



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - *CAMPUS* SOBRAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

EMANOEL DA SILVA FÉLIX

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS
DE *Croton argyrophyllus* Kunth DURANTE O CULTIVO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS
PRÉ-ANTRAIS INCLUSOS NO TECIDO OVARIANO BOVINO**

SOBRAL

2025

EMANOEL DA SILVA FÉLIX

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE
Croton argyrophyllus Kunth DURANTE O CULTIVO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-
ANTRAIS INCLUSOS NO TECIDO OVARIANO BOVINO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, *Campus* Sobral, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de Pesquisa: Análise integrativa de sistemas biológicos

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Viana Silva

SOBRAL

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- F36a Félix, Emanuel da Silva.
Avaliação do efeito antioxidante do óleo essencial das folhas de *Croton argyrophyllus* Kunth durante o cultivo in vitro de folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano bovino / Emanuel da Silva Félix. – 2025.
109 f. : il.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2025.
Orientação: Prof. Dr. José Roberto Viana Silva.
1. Antioxidante. 2. Bovino. 3. Cultivo In Vitro. 4. Matriz Extracelular. 5. Tecido Ovariano. I. Título.
CDD 660.6
-

EMANOEL DA SILVA FÉLIX

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Croton argyrophyllus* Kunth DURANTE O CULTIVO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS INCLUSOS NO TECIDO OVARIANO BOVINO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, *Campus* Sobral, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de Pesquisa: Análise integrativa de sistemas biológicos.

Aprovada em: 30/04/2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Roberto Viana Silva (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Anderson Weiny Barbalho Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

A Deus, e aos meus pais, pelo amor, dedicação
e esforço na educação de seus filhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua constante proteção, infinito amor e misericórdia. Por me conceder a dádiva de viver cada dia com fé, força e amor, virtudes que me sustentam, transformam e impulsionam na busca por ser alguém melhor, guiando-me rumo a caminhos antes inimagináveis.

Aos meus pais, José e Maria, pelo amor, dedicação e pela formação que me proporcionaram. Por acreditarem nos meus objetivos e por me ensinarem, desde cedo, a importância do respeito, da empatia e da convivência harmoniosa.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Roberto Viana Silva, pela confiança depositada em mim, pelos ensinamentos diários, pela honestidade e por cada oportunidade que contribuiu para o meu crescimento ao longo deste percurso acadêmico.

Ao Prof. Anderson Weiny Barbalho Silva, pelo acolhimento, apoio constante ao longo de toda a minha trajetória acadêmica e pelas orientações que tanto contribuíram para o meu desenvolvimento.

À equipe do Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia da Reprodução – LABIREP, pelo comprometimento, colaboração e pela relevante contribuição por meio do conhecimento compartilhado, que enriqueceu significativamente o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus irmãos, pelo apoio constante, pelas orientações valiosas, pelos exemplos que sempre me motivaram e pela confiança nas minhas decisões ao longo de toda essa jornada acadêmica.

Ao Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo, pela gentileza em aceitar o convite para integrar a banca examinadora desta dissertação.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro para a concretização de minhas atividades de pesquisa durante o curso.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela oportunidade oferecida.

Por fim, expresso minha sincera gratidão a todas as pessoas que, seja de forma direta ou indireta, contribuíram para a concretização do meu propósito.

“Per Aspera Ad Astra” (Sêneca 4 a.C.–65 d.C).

RESUMO

Este estudo teve como objetivos avaliar o efeito antioxidante do Óleo Essencial de *Croton argyrophyllus* Kunth (OECA) durante o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano de bovinos, considerando sua influência na ativação e desenvolvimento folicular, integridade morfológica dos folículos, densidade de células do estroma e configuração da matriz extracelular (MEC). Para isso, determinou-se a capacidade antioxidante do OECA por varredura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzoatiazolina-6-ácido-sulfônico) (ABTS). No laboratório, fragmentos de córtex ovariano (3x3x1 mm) foram fixados em paraformaldeído a 10% (controle não cultivado) ou cultivados *in vitro* em 500 µL de meio controle α -MEM, sem a utilização do OECA, constituído com Albumina Sérica Bovina (BSA) a 1,25 mg/mL, glutamina a 2 mM, penicilina/estreptomicina 100 µL, hipoxantina, insulina, selênio a 10 µg/mL e transferrina a 5,5 α -MEM, que foi denominado (α -MEM⁺), ou suplementado com 0,01, 0,1, 1, 10 e 100 µg/mL de OECA a 38,5°C, com 5% de CO₂ por seis dias. A cada dois dias, 60% do meio de cultura foi substituído. Ao final, os tecidos foram fixados em paraformaldeído a 10% e destinados ao processamento em histologia clássica para coloração com Hematoxilina & Eosina, Picrosirius Red e Azul Alcian, sendo posteriormente submetidos à análise histológica para avaliação morfológica, desenvolvimento folicular, análise do estroma e da MEC. Os resultados indicam que os tecidos cultivados com 1,0, 10,0 e 100,0 µg/mL de OECA apresentaram maior porcentagem de folículos normais em comparação aos outros tratamentos com 0,01 e 0,1 µg/mL OECA e α -MEM⁺. O tratamento com 100 µg/mL aumentou a quantidade de células do estroma após o cultivo quando comparado ao controle cultivado α -MEM⁺. Todos os tratamentos com OECA mantiveram os níveis das fibras de colágeno quando comparados ao controle não cultivado, no entanto, ocorreu aumento nas fibras de colágeno nos tratamentos com OECA quando comparados ao controle cultivado α -MEM⁺. Foi observada redução da densidade de colágeno ao redor dos folículos primários em comparação aos folículos primordiais, independentemente do tratamento com OECA. O cultivo com OECA ou α -MEM⁺ não interferiram nos níveis de glicosaminoglicanos quando comparados ao controle não cultivado e cultivado. Conclui-se que 100,0 µg/mL de OECA favorece a manutenção da morfologia folicular, a integridade das células estromais e preserva as fibras colágenas e glicosaminoglicanos presentes na matriz extracelular.

Palavras-chave: antioxidante; bovino; cultivo *in vitro*; matriz extracelular; tecido ovariano.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the antioxidant effect of *Croton argyrophyllus* Kunth Essential Oil (CAEO) in the *in vitro* culture of preantral follicles included in bovine ovarian tissue, considering its influence on follicle activation and development, morphological integrity of the follicles, stromal cell density and configuration of the extracellular matrix (ECM). To this end, the antioxidant capacity of CAEO was determined by scanning for the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) and the 2,2'-azinobis (3-ethylbenzoathiazoline-6-sulfonic acid) radical (ABTS). In the laboratory, fragments of ovarian cortex (3x3x1 mm) were fixed in 10% paraformaldehyde (uncultured control) or cultured *in vitro* in 500 μ L of α -MEM control medium alone, consisting of BSA at 1.25 mg/mL, glutamine at 2 mM, penicillin/streptomycin 100 μ L, hypoxanthine, insulin, selenium at 10 μ g/mL and transferrin at 5.5 μ g/mL (α -MEM⁺) or supplemented with 0.01, 0.1, 1, 10 and 100 μ g/mL CAEO at 38.5°C with 5% CO₂ in air for 6 days. Every two days, 60% of the culture medium was replaced. At the end, the tissues were fixed in 10% paraformaldehyde and processed in classical histology for staining with Hematoxylin & Eosin, Picrosirius Red and Alcian Blue, and then subjected to histological analysis for morphological assessment, follicular development, analysis of the stroma and ECM. The results indicate that the tissues cultured with 1.0, 10.0 and 100.0 μ g/mL of CAEO showed a higher percentage of normal follicles compared to the other treatments with 0.01 and 0.1 μ g/mL CAEO and α -MEM⁺. Treatment with 100 μ g/mL improved the amount of stromal cells after culture when compared to the α -MEM⁺ cultured control. All CAEO treatments maintained collagen fiber levels when compared to the uncultured control; however, there was an increase in collagen fibers in the CAEO treatments when compared to the α -MEM⁺ cultured control. A reduction in collagen density was observed around primary follicles compared to primordial follicles, regardless of the CAEO treatment. Cultivation with CAEO or α -MEM⁺ did not interfere with glycosaminoglycan levels when compared to the uncultivated control and cultured. It is concluded that 100.0 μ g/mL of CAEO favors the maintenance of follicular morphology, the integrity of stromal cells and preserves the collagen fibers and glycosaminoglycans in the extracellular matrix.

Keywords: antioxidant; bovine species; extracellular matrix; *in vitro* culture; ovarian tissue.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES DA DISSERTAÇÃO

FIGURA 1	Ovário de mamíferos, com a demonstração dos estágios do desenvolvimento folicular, dos folículos pré-antrais aos folículos antrais e corpo lúteo, bem como células estromais e matriz extracelular.....	17
FIGURA 2	Caracterização das fases foliculares dependentes e independentes de gonadotrofinas.....	19
FIGURA 3	Via de sinalização PI3K AKT FOXO3.....	22
FIGURA 4	Mecanismo de ativação folicular a partir da via Hippo, relacionadas aos sinais mecânicos no tecido ovariano.....	24
FIGURA 5	Processo de cultivo <i>in situ</i> de folículos ovarianos. A) Fragmentação do tecido ovariano, B) Deposição dos fragmentos dissecados em meio base de fragmentação, C) Deposição dos fragmentos de tecido ovariano em placa de cultivo, e D) Deposição da placa de cultivo em incubadora.....	25
FIGURA 6	Representação das fontes de EROs nas diferentes organelas em células eucarióticas.....	28
FIGURA 7	Fatores laboratoriais percussores do estresse oxidativo de folículos ovarianos no cultivo <i>in vitro</i>	29
FIGURA 8	Mecanismos gerais de ação das enzimas antioxidantes nos compartimentos celulares.....	31
FIGURA 9	Vias fundamentais na biossíntese de metabólitos secundários em vegetais.....	33
FIGURA 10	Biossíntese de isoprenos.....	35
FIGURA 11	Distribuição da espécie <i>Croton argyrophyllus</i> Kunth no continente Sul-americano.....	37
FIGURA 12	Principais constituintes químicos do óleo essencial de <i>Croton argyrophyllus</i> Kunth.....	38

LISTA DE ILUSTRAÇÕES DO CAPÍTULO 1

FIGURE 1.	Representation of the mammalian ovary showing the cortical and medullary regions and follicles at different stages of development surrounded by extracellular matrix.....	46
FIGURE 2.	Schematic representation of the extracellular matrix (ECM) and its interaction with the cell.....	47
FIGURE 3.	Schematic representation of the dynamics of collagen distribution (I, IV and VI) throughout the stages of reproductive life in females of different species (mice, pigs, cows and humans)	55

LISTA DE ILUSTRAÇÕES DO CAPÍTULO 2

- FIGURE 1. Morphology (A–F) and percentages (G) of normal follicles in uncultured samples and in samples cultured for 6 days in control medium alone (α -MEM⁺) or with 0.01, 0.1, 1.0, 10.0 or 100.0 μ g/mL CAEO. Normal follicles (A–C) degenerated (D–F). Granulosa cells (gc); oocyte (o); oocyte nucleus (n). Scale bar: 100 μ m: a-c: statistically significant differences between treatments. Numbers of normal and total follicles evaluated are shown within each column..... 73
- FIGURE 2. Percentages of primordial and developing (A) follicles in uncultured and in 6-day cultured samples in control medium alone (α -MEM⁺) or with 0.01, 0.1, 1.0, 10.0 or 100.0 μ g/mL CAEO. a-b: statistically significant differences between treatments. *Differs significantly from uncultured tissues. Numbers of primordial and developing follicles evaluated are shown within each column..... 74
- FIGURE 3. Morphology (A: Control, B: α -MEM⁺, C: 0.01 CAEO, D: 0.1 CAEO, E: 1.0 CAEO, F: 10.0 CAEO and G: 100.0 CAEO) and percentages (H) of collagen fiber area (mean $\pm$ SD) in uncultured samples and in samples cultured for 6 days in control medium alone (α -MEM⁺) or with 0.01, 0.1, 1.0, 10.0 or 100.0 μ g/mL CAEO. a, b: statistically significant differences between treatments. Scale bar = 100 μ m. 75
- FIGURE 4. Quantitative measurements of collagen density in a 50 μ m² area around primordial and primary follicles before and after cultured for 6 days in control medium alone (α -MEM⁺) or with 0.01, 0.1, 1.0, 10.0 or 100.0 μ g/mL CAEO. (a-b: statistically significant differences between treatments or follicular categories) 78
- FIGURE 5. Morphology (A: Control, B: α -MEM⁺, C: 0.01 CAEO, D: 0.1 CAEO, E: 1.0 CAEO, F: 10.0 CAEO and G: 100.0 CAEO) and percentages (H) of GAGs area (mean $\pm$ SD) in uncultured samples and in samples cultured for 6 days in control medium alone (α -MEM⁺) or with 0.01, 0.1, 1.0, 10.0 or 100.0 μ g/mL CAEO. a-b: statistically significant differences

	between treatments. Scale bar = 100 μm	79
FIGURE 6.	Morphology (A: Control, B: $\alpha\text{-MEM}^+$, C: 0.01 CAEO, D: 0.1 CAEO, E: 1.0 CAEO, F: 10.0 CAEO and G: 100.0 CAEO) and number (mean $\pm$ SD) of stromal cells (H) in uncultured samples and in samples cultured for 6 days in control medium alone ($\alpha\text{-MEM}^+$) or with 00.01, 0.1, 1.0, 10.0 or 100.0 $\mu\text{g/mL}$ CAEO. a–c statistically significant differences between treatments. Scale bar = 100 μm	81

LISTA DE TABELAS DO CAPÍTULO 2

Table 1.	Determination of the total antioxidant activity of the pure ethanolic extract of CAEO, through the ABTS and DPPH radicals scavenging methods.....	71
Table 2.	Effect size (ϵ^2) and confidence intervals (95% CI) for the density of collagen fibers in the different treatments.....	75
Table 3.	Effect size (ϵ^2) and confidence intervals (95% CI) for the GAGs in the different treatments.....	79
Table 4.	Effect size (ϵ^2) and confidence intervals (95% CI) for the stromal cells in the different treatments.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT	Proteína quinase B
AREG	Anfiregulina
BAPT	Peptídeos Bioativos
BSA	Albumina sérica bovina
CAT	Catalase
COL1	Colágeno tipo I
COL4	Colágeno tipo IV
COV	Compostos orgânicos voláteis
DIV	Derivação <i>in vitro</i>
DMAPP	Dimetilalil pirofosfato
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGF	Fatores de crescimento epidermal
EO	Estresse oxidativos
EROs	Espécies reativas ao oxigênio
ESO	Epitélio de Superfície Ovariana
FA	Fibrina-alginato
FACITs	Colágenos associados a fibrilas com hélices triplas interrompidas
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FAK	Quinase de adesão focal
FN	Fibronectina
FOP	Insuficiência Ovariana Prematura
FOXO3	Forkhead box O3
FRAP	Poder antioxidante redutor férrico
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GAG	Glicosaminoglicano
GPX	Glutathione Peroxidase
GR	Glutathione Redutase
GSH	Glutathione
GV	Vesícula Germinativa
HA	Hialuronano

hOSCs	Células-tronco oogoniais humanas
IPP	Isopentenil pirofosfato
ITS	Insulina, transferrina, selênio
IVA	Ativação <i>in vitro</i>
LH	Hormônio Luteinizante
LK	Ligante Kit
MAP4K	Proteína 4 quinase ativada por mitógeno
MEC	Matriz extracelular
MEP	Metileritritol 4-fosfato
MIV	Maturação <i>in vitro</i> (MIV)
MOIFOPA	Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos
MVA	Ácido mevalônico
α -MEM	Meio essencial mínimo alfa
α -MEM+	Meio essencial mínimo alfa suplementado
MVA	Ácido mevalônico
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
OEs	Óleos essenciais
PDK1	Quinase 1 dependente de fosfatidilinositol
PI3K	Fosfoinositídeo 3-quinases
PIP2	Fosfatidilinositol bifosfato
PIP3	Quinasefosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PIVI	Produção <i>In vitro</i> de Embriões
PSMs	Metabólitos secundários de plantas
PTEN	Fosfatase e homólogo de tensina
RTK	Receptores tirosina quinases
RNA	Ácido ribonucleico
SOD	Superóxido Dismutase
SOP	Síndrome do Ovário Policístico
SW	Ondas de cisalhamento
TAC1	Complexo esclerose tuberosa 1
TE	Transferência de Embriões
TSC2	Esclerose tuberosa 2

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
~	Aproximadamente
±	Erro padrão da média
≥	Maior ou igual
≤	Menor ou igual
°C	Graus Celsius
CO ₂	Dióxido de Carbono
S	Segundos
G	Grama
L	Litro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
Ng	Nanograma
Nm	Nanômetro
Mg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
mM	Milimolar
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
M	Molar
P<0,05	Probabilidade de erro menor que 5%
P>0,05	Probabilidade de erro maior que 5%

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Ovário mamífero e aspectos gerais da foliculogênese	16
2.2	Sinalização celular durante o processo de ativação folicular.....	20
2.3	Via de sinalização Hippo.....	22
2.4	Sistemas de cultivo <i>in vitro</i> de folículos ovarianos e suas aplicabilidades.....	24
2.5	Estresse oxidativo no cultivo de folículos ovarianos.....	27
2.6	Defesa antioxidante das células.....	30
2.7	Aspectos dos óleos essenciais extraído de plantas.....	32
2.7.1	Óleos essenciais.....	32
2.7.2	Classificação e aspectos químicos dos óleos essenciais (OEs).....	34
2.7.3	<i>Croton argyrophyllus</i> Kunth: distribuição e bioatividades do óleo essencial extraído do vegetal.....	36
3	JUSTIFICATIVA	39
4	HIPÓTESES	41
5	OBJETIVOS	41
5.1	Objetivos gerais.....	41
5.2	Objetivos específicos.....	41
6	CAPÍTULO 1	42
7	CAPÍTULO 2	63
8	CONCLUSÕES GERAIS.....	92
9	PERSPECTIVAS.....	92
	REFERÊNCIAS	93

1 INTRODUÇÃO

É amplamente aceito que o número de folículos ovarianos é finito, sendo determinado durante o desenvolvimento fetal e reduzido gradualmente ao longo da vida reprodutiva da fêmea (Liew et al., 2017). A maioria desses folículos (~99,9%) é perdida devido ao processo de atresia, um mecanismo de degeneração natural que ocorre durante a foliculogênese e que podem afetar os folículos em qualquer fase de desenvolvimento (Zhou; Peng; Mei, 2019). Portanto, o cultivo *in vitro* de tecido ovariano é uma biotécnica que vem sendo explorada com o objetivo de melhorar as condições ideais para o desenvolvimento folicular, assim, promover a recuperação dos folículos que seriam perdidos devido à atresia (Telfer et al., 2000; Bizarro-Silva & Seneda, 2021). Avanços nessa área também podem acarretar benefícios no melhoramento genético dos animais de alto valor zootécnico, além de favorecer o desenvolvimento pecuário (Fleming et al., 2018; Crowe; Lonergan; Butler, 2021). Entretanto, no cultivo de folículos ovarianos, a ausência de sistemas antioxidantes maternos favorece o acúmulo de oxigênio celular, contribuindo para o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), causando estresse oxidativo às células (Lins et al., 2017), uma das principais limitações no protocolo de cultivo de tecido ovariano, desfavorecendo a manutenção de um ambiente propício ao desenvolvimento folicular.

A Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais (MOIFOPA) também conhecida como “Ovário Artificial”, é uma biotécnica que envolve o isolamento de folículos pré-antrais ou manipulação dos folículos inclusos nos fragmentos do tecido ovariano, para conservação e cultivo, visando promover o crescimento, desenvolvimento, maturação e fecundação *in vitro* dos oócitos (Figueiredo et al., 2007). Por meio dessa biotécnica, é possível recuperar um número significativo de oócitos a partir de folículos pré-antrais em espécies domésticas e cultivá-los, *in vitro*, juntamente com os oócitos imaturos neles contidos até o estágio de maturação (Figueiredo et al., 2019). A técnica de MOIFOPA vem sendo utilizada para estudar os mecanismos que regulam o crescimento folicular através da realização de testes com diferentes substâncias como, hormônios, fatores de crescimento e substâncias antioxidantes (Plazas, 2015). Embora significativo progresso já tenha sido obtido através dessa biotécnica, o crescimento *in vitro* de folículos ovarianos ainda enfrenta limitações perante as EROs. Sabe-se que, *in vitro*, os folículos são submetidos a maiores concentrações de oxigênio em relação às condições *in vivo*, o que favorece a superprodução de EROs resultando em estresse oxidativo (Barrozo et al., 2021). De fato, estudos têm reportado a relação do estresse oxidativo com as altas taxas de atresia observadas durante o cultivo, que comprometem

severamente a qualidade dos folículos cultivados (Lins et al., 2017). Esses eventos afetam o funcionamento do DNA, perda da integridade e seletividade de membranas que culminam na disfunção mitocondrial com comprometimento severo da produção de Adenosina trifosfato (ATP) celular e no desenvolvimento dos folículos cultivados *in vitro* (Costa et al., 2022).

