

Vitrification of Ovarian Tissue from Non-Human Primates*

Adriel Behn Brito^{1,2}, Cinthia Távora de Albuquerque Lopes^{1,2}, Ana Paula Ribeiro Rodrigues³,
José Ricardo de Figueiredo³, Sheyla Farhayldes Souza Domingues^{1,2} & Regiane Rodrigues dos Santos^{1,2}

ABSTRACT

Background: One of the strategies to preserve genetic material from nonhuman primates (NHP) consists in the implementation of germplasm banks, for future application in reproductive biotechniques, as well as for biomedical research. Based on the success rates achieved in human, there is a prominent possibility to succeed also with NHP. However, studies with NHP are still scarce, especially regarding the cryopreservation of ovarian tissue.

Review: Neotropical non-human primates, especially males, have been used in research related to reproductive biotechniques in Brazil. Regarding research on female reproduction and ovarian tissue preservation, most studies were performed using domestic animals as models. Current concepts and controversies in the restoration of gametes in adult females does not exclude the needs to preserve ovarian tissue. Importantly, ovarian tissue can be collected and preserved even after the death of the donors, being applied when finding dead females. Furthermore, collection of ovarian biopsies is also feasible and will not affect reproductive function. Among the cryopreservation methods, the vitrification has been indicated due to practical logistic, as well as because it will avoid the formation of large intracellular ice crystals, and it is claimed that ovarian stromal damage will be decreased under vitrification. Considering the number of threatened primate species and the needs to preserve their habitat, but also their gametes, development of preservation protocols are needed. Among the procedures, vitrification appears as a practical method to be applied in the near future. Although a low number of studies is reported, most of them were performed in the recent years. In this context, this article reviews recent information on the vitrification of ovarian tissue of non-human primates. Due to the limited number of studies in these species, observed data are compared with the literature in domestic and human mammals.

Conclusion: Despite the advances summarized here, it is possible to conclude that there is still a need to improve procedures for the preservation of genetic material, including in post-mortem situations. The technique of vitrification, therefore, consists of a feasible and promising option. However, it is needed to study properly the methods of vitrification, as well as the introduction of new systems and supplements to minimize or avoid the cell damage caused by the cryopreservation procedure (physical and chemical).

Keywords: non-human primates, ovarian tissue, cryopreservation.

I. INTRODUÇÃO

II. CRONOLOGIA DA VITRIFICAÇÃO EM PRIMATAS NÃO-HUMANOS

III. PROTOCOLOS DE VITRIFICAÇÃO UTILIZADOS EM PRIMATAS NÃO-HUMANOS

IV. PRINCIPAIS MÉTODOS DE ANÁLISE E FATORES QUE INFLUENCIAM O SUCESSO DA VITRIFICAÇÃO

V. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

I. INTRODUÇÃO

A implantação de bancos de germoplasma é essencial na manutenção de patrimônio genético e para sua utilização futura em biotécnicas reprodutivas. Ressalta-se a possibilidade de coleta e preservação de gametas após a morte de animais em risco de extinção [14,53], ou através de biópsias, sem prejuízo da função reprodutiva das doadoras [51].

Embora a renovação de gametas femininos em grandes mamíferos após o nascimento seja controversa [16], o ovário ainda é considerado uma fonte limitada de células reprodutivas que formam um *pool*

de reserva representado pelos folículos pré-antrais (FOPA). Desta forma, a preservação de FOPA torna-se relevante e possível nessas espécies uma vez que o sistema reprodutivo feminino e a foliculogênese já foram caracterizados [1,12,29-31,58], bem como protocolos de maturação oocitária e de produção de embriões *in vitro* [13,27] encontram-se disponíveis.

Apesar dos vastos estudos direcionados a animais domésticos, os avanços em primatas neotropicais ainda são recentes e geralmente focados na congelamento convencional de sêmen [25,26,41,42], com raros estudos sobre a criopreservação (congelamento convencional ou vitrificação) de tecido ovariano [6].

A vitrificação em particular, vem sendo indicada pela praticidade de execução a campo, por evitar danos teciduais ocasionados por cristais de gelo e reduzir riscos de danos no estroma ovariano e foliculares [23]. Nos últimos cinco anos, publicações [4,11,32,39,40,60,62] demonstraram os avanços da técnica (Figura 1). Desta forma, a presente revisão objetiva fornecer informações sobre o desenvolvimento cronológico da vitrificação em PNH, métodos utilizados e principais resultados.

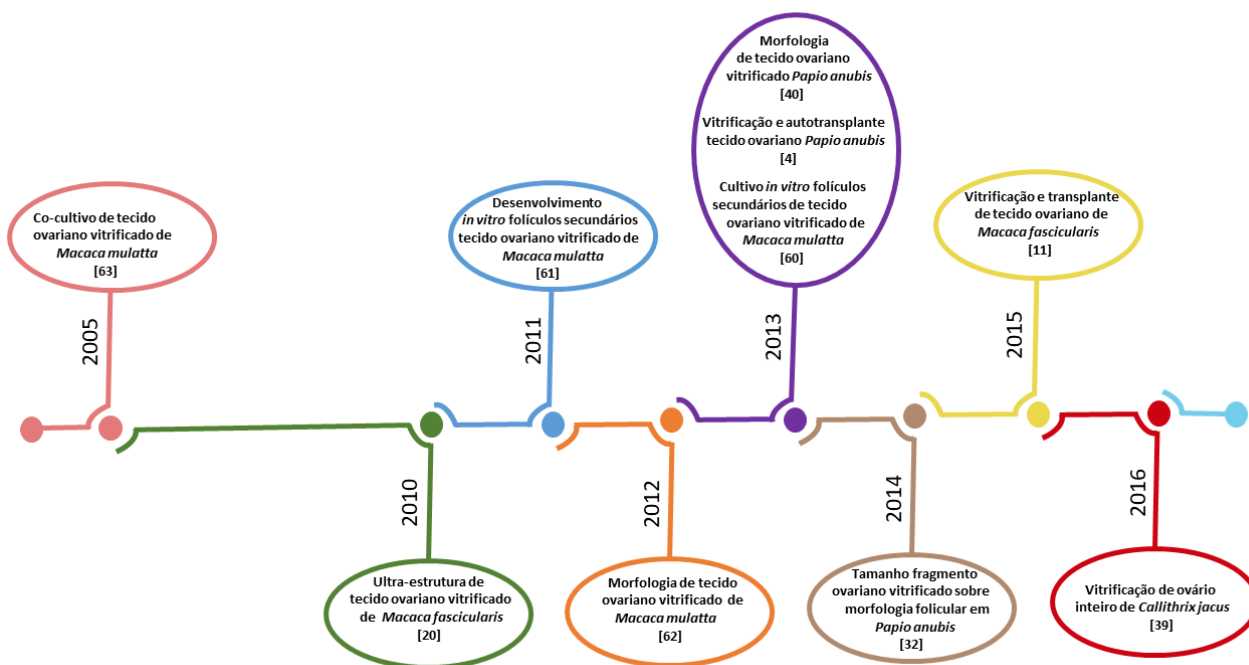


Figura 1. Ordem cronológica de publicações relacionadas à vitrificação de tecido ovariano de primatas não-humanos.

