparameter characterization of the neovasculature by dynamic contrast-enhanced MRI. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 52, p. 741-750, 2004.

IUCN 2013. **IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2013.1. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 03/07/2013.

KIM, J. M. et al. Granulosa cell apoptosis induced at the penultimate stage of follicular development is associated with increased levels of Fas and Fas ligand in the rat ovary. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 1170-1176, 1998.

KIM, S.S.; SOULES, M.R.; BATTAGLIA, D.E. Follicular development, ovulation, and corpus luteum formation in cryopreserved human ovarian tissue after xenotransplantation. **Fertility and Sterility**, v. 78, p. 77-82, 2002.

KIM, M.R.; 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.

KNIGHT, P.G.; GLISTER, C. TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. **Reproduction**, v. 132, p. 191-206, 2006.

KRAEMER, D.C.; VERA CRUZ, N.C. Collection, gross characteristics and freezing of baboon semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 20, p. 345-348, 1969.

KUEHL, T.J.; DUKELOW, W.R. Maturation and in vitro fertilization of follicular oocytes of the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). **Biology of Reproduction**, v.21, p. 545-556, 1979.

LAMBERT, H. et al. Penetration of zona-free hamster oocytes by ejaculated cryopreserved gorilla spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v. 56, p. 1201-1203, 1991.

LI, J. et al. Activation of dormant ovarian follicles to generate mature eggs. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.**, v. 107, p. 10280-10284, 2010.

LIMA, J. S. et al., Embryo production by parthenogenetic activation and fertilization of in vitro matured oocytes from *Cebus apella*. **Zygote**, v. 21, p.162-166, 2013.

LISSONI, P. Biochemotherapy with standard chemotherapies plus the pineal hormone melatonin in the treatment of advanced solid neoplasms. **Pathologie Biologie**, v. 55, p. 201-204, 2007.

LIU, J. et al. Early massive follicle loss and apoptosis in heterotopically grafted newborn mouse ovaries. **Human Reproduction**, v. 17, p. 605-611, 2002.

LUZ, H.K.M. et al. Catalase Prevents Lipid Peroxidation and Enhances Survival of Caprine Preantral Follicles Cryopreserved in a 1,2-Propanediol-Freezing Medium. **Biopreservation and Biobanking**, v. 10, p. 338-342, 2012.

MAHONE, J.P.; DUKELOW, W.R. Semen Preservation in *Macaca fascicularis*. **Laboratory Animal Science**, v. 28, n. 5, p. 556-561, 1978.

MCGEE, E.A.; HSUEH, A.J. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. **Endocrine Reviews**, v. 21, p. 200-214, 2000.

MENDOZA, S.P. Squirrel monkeys. In **The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals I**. Ed TB Poole. Oxford: Blackwell Science Ltd, 1999, p. 591-600.

MERCÊS, M. P. et al. Morphology and mitochondrial phylogenetics reveal that the Amazon River separates two eastern squirrel monkey species: *Saimiri sciureus* and *S. collinsi*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 82, p. 426-435, 2015.

MODI, D.; BHARTIYA, D.; PURI, C. Developmental expression and cellular distribution of Mullerian inhibiting substance in the primate ovary. **Reproduction**, v. 132, p. 443-453, 2006.

MOLPECERES, V. et al. Melatonin is able to reduce the apoptotic liver changes induced by aging via inhibition of the intrinsic pathway of apoptosis. **The journals of gerontology. Series A, Biological Sciences**, v. 62, p. 687-695, 2007.

MORRELL, J. M. et al. Birth of offspring following artificial insemination in the common marmoset, *Callithrix jacchus*. **American Journal of Primatology**, v. 41, n. 1, p. 37-43, 1997.

NUGENT, D.; NEWTON, H.; GALLIVAN, L.; GOSDEN, R. G. Protective effect of vitamin E on ischaemia-reperfusion injury in ovarian grafts. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 114, p. 341-346, 1998.

NUTTINCK, F.; MERMILLOD, P. M.; DESSY, F. Characterization of in vitro growth of bovine preantral ovarian follicles: a preliminary study. **Theriogenology**, v. 39, p. 811-821, 1993.

OLIVEIRA, K. G. et al. Semen coagulum liquefaction, sperm activation and cryopreservation of capuchin monkey (*Cebus apella*) in coconut water solution (CWS) and TES-TRIS. **Animal Reproduction Science**, v. 123, p. 75-85, 2011.

REDDY, P. et al. Oocytespecific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. **Science**, v. 319, p. 611-613, 2008.

ROUSSEL, J.D.; AUSTIN, C.R. Preservation of primate spermatozoa by freezing. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 13, p. 333-335, 1967.

SANKAI, T. et al. In vitro fertilization of follicular oocytes by frozen-thawed spermatozoa in Japanese monkeys (*Macaca fuscata*). **Laboratory Animal Science**, v. 47, n. 1, p. 58-62, 1997.