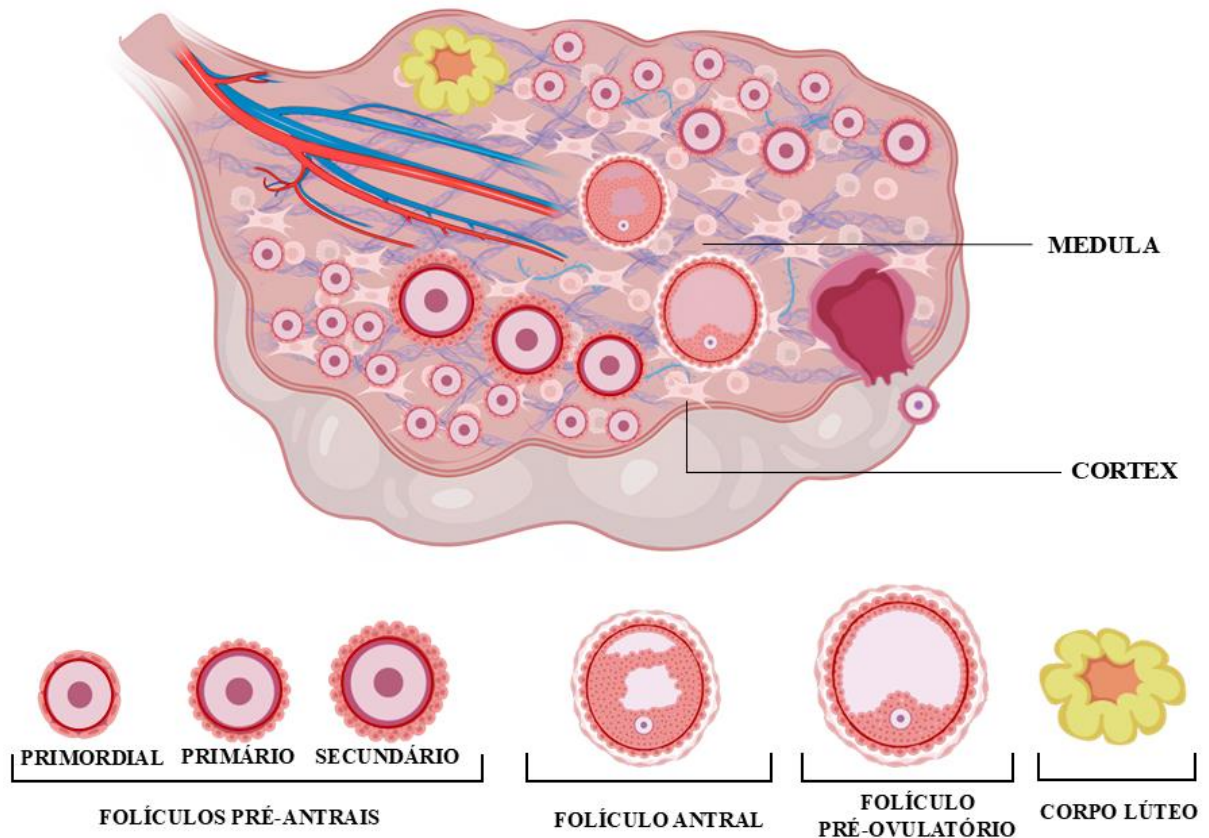
Com o propósito de contornar os efeitos deletérios ocasionados pelo estresse oxidativo durante os sistemas de cultivo folicular *in vitro*, a adição de substâncias antioxidantes nos meios de cultivo, especialmente aquelas de origem natural, têm sido propostas (Silva, B; Silva, R, 2023). Os óleos essenciais (OE), por exemplo, são extraídos a partir de plantas e possuem uma ampla variedade de componentes bioativos, razão pela qual têm atraído o interesse de pesquisadores para seu uso em diversas finalidades, incluindo seu uso como suplemento antioxidante (Carneiro et al., 2017). O *Croton argyrophyllus* Kunth, espécie pertencente à família Euphorbiaceae, apresenta OE com grande diversidade de agentes bioativos incluindo compostos com atividade antioxidante, em estudo realizado (Ramos et al., 2013a). O óleo essencial de *Croton argyrophyllus* Kunth (OECA) demonstrou alta atividade antioxidante pela sua capacidade de capturar radicais livres pelos métodos de Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) e 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), essa bioatividade foi atribuída à presença de constituintes fenólicos, além do acetato de etila (Costa, M. et al., 2017). Além disso, foi capaz de reduzir biomarcadores relacionados ao EO a níveis plasmático e muscular, atividade essa, atribuída aos seus constituintes fenólicos (Araújo et al., 2019). Souto et al. (2020) demonstram que nanopartículas lipídicas com OECA preservaram a atividade antioxidante em neuroblastoma *in vitro*, sugerindo uma abordagem promissora contra doenças neurodegenerativas. Ainda, um OE extraído do mesmo gênero *Croton growioides* demonstrou atividade antioxidante no cultivo de tecido ovariano bovino, promovendo a sobrevivência folicular (Silva, F. et al., 2024). A atividade antioxidante do OECA é associada à sua composição química, que apresenta metabólitos secundários, com concentrações significativas de compostos fenólicos (Brito et al., 2018). Desse modo, podemos inferir que as propriedades antioxidantes apresentadas pelo óleo deste vegetal, já descritas em estudos anteriores, demonstra seu potencial para atenuar o estresse oxidativo e proteger efeitos deletérios provocados pelas EROs. Portanto, considerando-se o potencial antioxidante do OECA atrelados a seus componentes químicos, bem como a importância de estudos que avaliem o efeito desses agentes antioxidantes no protocolo de cultivo de folículos pré-antrais bovinos, o estudo busca elucidar a importância do potencial biotecnológico do OECA, durante o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais bovinos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ovário mamífero e aspectos gerais da oogênese e foliculogênese

O ovário de mamíferos tem uma morfologia característica e é organizado em duas regiões bem definidas: córtex e medula. O córtex é a região externa do ovário onde estão contidos os folículos em diferentes estágios de desenvolvimento. Esta região é revestida pelo epitélio germinativo e uma camada de tecido conjuntivo denominado túnica albugínea; a medula é a porção mais interna do ovário, caracterizada por tecido conjuntivo frouxo e pela presença de vasos sanguíneos, linfáticos e nervos, e sua principal função é oferecer suporte estrutural e vascular ao córtex ovariano (Shah et al., 2018; Hu et al., 2023). Conforme descrito por Figueiredo et al. (2017), o córtex ovariano contém folículos em variados estágios de desenvolvimento, categorizados em pré-antrais (primordiais, primários e secundários) e antrais, estes últimos também referidos como folículos cavitários. Os folículos primordiais são caracterizados por uma única camada de células da granulosa dispostas em configuração pavimentosa; os folículos primários, por sua vez, apresentam células da granulosa em forma cuboidal; os folículos secundários, observa-se a proliferação das células da granulosa e a formação de uma camada de células da teca. Já os folículos antrais adquirem pequenos espaços cheios de líquido que, ao se fundirem, formam uma única cavidade denominada antro (Telfer & Zelinski, 2013; Jimenez et al., 2016) (Figura 1).

Figura 1. Ovário de mamíferos, com a demonstração dos estágios do desenvolvimento folicular, dos folículos pré-antrais aos folículos antrais e corpo lúteo, bem como células estromais e matriz extracelular.



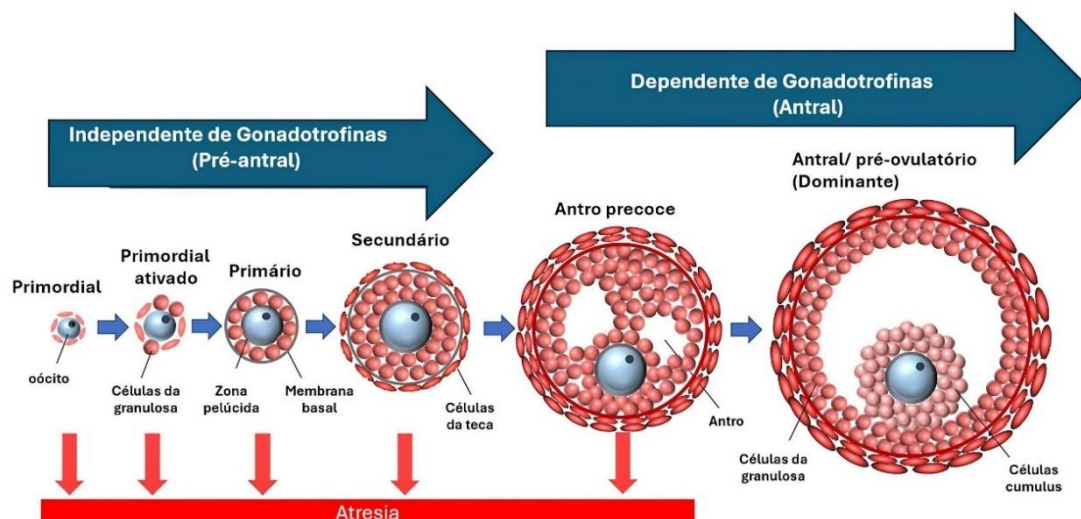
Fonte: Elaborado pelo autor

A oogênese e a foliculogênese são dois processos simultâneos e fundamentais, sendo que a oogênese precede a foliculogênese. A oogênese é o processo de desenvolvimento e diferenciação das células germinativas primordiais (CGPs) até a formação da maior célula do corpo, o oócito, e segue até o processo de fecundação. Esse processo tem-se início na vida intrauterina, quando as oogônias são desenvolvidas a partir das CGPs, à medida que o desenvolvimento do embrião progride (Virant-Klun, 2015; Krajnik et al., 2023). Nos ovários fetais, as oogônias, derivadas das CGPs; ao término desse ciclo proliferativo, essas células diploides ($2n$) aumentam de tamanho, finalizam sua última replicação de DNA e entram na meiose, diferenciando-se em oócito primário ou imaturo, que possui núcleo estacionado na prófase I (estádio de diplóteno) (Zhang, Xia, 2012; Tanimoto et al., 2022). Na puberdade, o pico pré-ovulatório do hormônio luteinizante (LH) desencadeia a retomada da meiose pelo oócito primário, que completa a meiose I (passando pelos estágios de metáfase I, anáfase I e

telófase I) e inicia a meiose II, sendo novamente interrompida na metáfase II, onde permanece até a fertilização (Baillet, Mandon-Pepin, 2012). A conclusão do processo ocorre apenas após a fecundação, quando o oócito completa a meiose e se torna um oócito haploide fecundado (Santella; Limatola; Chun, 2020).

A foliculogênese compreende o desenvolvimento e a maturação dos folículos ovarianos, desde a formação dos folículos primordiais até o estágio de folículo pré-ovulatório (Gershon; Dekel, 2020). Esse processo começa na parte mais interna do córtex ovariano em mamíferos, onde folículos primordiais quiescentes são formados, esses folículos consistem em oócitos no estágio de prófase I e diplóteno da meiose I (na maioria das espécies). Esses folículos posteriormente passam por estágios de crescimento e desenvolvimento até a liberação do oócito maduro e a subsequente formação do corpo lúteo (Lima et al., 2016), em um processo dinâmico e complexo que envolve múltiplas células ovarianas e endócrinas, sendo essencial para a função ovariana e a propagação da espécie. O desenvolvimento folicular é marcado por duas linhas bem definidas, a via independente/responsiva de gonadotrofinas e a dependente de gonadotrofinas, atreladas aos Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e Hormônio Luteinizante (LH) (Figura 2) (Gershon; Dekel, 2020; Lim; Jeremy; Kylie, 2021). A fase pré-antral se refere ao desenvolvimento inicial dos folículos, antes de se tornarem dependentes das gonadotrofinas, e a ativação folicular é controlado por reguladores intra-ovarianos, por comunicação entre oócito e células somáticas dos folículos, que regula o crescimento via transferência de moléculas e por ação de proteínas por meio de receptores, influenciando proliferação e diferenciação celular (Orisaka et al, 2021) como também pela remodelação da MEC (Zhang et al., 2024).

Figura 2. Caracterização das fases foliculares dependentes e independentes de gonadotrofinas.



Fonte: Adaptado de Lim; Jeremy; Kylie, (2021)

Sabe-se que os folículos primordiais ovarianos estabelecido ao nascimento, serve como uma reserva durante a vida reprodutiva de mamíferos, e o processo de ativação dos folículos primordiais e seu desenvolvimento subsequente é um processo irreversível (Shah et al., 2018). Nesse sentido, após a formação dos folículos primordiais, eles podem permanecer inativos (reserva ovariana), ativar-se para desenvolvimento subsequente, sendo o recrutamento folicular um processo controlado pela comunicação entre oócitos, células da granulosa e células somáticas circundantes, ou passam por atresia folicular (Hannon; Flaws, 2015). Os folículos que são ativados, transacionam do folículo primordial para o primário, essa transição é marcada histologicamente por uma mudança na morfologia das células da granulosa, que inicialmente são pavimentosas, e diferenciam-se em células cuboidais; essas células circundantes ainda podem proliferar-se, à medida que os folículos primários crescem, as células da granulosa se dividem mitoticamente para que os folículos secundários se formem e tenham de duas a seis camadas de células da granulosa em formato cuboide além das células da teca, antes de adquirirem uma cavidade antral (Aerts; Bols, 2010; Hao et al., 2019). Foi observado que a ativação de folículos primordiais *in vitro* pode ser regulada por diversos fatores de crescimento, incluindo GDF9, BMP15, IGF1, Kit Ligand, BMP7, LIF, FGF2, FGF10 e TGF β , bem como por hormônios como FSH, melatonina, hormônio do crescimento, estradiol e progesterona (Silva; Hurk; Figueiredo, 2016). A troca de fatores de crescimento entre o oócito e as células somáticas circundantes é fundamental para o desenvolvimento folicular, desde os estágios primordial, primário e secundário até o estágio antral (Aaron et al., 2015).

Diante dos aspectos da foliculogênese, estudos envolvendo a manipulação inicial do tecido ovariano tem um impacto significativo na ativação folicular. É demonstrado que as vias Fosfoinositídeo 3-quinases (PI3K) e Hippo são cruciais nesse processo (Barretta et al., 2023). A abordagem da ativação folicular é visto atualmente como um possível fator terapêutico, focado nas vias de transdução de sinal intracelular de ativação de folículos pré-antrais, como a fosfatase e homólogo de tensina (PTEN)/fosfatidilinositol-3-quinase(PI3K)/proteína quinase B (Akt)/via de sinalização forkhead box O3 (FOXO3) e as vias de sinalização Hippo, visando, por exemplo, ajudar pacientes com Síndrome do Ovário Policístico (SOP) (Zhang et al., 2021; Huang et al., 2022); além de oferecer uma nova estratégia para tratar a infertilidade em pacientes com Insuficiência Ovariana Prematura (FOP), permitindo a concepção de filhos geneticamente relacionados, além de mostrar eficácia em casos de diminuição da reserva ovariana, abrangendo mulheres mais velhas e sobreviventes de câncer (Sun et al., 2015). Além disso, técnicas como

a MOIFOPA foram elaboradas para recuperar e cultivar oócitos inclusos em folículos em fase pré-antral até atingirem completa maturação *in vitro*, possibilitando a produção em grande escala de oócitos maduros (Bizarro-Silva; Seneda, 2021). Entretanto, a eficácia e segurança dos métodos de Ativação *In Vitro* (AIV) ainda geram controvérsias, especialmente ao utilizar manipulação farmacológica nas vias PI3K/Akt e Hippo; estudos levantam preocupações sobre a qualidade dos oócitos, associando a ativação folicular com um inibidor de PTEN a danos no DNA e capacidade de reparo comprometida (Maidarti; Anderson; Telfer, 2020).

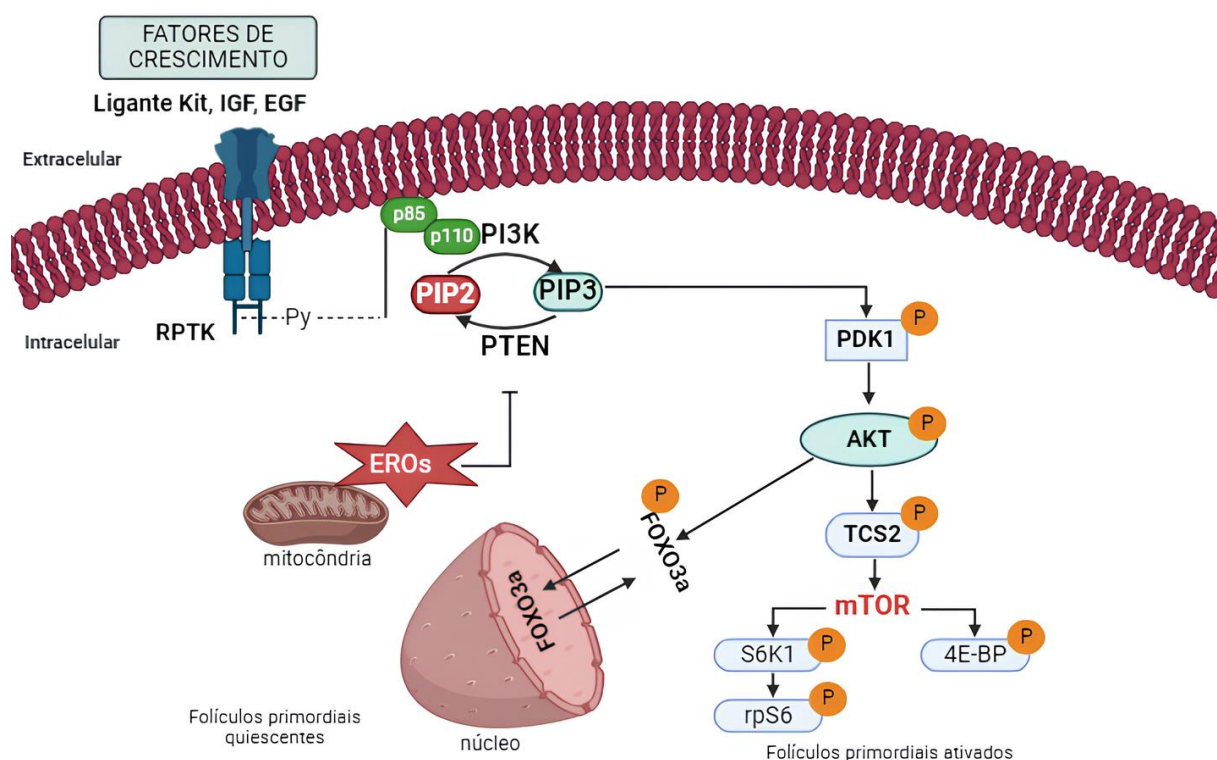
2.2 Sinalização celular durante o processo de ativação folicular

Sabe-se que a via Fosfoinositídeo 3-quinases (PI3K)/Akt desempenha um papel crucial na ativação dos folículos primordiais, sendo influenciada por diversos fatores de crescimento intra-ovariano, como o Kit ligante (KL), fator de crescimento semelhante à insulina I, fator de crescimento derivado de plaquetas e fator de crescimento epidermal (EGF) (Fabregues et al., 2021). Ainda, a ativação de PI3K por estímulos extracelulares é essencial para a ativação de AKT em todas as células e tecidos; assim, estimulação de Receptores Tirosina Quinases (RTK) ou receptores acoplados à proteína G (GPCR), resulta no recrutamento e ativação de isoformas da PI3K classe I, que juntamente com seus produtos lipídicos são cruciais para a ativação eficaz da AKT (Vanhaesebroeck et al., 2010).