II. CRONOLOGIA DA VITRIFICAÇÃO EM PRIMATAS NÃO-HUMANOS

Em 2005, foi publicado o primeiro relato de vitrificação de tecido ovariano de PNH, no qual não foi observada diferença entre a congelamento lenta e a vitrificação de tecido ovariano de *Macaca mulata* e *Macaca fascicularis* em relação às taxas de sobrevivência folicular [63]. Importante salientar que no citado trabalho a maioria dos folículos sobreviventes eram primordiais. Alguns anos depois, foi demonstrado que soluções de criopreservação complexas eram mais eficientes que soluções contendo apenas um crioprotetor para a vitrificação de folículos ovarianos de *Macaca fascicularis*, o que favorecia a manutenção da morfologia normal de mitocôndrias [20]. No ano seguinte, alguns autores indicaram ser possível, após vitrificação de tecido ovariano, obter o desenvolvimento *in vitro* de FOPA até a formação de antro [61]. Subsequentemente, os mesmos autores observaram que a suplementação do meio de vitrificação com polímeros sintéticos melhorava as taxas de sobrevivência folicular [62]. Infelizmente, esses resultados não foram substancialmente suficientes para otimizar o protocolo, e os autores observaram uma redução no diâmetro dos folículos vitrificados após cultivo *in vitro* por três semanas [60]. Posteriormente um promissor estudo piloto apresentou a preservação da morfologia folicular após o processo de vitrificação de tecido ovariano de babuínos [40].

Resultados mais animadores foram reportados ao auto-transplantarem tecido ovariano previamente vitrificado [4]. No estudo foi demonstrado que folículos primordiais de babuínos foram ativados e se desenvolveram nos transplantes, observando-se uma diminuição na taxa de folículos primordiais e aumento nas taxas de folículos secundários. Além disso, foi observada a presença de um corpo lúteo, indicando a ocorrência de ovulação. Em acréscimo, outro estudo sobre a vitrificação de tecido ovariano de babuínos, relatou a importância do tamanho do fragmento de ovário sobre a sobrevivência e funcionalidade folicular [32]. Após o cultivo *in vitro* dos fragmentos previamente vitrificados, a produção de estradiol foi maior em fragmentos de 1x0,5x1,5 mm do que em fragmentos de 1x1x2 mm. Em seguida, foi demonstrado que fragmentos ovarianos de *Macaca fascicularis* apresentavam melhor desenvolvimento folicular e qualidade estromal se vitrificados e auto-transplantados no local de um ovário imediatamente removido [11]. Recentemente, foi relatada a

vitrificação de ovários inteiros de *Callithrix jacchus* [39], onde a proporção de folículos normais não diferiu da proporção observada no controle fresco. Contudo, houve uma redução na taxa de células somáticas viáveis após a vitrificação.

Apesar do número restrito de estudos em PNH, em comparação aos realizados em animais domésticos ou na própria espécie humana, é possível observar que alguns pesquisadores estão obtendo sucesso com o desenvolvimento de protocolos promissores. Desta forma, o envolvimento de pesquisadores especialistas em PNH com essa técnica de preservação de gametas, auxiliará na sua aplicação a campo permitindo a formação de bancos com valioso material genético. Além disso, as informações obtidas com diferentes protocolos de vitrificação e métodos de avaliação permitem o aprimoramento das técnicas de criopreservação a serem aplicadas em tecido ovariano de PNH.

III. PROTOCOLOS DE VITRIFICAÇÃO UTILIZADOS EM PRIMATAS NÃO-HUMANOS

Apesar de ser um método simples, existem diferentes protocolos disponíveis de vitrificação. É importante ressaltar que não é objetivo da presente revisão detalhar técnicas, meios de vitrificação ou protocolos, o que pode ser aprofundado em revisões já publicadas [2,33]. A Tabela 1 apresenta as diferentes técnicas empregadas para a preservação de FOPA de PNH. Quando necessário outras técnicas desenvolvidas para grandes mamíferos domésticos, bem como para humanos, também são apresentadas. Com base na Tabela 1 é possível perceber a impossibilidade de comparar protocolos, devido à grande variação na composição dos meios de vitrificação (agentes crioprotetores - ACPs - e meios base), tempo e temperatura de exposição, e protocolos de aquecimento empregados pelos seis diferentes grupos de pesquisa aqui citados. A seguir, apenas alguns direcionamentos podem ser tomados.

O primeiro deles consiste no meio base, que possui uma constituição variável, sendo ou não suplementado com fontes proteicas, por exemplo, o substituto do soro ou albumina sérica humana. Além disso, a criopreservação requer a utilização de soluções contendo ACPs intracelulares, associados ou não com ACPs extracelulares. Dentre os ACPs intracelulares utilizados, o etilenoglicol (EG) está presente em todas as soluções de vitrificação, geralmente em combinação com dimetilsulfóxido (DMSO) ou glicerol. Na maioria das vezes, esses ACPs intracelulares estão associados

a ACPs extracelulares como a sacarose [4,11,39] e a polivinilpirrolidona (PVP) [4,11,60,62]. Outro açúcar que ainda não foi testado em primatas não-humanos é a trealose, que vem apresentando resultados animadores na vitrificação de tecido ovariano humano [59]. É importante considerar que outros tampões osmóticos [46] além de açúcares, deveriam ser considerados.