SANTANA, L.N. et al. Vitrification of Ovarian Tissue from Primates and Domestic Ruminants: An Overview. **Biopreservation and Biobanking**, p. 288-294, 2012.

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, p. 1455-458, 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, p. 151-163, 2010.

SAPMAZ, E. et al. Effects of melatonin and oxytetracycline in autologous intraperitoneal ovary transplantation in rats. **Neuroendocrinology Letters**, v. 24, p. 350-354, 2003.

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

SIGMA CHEMICAL Co. Disponível em:
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/238813?lang=pt®ion=BR>.
Acesso em 15/07/2014.

STONE, A.I. Age and seasonal effects on predator-sensitive foraging in juvenile squirrel monkeys: A field experiment. **American Journal of Primatology**, v. 69, p. 127-14, 2007.

STRASSMANN, B.I. The evolution of endometrial cycles and menstruation. **The Quarterly Review of Biology**, v. 71, p. 181-220, 1996.

TANIKAWA, M. et al. Expression of c-Kit messenger ribonucleic acid in human oocyte and presence of soluble c-Kit in follicular fluid. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 83, p. 1239-1242, 1998.

TARLETON STATE UNIVERSITY. Disponível em:
<http://www.tarleton.edu/~anatomy/ovary.html>. Acesso em: 15/07/2014.

THOMAS, F. H.; TELFER, E.E.; FRASER, H.M. Expression of anti-Müllerian hormone protein during early follicular development in the primate ovary in vivo is influenced by suppression of gonadotropin secretion and inhibition of vascular endothelial growth factor. **Endocrinology**, v. 148, p. 2273-2281, 2007.

THORNBERRY, N.A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. **Science**, v. 281, n. 5381, p. 1312-1316, 1998.

USHIO-FUKAI, M.; URAO, N. Novel role of NADPH oxidase in angiogenesis and stem/progenitor cell function. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, p. 2517-2533, 2009.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, p. 1717-1751, 2005.

VAN EYCK, A.S. et al. Both host and graft vessels contribute to revascularization of xenografted human ovarian tissue in a murine model. **Fertility and Sterility**, v. 93, p. 1676-1685, 2009.

WALKER, M.L. et al. Ovarian aging in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). **Reproduction**, v. 138, n. 5, p. 793-799, 2009.

WOLF, R.C.; O'CONNOR, R.F.; ROBINSON, J.A. Cyclic changes in plasma progesterone and estrogens in squirrel monkey. **Biology of Reproduction**, v.17, p.228-231, 1977.

WOLF, D.P. et al. In vitro fertilization and embryo transfer in the rhesus monkey. **Biology of Reproduction**, v. 41, p. 335-346, 1989.

ZHANG, L. et al. Developmental potential of rhesus monkey embryos produced by in vitro fertilization. **Biology of Reproduction**, v. 51, p. 433-440, 1994.

APENDICE A - Publicações Científicas

Artigos Publicados

SCALERCIO, R.R.A.; BRITO, A.B, DOMINGUES,S.F.S, SANTOS R.R., AMORIM, C.A. Immunolocalization of growth, inhibitory and proliferative factors involved in initial ovarian folliculogenesis from adult common squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). **Reproductive Sciences**, v. 22, v 1, p. 68-74, 2015.

SCALERCIO, R.R.A.; AMORIM, C.A.; BRITO, D.C.; PERCÁRIO, S.; OSKAM, I.C.; DOMINGUES, S.F.S.; SANTOS, R.R. Trolox enhances follicular survival after ovarian tissue autograft in squirrel monkey (*Saimiri collinsi*). **Reproduction, Fertility and Development**. <http://dx.doi.org/10.1071/RD14454>. 2015.

Artigo Submetidos à Publicação

SCALERCIO, S.R.R.A.; SANTANA, L.N.S.; DOMINGUES, S.F.S.; AMORIM C.A.; SANTOS, R.R. Transplante ovariano: aplicações para a reprodução de primatas não humanos. **Acta Scientiae Veterinariae**

Resumos Expandidos Apresentados em Eventos Científicos

SCALERCIO, S.R.R.A. ; NIKOLAK, E.; LIMA, M.C.M. ; BRITO, A.B. ; DOMINGUES, S.F.S. ; SANTOS, R.R. Avaliação do auto-transplante intraperitoneal de fragmentos de córtex ovariano de macaco de cheiro. Apresentação de Pôster. **Anais CONERA**, 27-29 de junho, p. 17-21, 2012, Fortaleza - CE, Brasil.

Resumos Apresentados em Eventos Científicos

SCALERCIO, S.R.R.A.; BRITO, D.C.C.; DOMINGUES, S.F.S.; AMORIM, C.A.; SANTOS, R.R. Effect of the vitamin E-analog Trolox on ovarian tissue autograft of the squirrel monkey (*Saimiri collinsi*). Oral presentation. **V International Symposium on Animal Biology of Reproduction**, October 8-11, 2014, Campinas - SP, Brazil.