O KL, um dos efetores importantes na sinalização de PI3K/AKT em células germinativas primordiais, pode exercer essa função ativante tanto em sua forma ancorada a membrana celular, como também em sua forma solúvel, por difusão (Felici; Klinger, 2021). Sendo assim, o KL ao se ligar ao receptor c-kit ativa o PI3K, composto por subunidades p85 e p110; essa ativação do c-kit leva à interação dessas subunidades, resultando na fosforilação do grupo 3-OH do anel inositol, convertendo fosfatidilinositol bifosfato (PIP2) em quinasefosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), que estimula a atividade da quinase 1 dependente de fosfatidilinositol (PDK1), que, por sua vez, fosforila Akt, a molécula chave dessa via (Chen et al., 2020; Vo; Kawamura, 2021). Por outro lado, o PTEN é um dos fatores de regulação negativa dessa via, que transforma PIP3 novamente em PIP2 (Cheng et al., 2015), diminuindo a atividade da AKT, e permitindo a acumulação de FOXO3a não fosforilada no núcleo, inibindo a ativação transcricional e suprimindo a proliferação celular e ativação folicular (Li et al., 2021). Existem quatro isoformas de proteínas FOXO (FOXO1, FOXO3, FOXO4 e FOXO6), sendo FOXO1, FOXO3 e FOXO4 fosforiladas pela AKT, levando à exportação nuclear e inibição da transcrição, ou seja, esses fatores de transcrição são

negativamente regulados pela via de sinalização PI3K/AKT (Zhang; Zhang, 2019), sendo assim, a deleção de PTEN estimula a fosforilação de AKT e a exportação nuclear de proteínas FOXO3, permitindo a ativação de folículos primordiais (Kawamura, K.; Kawamura, N.; Hsueh, 2016). Por outro mecanismo da via PI3K/AKT, o alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) uma serina/treonina quinase, é a subunidade catalítica de dois complexos estruturalmente distintos, mTORC1 e mTORC2 (Panwar et al., 2023), que regula o crescimento e a proliferação celular, sendo o complexo mTORC1 sensível à rapamicina; dessa forma, a supressão da atividade do complexo mTORC1 pelo complexo esclerose tuberosa 1 (TSC1) e esclerose tuberosa 2 (TSC2), mantém a dormência de folículos primordiais (Hsueh et al., 2015; Kawamura, K.; Kawamura, N.; Hsueh, 2016) no entanto, a AKT pode ativar o mTORC1 ao inibir TSC2, que é um supressor do mTOR, e regula a síntese de proteínas ao fosforilar moléculas como 4E-BP1 e S6K1, desencadeando a ativação de rpS6 e favorecendo a progressão na ativação (Herta; Lolicato; Smits, 2018). Ademais, o KL atua abaixo do mTOR, controlando a resposta do oócito por meio de seu receptor, expresso no oócito, destacando a influência crucial da via mTOR e do Ligante Kit (KITL) na formação de folículos (Zhang et al., 2017) (Figura 3). Diante da perspectiva das EROs, foi demonstrado que a regulação positiva de PTEN, via PI3K/AKT, reduz a produção de EROs celular, no entanto, o aumento de EROs nas mitocôndrias, inibe PTEN e acumula níveis de PIP3 e intensifica a produção de EROs, sugerindo um ciclo de feedback positivo entre PTEN, PIP3 e EROs (Maidarti; Anderson; Telfer, 2020).

Figura 3. Via de sinalização PI3K -AKT- FOXO3-mTOR.



Fonte: Elaborado pelo autor

2.3 Via de sinalização Hippo

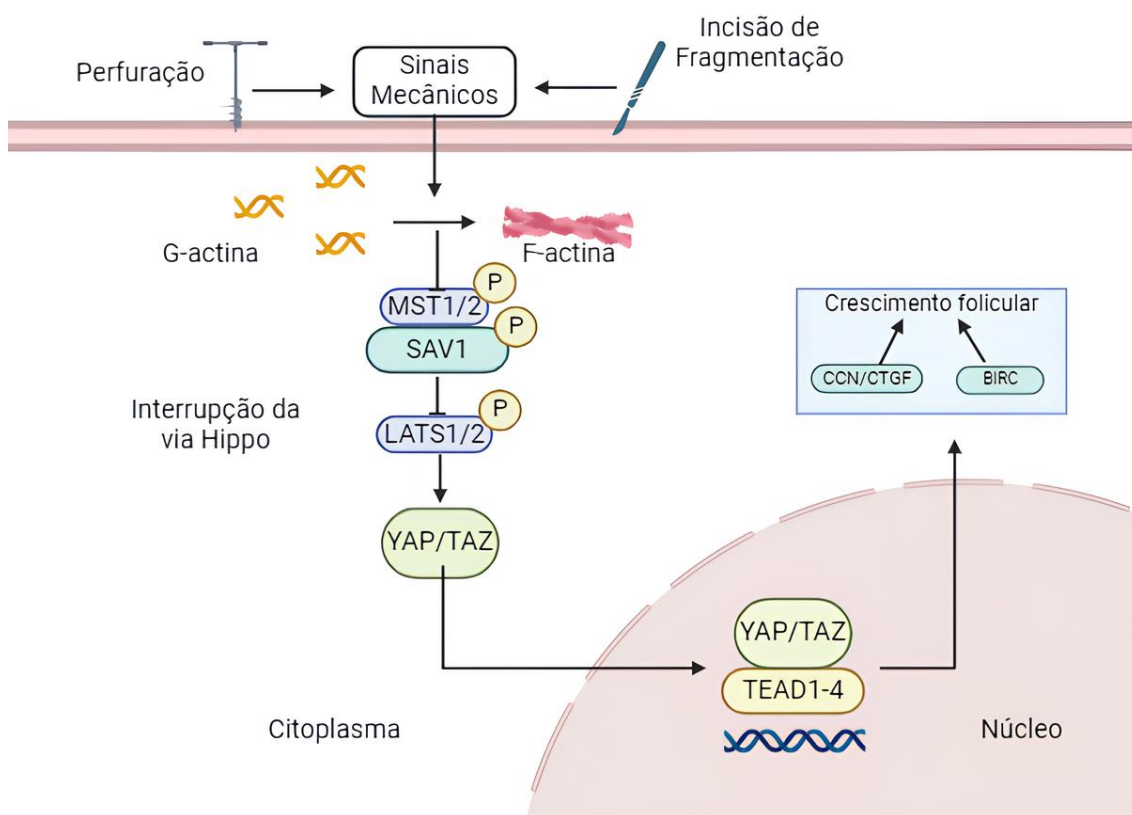
A via Hippo é a segunda via fundamental na ativação folicular. Na sua fundamentação clássica em mamíferos, ela envolve uma cascata de quinases (Meng; Moroishi; Guan, 2016). Essa via evolutiva foi evidenciada pela primeira vez em espécie de *Drosophila melanogaster*, usando telas de mosaico genético para identificar mutações que causam crescimento clonal excessivo; os principais componentes incluem as proteínas Warts (Wts), Salvador (SAV), proteína quinase Hippo (Hpo) e ativador MOB quinase (Mob) como supressor de tumor (Mats) (Pan, 2010), estas, formam um módulo de sinalização associado a fenótipos de crescimento descontrolado, sendo chamado de "via Hippo" em homenagem a mutantes hpo que exibem fenótipos de órgãos de grande dimensão (Ma et al., 2019). Essa via controla o crescimento celular através de complexos de quinase, como quinase 1/2 (MST1/2), SAV e homólogo supressor de tumor grande 1/2 (LATS1/2), que inibem proteínas associadas ao Yes (YAPs) e coativadores transcricionais (TAZ), limitando sua atividade nuclear e, assim, regulando a proliferação celular (Fu; Plouffe; Guan, 2017). Além de controlar a migração de células

germinativas ovarianas e células somáticas, a via hippo interage com outras vias, como a PI3K, e influenciam o desenvolvimento folicular; essa interação é sensível à regulação endócrina e metabólica ovariana, impactando a ativação, desenvolvimento folicular e apoptose celular (Zhu et al., 2023).

Foi demonstrado que a manipulação mecânica de fragmentos de tecido ovariano no cultivo *in vitro* (CIV) promove ativação dos folículos, uma vez que, induz mudanças nas células da granulosa, resultando na diminuição da proteína inibitória fosfo-YAP (pYAP) e no aumento do YAP estimulador nos primeiros dias de cultivo (Roo et al., 2020), além disso, a via hippo pode ser interrompida por vários sinais tanto intracelulares e extracelulares, como perda de contato célula-célula, polaridade celular, estresse energético e ligantes de receptores acoplados à proteína G (Grosbois; Devos; Demeestere, 2020). Sabe-se que MST1/2, SAV1 e LATS1 são os reguladores negativos da via Hippo, sua atividade regula o crescimento, desenvolvimento e funções ovarianas em mamíferos, logo, exercendo um processo na regulação da ativação dos folículos primordiais (Tsoi et al., 2019). Sendo assim, a proteína-4-quinase ativada por mitógeno (MAP4K) faz a regulação dos complexos quinase MST1/2 e LATS1/2, que fosforilam YAP/TAZ e promove sua inibição (Chen et al., 2019). Nesse sentido, a fragmentação ovariana altera a tensão intercelular, promovendo a conversão da actina globular em actina fibrosa e interrompendo os genes associados à via hippo, resultando na redução dos níveis de pYAP e no aumento da localização nuclear de YAP, estimulando fatores de crescimento e inibidores da apoptose, que promovem o crescimento folicular (Wada et al., 2011; Lee; Chang, 2019); sendo assim, modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*, destacam que o equilíbrio na atividade de YAP1 nas células da granulosa é essencial para a proliferação, diferenciação e sobrevivência dessas células, desempenhando um papel crucial no desenvolvimento folicular (Lv et al., 2019). Ao adentrar o núcleo, o fator nuclear YAP interage com o domínio associado aprimorado transcricional (TEAD), resultando no aumento da expressão de fatores transcricionais de fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) e repetição baculoviral IAP contendo (*BIRC*) *downstream*; esse processo, em última instância, estimula a proliferação das células da granulosa e da membrana, favorecendo o desenvolvimento folicular (Hsueh; Kawamura, 2020). O mecanismo da via Hippo está representado na Figura 4.

Figura 4. Mecanismo de ativação folicular a partir da via Hippo, relacionadas aos sinais

mecânicos no tecido ovariano.



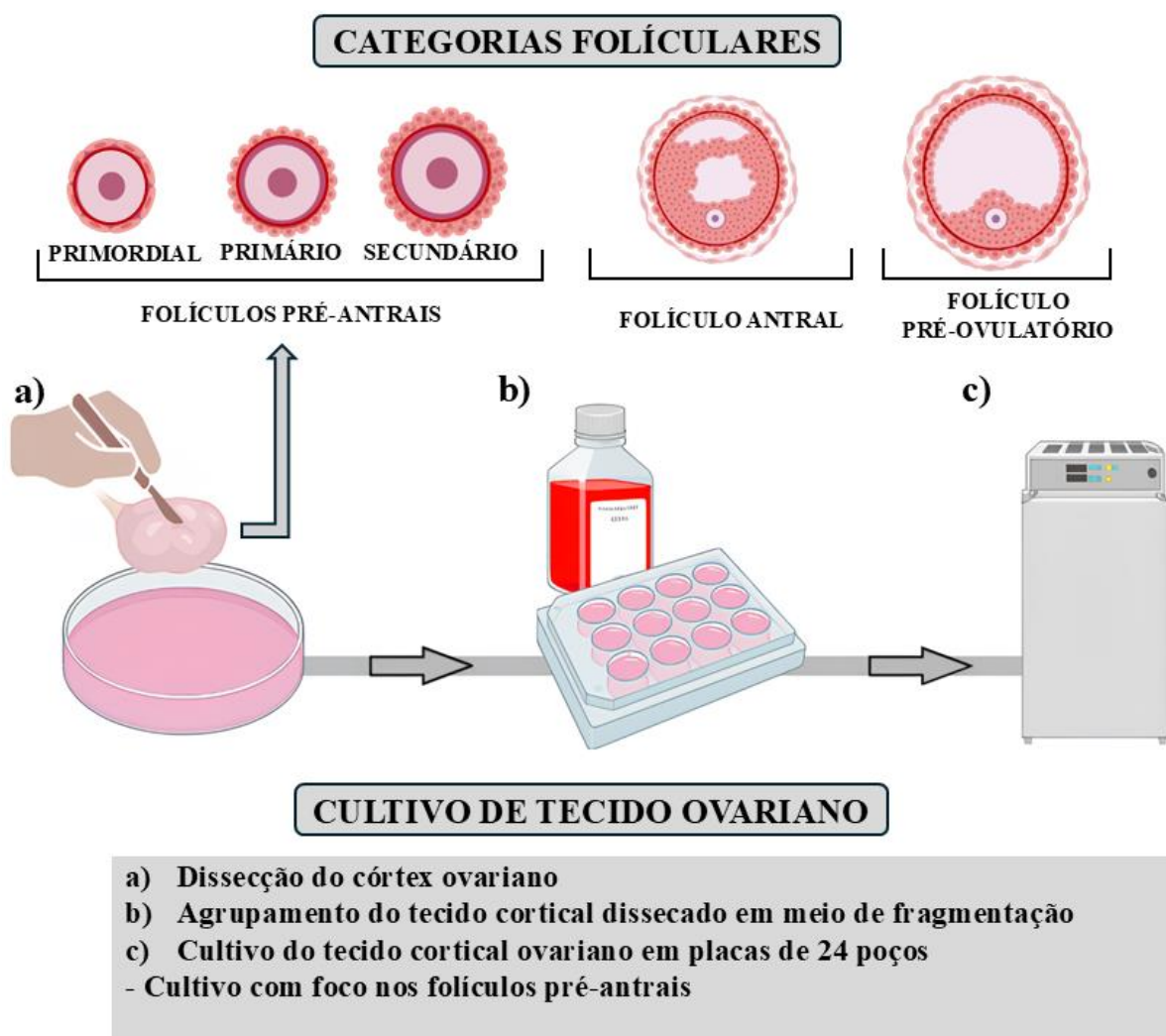
Fonte: Adaptado de Zhu et al., 2023

2.4 Sistemas de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos e suas aplicabilidades

Os folículos pré-antrais bovinos podem ser cultivados de duas formas bem difundidas: (1) folículos inclusos em tecido ovariano, denominado *in situ*, ou (2) isolados, cultivados em sistemas bidimensionais (2D) – onde são depositados sobre uma superfície plástica ou matriz extracelular (como colágeno ou matrigel) – ou tridimensionais (3D), nos quais ficam imersos em uma matriz extracelular (Araújo et al., 2014). A primeira permite preservar interações entre folículos e entre células do estroma e folículos, o que possibilita maior velocidade na ativação folicular, enquanto a segunda permite um monitoramento direto do crescimento folicular (Telfer et al., 2008; Ghezelayagh et al., 2022) (Figura 6). O cultivo de folículos isolados é empregado para estimular o crescimento de oócitos imaturos e compreender os mecanismos que regulam a foliculogênese, incluindo a diferenciação das células da granulosa e a influência de fatores autócrinos e parácrinos (Thomas; Walters; Telfer, 2003; Dey et al., 2024). No cultivo de tecido ovariano, os folículos são mantidos diretamente em contato com o ambiente circundante, células estromais, MEC, células tecaais e da granulosa, fatores que influenciam seu

desenvolvimento (Araújo et al., 2014). Para além da espécie bovina, esse sistema de cultivo é aplicado a outras espécies, como camundongos fêmeas (Sofia et al., 2021), caprinos (Sousa et al., 2021) e humanos (Hao et al., 2020) além de outras espécies. Em bovino os folículos inclusos em tecido ovariano podem sofrer ativação *in vitro* em até 2 dias e atingir o estágio secundário em até 6 dias de cultivo (Yang, Fortune, 2008; McLaughlin; Telfer, 2010). A (Figura 5) ilustra o processo de cultivo *in vitro* de tecido ovariano de forma simplificada.

Figura 5. Etapas do cultivo *in vitro* de tecido ovariano de folículos ovarianos.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Um dos fatores importantes do cultivo de folículos pré-antrais é o meio de base. Rossetto e colaboradores (2013), ao comparar os meios de cultivo α meio essencial mínimo (α -MEM), meio McCoy ou meio de cultivo tecidual (TCM199) durante o CIV de folículos pré-antrais

isolados bovinos, demonstraram que TCM199 foi o meio mais adequado para preservar a viabilidade folicular e a ultraestrutura, resultando nas maiores taxas de formação do antro, sendo o melhor candidato a suplementação nestas condições de cultivo. No entanto, neste mesmo estudo, os folículos cultivados em α -MEM ou TCM-199 mantiveram a integridade ultraestrutural, preservando a membrana citoplasmática e o núcleo do oócito, além de apresentarem mitocôndrias e retículo endoplasmático distribuídos de forma uniforme. Na literatura não há um meio padronizado para cultivo de folículos pré-antrais, mas se observa que os meios α -MEM, TCM-199 e McCoy são os mais utilizados (Saha et al., 2002; Araújo et al., 2012; McLaughlin et al., 2010; Rosseto et al., 2013). Apesar dessa variação nos protocolos, para o cultivo de folículos ovariano incluso em tecido ovariano bovino, o α -MEM se destaca como meio mais comumente utilizado (Barbato et al., 2023; Silva, R. et al., 2022; Cavalcante et al., 2019), ainda, os meios base podem ser suplementados com: piruvato, glutamina, hipoxantina, ácido ascórbico, insulina, transferrina e selênio (Figueiredo et al., 1994; Saha et al., 2000; Thomas et al., 2001).

Atualmente uma das formas mais eficientes de restaurar a fertilidade é através do transplante, mas essa opção não é viável para todos os pacientes, dessa forma, os bancos de tecidos ovarianos estão sendo oferecidos para preservação da fertilidade, contendo biópsias da superfície cortical com folículos primordiais (Lunardi et al., 2013; Chen et al., 2022). Nesse sentido, o desenvolvimento de sistemas de CIV para apoiar o crescimento dos folículos desde os estágios primordiais até a maturidade fortalece o potencial reprodutivo e contribui para a compreensão da foliculogênese (Figueiredo et al., 2019), além de possibilitar diversas aplicações terapêuticas, incluindo a produção de oócitos para tecnologias de reprodução assistida, a avaliação dos efeitos toxicológicos no desenvolvimento de células germinativas, a análise de tecido criopreservado antes do transplante, e o fornecimento de um modelo experimental para estudar o desenvolvimento de oócitos humanos (Telfer; McLaughlin, 2012). Aliado a isso, o cultivo de tecido, é um modelo essencial em várias áreas de pesquisa, abrangendo biologia celular, mecanismos do ciclo celular, funções especializadas celulares e interações entre células e matriz extracelular (Verma, A.; Verma, M.; Singh, 2020), sendo assim, tais aplicações destacam novas perspectivas para a produção em larga escala de embriões de animais com características genéticas desejáveis, favorecendo avanços na pecuária (Figueiredo; Lima, 2017). Desse modo, o CIV permite estudar especificamente tipos ou estágios de folículos, além da eficiência para avaliar alvos celulares específicos e realizar testes com substâncias químicas complexas; no entanto, os resultados podem não se traduzir diretamente em efeitos observados *in vivo*, e muitas vezes não é considerado o metabolismo das

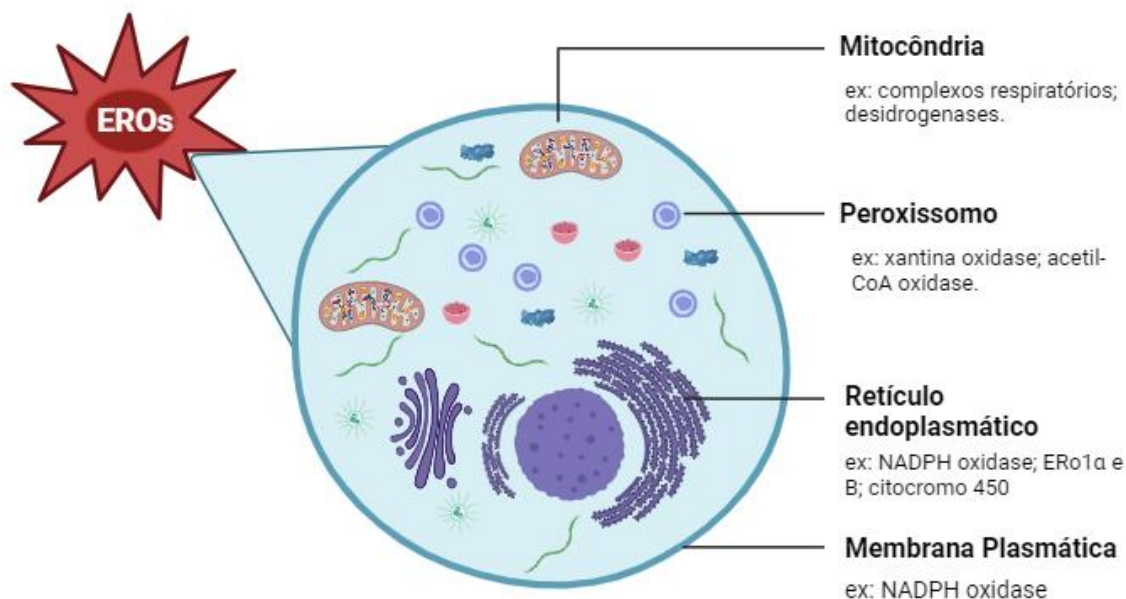
substâncias químicas (Stefansdottir et al., 2014). Ainda, apesar dos benefícios do CIV, o aumento das EROs ainda é um grande desafio, visto que prejudicam as condições foliculares e desenvolvimento embrionário, ao induzir apoptose nas células da granulosa e comprometer a viabilidade dos oócitos.