É comum vitrificar tecido ovariano com a utilização de apenas um crioprotetor intracelular como também com uma combinação de dois crioprotetores intracelulares. A eficiência do crioprotetor dependerá da ótima perfusão do tecido ovariano [37,45], o qual é complexo e fibroso em grandes mamíferos. Recentemente, foi demonstrado que a vitrificação de tecido ovariano ovino utilizando a combinação DMSO + EG resultou em uma redução na síntese de proteínas de canais transmembranares, as aquaporinas 3 e 9, o que não aconteceu quando a vitrificação foi realizada na presença de apenas EG com sacarose 0,25 M [49]. Independente da presença ou ausência da sacarose no meio de vitrificação, todos os estudos aqui revisados relatam a utilização da sacarose no meio de lavagem para remoção dos crioprotetores. Vitrificando tecido ovariano bovino, alguns autores mostraram que a adição de um crioprotetor extracelular como a sacarose no meio de remoção do crioprotetor pode aumentar as taxas de sobrevivência folicular [21], uma vez que o

dano celular por choque osmótico é causado não apenas durante a exposição ao crioprotetor, mas também durante a sua remoção [56].

Existem estudos indicando que a temperatura de remoção do crioprotetor pode afetar a sobrevivência folicular pós-aquecimento. Por exemplo, foi observado que a remoção do crioprotetor realizada a 4, 30 ou 37°C afetou as taxas de folículos ovarianos ovinos previamente criopreservados, sendo a temperatura de 30°C a mais indicada [43]. Contudo, pelos dados coletados em PNH, a temperatura de remoção do crioprotetor não tem sido um fator crucial para o sucesso do procedimento.

Diferentes técnicas de vitrificação comumente utilizadas são as denominadas de *dropping* (ou em gotas) [63], criotubos com agulhas no topo [20], lâmina de alumínio [61,62], agulhas [4,11], palhetas [40,60], vitrificação em superfície sólida - VSS [32], bem como cryotop [39]. A maioria dessas técnicas foi previamente testada em mamíferos de laboratório ou domésticos. Além dessas técnicas, um sistema que vem preservando com sucesso a qualidade folicular durante a vitrificação, consiste no OTC (ovarian tissue cryosystem em inglês). O primeiro relato foi publicado [9], e testes em tecido ovariano de PNH poderiam indicar se essa seria mais uma possibilidade a ser considerada nos procedimentos de vitrificação.

Tabela 1. Descrição de protocolos utilizados para a vitrificação de tecido ovariano de diferentes espécies de primatas não-humanos.

Espécie	Descrição do protocolo	
	Composição	Método
<i>Macaca mulatta</i> [63]	Vitrificação em TALP ⁺ (TALP com 15% SFB) 1) 10% Glicerol em TALP ⁺ (3 min) – temperatura não informada 2) 10% Glicerol + 20% EG (3 min) – temperatura não informada 3) 25% Glicerol + 25% EG (alguns segundos) – temperatura não informada Fragmentos de 2 x 2 x 1 mm Aquecimento 1) sacarose 0,5 M, 0,25 M e 0,125 M em TALP ⁺ , cada por 3 min, 37 °C 2) lavado em TALP ⁺ a 37 °C	Dropping (gotas de meio de vitrificação)

(continua...)

(...continuação)

<i>Macaca fascicularis</i> [20]	<p>Vitrificação (Duas soluções foram preparadas em H199⁺ - H199 com 20% SSS)</p> <p>VS1</p> <p>1) EG 0,805 M + DMSO 0,64 M em H199⁺ (10 min) a TA</p> <p>2) EG 1,61 M + DMSO 1,28 M em H199⁺ (10 min) a TA</p> <p>3) EG 3,22 M + DMSO 2,56 M em H199⁺ (5, 10, and 20 min) a TA</p> <p>VS2</p> <p>1) EG 1,61 M em H199⁺ (10 min) a TA</p> <p>2) EG 3,22 M em H199⁺ (10 min) a TA</p> <p>3) EG 5,64 M + PVP 5% em H199⁺ (5, 10, and 20 min) a TA</p> <p>Fragmentos de 10 x 10 x 1 mm</p> <p>Aquecimento</p> <p>1) sacarose 0,8 M em H199⁺ por 1 min a TA</p> <p>2) sacarose 0,4 M e 0,2 M em H199⁺, cada por 5 min, a TA</p> <p>3) H199⁺ por 3 h a TA</p>	Criotubo com agulhas no topo, a fim de perfurar o tecido ovariano.
<i>Macaca mulatta</i> [61]	<p>Vitrificação em HM⁺ (HM com 15% SPS e 29 mg/mL ácido ascórbico)</p> <p>1) 10% Glicerol (8 min) a 4 °C</p> <p>2) 10% Glicerol + 20% EG (8 min) a 4 °C</p> <p>3) 25% Glicerol + 25% EG (5 min) a 4 °C</p> <p>Fragmentos de 3 x 3 x 1 mm</p> <p>Aquecimento</p> <p>1) sacarose 0,5 M, 0,25 M e 0,125 M em HM⁺, cada por 5 min, a 37 °C</p> <p>2) HM⁺ por 10 min a 37 °C</p>	Lâmina de alumínio, acondicionada em Criotubos.
<i>Macaca mulatta</i> [62]	<p>Vitrificação em HM⁺ (HM com 15% SPS e 29 mg/mL ácido ascórbico)</p> <p>VS1</p> <p>1) Glicerol 1,2 M em HM⁺ (3 ou 8 min) a 37 °C</p> <p>2) EG 3,6 M + glicerol 1,2 M em HM⁺ (3 ou 8 min) a 37 °C</p> <p>3) EG 4,5 M + glicerol 3 M em HM⁺ (1 ou 3 min) a 37 °C</p> <p>VS2</p> <p>1) Glicerol 1,2 M em HM⁺ (3 ou 8 min) a 37 °C</p> <p>2) EG 3,6 M + glicerol 1,2 M em HM⁺ (3 ou 8 min) a 37 °C</p> <p>3) EG 4,5 M + glicerol 3 M + polímeros sintéticos em HM⁺ (1 ou 3 min) a 37 °C</p> <p>Fragmentos de 3 x 3 x 1 mm</p> <p>Aquecimento</p> <p>1) sacarose 0,5 M em HM⁺ por 5 min a TA</p> <p>2) sacarose 0,25 M em HM⁺ por 5 min a TA</p> <p>3) sacarose 0,125 M em HM⁺ por 5 min a TA</p> <p>4) HM⁺ por 10 min a TA (2x) e HM⁺ por 30 min a 37 °C</p>	Lâmina de alumínio, acondicionada em Criotubos.
<i>Papio anubis</i> [4]	<p>Vitrificação em MEM⁺ (MEM com 20 mg/mL ASH)</p> <p>1) DMSO 2,5%, EG 6,5%, PVP 0,625%, sacarose 0,25 M (7 min) a TA</p> <p>2) DMSO 5%, EG 13%, PVP 1,25%, sacarose 0,5 M (4 min) a TA</p> <p>3) DMSO 10%, EG 26%, PVP 2,5%, sacarose 1 M (3 min) a TA</p> <p>Fragmentos de 8 x 3 x 1 mm</p> <p>Aquecimento</p> <p>1) sacarose 1 M em MEM⁺ por 15 s a 37 °C</p> <p>2) sacarose 0,5 M, 0,25 M e 0 M em MEM⁺, cada por 5 min, a 37 °C</p>	Agulhas

(continua...)