2.5 Estresse oxidativo no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos

Um dos grandes fatores que afetam os aspectos reprodutivos *in vivo* e *in vitro* é o estresse oxidativo (Halliwell; Gutteridge, 2015). Em circunstâncias fisiológicas, as EROs desempenham um papel crucial na regulação redox e na sinalização biológica de células e tecidos; no entanto, a produção descontrolada de EROs conduz ao estresse oxidativo, um desequilíbrio entre oxidantes e defesa antioxidantes, que acarreta a interrupção das sinalizações celulares e resulta em danos moleculares (Sies; Berndt; Jones, 2017), além de influenciar outras funções celulares, modificando proteínas por meio de oxidação, sendo que as proteínas sensíveis ao desbalanço de redução e oxidação incluem transportadores, receptores, moléculas sinalizadoras, fatores de transcrição, componentes do citoesqueleto e metaloproteases de matriz (Touyz et al., 2020). No estroma ovariano, um nível moderado de EROs pode estimular a proliferação das células teca-intersticiais, mas um nível alto de EROs leva à supressão dessas células, hiperplasia estromal e produção excessiva de andrógenos; além disso, inibe a proliferação e migração de fibroblastos, que são moduladores cruciais da reconstituição da MEC (Shen et al., 2023), ainda, podem desencadear apoptose celular e levar à disfunção folicular, afetar as células da granulosa (CGs) cultivadas *in vitro*, visto que são particularmente sensíveis à exposição a altos níveis de EROs (Vitale et al., 2023). Além disso, esses fatores comprometem a qualidade dos folículos ovarianos, causando danos ao DNA e RNA, mitocôndrias e outras organelas, além de provocar danos oxidativo aos lipídios no oócito (Luderer, 2014; Barrozo et al., 2021).

Sabe-se que as mitocôndrias e Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidases (NOXs) são fontes principais de EROs em células, através da cadeia de transporte de elétron e atividade de NOX, respectivamente, além de outras vias, como o metabolismo peroxissomal e citocromo P450, também contribuem para a formação de EROs durante o metabolismo oxidativo (Zhou; Shao; Spitz, 2014; Hernansanz-Agustín; Enríquez 2021). As mitocôndrias, contendo antioxidantes como glutathione peroxidase e catalase, que representam cerca de um terço do conteúdo celular, e devido a presença da SOD dependente de manganês exclusivamente nas mitocôndrias, destaca a organela como principal fonte de EROs, além de outras organelas importantes (Figura 6) (Zhang; Wong, 2021).

Figura 6. Representação das fontes de EROs nas diferentes organelas em células eucarióticas.

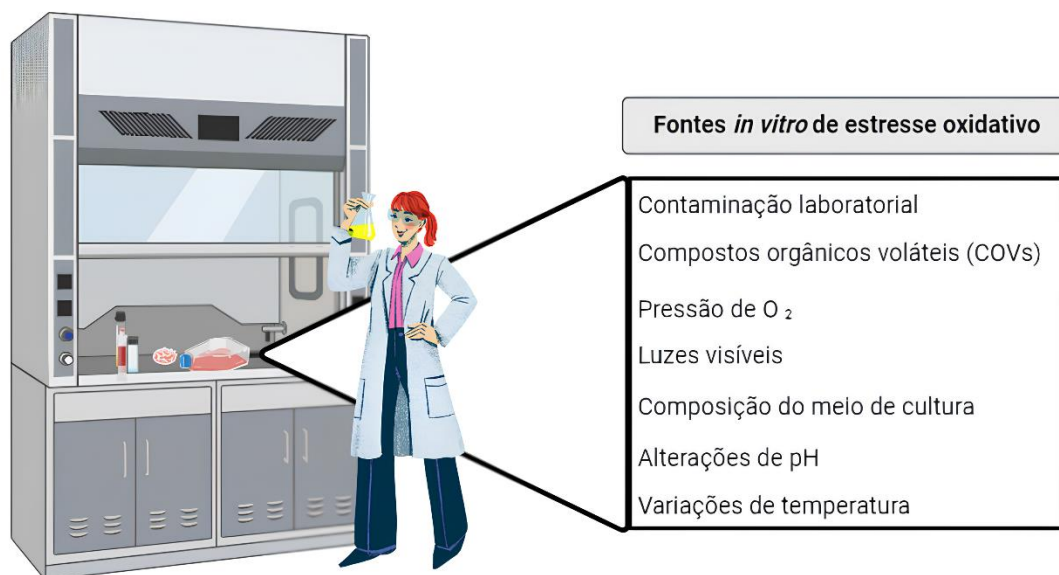


Fonte: Adaptado de Zhang; Wong (2021)

As EROs são capazes de reagir com ácidos nucleicos, lipídios, proteínas e carboidratos para obter elétrons, desencadeando reações que causam danos celulares, incluindo alterações mitocondriais, parada meiótica e morte celular (Khazaei; Aghaz, 2017). A geração aumentada de EROs em biotécnicas da reprodução resulta de fatores além das condições fisiológicas, incluindo níveis inadequados de oxigênio, considerando que o tecido opera fisiologicamente em concentrações de 4% a 10% de oxigênio (Jagannathan; Cuddapah; Costa, 2016), destacando que a otimização da tensão de oxigênio é vital para aprimorar a competência do embrião durante o CIV, promovendo funções antioxidantes, mitocondriais, glicólise embrionária, estimulando a angiogênese e efeito anti-apoptótico, contribuindo para uma melhoria na implantação (Ma; Chen, 2017). Além disso, as EROs advêm também da contaminação laboratorial, presença de compostos orgânicos voláteis (COVs), além de fatores como centrífugas, luz, temperatura, umidade, óleo mineral, aditivos em meios de cultura e criopreservação de gametas ou embriões (Agarwal et al., 2022), podendo causar significativa baixa na qualidade do oócito de humano e de outros animais durante técnicas de fertilização *in vitro*, resultante da exposição a fatores como pressão de oxigênio, luz visível, composição do meio de cultura, pH e variações de temperatura (Von_Mengden; Klamt; Smitz, 2020) (Figura 7). É essencial uma análise abrangente das variáveis que contribuem para a contaminação do ar no laboratório, além do controle rigoroso de material particulado e COVs, pois podem prejudicar a implantação e

concepção em ciclos de tecnologia de reprodução assistida (TRA) (Sciorio; Rapalini; Esteves, 2021).

Figura 7. Fatores laboratoriais precursores do estresse oxidativo de folículos ovarianos no cultivo *in vitro*.



Fonte: Elaborado pelo autor

Durante o CIV, foi observado que oócitos de folículos grandes têm mais EROs, possivelmente ligados ao aumento no crescimento, visto que o desenvolvimento oocitário envolve alterações estruturais, bioquímicas e demanda energia, sustentada pelo aumento mitocondrial, além dos fatores externos (Barros et al., 2019). Ainda, foi relatado que os níveis de EROs nos meios de cultivo não são os únicos fatores limitantes no sucesso em fertilização *in vitro*; mas que a idade e qualidade do embrião são os principais preditores da gravidez, visto que, os níveis de EROs não distinguem entre ciclos de concepção e não concepção (Lan et al., 2019). *In vivo*, as EROs possuem papéis cruciais na indução da ovulação, angiogênese folicular e manutenção do oócito para a fertilidade, mas seu excesso pode prejudicar a maturação e fertilização do oócito (Lu et al., 2018), além de causar ou acentuar doenças ovarianas, como: disfunção ovariana relacionada a idade, câncer de ovário, SOP e endometriose ovariana (Liang et al., 2023). A complexidade do papel regulador das EROs no desenvolvimento embrionário destaca a necessidade de análise detalhada para otimizar condições *in vitro*.

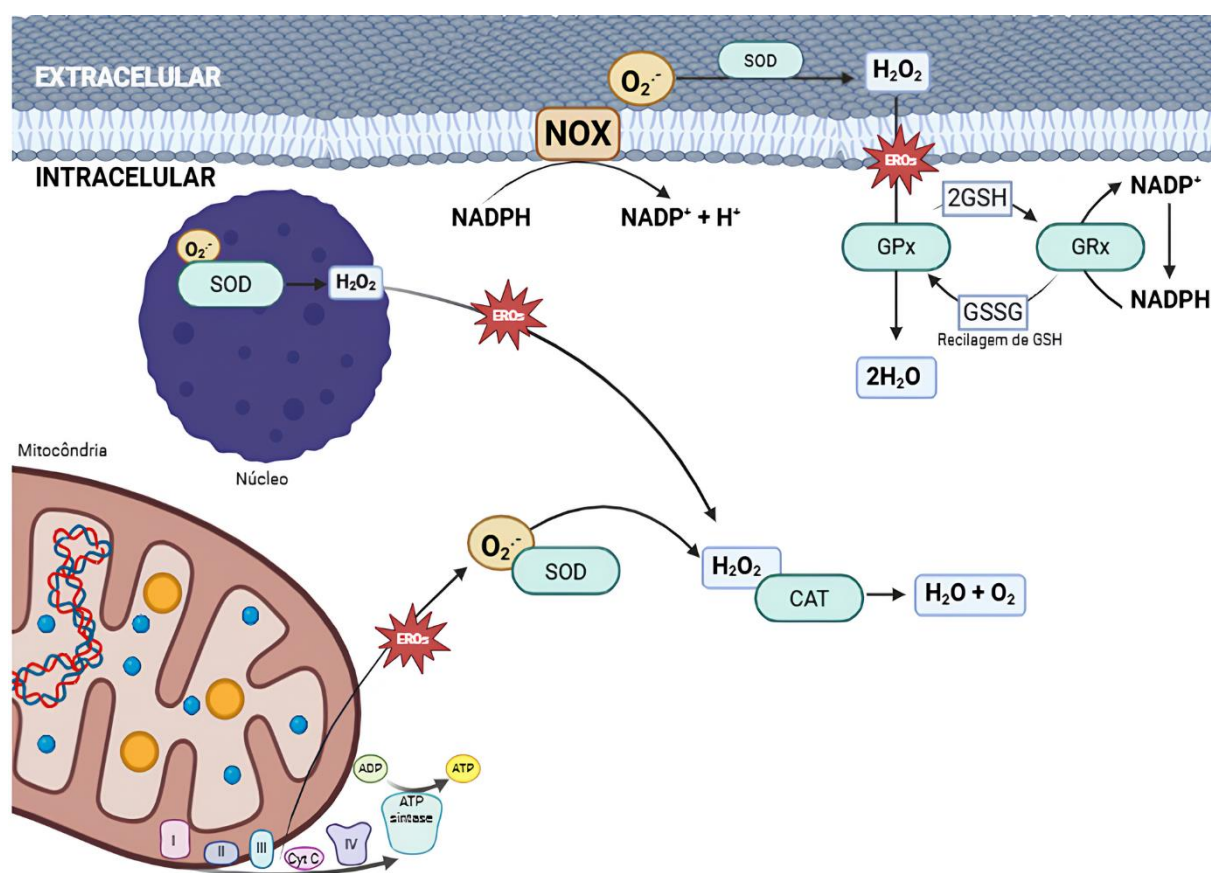
2.6 Defesa antioxidante

Tem-se reportado que as EROs apresentam moléculas altamente reativas produzidas a partir do oxigênio molecular, ocorrendo principalmente nas mitocôndrias durante o processo de transporte de elétrons na cadeia respiratória; dentre as quais três espécies principais se destacam: ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($HO^{\bullet}$), que são destacadas como radicais livres (Collin, 2019). Elas são geradas de várias maneiras, (1) incluindo diretamente por enzimas como número de oxidação (NOX) de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) oxidases, que convertem NADPH em $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , cujos componentes transmembrana são responsáveis pelo transporte dos elétrons, (2) como subprodutos do fluxo da cadeia de transporte de elétrons (FCTE) (Hardy; Day; Morris, 2021). Como observado, além do $O_2^{\bullet-}$ gerado tanto interna quanto externamente à célula, as oxidases de membrana que utilizam elétrons do NADPH podem gerar EROs, principalmente devido a cinco membros das Oxidases Dependentes de NADPH, (NOX) e duas Oxidases Relacionadas (DUOX), que convertem o oxigênio molecular em superóxido e peróxido de hidrogênio como produtos primários (Fujii; Homma; Osaki, 2022). Diante disso, dois sistemas de defesa são relatados: um sistema antioxidante composto por enzimas como Catalase (CAT), Superóxido Dismutase (SOD), Glutathione Peroxidase (GPX), e Glutathione Redutase (GR), além de mecanismos complementares não enzimáticos como: Glutathione (GSH), vitamina C, vitamina E, selênio, zinco, e outros elementos que defendem contra danos causados pelo estresse oxidativo e desequilíbrio REDOX (Wang et al., 2017).

Referente ao mecanismo antioxidante enzimático, a SOD é uma metaloenzima que representa a primeira linha de defesa contra EROs, e que necessita de um cofator metálico para sua atividade, existindo diferentes formas da enzima, dependendo do tipo de íon metálico requerido como cofator (Maurya; Namdeo, 2021), sendo quatro isoformas de SOD: SOD de Ferro (Fe-SOD), Cobre-Zinco-SOD (Cu, Zn-SOD), SOD de Níquel e Manganês (Mn-SOD) (Younus, 2018). Essa enzima é capaz de converter radicais livres do $^{\bullet}O_2^-$ em H_2O_2 e O_2 ; entretanto, níveis elevados de H_2O_2 podem ser prejudiciais quando excedem o valor de 100 nM, passando a provocar estresse oxidativo, o qual pode acarretar em lesão celular (Rosa et al., 2021); para atenuar os níveis elevados de H_2O_2 , entra em ação a enzima CAT, uma proteína tetramérica com quatro subunidades semelhantes, presente nos peroxissomos, que reduz o H_2O_2 a O_2 e H_2O , protegendo o genoma dos danos oxidativos e auxiliando no desenvolvimento ovariano (Elko et al., 2019). A GPx também é responsável por metabolizar o peróxido de hidrogênio em água e peróxidos lipídicos a álcoois, nas mitocôndrias e no citoplasma; no ser

humano há presença de pelo menos oito tipos distintos de (GPx), sendo a GPX-1 presente em quase todas as células e indispensáveis para o controle oxidativo (Ighodaro; Akinloye, 2018). A GR também é responsável por proteção contra as EROs, equilibrando o sistema REDOX dentro da célula, participando da proliferação celular durante o desenvolvimento do embrião; na espécie bovina a GR é relatada como marcador bioquímico de qualidade oocitária (Torres Osoroi et al., 2019). A representação simplificada das ações das enzimas antioxidantes nas células está ilustrada na (Figura 8).

Figura 8. Mecanismos gerais de ação das enzimas antioxidantes nos compartimentos celulares.



Fonte: Elaborado pelo autor

Diante dos danos ocasionados pelas EROs no CIV de células reprodutivas, diferentes agentes antioxidantes naturais com potencial antioxidante vêm sendo testados visando atenuar os efeitos das EROs (Cajas et al., 2020). Estudos exploram os efeitos benéficos de antioxidantes não enzimáticos, como Melatonina (Cavalcante et al., 2019), Resveratrol (Kong et al. 2019), Ácido ascórbico (Boldura et al., 2021), L-carnitina (Held-hoelker et al., 2021), N-acetilcisteína, cisteamina (Li; Zhao, 2019) dentre outras substâncias; esses compostos demonstram impactos

positivos nos folículos, oócitos e embriões, oferecendo perspectivas promissoras para mitigar seus efeitos adversos das EROs; além de Peptídeos Bioativos (BAPT) de origem animal, que melhoram o desenvolvimento de folículos pré-antrais de camundongos, *in vitro*, atenuando os danos celulares ocasionados por EROs e melhoram as distribuições mitocondriais (Liu et al., 2020). Estudos com óleo essencial de *Ocimum gratissimum* mostraram que os folículos cultivados preservaram morfologia, viabilidade e crescimento, apresentaram níveis elevados de RNA mensageiros para PRDX6 e CAT, sendo atribuído a capacidade de redução das EROs (Vasconcelos et al., 2022). Ainda, o óleo essencial de *Croton growioides* apresentou maior porcentagem de folículos, aumentou o número de células estromais, fibras de colágeno e níveis de tiol (Silva, F. et al., 2024). Sendo assim, a suplementação do meio de cultivo com antioxidantes pode reduzir os níveis de EROs, favorecer a expressão de genes antioxidantes, como *GSH*, *CAT* e *SOD*, além de oferecer benefícios à viabilidade dos folículos, ativação e desenvolvimentos dos folículos pré-antrais (Silva; Barberino; Matos, 2023).

2.7 Aspectos dos óleos essenciais extraído de plantas

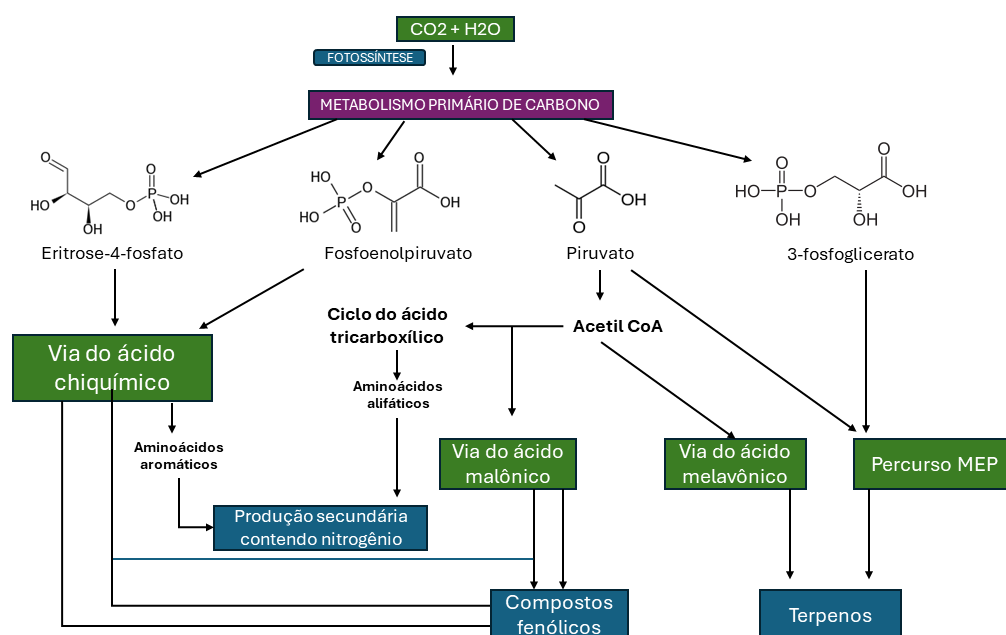
2.7.1 Óleos essenciais

Os Óleos essenciais (OE), derivados de materiais vegetais, são um conjunto de substâncias aromáticas presentes nas células ou glândulas especializadas de certas plantas, caracterizadas por sua pureza química e volatilidade em condições normais, e são nomeados em homenagem à planta de origem (Rios, 2016). De acordo com o Centro de Comércio Internacional (CCI) (2023), o Brasil é um importante exportador de destilados aquosos aromáticos, soluções aquosas de óleos essenciais e oleorresinas, destacando-se como fornecedor para os Estados Unidos e Alemanha; além disso, é o segundo maior fornecedor de uma variedade de produtos, incluindo óleos essenciais; sendo os principais OEs exportados: Laranja, Limão siciliano, *Mentha arvensis*, *Mentha viridis*, Cedro, Eucalipto, Lavanda e outros OEs (Bizzo; Rezende, 2022).