(...continuação)

<i>Papio anubis</i> [40]	<p>Vitrificação em PBS⁺ (PBS com 10% ASH) 1) DMSO 10%, e EG 10% em PBS⁺ por 2 min a TA 2) DMSO 20%, e EG 20% em PBS⁺ por 30 s a TA Fragmentos de 1 mm³ Aquecimento 1) sacarose 0,5 M em PBS⁺ por 2 min a 37 °C 2) sacarose 0,25 M em PBS⁺ por 1 min a 37 °C 3) sacarose 0,125 M em PBS⁺ por 1 min a 37 °C 4) 10% de HSA em PBS⁺ por 1 min a 37 °C</p>	Palhetas 0,5 mL
<i>Macaca mulatta</i> [60]	<p>Vitrificação em HM⁺ (HM com 15% SPS e 29 mg/ml ácido ascórbico) VS1: EG 27% + glicerol 27% em HM⁺ VS2: EG 25,5% + DMSO 25,5% em HM⁺ 1) 25% VS1 ou VS2 (5 min) a 37 °C 2) 50% VS1 ou VS2 (5 min) a 37 °C 3) 100% VS1 + polímeros ou VS2 + polímeros (1 min) a 37 °C 4) 1 mL VS1 + polímeros ou 1 mL VS2 + polímeros (10 min) ao vapor de NL – palhetas Fragmentos de 3 x 3 mm²</p>	Palhetas (6 x 65 mm)
	<p>Aquecimento 1) sacarose 1 M em HM⁺, por 1 min, a 37 °C 2) sacarose 0,75 M, 0,5 M e 0,25 M em HM⁺, cada por min, a 37 °C 3) HM⁺ por 10 min a 37 °C (2 x)</p>	
<i>Papio anubis</i> [32]	<p>Vitrificação em MEM⁺ (MEM com 25 mg/mL ASH) 1) EG 5% e DMSO 5% a 4 °C 2) EG 10% e DMSO 10% a 4 °C 3) EG 20% e DMSO 20% a 4 °C Tempo de exposição em cada etapa: Fragmentos de 0,5 x 1 x 1 mm (2,5; 2,5; 5 min) Fragmentos de 1 x 1 x 1 mm (5; 5; 10 min) Fragmentos de 1 x 1 x 1,5 mm (7,5; 7,5; 15 min) Fragmentos de 1 x 1 x 2 mm (10; 10; 20 min) Aquecimento 1) sacarose 1 M em MEM⁺ por 15 s a 37 °C 2) sacarose 0,5 M e 0,25 M e 0 M em MEM⁺, cada por 5 min, a 37 °C</p>	VSS
<i>Macaca fascicularis</i> [11]	<p>Vitrificação em MEM⁺ (MEM + 20 mg/mL ASH) 1) DMSO 2,5%, EG 6,5%, PVP 0,625%, sacarose 0,25 M (4 min) a TA 2) DMSO 5%, EG 13%, PVP 1,25%, sacarose 0,5 M (4 min) a TA 3) DMSO 10%, EG 26%, PVP 2,5%, sacarose 1 M (3 min) a TA Fragmentos de 5 x 1 x 1 mm Aquecimento 1) sacarose 1 M em MEM⁺ por 15 s a 37 °C 2) sacarose 0,5 M, 0,25 M e 0 M em MEM⁺, cada concentração por 5 min a 37 °C</p>	Agulhas

(continua...)

(...continuação)

<i>Callithrix jacus</i> [39]	Vitrificação em TCM199 ⁺ (TCM199 Hepes com SSS 20%)	Ovário inteiro	Cryotop
	1) EG 7,5% e DMSO 7,5% em TCM199 ⁺ (15 min) a TA 2) EG 15%, DMSO 15% e sacarose 0,5 M em TCM199 ⁺ (30 min) a 4 °C.		
		Aquecimento	
		1) TCM199 ⁺ e sacarose 1 M por 3 min a 37 °C. 2) TCM199 ⁺ e sacarose 0,5 M por 5 min (TA) 3) TCM199 ⁺ por 15 min (TA) - 2x	

IV. PRINCIPAIS MÉTODOS DE ANÁLISE E FATORES QUE INFLUENCIAM O SUCESSO DA VITRIFICAÇÃO

Para uma comparação subjetiva dos dados obtidos na literatura relacionada a PNH, o presente tópico apresenta os métodos de análise utilizados nos dez trabalhos aqui apresentados, bem como os principais resultados obtidos (ver Tabela 2).

Em geral, a eficiência de todos os protocolos foi avaliada através de histologia clássica. Quando a morfologia folicular observada no tecido vitrificado não foi mantida similar àquela verificada no tecido fresco, as taxas de folículos normais atingiram cerca de 57%. Análises realizadas imediatamente após a criopreservação geralmente não fornecem dados robustos relativos à eficiência do procedimento, uma vez que a qualidade folicular pode ser avaliada de maneira consistente após o cultivo *in vitro* ou transplante de tecido ovariano previamente criopreservado [17,44]. Dos dez estudos em PNH, três apresentam resultados imediatamente após o aquecimento das amostras de tecido e posterior remoção dos crioprotetores [20,39,40], cinco apresentam resultados após cultivo *in vitro* [32,60-63] e dois apresentam resultados após autotransplante [4,11]. Contudo, é necessário reconhecer que métodos eficientes de cultivo de FOPA ainda estão sendo desenvolvidos, especialmente para PNH. Além disso, o transplante do tecido ovariano também pode influenciar a sobrevida e o desenvolvimento folicular.

Relatou-se o desenvolvimento *in vitro* de folículos primários para o estágio de folículos secundários cultivados *in vitro* no tecido ovariano de *Sapajus apella*, por 24 h [5]. Contudo, torna-se necessário ainda investigar se esse desenvolvimento folicular é sincrônico, i.e. se oócito e células da granulosa se desenvolvem de maneira conjunta permitindo o funcionamento normal de ambos os compartimentos foliculares, ou se os mesmos resultados seriam obtidos ao cultivar tecido ovariano previamente vitrificado. Além disso, em ovinos, foi observado que dependendo da fase folicular, a vitrificação deve ser realizada na forma de fragmentos ovarianos ou folículos isolados. Por exemplo, folículos secundários sobrevivem melhor se vitrificados isoladamente e não inclusos no tecido ovariano [35]. Não menos importante, a manutenção da estrutura tridimensional pode ser um fator facilitador para a sobrevivência e desenvolvimento folicular *in vitro* [47,48].

Finalmente, o meio de criopreservação [6,36] ou o meio de cultivo *in vitro* após aquecimento [19], tem permitido uma maior sobrevivência folicular [28,38]. A adição de antioxidantes e vitaminas para manter transplantes frescos ou criopreservados viáveis também tem sido relatada com sucesso [18,24,57], por reduzir a massiva ativação folicular e consequente perda do pool de reserva imediatamente após o transplante de tecido ovariano [54].

Tabela 2. Resumo de análises e resultados obtidos após a vitrificação de tecido ovariano de diferentes espécies de primatas não-humanos.

Espécie	Descrição	
	Análises	Resultados
<i>Macaca mulatta e M. fascicularis</i> [63]	Cultivo <i>in vitro</i> 5 dias Viabilidade folicular (sonda fluorescente)	70% folículos viáveis imediatamente após vitrificação, e 89% folículos viáveis após cultivo <i>in vitro</i> de tecido vitrificado.

(continua...)

(...continuação)

<i>Macaca fascicularis</i> [20]	Morfologia (histologia clássica - ultra-estrutura) Estimativa taxas de mitocôndrias intactas Frequência de lisossomos	Após aquecimento, 77-94% folículos normais. EG+DMSO superior a EG+PVP, mas reduziu a percentagem de mitocôndrias intactas e aumentou a frequência de lisossomos.
<i>Macaca mulatta</i> [61]	Histologia clássica Marcador de mitose (PPH3 e BrdU) Quantificação de folículos secundários Cultivo <i>in vitro</i> (5 semanas) de folículos secundários sobrevivência e crescimento folicular Produção hormonal (E2, P4 e A4)	Folículos primordiais, primários e, especialmente, secundários bem preservados. 74% folículos pré-antrais normais. Após cultivo <i>in vitro</i> , proliferação das células da granulosa do tecido vitrificado foi similar ao obtido de tecido fresco. Contudo, taxa de sobrevivência foi inferior, bem como a formação de antro e produção hormonal.
<i>Macaca mulatta</i> [62]	Histologia clássica Marcador de mitose (PPH3) Quantificação de folículos secundários Cultivo <i>in vitro</i> (5 semanas) de folículos secundários Sobrevivência e crescimento folicular Produção hormonal (E2, P4 e A4)	57% e 74% de folículos normais foram observados no tecido fresco, nos folículos com 2 camadas e mais de 2 camadas, respectivamente. Após cultivo <i>in vitro</i> , proliferação das células da granulosa do tecido vitrificado foi similar ao obtido de tecido fresco. Contudo, taxa de sobrevivência foi inferior, bem como a formação de antro e produção hormonal.
<i>Papio anubis</i> [4]	Autotransplante Histologia clássica Densidade folicular Imunohistoquímica Detecção de fibrose	Decréscimo na densidade da população de folículos primordiais, e na proliferação de células da granulosa dos folículos secundários, mas sem efeitos no funcionamento folicular. Vitrificação aumentou a taxa de fibrose tecidual. Foi observado corpo lúteo em todos os enxertos após 5 meses.
<i>Papio anubis</i> [40]	Histologia	84 e 67% folículos normais foram observados em tecido fresco e vitrificado, respectivamente.
<i>Macaca mulatta</i> [60]	Histologia clássica Marcador de mitose (BrdU) Quantificação de folículos secundários Cultivo <i>in vitro</i> (6 semanas) de folículos secundários Sobrevivência e crescimento folicular Produção hormonal (E2, P4 e A4)	Morfologia de folículos primordiais, primários e secundários foi negativamente afetada pela vitrificação combinando EG e DMSO, quando comparada com EG + glycerol. Após cultivo <i>in vitro</i> , (foi cultivado apenas folículos secundários do grupo EG + glycerol e do controle) proliferação das células da granulosa e a sobrevivência folicular foram similares para os obtidos de tecidos frescos ou vitrificados. Contudo, a taxa de a formação de antro foi inferior. A produção de homônimo foi menor que no controle, mas não teve diferença estatística.

(continua...)

(...continuação)

<i>Papio anubis</i> [32]	Histologia clássica Marcador de apoptose (bax) Cultivo <i>in vitro</i> (2 semanas) Produção hormonal (E2, P4 e A4)	Vitrificação reduziu as percentagens de folículos morfologicamente normais (Controle fresco 92,6% e tratamentos de 52,1% a 69,6% de folículos morfologicamente normais), reduziu a produção hormonal <i>in vitro</i> , e aumentou as taxas de apoptose.
<i>Macaca fascicularis</i> [11]	Autotransplante Histologia clássica Densidade folicular Imunohistoquímica	Decréscimo na densidade da população de folículos pré-antrais, e na proliferação das células da granulosa de folículos secundários, mas sem efeitos no funcionamento folicular. Vitrificação aumentou a taxa de fibrose tecidual.
<i>Callithrix jacus</i> [39]	Histologia Viabilidade (sonda fluorescente) Integridade de DNA	Densidade e morfologia folicular foram similares quando comparando ovários frescos e vitrificados. Houve diminuição na sobrevivência dos folículos vitrificados (86% para 69%). A integridade do DNA não foi afetada pela vitrificação.

V. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Comparar resultados de diferentes grupos torna-se difícil quando variados métodos e pontos de observação são utilizados. Contudo, é possível observar que os avanços relacionados à vitrificação de tecido ovariano de PNH são promissores. Ainda faz-se necessário comparar diferentes técnicas de vitrificação em tecido ovariano de PNH antes de definir um protocolo a ser seguido na formação de bancos de germoplasma para essas espécies. Os crioprotetores EG e DMSO têm se mostrado os crioprotetores de escolha para a vitrificação de tecido ovariano, sendo utilizados de maneira isolada ou combinados. Apesar da adição de crioprotetores extracelulares como a sacarose ser rotineira, uma análise sobre a eficiência desse açúcar ainda é necessária. Além disso, outros métodos ou substâncias capazes de eliminar ou minimizar os danos

causados pelo estresse oxidativo e osmótico precisam ser testados. Apesar das taxas de sucesso obtidas com a vitrificação de tecido ovariano serem animadoras, a sobrevivência e funcionalidade folicular após cultivo *in vitro* ou transplante do tecido ainda continuam sendo um desafio. Muitos dos danos causados serão observados apenas durante ou após a indução do desenvolvimento folicular. Para tanto, é necessário um maior aprofundamento sobre os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na vitrificação, o desenvolvimento de protocolos específicos de cultivo *in vitro*, bem como o tratamento do tecido a ser transplantado para reduzir os danos causados por hipóxia pós-transplante.

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 para Adriel Behn Brito.

REFERENCES

- 1 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.
- 2 Amorim C.A., Curaba M., Van Langendonck A., Dolmans M.M. & Donnez J. 2011. Vitrification as an alternative means of cryopreserving ovarian tissue. *Reproductive Biomedicine Online*. 23(2): 160-186.
- 3 Amorim C.A., Dolmans M.M., David A., Jaeger J., Vanacker J., Camboni A., Donnez J. & Van Langendonck A. 2012. Vitrification and xenografting of human ovarian tissue. *Fertility and Sterility*. 98(5): 1291-1298.

- 4 Amorim C.A., Jacobs S., Devireddy R.V., Van Langendonck A., 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.
- 5 Brito A.B., Santos R.R., Van den Hurk, R., Lima J.S., Miranda M.S., Ohashi OM & Domingues S.F. 2013. 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.
- 6 Brito D.C., Brito A.B., Scalercio S.R., Percario 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
- 7 Brito D.C., Domingues S.F., Silva J.K., Wu X., Santos R.R. & Pieczarka J.C. 2016. Detrimental effect of phenol red on the vitrification of cat (*Felis catus*) ovarian tissue. *Biopreservation and Biobanking*. 14(1): 17-22.
- 8 Carvalho A.A., Faustino L.R., Silva C.M., Castro S.V., Lobo C.H., Santos F.W., Santos R.R., Campello C.C., Bourdignon V., Figueiredo J.R. & Rodrigues A.P. 2014. Catalase addition to vitrification solutions maintain goat ovarian preantral follicles stability. *Research in Veterinary Science*. 97(1): 140-147.
- 9 Carvalho A.A., Faustino L.R., Silva C.M., Castro S.V., Lopes C.A., Santos R.R., Bao S.N., Figueiredo J.R. & Rodrigues A.P. 2013. Novel wide-capacity model for vitrification of caprine ovaries: ovarian tissue cryosystem (OTC). *Animal Reproduction Science*. 138(3-4): 220-227.
- 10 Celestino J.J., Santos R.R., Melo M.A., Rodrigues A.P. & Figueiredo J.R. 2010. Vitrification of bovine ovarian tissue by the solid-surface vitrification method. *Biopreservation and Biobanking*. 8(4): 219-221.
- 11 Dolmans M.M., Binda M.M., Jacobs S., Dehoux J.P., Squifflet J.L., Ambroises J., Donnez J. & Amorim C.A. 2015. Impact of the cryopreservation technique and vascular bed on ovarian tissue transplantation in cynomolgus monkeys. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 32(1): 1251-1262.
- 12 Domingues S.F., Almeida D.V., Scalercio S.R., Kastelic J.P. & Santos R.R. 2011. Unilateral ovarian absence in two capuchin monkeys. *Journal of Medical Primatology*. 40(1): 37-40.
- 13 Domingues S.F., Caldas-Bussiere M.C., Petretski M.D., Ohashi O.M., Lima J.S., Santos R.R., Cordeiro M.S. & Gomes de Castro P.H. 2010. Effects of follicular phase and oocyte-cumulus complexes quality on the protein profile and *in vitro* oocyte meiosis competence in *Cebus apella*. *Fertility and Sterility*. 93(5): 1662-1667. F.I.=4.373.
- 14 Domingues S.F.S., Lima J.S., Oliveira K.G. & Santos R.R. 2011. Biotecnologias de reprodução como uma estratégia complementar à conservação *in situ* de primatas neotropicais ameaçados de extinção: perspectivas e desafios. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 35(2): 124-129.
- 15 Faustino L.R., Santos R.R., Silva C.M., Pinto L.C., Celestino J.J., Campello C.C., Figueiredo J.R. & Rodrigues A.P. 2010. Goat and sheep ovarian tissue cryopreservation: effects on the morphology and development of primordial follicles and density of stromal cell. *Animal Reproduction Science*. 122(1-2): 90-97.
- 16 Fereydouni B., Salinas-Riester G., Heistermann M., Dressel R., Lewerich L., Drummer C. & Behr R. 2016. Long-term oocyte-like cell development in cultures derived from neonatal marmoset monkey ovary. *Stem Cell*. 2016: 2480-2498.
- 17 Figueiredo J.R., Rodrigues A.P., Silva J.R. & Santos R.R. 2011. Cryopreservation and *in vitro* culture of caprine Preantral follicles. *Reproduction, Fertility and Development*. 23(1): 40-47.
- 18 Friedman O., Orvieto R., Fisch B., Felz C., Freud E., Ben-Haroush A. & Abir R. 2012. Possible improvements in human ovarian grafting by various host and graft treatments. *Human Reproduction*. 27(2): 474-482.
- 19 Ganji R., Nabiuni M. & Faraji R. 2015. Development of mouse preantral follicle after *in vitro* culture in a medium containing melatonin. *Cell Journal*. 16(4): 546-553.
- 20 Hashimoto S., Suzuki N., Yamanaka M., Hosoi Y., Ishizuka B. & Morimoto Y. 2010. Effects of vitrification solutions and equilibration times on the morphology of cynomolgus ovarian tissues. *Reproductive Biomedicine Online*. 21(4): 501-509.
- 21 Jimenez C.R., Penitente-Filho J.M., Torres C.A.A., Medeiros A.M. & Silva L.S. 2016. Vitrification of bovine preantral follicles with dimethylsulfoxide and sucrose plus -tocopherol. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 36(3): 209-215.
- 22 Kawamura K., Cheng Y., Suzuki N., Deguchi M., Sato Y., Takae S., Ho C.H., Kawamura N., Tamura M., Hashimoto S., Sugishita Y., Morimoto Y., Hosoi Y., Yoshioka N., Ishizuka B. & Hsueh A.J. 2013. Hippo signalling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proceedings of National Academy of Science*. 110(43): 17474-17479.