Os OEs apresentam propriedades terapêuticas; e desempenham um papel crucial em setores como farmacêutico, alimentício, oferecendo uma alternativa segura e ecologicamente sustentável (Diass et al., 2021). Devido a suas diversas atividades biológicas como antioxidante, anti-inflamatória e alelopática, podem ser reconhecidos e valorizados em setores como saúde humana, química verde e agricultura sustentável (Dhifi et al., 2016; Spisni; 2020). A biossíntese dessas substâncias odoríferas nas plantas, ocorre nas folhas, migrando para flores durante a

floração e, após a fecundação, acumulando-se em frutos, sementes, folhas, cascas e raízes, e com o amadurecer, a composição dos OE variam nos vegetais (Butnariu; Sarac, 2018). Os componentes voláteis nas plantas apresentam funções fundamentais, como: alelopatia, adaptação a estresses abióticos, sinalização intra-planta, sinalização entre plantas, defesa direta contra herbívoros e patógenos e defesa indireta, com ajuda de seus metabólitos secundários (Sharifi-Rad et al., 2017). Diante disso, a biossíntese desses metabólitos secundários de plantas (PSMs) é complexo, envolvendo vias específicas e enzimas relacionadas, precursores como aminoácidos, ácidos graxos e açúcares são fundamentais; sendo derivados do ciclo do ácido tricarboxílico e vias do chiquimato (Divekar et al., 2022). Plantas com metabólitos secundários, são valiosas para a medicina, mas enfrentam desafios na síntese industrial devido à complexidade de suas vias metabólicas, estruturas intrincadas e quiralidade (Figura 9) (Twaij; Hasan, 2022).

Figura 9. Vias fundamentais na biossíntese de metabólitos secundários em vegetais.



Fonte: Waij; Hasan, (2022)

Os fatores bióticos e abióticos são capazes de exercer influência diante da quantidade e qualidade dos componentes químicos liberados por diversas estruturas secretoras, como glândulas e tricomas (Butnariu; Sarac, 2018), condições ambientais, como temperatura, luz e nutrientes, têm um impacto significativo na produção de OEs; fatores sazonais, seca, qualidade da luz e densidades de plantio afetam a taxa de emissão, a composição química dos óleos e o

crescimento das plantas (Rehman et al., 2016; Laftouhi et al., 2023). Sendo assim, aumentos na biossíntese de OE podem ocorrer tanto por regulação positiva, ativando a capacidade biossintética, quanto por mudanças passivas, como o estado super-reduzido e o fechamento estomático induzido por estresse (Yahyazadeh et al., 2023). Nesse sentido, Wang et al., (2018) observaram perfis terpenoides de diferentes tecidos e estágios de desenvolvimento de *Amomum villosum*, revelando 24 terpenos, sendo 15 monoterpenos e 9 sesquiterpenos, evidenciando especificidade tecidual, sugerindo associação entre produção de princípios ativos e características do tecido e estágio de desenvolvimento.

2.7.2 Classificação e aspectos químicos dos óleos essenciais (OEs)

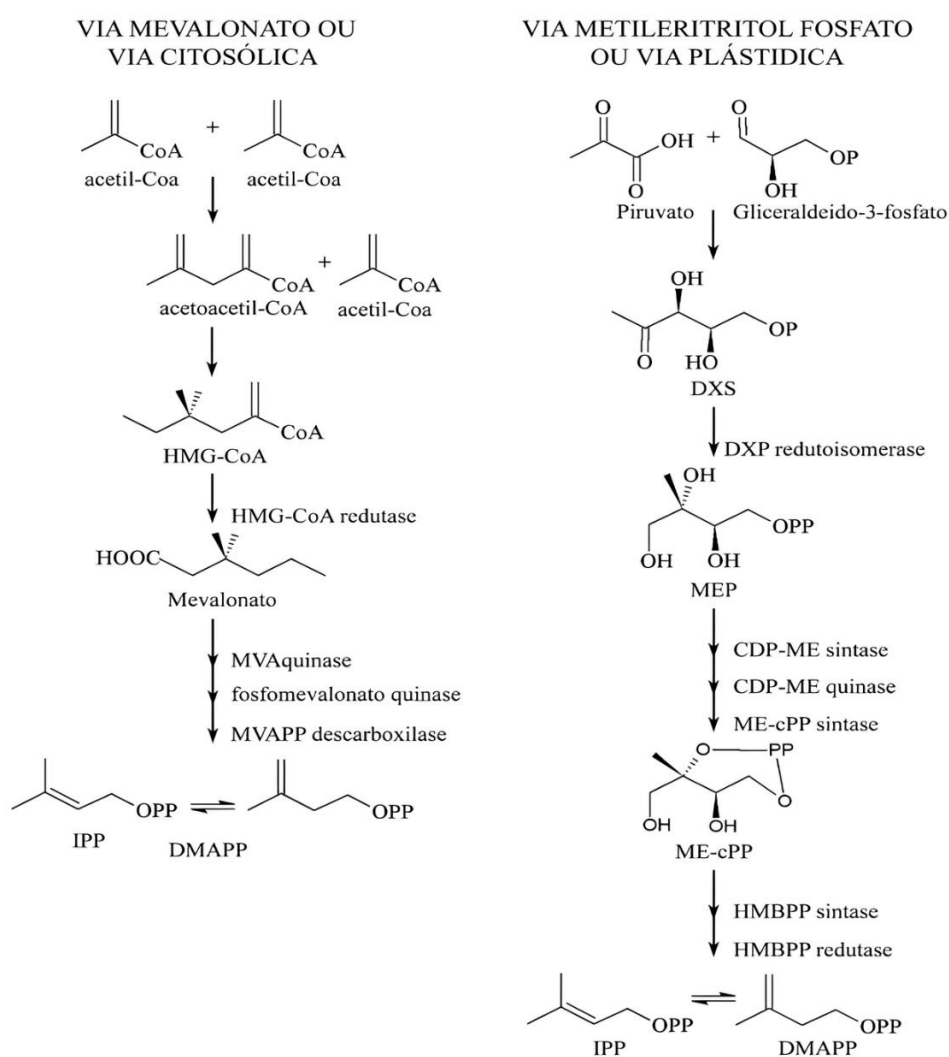
Os OEs podem ser classificados por composição química (hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos etc.), métodos de extração (destilação a vapor, prensagem a frio, extração por solventes) e aroma em categorias como (Citrus, Herbáceos, Medicinais/Cânfora, Florais, Resinosos, Amadeirados, Terrosos, Mentolados e Picantes) (Herman et al., 2019). Além de tais métodos de extração citados, a extração de óleos essenciais é otimizada por métodos inovadores, como fluido supercrítico, micro-ondas e ultrassom, que eficientemente reduzem o tempo e melhoram rendimento e qualidade (Stratakos; Koidis, 2016).

Os óleos essenciais são compostos predominantemente lipofílicos e voláteis, com baixa solubilidade em água, características que influenciam suas propriedades e atividades biológicas. Sua composição deriva de diferentes vias metabólicas que agem sobre a síntese de compostos secundários, sendo classificados em terpenoides (predominantes), formados pela união de duas (monoterpenos), três (sesquiterpenos) ou quatro (diterpenos) unidades de isopreno, com destaque para mono e sesquiterpenos, e não terpenoides, principalmente fenilpropanoides; no entanto, ambas as famílias incluem compostos fenólicos, frequentemente identificados como constituintes primários de diversos OEs (Nieto; 2017; Verdeguer; Sanchez-Moreiras; Aranit, 2022; De Sousa et al., 2023). Os não terpênicos, como eugenol, cinamaldeído e safrol, esses componentes têm diferentes precursores metabólicos e são biossintetizados por meio das vias do mevalonato e do chiquimato (Benomari et al., 2018). Embora os OEs apresentem grandes quantidades de fenilpropanoides, terpenos e terpenoides, eles apresentam grande diversidade química e estrutural, fator que confere uma ampla gama de propriedades terapêuticas (Aumeeruddy-Elalfi et al., 2017).

Os compostos secundários são sintetizados, incluindo terpenos, fenóis e alcaloides, por meio das vias metabólicas do ácido mevalônico (MVA) e do 2-C-metileritritol 4-fosfato (MEP),

operando no citosol e no plastídio, respectivamente (Chatzivasileiou et al., 2019; Khare et al., 2020). Ademais, produtos da glicólise, como piruvato e gliceraldeído-3-fosfato, convertem-se em isopentenil pirofosfato (IPP) e dimetilalil pirofosfato (DMAPP) atuando como precursores universais para terpenóides, em que a produção de IPP ocorre por meio de duas vias: a via do mevalonato (MVA) e a via independente de mevalonato (Figura 10) (Dewick, 2009; Said-Al et al., 2017; Gomes; Rodrigues, L.; Rodrigues, J. 2022).

Figura 10. Biossíntese de isoprenos.



Fonte: Dewick (2009)

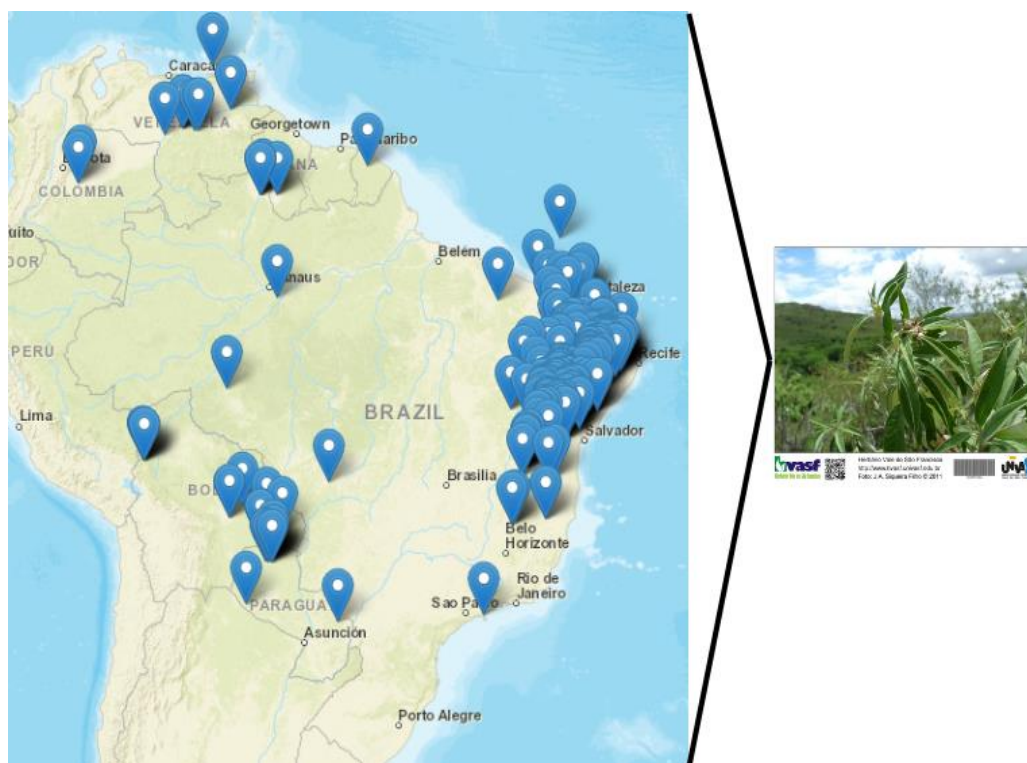
Mesmo com amplos relatos dos benefícios dos OEs, os relatos sobre seus benefícios à saúde têm limitações, como a falta de relato de efeitos adversos, doses variáveis e escassez de ensaios clínicos; visto que a identificação e validação de metabólitos bioativos são cruciais para entender a eficácia e segurança dos OEs (Osaili et al., 2023). Além disso, em fitoquímicos

existem duas interações principais em misturas de compostos: aditividade, onde os efeitos são previsíveis com base nas propriedades individuais e sinergia, onde a combinação potencializa significativamente os efeitos, sendo complexo e não limitado a alguns constituintes principais em óleos essenciais (Bunse et al., 2022). Além disso, existe as ações antagônicas, esse fenômeno ocorre quando substâncias são administradas e promovem efeitos, contrários quando comparados ao esperado em compostos individuais (Połec et al., 2022).

2.7.3 Croton argyrophyllus Kunth: distribuição e bioatividades do óleo essencial extraído do vegetal

O gênero botânico *Croton* é pertencente à família Euphorbiaceae, no Brasil, esse gênero apresenta mais de 316 espécies (Cordeiro et al., 2014; De Sousa et al., 2020), que são endêmicas do nordeste brasileiro, encontradas no domínio caatinga, e possuem ampla utilidade medicinal pela população Africana e na América do Sul (Brito et al., 2018). O gênero *Croton* exibe diversas propriedades importantes, como ação antioxidante, efeitos antiparasitários em animais, alelopático, gastroprotetor, anti-inflamatório, anticonceptivo, modulador de resistência a antibióticos, além de outros benefícios (Cavalcante; Da Silveiras; Da silva, 2020). Os constituintes químicos do gênero são os responsáveis por tais propriedades, sendo constituídos por componentes não voláteis, como: dipertenos, sesquiterpenóides, triterpenóides, flavonóides e alcalóides, dentre outros, além dos constituintes voláteis, principalmente monoterpenos, sesquiterpenos (Moremi et al., 2021). A ação antioxidante dos OEs se dar em função dos metabólitos secundários e fenólicos com ligações duplas conjugadas os principais responsáveis por essa propriedade (Djilani; Dicko, 2012). Devido à composição complexa e variável dos OEs, suas atividades biológicas envolvem múltiplos mecanismos celulares e não por mecanismos únicos (Djilani; Dicko, 2012). Dentre as várias espécies, o *Croton argyrophyllus* Kunth espécie vegetal endêmica do Nordeste do Brasil, já foram obtidos mais de 318 registros dessa espécie (Figura 11) (*Specieslink*, 2025).

Figura 11. Distribuição da espécie *Croton Argyrophyllus* Kunth no continente Sul-americano.



Fonte: Adaptada de *speciesLink* (2023)

Entre as espécies do gênero *Croton*, o OECA tem se destacado por suas diversas propriedades, incluindo atividades anti-inflamatória, antinociceptiva e antioxidante, atuando tanto em nível plasmático quanto muscular. O OECA demonstrou atividade antinociceptiva em camundongos, atuando tanto central como periféricamente, com a possibilidade de envolver vias opióides como mecanismo de ação (Ramos, J. et al., 2017). Ademais, estudos em roedores evidenciaram atividade anti-inflamatória, inibindo a movimentação de células leucocitárias, essa ação foi atribuída à capacidade antioxidante do composto, sugerindo seu potencial como candidato promissor para o tratamento de condições inflamatórias (Ramos et al., 2013b). A espécie também demonstrou atividade antioxidante, avaliada pelos métodos de Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) e 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), essa atividade antioxidante foi atribuída à presença de constituintes como fenólicos e flavonoides, além do acetato de etila, que apresentou importante atividade antioxidante (Costa et al., 2017); aliado a isso, em ratos submetidos a exercícios de alta intensidade, o extrato da casca de *Croton argyrophyllus* Kunth foi capaz de agir sobre danos musculares e estresse oxidativos (EO), ao reduzir biomarcadores relacionados ao EO a níveis plasmático e muscular, atividade essa, atribuída aos seus constituintes fenólicos (Araújo et al., 2019). Souto et al. (2020) reportaram que nanopartículas lipídicas com óleo essencial de *Croton* preservaram a atividade antioxidante, diminuindo os

efeitos citotóxicos em neuroblastoma *in vitro*, sugerindo uma promissora abordagem para desenvolver alimentos funcionais com propriedades protetoras contra doenças neurodegenerativas e crônicas ligadas ao estresse oxidativo. Diante de tais propriedades apresentadas, a (Figura 12) apresenta os principais constituintes encontrados nos óleos e extratos de *Croton argyrophyllus* Kunth.

Figura 12. Principais constituintes químicos do óleo essencial de *Croton argyrophyllus* Kunth.



Croton Argrophyllus Kunth

Monoterpenos Hidrocarbonetos	Monoterpenos Oxigenados	Sesquiterpenos Hidrocarbonetos	Sesquiterpenos Oxigenados	
α-Pineno	Alloaromadendreno	β-Selineno	β-bourboneno	Espatuleno
Canfeno	Bunesol	Germacreno-A	Elemeno	Elemol
Sabineno	Naftaleno	8-Cadineno	Gurjuneno	Guaiol
β-Pineno	α-terpineol	Biciclogermacreno	B-gurjuneno	γ-eudesmol
α-Mirceno	Linalol	(E)-cariofileno	Aromadendreno	Óxido de cariofileno
3-careno	Terpinen-4-ol	Germacreno D	Óxido de cariofileno	Ledol
α-terpineno	α-tujona	Germacreno B	α-copaeno	Cadinol
p-cimeno	Cánfora	Humuleno	β-elemenno	α-Cadinol
β-felandreno	Borneol	γ-muroleno	Aromadendreno	
(Z)-β-ocimeno	Terpinen-4-ol	Germacreno D	α-humuleno	
γ-terpineno	p-menta-2-en-1-ol	Selineno	Selineno	
(E)-sabineno	Isopinocampheol	Viridiflorene	Viridiflorene	
α-terpinoleno	γ-terpineol	α-muroleno		
Triciclona	Acetato de α-terpinila	α-bulneseno		
	β-acetato de terpinilo	β-bisaboleno		
		γ-cadineno		
		8-cadineno		
		α-calacoreno		
		α-copaeno		
		Cariofileno		

Fonte: (Araújo et al., 2014; Cruz et al., 2017; Brito et al., 2018; Da Cruz et al., 2020; Vasconcelos et al., 2022)

3 JUSTIFICATIVA

Os folículos ovarianos pré-antrais (FOPA) representam 90-95% da população folicular e armazenam a maioria dos oócitos nos ovários de mamíferos. Incluem os folículos primordiais, intermediários, primários e secundários. Apesar da grande quantidade de oócitos nesses folículos, 99,9% são eliminados por atresia folicular antes da ovulação (Figueiredo 2007). Nesse contexto, a biotécnica de MOIFOPA emerge como uma ferramenta fundamental, permitindo a recuperação e o CIV de folículos pré-antrais presentes no ovário. Ao reduzir as perdas foliculares por atresia, a MOIFOPA não apenas pode aumentar a disponibilidade de oócitos viáveis, mas também contribui para o avanço do conhecimento sobre a fisiologia reprodutiva, particularmente no que diz respeito à dinâmica do desenvolvimento dos folículos pré-antrais *in vitro*. Além disso, a obtenção de oócitos bovinos competentes para fertilização *in vitro* continua sendo um desafio, reflexo da compreensão ainda limitada dos mecanismos reguladores da foliculogênese, um fator essencial para a otimização das taxas reprodutivas na espécie (Figueiredo 2007; Araújo et al., 2014; Costa; Fair; Seneda, 2023). Embora o CIV de folículos ovarianos tenha demonstrado sucesso em camundongos fêmeas, na obtenção de nascidos vivos (Eppig & O'Brien, 1996; O'Brien, Pendola & Eppig, 2003), a transposição desses resultados para humanos e outras espécies de grande porte ainda enfrenta desafios consideráveis.

Um dos grandes entraves relacionados ao protocolo de CIV de folículos ovarianos se remete ao fato de que as condições de cultivo contribuem para o desbalanço nas EROs que pode culminar em estresse oxidativo e diminuir a proteção antioxidante das células (Agarwal et al., 2017; Halliwell; Gutteridge, 2015). Esses efeitos influenciam negativamente a fisiologia folicular, podendo ocasionar a morte dos folículos, diminuindo a qualidade de gametas cultivados *in vitro* (Barrozo et al., 2021). Assim, é essencial aprimorar o protocolo de sistema de CIV, que sustentem o desenvolvimento folicular e preservem as interações celulares necessárias para o desenvolvimento prolongado dos folículos. Por esta razão, diversas substâncias com ação antioxidante têm sido utilizadas em associação aos meios de cultivo com a finalidade de evitar a formação de EROs; entre essas substâncias, os antioxidantes naturais extraídos de plantas têm sido evidenciados (Silva, B.; Silva, J., 2023). Estas substâncias apresentam baixo valor comercial, o processo de caracterização das substâncias é viável de execução, sendo passível de gerar produtos comerciais, uma vez que validado suas propriedades bioativas.

A utilização de produtos naturais com atividade antioxidante, como óleos essenciais, pode contribuir com desenvolvimento folicular, atenuando os danos celulares ocasionados pelo estresse oxidativo. Nesse contexto, o uso do OECA pode ser uma estratégia importante, já que estudos reportaram suas propriedades antioxidantes, atribuída à presença de fenólicos em sua constituição (Costa et al., 2017). Estudo de citotoxicidade com 12,5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL e 200 µg/mL de OECA em neuroblastoma e células J774 (macrófagos), não indicaram danos celulares, sugerindo ação segura no uso. Células HEK (embrionárias renais) mostraram crescimento em concentrações menores (12,5 µg/mL e 25 µg/mL OECA), sem diferenças notáveis em dosagens maiores, sugerindo viabilidade celular (Paixão, 2018). Desse modo, visto que o potencial antioxidante do OECA é crucial investigar sua ação antioxidante no cultivo de folículos pré-antrais bovinos *in vitro*. A ação sinérgica do óleo essencial (Bunse et al., 2022), pode auxiliar na mitigação dos danos causados pelo estresse oxidativo durante o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais. Assim, com o progresso do protocolo de cultivo de tecido ovariano, os folículos poderão ser utilizados futuramente para maturação oocitária, e com o avanço das biotecnologias, é possível alcançar a subsequente fertilização *in vitro*.

4 HIPÓTESE

A adição do óleo essencial de *Croton argyrophyllus* Kunth ao meio de cultivo *in vitro* de tecido ovariano bovino promove ativação e desenvolvimento folicular mantendo a morfologia celular adequada, preservando a integridade da matriz extracelular, a densidade estromal, reduzindo a produção de espécies reativas de oxigênio.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da adição do óleo essencial de *Croton argyrophyllus* Kunth durante o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano de bovino.

5.2 Objetivos específicos

- Quantificar a capacidade antioxidante do óleo essencial do *Croton argyrophyllus* Kunth por varredura dos radicais ABTS e DPPH.
- Avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações (0,01, 0,1, 1, 10 e 100 µg/mL) do óleo essencial do *Croton argyrophyllus* Kunth no cultivo *in vitro* de tecido ovariano bovino sobre a morfologia folicular, ativação e desenvolvimento folicular, densidade celular do estroma e integridade da matriz extracelular.

6 CAPÍTULO 1

Characteristics of collagen in ovarian extracellular matrix and its relationship with the development of primordial follicles up to ovulation

Emanoel da Silva Félix¹ José Roberto Viana Silva²

Federal University of Ceará Postgraduate Program in Biotechnology -PPGB

***Corresponding author:** jrvsilva@ufc.br

Characteristics of collagen in ovarian extracellular matrix and its relationship with the development of primordial follicles up to ovulation

Emanoel da S. Félix¹, José R.V. Silva^{1*}

Affiliation

^aLaboratory of Biotechnology and Physiology of Reproduction (LABIREP), Federal University of Ceará, Sobral, CE, Brazil.

Correspondence

Prof. José Roberto Viana Silva

Laboratory of Biotechnology and Physiology of Reproduction

Federal University of Ceara

Av. Maurocélvio Rocha Ponte, 100

62041-040 Sobral (CE)

Brazil

Phone: +55 88 3611 8000

Fax: +55 88 3611 8000

jrvsilva@ufc.br

Abstract

The extracellular matrix (ECM) is a dynamic network of proteins and biomolecules that performs essential structural and signaling functions in mammalian ovarian physiology. In addition to modulating processes such as cell adhesion, migration, and differentiation, the ECM is actively involved in regulating tissue stiffness, a physical property directly involved in follicle activation and development. Among its components, collagen fibrils stand out as determinants in maintaining ovarian architecture and remodeling the follicular microenvironment throughout folliculogenesis. Evidence from in vivo and in vitro models shows that changes in the composition, organization, and distribution of collagen fibrils, particularly types I, III, IV, and VI, influence the transition from primordial follicles to growth stages and are involved in the

intense remodeling that occurs during ovulation and reproductive senescence. In this review, we discuss the central role of collagen fibrils in regulating ovarian cortex stiffness and its relationship to follicular growth, highlighting cellular and molecular mechanisms associated with ECM remodeling in different species and physiological contexts.

1. Introduction

The extracellular matrix (ECM) is a molecular assembly that forms a dynamic three-dimensional system essential for structural support of tissues and for cell communication and signaling. In the ovary, the ECM plays a critical role in responding to biomechanical stimuli, such as tissue stress, and modulates the extracellular environment in a way that favors follicular development (Shah et al., 2018, Hu; Ling; Ren, 2022). As they are mechanically responsive, the developmental category in which follicles are found is influenced by a tissue gradient with different stiffness and the mechanical signals triggered by ECM remodeling (Shah et al., 2018). In this sense, the ECM is remodeled by different parameters related to its biophysical properties, such as pore size, fiber thickness, fiber orientation, binder density, stiffness and viscoelasticity (Elosegui-Artola, 2021). In addition, the relationship between biomolecules and their structural and metabolic specificities is fundamental in determining their behavior, and the physical and biochemical properties of the ECM determine the type of function the connective tissue will perform, which is determined by the protein composition present (McKee et al., 2019), consisting mainly of proteoglycans (PGs) and fibrous proteins (collagens, elastins, fibronectins and laminins), as well as hyaluronan, which shape the tissue microenvironment and provide a suitable environment for follicular growth and development (Frantz, 2010; Sun et al., 2022).

It has been reported that the stiffness of the ovarian cortex is greater than that of the medulla, and this property is attributed to the need to preserve primordial follicles due to the compaction that limits follicular maturation and growth, an inherent characteristic of ovarian

tissue mechanics (Sun et al., 2022). Studies highlight the hypothesis that the physical environment of the ovary may play a role in follicular activation, initiating the process of a single primordial follicle emerging from dormancy and triggering subsequent oocyte growth, follicular development and final oocyte maturation (Woodruff; Shea, 2011). In this sense, the ECM is known to perform vital functions in ovarian follicles, including the regulation of proliferation, growth and development, playing a crucial role in ovarian dynamics (Franchi et al., 2020). To reach full growth and maturity, primordial follicles rely on a specialized environment that supports follicular activation, and type I collagen, a fundamental component of the tissue ECM, contributes significantly to this process (Paradiso et al., 2019). In addition to collagen, fibronectins have also been observed to be associated with primordial follicle development (Heeren et al., 2015). And laminin as a supporter of ovarian activity, acting on premature ovarian failure (Prunskaitė et al., 2014).

This review aims to discuss the central role of collagen fibers in the regulation of ovarian cortex stiffness and their influence on follicular growth, by summarizing evidences that highlights the cellular and molecular mechanisms involved in ECM remodeling in different species and physiological contexts.

2. Ovary and extracellular matrix

The mammalian ovary contains follicles at different stages of development, immersed in connective tissue rich in ECM (Shah et al., 2018; Zhang et al., 2024). These are classified according to Figueiredo et al. (2017) as: primordial follicles, characterized by a single layer of sidewalk granulosa cells; primary follicles, with cubic granulosa cells organized in a single layer; and secondary follicles, which have two or more layers of granulosa cells and initiate the formation of theca, later dividing into internal and external theca. Antral follicles are

characterized by the presence of small fluid-filled cavities that coalesce to form a single central cavity called the follicular antrum (Figure 1).

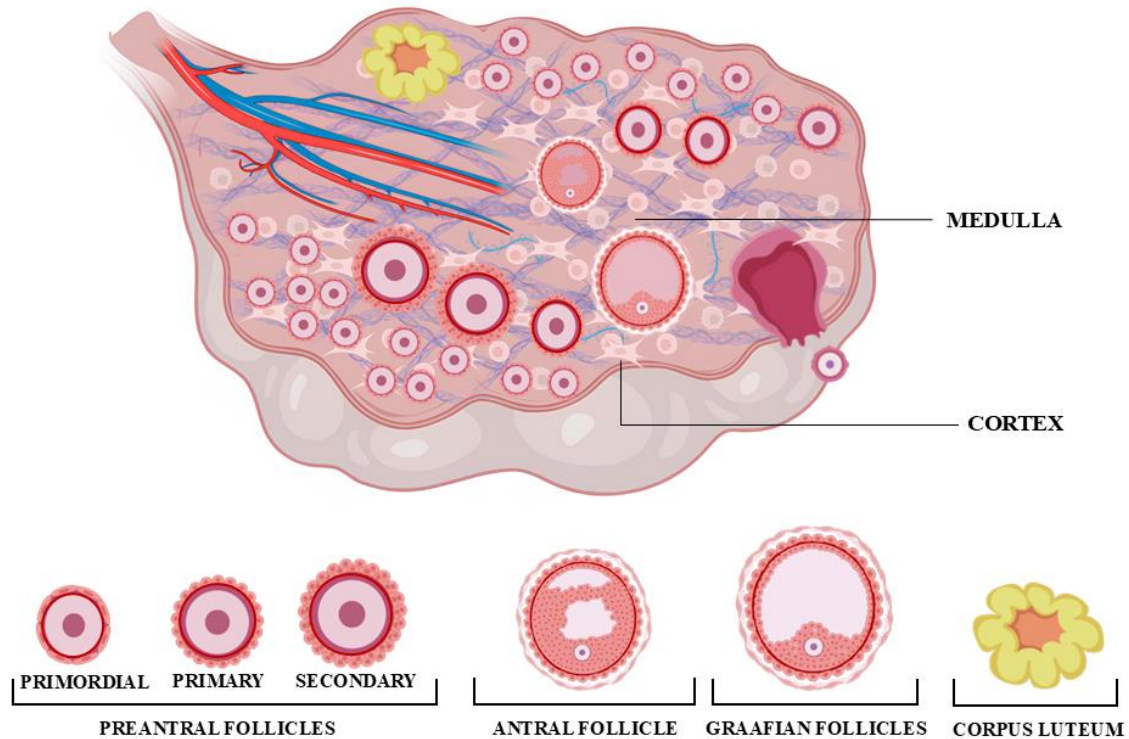


Figure 1. Representation of the mammalian ovary showing the cortical and medullary regions and follicles at different stages of development surrounded by extracellular matrix.

Ovarian tissue is known to have an ECM that is essential for several biological processes, and its role in follicular development stands out. The ECM of a tissue is a highly dynamic three-dimensional network composed of collagens, proteoglycans (PGs), glycosaminoglycans (GAGs), elastin, laminins, fibronectin and other protein and glycoprotein components (Schwarzbauer, DeSimone; 2011; Halper; Kjaer, 2014; Kozel, Mecham; 2019; Revell et al, 2021; Mienaltowski et al, 2021; Ozsvar et al, 2021). The ECM dynamically interacts with cells through receptors and the action of extracellular vesicles, regulating signalling, cytoskeletal and cellular functions. Its continuous remodeling affects processes such as autophagy and angiogenesis, thereby influencing tissue homeostasis (Manou et al, 2019; Rilla et al; 2019). The

ECM can be altered by the action of matrix metalloproteinases (MMPs), zinc-dependent enzymes that degrade ECM components such as collagens, laminin and fibronectin, and affect cell migration by disrupting matrix and basement membrane barriers (Hrabec et al., 2007). This proteolysis is regulated by tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMPs), which inhibit MMPs, cellular disintegrins and metalloproteinases (ADAMs), and disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTSs). Although high levels of TIMPs generally lead to ECM accumulation, their loss can also cause this accumulation, depending on the tissue type and local environment, and their action varies depending on the specific metalloproteinases regulated (Arpino, Brock, Gill; 2015). A schematic representation of these processes is shown in Figure 2.

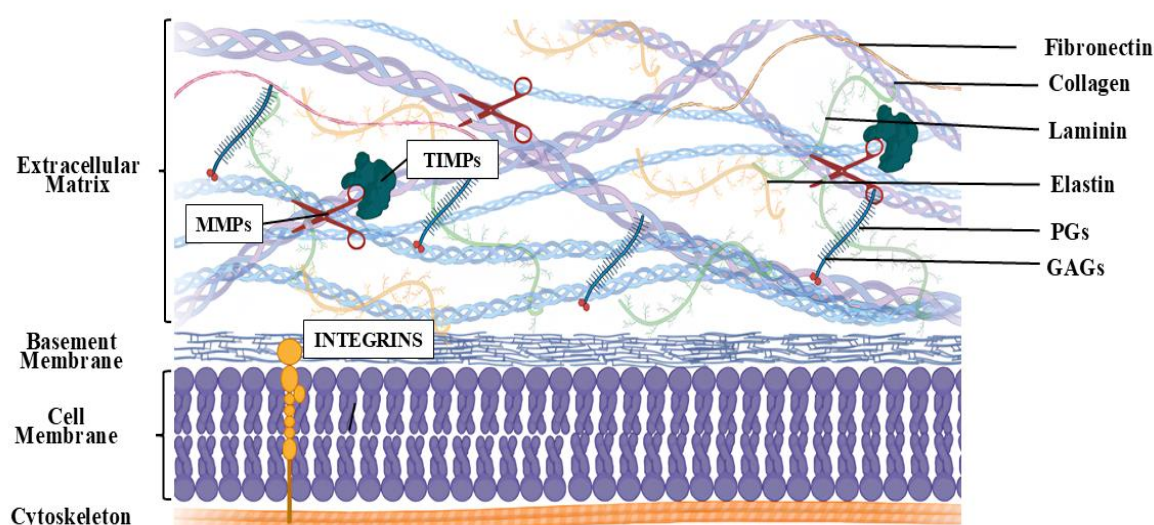


Figure 2. Schematic representation of the extracellular matrix (ECM) and its interaction with the cell

3. Collagen remodeling in the ovary: from follicular dormancy to ovulation

Collagens are a group of proteins containing one or more triple-helix domains formed by polypeptide chains and are essential components of the ECM of most mammalian tissues.

They are represented by 28 known types of collagens, each with different tissue properties and functions (Necula et al., 2022). They can be classified according to their structure, function and tissue distribution as follows: Fibril-forming collagens: (I, II, III V, XI, XXIV and XXVII), Collagens associated with interrupted triple helix fibrils (FACITs): (IX; XII; XIV; XVI; XIX; XX; XXI and XXII); network-forming collagens: (IV; VIII and X); transmembrane collagens (IV); multiplexins: (XV and XVIII); anchor fibres (VII) and collagens forming crimped filaments (VI) (Arseni; Lombardi; Orioli, 2018; Drain; Weaver, 2020).

In the mammalian ovary, the distribution of collagen has been studied to understand its dynamics during follicular development. In the *in vivo* environment of the bovine ovary, the cortical regions containing the primordial follicles are essentially avascular, rich in collagen fibrils and with low oxygen concentrations, together with the primary follicles present in the same hypoxic environment, while the other follicular categories are generally found in the vascularized medulla, where O₂ tension is higher, characteristics shared with other mammalian species (van Wezel; Rodgers, 1996; Makanji et al., 2014). Thus, high rates of oxygen consumption have been observed during follicular activation and the subsequent transition from primary to secondary follicles; in contrast, hypoxia has been identified as a key factor in the induction and maintenance of primordial follicle dormancy, mediated in part by the expression of the transcription factor FOXO3 in oocytes (Ishikawa et al., 2014; Shimamoto et al., 2019). In addition to these factors, ovarian stiffness is also an important regulator of follicular dormancy. In cattle, it has been observed that primordial follicles in the cortex are in a more rigid environment than growing follicles close to the medulla; moreover, a higher abundance of type I collagen (COL1) was observed in the cortical matrisome compared to the medulla, whereas type IV collagen (COL4) showed no difference between the compartments (Henning; Laronda, 2021). In the same species, regions immediately surrounding primordial follicles were observed to have a higher density of collagen fibers I and III (Parkes et al., 2021). Collagen

fibers I and III are therefore an important factor in the stiffness dynamics of the ovarian cortex, where the primordial follicles are inserted. In this sense, type I collagen is known to be one of the major components of the fetal ovary in cattle (Hummitzsch et al. 2013) and rats (Paranko, 1987), as well as in the ovaries of adult cattle (Figueiredo et al. 1995), mice (Berkholtz et al. 2006) and humans (Lind et al. 2006). Nakano et al (2007) also observed that during mouse follicular development, type IV collagen chains show a dynamic distribution pattern. The alpha 3(IV) and alpha 4(IV) chains are progressively lost after the primordial stage, while the alpha 1(IV) and alpha 2(IV) chains remain constant and the alpha 5(IV) and alpha 6(IV) chains show a partial reduction. This selective loss may be related to follicular activation and the progression of follicular growth and maturation.

When human ovarian tissue was cultured in vitro, a progressive reduction in collagen type I and III levels was observed over time. In addition, changes in the ovarian cortex, such as an initial decrease in stromal cell density and remodeling of the ECM, were associated with activation of primordial follicles (Grosbois et al., 2023). A similar phenomenon has been described in bovine ovarian tissue cryopreservation protocols, both by slow freezing and vitrification, followed by in vitro culture, showing a decrease in collagen fibers, possibly related to the need to reduce tissue stiffness in order to promote follicular activation (Candelaria & Anna, 2024). Corroborating these findings, Costa et al (2025) reported that after six days of culturing bovine ovarian tissue in minimal essential medium (α -MEM), there was a decrease in collagen fibers (type I and III) and glycosaminoglycans around primordial and primary follicles compared to fresh tissue, although no significant differences were observed between these two categories of follicles; furthermore, a reduction in collagen fibers was also reported in the regions adjacent to the follicles. Additionally, Nagamatsu et al (2019) showed that in mice, mechanical stress generated by ECM fibers is crucial for maintaining follicular quiescence and that type IV collagen digestion is associated with oocyte development, suggesting that

loosening the ECM around follicles contributes to their activation by reducing mechanical stress.

In cattle, growing follicles (primary and secondary) show a reduction in the amount of type I and II collagen fibers around them, a change associated with the follicular growth process (Parkes et al., 2021). However, in the same study, porcine follicles were found to have a thicker collagen layer than primary follicles, which may reflect specific differences between species. With regard to localization, the distribution of collagen fibers in the mouse ovary varies according to the compartment: type I collagen predominates in the stroma, follicular compartment and surface epithelium, whereas type IV collagen is absent in primordial follicles but present in primary follicles and becomes predominant in the theca of secondary and antral follicles (Berkholtz et al., 2006) showed that laminin fibers and collagen are present in the basal lamina at different stages of follicular development; type IV collagen $\alpha 1$ and $\alpha 2$, laminin $\alpha 1$ as well as laminin $\beta 1$ and $\gamma 1$ were consistently found at all stages of development, whereas laminin $\alpha 2$ was only observed in secondary and antral follicles; and the composition of the basal membrane in atretic follicles was identical to that of healthy follicles. In humans, type VI collagen was detected in the theca layers of follicles, with greater immunostaining in the outer theca and a predominant hybridization signal in the inner theca, suggesting that this layer is primarily responsible for its synthesis, with subsequent accumulation in the outer region. These findings suggest a possible functional role for type VI collagen in follicular development (Iwahashi et al, 2000).

During ovulation, type I and type III collagens are found in the perifollicular stroma, with type I predominating in the cortex and type III in the innermost (medullary) regions of the ovary; Type IV collagen is located in the basal lamina between the cells of the inner theca and the granulosa, but is absent at the interface between the ovarian epithelium and the tunica albuginea; this remodeling is closely linked to the coordinated action of MMPs and TIMPs (Lind et al., 2006). Groundbreaking studies have shown that follicular rupture and corpus

luteum formation depend on precise remodeling of the ovarian ECM. This process is regulated by the balance between synthesis and degradation of its components, involving MMPs, ADAMTS family enzymes and the plasminogen activator/plasmin system (Curry & Smith, 2006). This mechanism has been observed during the pre-ovulatory period in humans. Dominant follicles expressed proteolytic enzymes essential for follicular rupture, including increased expression of mRNA for MMP-1, which is responsible for the degradation of type I collagen, one of the major components of the ovarian ECM (Rosewell et al., 2015).

The LH surge induces the production of bioactive molecules such as prostaglandins, progesterone and proteolytic enzymes (MMPs and the plasmin/plasminogen activator system), which promote the degradation of the ECM and the rupture of the follicular wall, allowing the release of the oocyte (Curry & Osteen, 2001; Duffy et al., 2019). Among these enzymes, MMP-9 (gelatinase B) stands out, whose expression and activity increases in the preovulatory follicles of several species - such as rats (Curry et al., 2001), pigs (Kim et al., 2014), cattle (Goldberg et al., 1996) and humans (Duncan et al., 1998) - and is regulated by hormones such as LH and FSH, especially in pigs (Zhu, 2021). In mares, the expression of the LH receptor (LHR) plays an important role in the regulation of MMPs, particularly MMP-1 and MMP-2, with implications for follicular development, acquisition of dominance and ovulation (Bastos et al., 2014). In pigs, FSH and LH have been observed to modulate the interaction between TIMPs and MMPs in vitro, increasing the expression of MMP-9 and promoting ECM remodeling and cell development through synergistic effects (Kim & Yoon, 2020). On the other hand, in granulosa cells from bovine ovarian follicles, both FSH and IGF-1 negatively regulate the expression of MMP-2 and MMP-9, probably as a control mechanism to avoid overproduction of proteases during follicular development (Portela, Veiga & Price, 2009). Similarly, a negative regulation of MMP-9 expression by LH has been observed in rhesus monkeys (Young & Stouffer, 2004). In horses, although no significant changes in MMP-2 and MMP-9 secretion

were observed during the follicular growth phase, there was a reduction in MMP-9 levels just prior to ovulation, a period characterized by morphological changes in the follicle, possibly related to the FSH peak. It has also been suggested that other MMPs, such as collagenases (MMP-1, -8 and/or -13), which are involved in the degradation of fibrillar collagens, may be involved in the overall process of ovarian softening (Rieger et al., 2020).