- 23 Keros V., Xella S., Hultenby K., Pettersson K., Sheikhi M., Volpe A., Hreinsson J. & Hovatta O. 2009. Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. *Human Reproduction.* 24(7): 1670-1683.
- 24 Kim E.J., Lee H.J., Lee J., Youm H.W., Lee J.R., Suh C.S. & Kim S.H. 2015. The beneficial effects of polyethylene glycol-superoxide dismutase on ovarian tissue culture and transplantation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics.* 32(10): 1561-1569.
- 25 Leão D.L., Brito A.B., Miranda S.A., Oliveira K.G., Almeida D.V.C., Santos R.R. & Domingues S.F. 2017. Extender supplementation with catalase maintains the integrity of sperm plasma membrane after freezing-thawing of semen from capuchin monkey. *Zygote.* 25(2): 231-234.
- 26 Leão D.L., Miranda S.A., Brito A.B., Lima J.S., Santos R.R. & Domingues S.F. 2015. Efficacious long-term cooling and freezing of *Sapajus apella* semen in ACP-118®. *Animal Reproduction Science*159(1): 118-123.
- 27 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.
- 28 Lima-Verde I.B., Matos M.H.T., Bruno J.B., Martins F.S., Santos R.R., Bao S.N., Luque M.C.A., Vieira G.A.B., Silveira E.R., Rodrigues A.P.R., Figueiredo J.R., Oliveria M.A.L. & Lima P.F. 2009. Effects of -tocopherol and ternatin antioxidants on morphology and activation of goat preantral follicles *in vitro* cultured. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.* 61(1): 57-65.
- 29 Lopes G.P., Brito A.B., Paim F.P., Santos R.R., Queiroz H.L. & Domingues S.F. 2017. Comparative characterization of the external genitalia and reproductive tubular organs of three species of the genus *Saimiri* Voigt, 1831 (Primates: Cebidae). *Anatomia, Histologia Embryologia.* 46(2): 143-161.
- 30 Lopes G.P., Brito A.B., Santos R.R., Domingues S.F., Paim F.P. & Queiroz H.L. 2017. Unilateral ovarian absence in a Black-headed squirrel monkey (*Saimiri vanzolinii* Ayres, 1985), a threatened neotropical primate species. *Journal of Medical Primatology.* 46(3): 87-89.
- 31 Lopes G.P., Santos R.R., Almeida D.V., Brito A.B., Queiroz H.L. & Domingues S.F. 2017. Population estimate and morphometry of ovarian preantral follicles from three recently recognized squirrel monkey species: a comparative study. *Zygote.* 25(3): 279-287.
- 32 Lu X.L., Yu J., Zhang G., Wei Z.T., Li J.T. & Zhang J.M. 2014. Effects of varying tissue sizes on the efficiency of baboon ovarian tissue vitrification. *Cryobiology.* 69(1): 79-83.
- 33 Lunardi F.O., Bass C.S., Bernuci M.P., Chaves R.N., Lima L.F., Silva R.F., Figueiredo J.R. & Rodrigues A.P. 2015. Ewe ovarian tissue vitrification: a model for the study of fertility preservation in women. *JBRA Assisted Reproduction.* 19(4): 241-251.
- 34 Lunardi F.O., de Aguiar F.L., Apolloni L.B., Duarte A.B., de Sá N.A.R., Leal E.S.S., Sales A.D., Lobo C.H., Campello C.C., Smitz J., Apgar G.A., Figueiredo J.R. & Rodrigues A.P. 2017. Sheep isolated secondary follicles are able to produce metaphase II oocytes after vitrification and long-term *in vitro* growth. *Biopreservation and Biobanking.* 15(4): 321-331.
- 35 Lunardi F.O., de Aguiar F.L., Duarte A.B., Araujo V.R., de Lima L.F., Ribeiro de Sa N.A., Vieira Correia H.H., Domingues S.F., Campello C.C., Smitz J. Figueiredo J.R. & Rodrigues A.P. 2016. Ovine secondary follicles vitrified out the ovarian tissue grow and develop *in vitro* better than those vitrified into the ovarian fragments. *Theriogenology.* 85(7): 1203-1210.
- 36 Luz H.K., Santos R.R., Wanderley L.S., Faustino L.R., Silva C.M., Carvalho A.A., Campello C.C., Santos F.W., Figueiredo J.R. & Rodrigues A.P. 2012. Catalase prevents lipid peroxidation and enhances survival of caprine preantral follicles cryopreserved in a 1,2-propanediol-freezing medium. *Biopreservation and Biobanking.* 10(4): 338-342.
- 37 Luz V.B., Santos R.R., Pinto L.C., Soares A.A., Celestino J.J., Mafezoli J., Campello C.C., Figueiredo J.R. & Rodrigues A.P. 2009. Dimethyl sulfoxide perfusion in caprine ovarian tissue and its relationship with follicular viability after cryopreservation. *Fertility and Sterility.* 91(4 Suppl): 1513-1515.
- 38 Melo M.A., Oskam I.C., Celestino J.J., Carvalho A.A., Castro S.V., Figueiredo J.R., Rodrigues A.P. & Santos R.R. 2011. Adding ascorbic acid to vitrification and IVC medium influences preantral follicle morphology, but not viability. *Reproduction in Domestic Animals.* 46(4): 742-745.
- 39 Motohashi H.H. & Ishibachi H. 2016. Cryopreservation of ovaries from neonatal marmoset monkeys. *Experimental Animals.* 65(3): 189-196.