4. The Relationship Between Ovarian Tissue Stiffness and Extracellular Matrix

It has been observed that the stiffness of ovarian tissue is usually associated with ECM components, particularly collagen, since this protein is an important factor in avoiding mechanical stress in ovarian tissue due to its elastic properties, especially in the stroma, thus avoiding significant morphological changes in the follicles (Pascoletti et al., 2020). In mice, a spatial analysis of the ovary has shown that the regions with the lowest stiffness are located in the cortex and in the center of the organ (medulla), while an intermediate zone has the highest stiffness, and it has also been observed that the most stiff areas are more associated with the presence of follicles in advanced stages of development and not with a higher concentration of type IV collagen (Hopkins et al., 2021). Furthermore, when characterizing the elastic and viscoelastic properties of domestic cat ovarian tissue to understand the mechanical microenvironment of follicles in the cortex and medulla, Stewart et al. (2023) point out that in both younger and older cats, type 1 collagen is similar in the cortical and medullary regions and that its distribution does not appear to correlate with patterns of stiffness in the ovarian tissue. In addition, Nagashima et al (2023) compared the ovarian ECM of dogs and cats; in dogs, collagen fibers are thicker and more aligned with fewer gaps, whereas in cats they are thinner and more branched, resulting in a less dense collagen matrix, but there were no differences in stiffness between species or between pre- and post-pubertal states. Furthermore, when shear

wave (SW) propagation was compared between the cortex and medulla of the ovary, the cortex was found to be less stiff than the medulla (Gargus et al., 2020). The results contradict the prevailing view in the field that the cortex is stiffer than the medulla and that this increased stiffness is responsible for maintaining the quiescence of immature primordial follicles. Further research is needed to understand collagen remodeling and its relationship to ovarian stiffness in different species.

5. Reproductive Senescence and Remodeling of Collagen Fibrillar Components in the Ovary

Reproductive senescence and remodeling of ovarian collagen fibril components
Reproductive age has been identified as a limiting factor in fertility, influenced by hormonal changes, a reduction in follicular reserve and compromised oocyte quality (Li et al., 20-21). In addition, studies have investigated variations in the amount of collagen fibers throughout the reproductive life of different mammalian species and correlated these changes with fertility and the integrity of the follicular microenvironment (Lind et al. 2006; Umehara et al., 2022).

In mice, it has been observed that the composition of types I and IV collagen changes with age, it becomes more intense in older ovaries while remaining constant in younger ones (Berkholtz et al., 2006). In this sense, ovarian stiffening is associated with the presence of collagen and increased reproductive age, but other aspects of the collagen ECM such as organization, cross-linking and its relationship with other ECM components may be important in this process (Amargant et al., 2020). This has also been observed in pigs, where aged ovaries have higher levels of collagen and laminin (Pennarossa et al., 2022). In humans, collagen IV is mainly found in the follicular basement membrane and collagen VI is found throughout the ovarian ECM, highlighting that both can play diverse roles, including mechanical functions,

cytoprotection and regulation of cellular processes (Ouni et al., 2019). In characterizing the amount of perfollicular collagen in prepubertal and adult human ovarian tissue, Philippart et al (2021) observed that the presence of perfollicular collagen IV also increases with age, particularly in early-stage follicles, and is weaker in prepubertal follicles compared to adults. Coupled with this, changes in perfollicular collagen fibers occur between prepubertal and reproductive age follicles, revealing follicular stage and ovarian age-dependent remodeling, with ovaries showing similar viscoelastic behavior, but with ovarian tissue being stiff in prepubertal, more pliable in reproductive age and stiffer at menopause (Ouni et al., 2021). A representative diagram of the ECM network of major collagen fibers surrounding follicles in the ovarian stroma is shown in Figure 3.

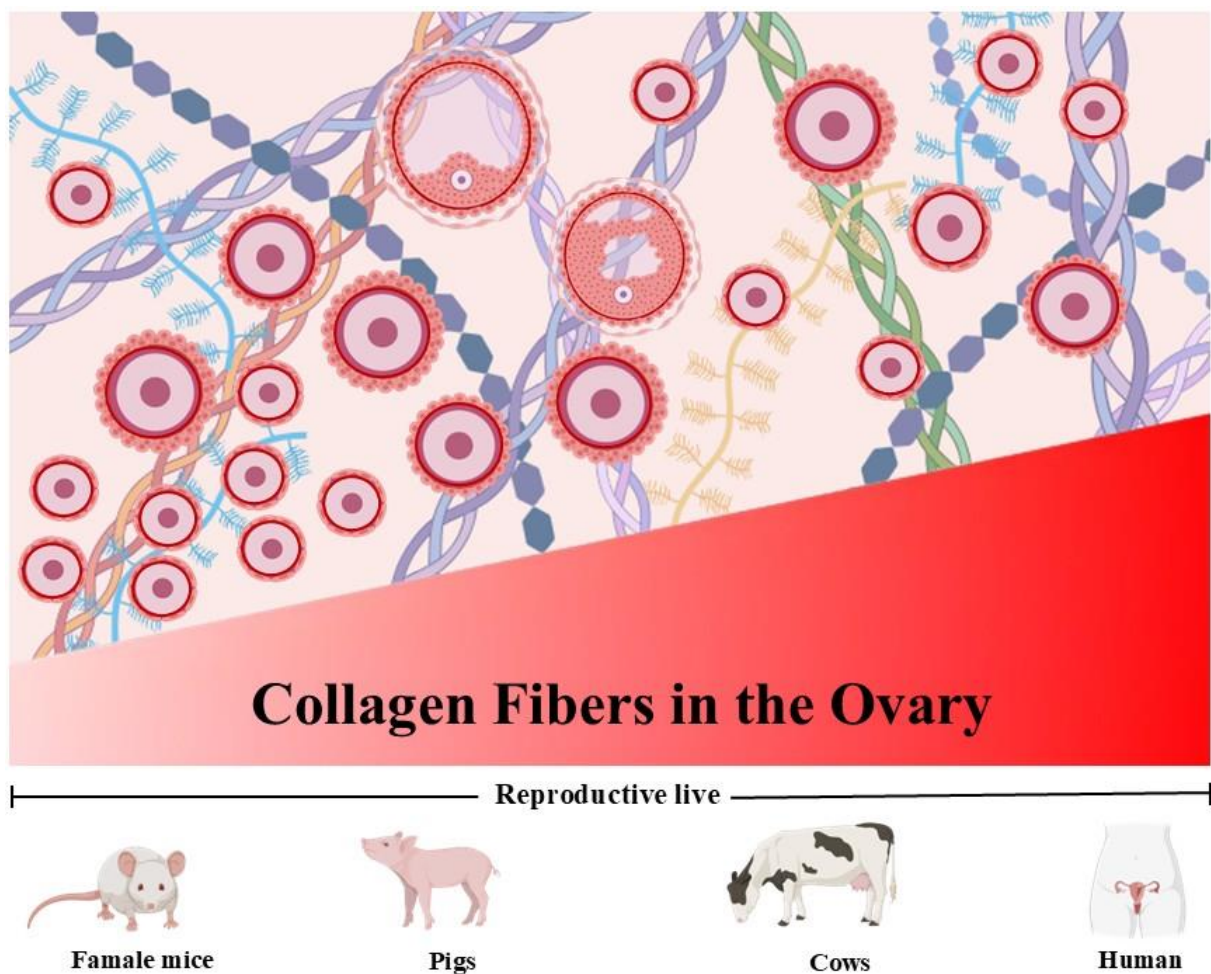


Figure 3. Schematic representation of the dynamics of collagen distribution (I, IV and VI) throughout the stages of reproductive life in females of different species (mice, pigs, cows and humans)

6. Conclusion

Understanding the distribution and dynamics of collagens in the mammalian ovary (in vivo and in vitro) has revealed a crucial role for the extracellular matrix in regulating follicular activation, maintenance of dormancy and the ovulation process. The ovarian tissue is highly dynamic and promotes a complex network of interactions that are essential for maintaining tissue homeostasis. Current evidence indicates that the ECM plays a fundamental role in ovarian function, not only as a structural support, but also through its mechanical dynamics, particularly in terms of tissue stiffness. These dynamics directly influence the mechanisms of follicular development, modulating the responsiveness of follicles at different stages, from primordial to pre-ovulatory. In addition, the biomechanical implications associated with matrix stiffness affect the ovary throughout reproductive life and are also a relevant factor in the decline in fertility observed at menopause. These findings reinforce the ECM as a key element in ovarian physiology, not only as a structural support, but also as an active mediator of cell communication and response to hormonal and mechanical signals. Advances in this area may open new perspectives for therapeutic and biotechnological interventions aimed at preserving and restoring ovarian function.

References

- Amargant, F., Manuel, S.L., Tu, Q., Parkes, W.S., Rivas, F., Zhou, L.T., Rowley, J.E., Villanueva, C.E., Hornick, J.E., Shekhawat, G.S., Wei, J.J., Pavone, M.E., Hall, A.R., Pritchard, M.T., Duncan, F.E., 2020. Ovarian stiffness increases with age in the mammalian ovary and depends on collagen and hyaluronan matrices. *Aging Cell*, 19 (11), e13259. <https://doi.org/10.1111/acel.13259>.

- Arpino, V., Brock, M., Gill, S.E., 2015. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. *Matrix Biology*, 44-46, 247-254. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.03.005>.
- Arseni, L., Lombardi, A., Orioli, D., 2018. From structure to phenotype: Impact of collagen alterations on human health. *International Journal of Molecular Sciences*, 19 (5), 1407. <https://doi.org/10.3390/ijms19051407>.
- Bastos, H.B., Kretzmann, N.A., Santos, G.O., Esmeraldino, A.T., Rechsteiner, S.F., Mattos, R.C., Neves, A.P., 2014. Gene expression of matrix metalloproteinases and LH receptors in mare follicular development. *Theriogenology*, 82 (8), 1131-1136. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.07.033>.
- Berkholtz, C. B., Lai, B. E., Woodruff, T. K., & Shea, L. D. (2006). Distribuição das proteínas da matriz extracelular colágeno tipo I, colágeno tipo IV, fibronectina e laminina na foliculogênese de camundongos. *Histochemistry and Cell Biology*, 126, 583–592. <https://doi.org/10.1007/s00418-006-0190-x>.
- Candelaria, J.I., Denicol, A.C., 2024. Assessment of ovarian tissue and follicular integrity after cryopreservation via slow freezing or vitrification followed by in vitro culture. *F S Sci*. 5 (2), 154-162. <https://doi.org/10.1016/j.xfss.2023.10.004>.
- Costa, F. C., Silva, B. R., Filho, F. F. C., Bezerra, V. S., Azevedo, V. A. N., Silva, A. A., & Silva, J. R. V. (2025). Ascorbic acid and resveratrol improve the structural integrity of the extracellular matrix and enhance follicular survival in cultured bovine ovarian tissue. *Theriogenology*, 235, 231-244. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2025.01.020>.
- Curry, T. E. Jr., Song, L., & Wheeler, S. E. (2001). Localização celular de gelatinases e inibidores teciduais de metaloproteínases durante o crescimento folicular, ovulação e formação inicial do corpo lúteo em ratas. *Biology of Reproduction*, 65(3), 855–865. <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.3.855>.
- Curry, T.E. Jr, Osteen, K.G., 2001. Cyclic changes in the matrix metalloproteinase system in the ovary and uterus. *Biol. Reprod.* 64 (5), 1285-1296. <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.5.1285>.
- Curry, T.E. Jr, Smith, M.F., 2006. Impact of extracellular matrix remodeling on ovulation and the folliculo-luteal transition. *Semin. Reprod. Med.* 24 (4), 228-241. <https://doi.org/10.1055/s-2006-948552>.
- Drain, A.P., Weaver, V.M., 2020. Matrix molecules and their ligands. In: *Principles of Tissue Engineering*, Academic Press, pp. 119-132. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818422-6.00008-3>.
- Duffy, D.M., Ko, C., Jo, M., Brannstrom, M., Curry, T.E., 2019. Ovulation: Parallels with inflammatory processes. *Endocr. Rev.* 40 (2), 369-416. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00075>.
- Duncan, W. C., McNeilly, A. S., & Illingworth, P. J. (1998). O efeito do "resgate" luteal sobre a expressão e localização de metaloproteínases da matriz e seus inibidores no corpo lúteo humano. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83(7), 2470–2478. <https://doi.org/10.1210/jcem.83.7.4950>.
- Elosegui-Artola, A., 2021. The extracellular matrix viscoelasticity as a regulator of cell and tissue dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 72, 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2021.04.002>.
- Figueiredo, J. D., & Lima, L. D. (2017). Artificial ovary technology: applications, state of art, limitations and prospects.
- Figueiredo, J. R., Hulshof, S. C. J., Thiry, M., Van den Hurk, R., Bevers, M. M., Nusgens, B., & Beckers, J. F. (1995). Proteínas da matriz extracelular e membrana basal: sua identificação em ovários bovinos e importância para a adesão de folículos pré-antrais

- cultivados. *Theriogenology*, 43, 845–858. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00012-Y](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00012-Y).
- Franchi, F.F., Hernandez, M.P., Coelho Ferreira, A.L., Vieira de Lima, V.A., de Oliveira Mendes, L., Musa de Aquino, A., Scarano, W.R., César de Souza Castilho, A., 2020. Fractal analysis and histomolecular phenotyping provides insights into extracellular matrix remodeling in the developing bovine fetal ovary. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 523 (4), 823-828. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.01.025>.
- Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci.* 2010 Dec 15;123(Pt 24):4195-200. <https://doi.org/10.1242/jcs.023820>.
- Gargus, E.S., Jakubowski, K.L., Arenas, G.A., Miller, S.J., Lee, S.S.M., Woodruff, T.K., 2020. Ultrasound shear wave velocity varies across anatomical region in ex vivo bovine ovaries. *Tissue Eng. Part A* 26 (13-14), 720-732. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2020.0037>.
- Goldberg, M. J., Moses, M. A., & Tsang, P. C. (1996). Identificação de metaloproteinases da matriz e seus inibidores nos corpos lúteos bovinos e sua variação durante o ciclo estral. *Journal of Animal Science*, 74(4), 849–857. <https://doi.org/10.2527/1996.744849x>.
- Grosbois, J., Bailie, E.C., Kelsey, T.W., Anderson, R.A., Telfer, E.E., 2023. Spatio-temporal remodelling of the composition and architecture of the human ovarian cortical extracellular matrix during in vitro culture. *Hum. Reprod.* 38 (3), 444-458. <https://doi.org/10.1093/humrep/dead008>.
- Halper, J., Kjaer, M., 2014. Basic components of connective tissues and extracellular matrix: Elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins. *Adv. Exp. Med. Biol.* 802, 31-47. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7893-1_3.
- Heeren, A.M., van Iperen, L., Klootwijk, D.B., de Melo Bernardo, A., Roost, M.S., Gomes Fernandes, M.M., Louwe, L.A., Hilders, C.G., Helmerhorst, F.M., van der Westerlaken, L.A., Chuva de Sousa Lopes, S.M., 2015. Development of the follicular basement membrane during human gametogenesis and early folliculogenesis. *BMC Dev. Biol.* 15, 4. <https://doi.org/10.1186/s12861-015-0054-0>.
- Henning, N.F., Laronda, M.M., 2021. The matrisome contributes to the increased rigidity of the bovine ovarian cortex and provides a source of new bioengineering tools to investigate ovarian biology. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.10.06.463107>.
- Hopkins, T.I.R., et al., 2021. Mapping the mechanical microenvironment in the ovary. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.01.03.425098>.
- Hrabec, E., Naduk, J., Strek, M., & Hrabec, Z. (2007). Type IV collagenases (MMP-2 and MMP-9) and their substrates – extracellular matrix proteins, hormones, cytokines, chemokines and their receptors. *Postępy Biochemii*, 53(1), 37–45. PMID: 17718386.
- Hu, M., Ling, Z., Ren, X., 2022. Dinâmica da matriz extracelular: rastreamento em sistemas biológicos e suas implicações. *J. Biol. Eng.* 16, 13. <https://doi.org/10.1186/s13036-022-00292-x>.
- Hummitzsch, K., Irving-Rodgers, H. F., Hatzirodos, N., Bonner, W., Sabatier, L., Reinhardt, D. P., Sado, Y., Ninomiya, Y., Wilhelm, D., & Rodgers, R. J. (2013). Um novo modelo de desenvolvimento do ovário e dos folículos em mamíferos. *PLoS One*, 8, e55578. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055578>.
- Irving-Rodgers, H.F., Hummitzsch, K., Murdiyarso, L.S., Bonner, W.M., Sado, Y., Ninomiya, Y., Couchman, J.R., Sorokin, L.M., Rodgers, R.J., 2010. Dynamics of extracellular matrix in ovarian follicles and corpora lutea of mice. *Cell Tissue Res.* 339 (3), 613-624. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0905-8>.
- Ishikawa, T., et al. (2014). Taxa de consumo de oxigênio de folículos pré-antrais iniciais de

- tecido cortical ovariano humano vitrificado. *Journal of Reproduction and Development*, 60, 460–467. <https://doi.org/10.1262/jrd.2014-009>.
- Iwahashi, M., Muragaki, Y., Ooshima, A., & Nakano, R. (2000). Expressão do colágeno tipo VI durante o crescimento de folículos ovarianos humanos. *Fertility and Sterility*, 74(2), 343–347. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(00\)00618-x](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(00)00618-x).
- Kim, S. H., Kang, C. W., Min, K. S., & Yoon, J. T. (2014). Metaloproteínas da matriz são importantes para o desenvolvimento folicular em porcas normais e miniaturas. *Biotechnology Letters*, 36(6), 1187–1196. <https://doi.org/10.1007/s10529-014-1474-9>.
- Kim, S.H., Yoon, J.T., 2020. Matrix metallopeptidases regulate granulosa cell remodeling through the hormone signaling pathway. *J. Adv. Vet. Anim. Res.* 7 (2), 367-373. <https://doi.org/10.5455/javar.2020.g430>.
- Kozel, B.A., Mecham, R.P., 2019. Elastic fiber ultrastructure and assembly. *Matrix Biol.* 84, 31-40. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2019.10.002>.
- Li, C.-J., Lin, L.-T., Tsai, H.-W., Chern, C.-U., Wen, Z.-H., Wang, P.-H., & Tsui, K.-H. (2021). The molecular regulation in the pathophysiology in ovarian aging. *Aging and Disease*, 12(3), 934–949. <https://doi.org/10.14336/AD.2020.1113>.
- Lind, A.K., Weijdegård, B., Dahm-Kähler, P., Mölne, J., Sundfeldt, K., Brännström, M., 2006. Collagens in the human ovary and their changes in the perifollicular stroma during ovulation. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 85 (12), 1476-1484. <https://doi.org/10.1080/00016340601033741>.
- Makanji, Y., Tagler, D., Pahnke, J., Shea, L. D., & Woodruff, T. K. (2014). O metabolismo e transporte de carboidratos mediados por hipóxia promovem o crescimento e a sobrevivência de folículos murinos em estágio inicial. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 306, E893–E903. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00484.2013>.
- Manou, D., Caon, I., Bouris, P., Triantaphyllidou, I.E., Giaroni, C., Passi, A., Karamanos, N.K., Vigetti, D., Theocharis, A.D., 2019. The complex interplay between extracellular matrix and cells in tissues. *Methods Mol. Biol.* 1952, 1-20. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9133-4_1.
- McKee, T.J., Perlman, G., Morris, M., et al., 2019. Composição da matriz extracelular dos tecidos conjuntivos: uma revisão sistemática e meta-análise. *Sci. Rep.* 9, 10542. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46896-0>.
- Mienaltowski, M.J., Gonzales, N.L., Beall, J.M., Pechanec, M.Y., 2021. Basic structure, physiology, and biochemistry of connective tissues and extracellular matrix collagens. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1348, 5-43. https://doi.org/10.1007/978-3-030-80614-9_2.
- Nagamatsu, G., Shimamoto, S., Hamazaki, N., Nishimura, Y., Hayashi, K., 2019. Mechanical stress accompanied with nuclear rotation is involved in the dormant state of mouse oocytes. *Sci. Adv.* 5 (6), eaav9960. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav9960>.
- Nagashima, J.B., Zenilman, S., Raab, A., Aranda-Espinoza, H., Songsasen, N., 2023. Comparative tensile properties and collagen patterns in domestic cat (*Felis catus*) and dog (*Canis lupus familiaris*) ovarian cortical tissues. *Bioengineering (Basel)*. 10 (11), 1285. <https://doi.org/10.3390/bioengineering10111285>.
- Necula, L., Matei, L., Dragu, D., Pitica, I., Neagu, A., Bleotu, C., Diaconu, C.C., Chivu-Economescu, M., 2022. Collagen family as promising biomarkers and therapeutic targets in cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 23 (20), 12415. <https://doi.org/10.3390/ijms232012415>.
- Ouni, E., Peaucelle, A., Haas, K.T., et al., 2021. A blueprint of the topology and mechanics of the human ovary for next-generation bioengineering and diagnosis. *Nat. Commun.* 12, 5603. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25934-4>.
- Ouni, E., Vertommen, D., Chiti, M.C., Dolmans, M.M., Amorim, C.A., 2019. A draft map of