- 40 Nyachieo A., Spiessens C., Chai D.C., Kiulia N.M., Willemen D., Mwenda J.M., Bourgain C. & D'Hooghe T.M. 2013. Ovarian tissue cryopreservation by vitrification in olive baboons (*Papio Anubis*): A pilot study. *Gynecologic and Obstetric Investigation.* 75(1): 157-162.
- 41 Oliveira K.G., Leão D.L., Almeida D.V., Santos R.R. & Domingues S.F. 2015. Seminal characteristics and cryopreservation of sperm from the squirrel monkey, *Saimiri collinsi*. *Theriogenology.* 84(5): 743-749.
- 42 Oliveira K.G., Santos R.R., Leão D.L., Brito A.B., Lima J.S., Sampaio W.V. & Domingues S.F. 2016. Cooling and freezing of sperm from captive, free-living and endangered squirrel monkey species. *Cryobiology.* 72(3): 283-289.
- 43 Oskam I.C., Asadi B.A. & Santos R.R. 2010. Histologic and ultrastructural features of cryopreserved ovine ovarian tissue: deleterious effect of 1,2-propanediol applying different thawing protocols. *Fertility and Sterility.* 93(8): 2764-2766.
- 44 Oskam I.C., Lund T. & Santos R.R. 2011. Irreversible damage in ovine ovarian tissue after cryopreservation in propanediol: analyses after *in vitro* culture and xenotransplantation. *Reproduction in Domestic Animals.* 46(5): 793-799.
- 45 Pinto L.C., Santos R.R., Faustino L.R., Silva C.G.M., Luz V.B., Maia Junior J.E., Soares A.A.X., Celestino J.J.H., Mafezoli J., Campello C.C., Figueiredo J.R. & Rodrigues A.P. 2008. Quantification of dimethyl sulfoxide perfusion in sheep ovarian tissue: A predictive parameter for follicular survival to cryopreservation. *Biopreservation and Biobanking.* 6(1): 269-276.
- 46 Prasath E.B. 2008. Ovarian tissue cryopreservation: an update. *Journal of Human Reproductive Science.* 1(2): 50-55.
- 47 Rodrigues J.K., Navarro P.A.A.S., Zelinski M.B., Stouffer R.L. & Xu J. 2015. Local role of androgens in the development of preantral follicles from nonhuman primates cultured individually a in three dimensional matrix. *Reprodução & Climatério.* 29(3): 93-104.
- 48 Rodrigues J.K., Navarro P.A.A.S., Zelinski M.B., Stouffer R.L. & Xu J. 2015. Direct actions of androgens on the survival, growth and secretion of steroids and anti-Müllerian hormone by individual macaque follicles during three-dimensional culture. *Human Reproduction.* 30(3): 664-674.
- 49 Sales A.D., Duarte A.B., Santos R.R., Alves K.A., Lima L.F., Rodrigues G.Q., Brito I.R., Lobo C.H., Bruno J.B., Locatelli Y., Figueiredo J.R. & Rodrigues A.P. 2016. Modulation of aquaporins 3 and 9 after exposure of ovine ovarian tissue to cryoprotectants followed by *in vitro* culture. *Cell and Tissue Research.* 365(2): 415-424.
- 50 Sanfilippo S., Canis M., Smitz J., Sion B., Darcha C., Janny L. & Brugnon F. 2015. Vitrification of human ovarian tissue: a practical and relevant alternative to slow freezing. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 13(1): 67.
- 51 Santana L.N., Brito A.B., Brito D.C., Lima J.S., Domingues S.F. & Santos R.R. 2013. Adaptation of a trap door technique for the recovery of cortical biopsies from *Cebus apella* (capuchin monkeys). *Zygote.* 21(2): 158-161.
- 52 Santana L.N., Van den Hurk R., Oskam I.C., Brito A.B., Brito D.C., Domingues S.F. & Santos R.R. 2012. Vitrification of ovarian tissue from primates and domestic ruminants: an overview. *Biopreservation and Biobanking.* 10(3): 288-294.
- 53 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.
- 54 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. 2009. Complete follicular development and recovery of ovarian function of frozen-thawed, autotransplanted caprine ovarian cortex. *Fertility and Sterility.* 91(4 Suppl.): 1455-1458.
- 55 Santos R.R., Tharasanit T., Van Haeften T., Figueiredo J.R., Silva J.R. & Van den Hurk R. 2007. Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods. *Cell and Tissue Research.* 327(1): 167-176.
- 56 Santos R.R., Van Haeften T., Roelen B.A., Knijn H.M., Colenbrander B., Gadella B.M. & Van den Hurk. 2008. Osmotic tolerance and freezability of isolated caprine early-staged follicles. *Cell and Tissue Research.* 333(2): 323-331.
- 57 Scalercio S.R., Amorim C.A., Brito D.C., Percário S., Oskam I.C., Domingues S.F.S. & Santos R.R. 2015. Trolox enhances follicular survival after ovarian tissue autograft in squirrel monkey (*Saimiri collinsi*). *Reproduction, Fertility and Development.* 28(11): 1854-1864.
- 58 Scalercio S.R., Brito A.B., Domingues S.F., Santos R.R. & Amorim C.A. 2015. Immunolocalization of growth, inhibitory, and proliferative factors involved in initial ovarian folliculogenesis from adult common squirrel monkey (*Saimiri collinsi*). *Reproductive Sciences.* 22(1): 68-74.

- 59 Tian T., Zhao G., Han D., Zhu K., Chen D., Zhang Z., Wei Z., Cao Y. & Zhou P. 2015.** Effects of vitrification cryopreservation on follicular morphology and stress relaxation behaviours of human ovarian tissues: sucrose versus trehalose as the non-permeable protective agent. *Human Reproduction*. 30(4): 877-883.
- 60 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. *Human Reproduction*. 28(5): 1267-1279.
- 61 Ting A.Y., Yeoman R.R., Lawson M.S., Zelinski M.B. 2011.** *In vitro* development of secondary follicles from cryopreserved rhesus macaque ovarian tissue after slow-rate freeze or vitrification. *Human Reproduction*. 26(9): 2461-2472.
- 62 Ting A.Y., Yeoman R.R., Lawson M.S. & Zelinski M.B. 2012.** Synthetic polymers improve vitrification outcomes of macaque ovarian tissue as assessed by histological integrity and the *in vitro* development of secondary follicles. *Cryobiology*. 65(1): 1-11.
- 63 Yeoman R.R., Wolf D.P. & Lee D.M. 2005.** Coculture of monkey ovarian tissue increases survival after vitrification and slow-rate freezing. *Fertility and Sterility*. 83(Suppl 1): 1248-1254.