- the human ovarian proteome for tissue engineering and clinical applications. *Mol. Cell. Proteomics* 18 (Suppl 1), S159-S173. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA117.000469>.
- Ozsvar, J., Yang, C., Cain, S.A., Baldock, C., Tarakanova, A., Weiss, A.S., 2021. Tropoelastin and elastin assembly. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9, 643110. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.643110>.
- Paradiso, F., Fitzgerald, J., Yao, S., Barry, F., Taraballi, F., Gonzalez, D., Conlan, R.S., Francis, L., 2019. Marine collagen substrates for 2D and 3D ovarian cancer cell systems. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7, 343. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00343>.
- Paranko, J. (1987). Expressão dos colágenos tipo I e III durante a morfogênese do testículo e ovário fetal de rato. *Anatomical Record*, 219, 91–101. <https://doi.org/10.1002/ar.1092190114>.
- Parkes, W.S., Amargant, F., Zhou, L.T., Villanueva, C.E., Duncan, F.E., Pritchard, M.T., 2021. Hyaluronan and collagen are prominent extracellular matrix components in bovine and porcine ovaries. *Genes (Basel)* 12 (8), 1186. <https://doi.org/10.3390/genes12081186>.
- Pascoletti, G., Di Nardo, M., Fragomeni, G., Barbato, V., Capriglione, T., Gualtieri, R., Talevi, R., Catapano, G., Zanetti, E.M., 2020. Caracterização dinâmica do comportamento biomecânico do tecido cortical ovariano bovino e seu efeito de curto prazo no tecido e folículos ovarianos. *Materiais* 13, 3759. <https://doi.org/10.3390/ma13173759>.
- Pennarossa, G., De Iorio, T., Gandolfi, F., Brevini, T.A.L., 2022. Impact of aging on the ovarian extracellular matrix and derived 3D scaffolds. *Nanomaterials (Basel)* 12 (3), 345. <https://doi.org/10.3390/nano12030345>.
- Philippart, C., Masciangelo, R., Camboni, A., Donnez, J., Dolmans, M.M., 2021. Basal lamina characterization in frozen-thawed and long-term grafted human prepubertal ovarian tissue. *Reprod. Biomed. Online* 42 (5), 859-869. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2021.02.012>.
- Portela, V.M., Veiga, A., Price, C.A., 2009. Regulation of MMP2 and MMP9 metalloproteinases by FSH and growth factors in bovine granulosa cells. *Genet. Mol. Biol.* 32 (3), 516-520. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572009005000048>.
- Prunskaitė-Hyyryläinen, R., Shan, J., Railo, A., Heinonen, K.M., Miinalainen, I., Yan, W., Shen, B., Perreault, C., Vainio, S.J., 2014. Wnt4, a pleiotropic signal for controlling cell polarity, basement membrane integrity, and antimüllerian hormone expression during oocyte maturation in the female follicle. *FASEB J.* 28 (4), 1568-1581. <https://doi.org/10.1096/fj.13-233247>.
- Revell, C.K., Jensen, O.E., Shearer, T., Lu, Y., Holmes, D.F., Kadler, K.E., 2021. Collagen fibril assembly: new approaches to unanswered questions. *Matrix Biol. Plus* 12, 100079. <https://doi.org/10.1016/j.mbplus.2021.100079>.
- Rieger, J., Kaessmeyer, S., Al Masri, S., Hünigen, H., Plendl, J., 2020. Endothelial cells and angiogenesis in the horse in health and disease-a review. *Anat. Histol. Embryol.* 49 (5), 656-678. <https://doi.org/10.1111/ahe.12588>.
- Rilla, K., Mustonen, A.M., Arasu, U.T., Härkönen, K., Matilainen, J., Nieminen, P., 2019. Extracellular vesicles are integral and functional components of the extracellular matrix. *Matrix Biol.* 75-76, 201-219. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2017.10.003>.
- Rosewell, K.L., Al-Alem, L., Zakerkish, F., McCord, L., Akin, J.W., Chaffin, C.L., Brännström, M., Curry, T.E. Jr., 2015. Induction of proteinases in the human preovulatory follicle of the menstrual cycle by human chorionic gonadotropin. *Fertil. Steril.* 103 (3), 826-833. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.11.017>.
- Schwarzbauer, J.E., DeSimone, D.W., 2011. Fibronectins, their fibrillogenesis, and in vivo functions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3 (7), a005041. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005041>.

- Shah, J. S., Sabouni, R., Cayton Vaught, K. C., et al. (2018). Biomecânica e sinalização mecânica no ovário: uma revisão sistemática. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 35(8), 1135–1148. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1180-y>.
- Shimamoto, S., et al. (2019). A hipóxia induz o estado dormiente em oócitos por meio da expressão de Foxo3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 116, 12321–12326. <https://doi.org/10.1073/pnas.1817223116>.
- Stewart, S., Ou, W., Aranda-Espinoza, H., Rahaman, S.O., He, X., 2023. Micromechanical characterizations and viscoelastic modeling reveal elastic and viscoelastic heterogeneities in ovarian tissue and the significant viscoelastic contribution to the apparent elastic modulus determined by AFM indentation. *Acta Biomater.* 168, 286-297. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2023.07.010>.
- Sun, C., Yang, X., Wang, T., Cheng, M., Han, Y., 2022. Ovarian biomechanics: from health to disease. *Front. Oncol.* 11, 744257. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.744257>.
- Umehara, T., Winstanley, Y. E., Andreas, E., Morimoto, A., Williams, E. J., Smith, K. M., Carroll, J., Febbraio, M. A., Shimada, M., Russell, D. L., & Robker, R. L. (2022). Female reproductive life span is extended by targeted removal of fibrotic collagen from the mouse ovary. *Science Advances*, 8(24), eabn4564. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abn4564>.
- van Wezel, I. L., & Rodgers, R. J. (1996). Caracterização morfológica de folículos primordiais bovinos e seu ambiente in vivo. *Biology of Reproduction*, 55(5), 1003–1011. <https://doi.org/10.1095/biolreprod55.5.1003>.
- Woodruff, T.K., Shea, L.D., 2011. A new hypothesis regarding ovarian follicle development: ovarian rigidity as a regulator of selection and health. *J. Assist. Reprod. Genet.* 28 (1), 3-6. <https://doi.org/10.1007/s10815-010-9478-4>.
- Young, K.A., Stouffer, R.L., 2004. Regulação de gonadotropina e esteroides de metaloproteases de matriz e seus inibidores de tecido endógeno no corpo lúteo desenvolvido do macaco rhesus durante o ciclo menstrual. *Biol. Reprod.* 70, 244–252. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.022053>.
- Zhang, J., Xia, W., Zhou, J., Qin, S., Lin, L., Zhao, T., Wang, H., Mi, C., Hu, Y., Chen, Z., Zhu, T., Yang, X., Zhang, T., Xia, G., Ke, Y., Wang, C., 2024. Participation of preovulatory follicles in the activation of primordial follicles in mouse ovaries. *Int. J. Biol. Sci.* 20 (10), 3863-3880. <https://doi.org/10.7150/ijbs.95020>.
- Zhu, Y., 2021. Metalloproteases in gonad formation and ovulation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 314, 113924. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2021.113924>.

7 CAPÍTULO 2

Dynamic of Extracellular Matrix Remodeling and Follicular Morphology in Bovine Ovarian Tissue Cultured In Medium Supplemented with *Croton argyrophyllus* Khunt Essential Oil

Periódico: Animal Reproduction Science (Artigo a ser submetido) (ISSN: 0378-4320)

Dynamic of Extracellular Matrix Remodeling and Follicular Morphology in Bovine Ovarian Tissue Cultured In Medium Supplemented with *Croton argyrophyllus* Khunt Essential Oil

Emanoel da S. Félix¹, Venância A.N. Azevedo¹, Felipe F. da Silva¹, Ernando I.T. de Assis¹, Solano D. Martins², Valdevane R. Araujo², Geovany A. Gomes³, José R.V. Silva^{1*}

Affiliation

¹Laboratory of Biotechnology and Physiology of Reproduction (LABIREP), Federal University of Ceará, Sobral, CE, Brazil.

²Reproductive Physiology Research Laboratory, Federal University of Delta do Parnaíba - UFDPAr, Parnaíba, PI, Brazil.

³Laboratory of Phytochemical and Bioactive Products, State University Vale do Acaraú, Sobral, Ceara, Brazil

Correspondence

Prof. José Roberto Viana Silva

Laboratory of Biotechnology and Physiology of Reproduction

Federal University of Ceara

Av. Maurocélvio Rocha Ponte 100

62041-040 Sobral (CE)

Brazil

Phone: +55 88 3611 8000

Fax: +55 88 3611 8000

jrvsilva@ufc.br

Abstract

The aim of this study was to evaluate the changes resulting from the culture system and the effects of *Croton argyrophyllus* Khunt essential oil (CAEO), with emphasis on its antioxidant activity, on follicular morphology, follicular activation and development, extracellular matrix (ECM) and stromal population in bovine ovarian tissue cultured in vitro. The tissues were cultured for six days in α -MEM⁺ alone or supplemented with different concentrations of CAEO (0.01, 0.1, 1.0, 10.0 and 100.0 μ g/mL). At the end of culture period, the tissues were processed for histological analysis. The ovarian follicles parameters such as survival, activation and development were evaluated, as well the ECM integrity involving collagen content and glycosaminoglycans area, also the stromal cells counting. The results indicate that bovine ovarian tissue cultured with 1.0, 10.0 and 100.0 μ g/mL CAEO showed a higher percentage of normal follicles after culture. Irrespective of the concentration, CAEO promoted an increase in collagen fiber density compared to culture in α -MEM⁺, but with no significant difference compared to uncultured tissue. No statistical differences were observed between the different concentrations of CAEO. There was also a reduction in collagen density around primary follicles compared to primordial follicles in all conditions evaluated. Glycosaminoglycan levels showed no significant differences between the groups. However, the concentration of 100.0 μ g/mL CAEO increased the density of stromal cells in the cultured tissues. Taken together, the data show that 100.0 μ g/mL CAEO improves follicle survival, stromal cell density, collagen

fiber organization and maintains glycosaminoglycan levels during in vitro culture.

Keywords: Antioxidant; Bovine species; *Croton argyrophyllus* Khunt; *In vitro* culture; Ovarian tissue.

1. Introduction

The culture of ovarian tissue is an important strategy for studying the early stages of folliculogenesis, especially primordial and primary follicles, making it possible to comprehensive mechanisms of follicular activation and in vitro development (Telfer et al., 2000; Bizarro-Silva & Seneda, 2021). It has been known that culture of ovarian tissue preserves cellular interactions, favoring more efficient follicular activation and maintenance of follicular health (Telfer et al., 2008). In this sense, studies have focused on the remodeling of the extracellular matrix, in particular collagen fibrils, assessing their composition, organization and role in follicle recruitment during culture (Pascoletti et al., 2020; Grosbois et al., 2023; Costa et al., 2025). In addition, various authors have shown that stromal cell density assessments are fundamental to maintaining tissue homeostasis and supporting follicle growth (Scott et al., 2004; Kinnear et al., 2020; Grubliauskaitė et al., 2023). Despite biotechnological advances, ovarian tissue culture can compromise follicular morphology, ECM, stromal cells and antioxidant defense mechanisms (Costa et al., 2025), largely due to oxidative stress associated with excessive ROS accumulation.

The ROS can cause significant cellular damage that compromises cell viability. This damage includes the oxidation of redox-sensitive proteins such as transporters, receptors, signaling molecules, transcription factors, cytoskeletal components, ECM, and the activity of matrix metalloproteases (MMPs), which are responsible for regulating the remodeling of the ECM, including collagen (Agarwal and Majzoub, 2017; Touyz et al., 2020). Additionally, ROS

negatively affect follicular quality, causing DNA, RNA, mitochondrial, and lipid peroxidation damages, ultimately compromising oocyte integrity (Luderer, 2014; Barrozo et al., 2021). Thus, antioxidant supplementation is crucial for mitigating oxidative stress, preserving follicular integrity, and maintaining homeostasis during ovarian tissue culture (Da Silva et al., 2024).

The CAEO has demonstrated important antioxidant activity in biological systems (Ramos et al., 2013; Ramos et al., 2017; Araújo et al., 2019). The CAEO has demonstrated capacity to eliminate free radicals by Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assays (Costa et al., 2017). Essential oils with antioxidant properties prevent cell damage and interrupt harmful chain reactions due to their low molecular weight (Tumilaar et al., 2024). Thus, the antioxidant activity of EOs contributes to protection against oxidative damage. This bioactivity has been attributed both to the synergistic effect between their different chemical components and to the presence of key compounds in high levels such as phenolic compounds that play a central role in the protective effects against ROS (Riella et al., 2012; Rafie, Soheila and Grant, 2017). Therefore, the aim of this study was to evaluate the changes resulting from the culture system and the effects of OECA at different concentrations on follicular morphology, follicular activation and development, ECM integrity and stromal cells in bovine ovarian tissue cultured *in vitro*.

2. Material and methods

2.1 Chemicals

Unless otherwise specified, the chemicals and media used in this study were obtained from Sigma-Aldrich (USA).

2.2 Plant material and essential oil extraction

Leaves of *Croton argyrophyllus* Kunth were collected from Sítio Cocalzinho, Viçosa do Ceará, CE, Brazil (latitude: -3.602786; longitude: -41.219967), and identified at the Professor Francisco José de Abreu Matos Herbarium (HUVA), exsiccata number 28890. Essential oil extraction was performed through hydrodistillation using a Clevenger apparatus. The essential oil yield was 0.38% (w/w), with α -pinene being the predominant compound (54.74%).

2.3. Antioxidant activity assessment

The antioxidant activity of CAEO was assessed using the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and ABTS (2,2'-azinobis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) assays, as described by Becker et al. (2019). In the DPPH assay, 20 μ L of CAEO was diluted in 80 μ L of methanolic DPPH solution, reaching a final concentration of 0.2 mg/mL. CAEO and the positive standard (ascorbic acid) were diluted in concentrations ranging from 200 μ g/mL to a final concentration of 0.78 μ g/mL. The absorbance was measured at 490 nm during 60 minutes of incubation ($\sim 25^{\circ}\text{C}$). The values obtained were adjusted to eliminate interference caused by the natural colorations of the extracts, ensuring greater precision in the antioxidant analysis. The protocol described by Re et al. (1999) was used to measure antioxidant activity using the ABTS method. The radical cation (ABTS) was prepared by mixing 7 mM ABTS (5 mL) with 88 μ L potassium persulphate (140 mM). The mixture was stirred and kept in the dark at room temperature for 16 hours. Then 1 mL of this solution was diluted in 99 mL of ethanol. The samples and positive standards were diluted following the same protocol used in the DPPH assay. The absorbance was measured at 630 nm after 10 minutes of incubation.

2.4 Source of the ovaries and tissue preparation

Bovine ovaries (n= 08 pairs) from adult cows were collected post-mortem at a local slaughterhouse and transported to the laboratory as described by Da Silva et al. (2024). This study was conducted following the approval of the Animal Ethics and Welfare Committee of the Federal University of Ceará (n° 10/23).

In the laboratory, under sterile conditions, the cortex of each pair of ovaries was dissected into 38 fragments of approximately (3 mm × 3 mm × 1 mm) in α Minimum Essential Medium (α -MEM) supplemented with penicillin (100 μ g/mL) and streptomycin (100 μ g/mL). For each animal, cortical fragments were fixed in buffered formalin (10%) for 24 hours at 4°C for histological analysis (uncultured control) as well as for analysis of the extracellular matrix, distribution of collagen fibers and glycosaminoglycans, stromal density and follicular morphology. The remaining fragments were cultured for six days in 24-well plates (TPP 92024) containing 500 μ L of culture medium. The fragments were cultured in α -MEM (pH 7.2 - 7.4) supplemented with BSA (1.25 mg/mL) glutamine (2 mM), hypoxanthine (2 mM), penicillin (100 μ g/mL) and streptomycin (100 μ g/mL), insulin (10 μ g/mL), transferrin (5.5 μ g/mL), selenium (10 μ g/mL). This control medium was called α -MEM⁺. Then, the fragments were cultured in α -MEM⁺ alone (cultured control) or supplemented with 0.01, 0.1, 1.0, 10.0 and 100.0 μ g/mL of CAEO. The cultivation conditions were at 38.5°C with 5% CO₂ in a humidified incubator (Costa et al., 2022). After the cultivation period, the fragments were used for the same analyses performed on the uncultivated control.

2.6 Morphological analyses and assessment of in vitro follicular growth

Histological analysis was carried out according to the methodological protocol of Costa et al. (2022). Only follicles with oocytes with a visible nucleus were analyzed. The evaluation was carried out blindly by an examiner using an optical microscope (Nikon, Eclipse, TS 100,

Japan). Healthy follicles (intact oocytes and well-organized granulosa cells) were classified according to Telfer et al. (2008) and degeneration (retracted oocytes or disorganized granulosa cells detached from the basement membrane) according to Celestino et al. (2007). Follicle classification (primordial, primary or secondary) was performed according to the work of Figueiredo et al. (2017). The proportion of follicles was calculated as the percentage of morphologically healthy follicles in relation to the total number of follicles.

2.7 Analysis of the extracellular matrix (ECM) of collagen, glycosaminoglycan (GAGs) and stromal cell density

In each condition, collagen fibers were assessed using Picrosirius Red staining (Abcam Kit) following Rittié (2017). Ovarian sections (6 μm) were deparaffinized, stained with 0.1% Sirius Red for 1 hour, dehydrated, and analyzed under an optical microscope (Nikon Eclipse TS 100, Japan) at 400x magnification. The percentage of the area occupied by collagen fibers in ten different fields in the stromal area of the tissue, and the quantification of the percentage of collagen after delimiting a region of interest (ROI) of 50 μm around 84 follicles (12 primordial and 12 primary) of each group, adapted from (Costa et al., 2025). All treatments with CAEO and controls (uncultured control and $\alpha\text{-MEM}^+$ cultured control), were evaluated using a DS Cooled Camera Head DS-Ri1 and analyzed with Image J software (version 1.51p, 2017). Only the collagen fibers were stained red, while the follicles remained colorless. Alcian Blue stain was used to assess *glycosaminoglycan* (GAGs) in the ovarian cortex. Slides were deparaffinized, rehydrated, stained with Alcian Blue (pH 2.5) for 5 minutes, washed, rehydrated, and treated with graded ethanol concentrations, followed by two xylene baths (Quintarelli and Dellovo, 1965). Observations were performed under an optical microscope (Nikon Eclipse TS 100, Japan) at 400x magnification. The percentage of area occupied by GAGs in ten fields was

determined using the same protocol as for collagen fibers.

The cellular density of the ovarian stroma was assessed by calculating the number of nuclei in an area of 100 μm^2 /field. Twenty fields from different histological sections of five distinct animals were evaluated. The average number of nuclei per field was calculated as described by Cavalcante et al. (2019), and all evaluations and measurements were performed by a single operator.

2.8 Statistic Analyze

The data was statistically analyzed using R Studio software (R Studio Team, 2020). Normality was tested using the Shapiro-Wilk test. The chi-squared test was applied to assess the percentage of normal, primordial and developing follicles. The Kruskal-Wallis test was used to analyze the density of stromal cells, collagen fibers of the stromal and glycosaminoglycans, followed by Dunn's post-hoc test with Bonferroni adjustment. Student's t-test was used to compare the groups in pairs with regard to the collagen fibers immediately around the follicles (50 μm). DPPH and ABTS were analyzed using the variance test (ANOVA) with multiple comparison between pairs using the Tukey test. In addition to statistical significance, the effect size was included in the analysis to measure the magnitude of the differences observed between the groups, thus providing a more robust estimate of the practical relevance of the findings. This was done using the partial epsilon square (ϵ_p^2), which is particularly appropriate for variables with non-normal distributions in some of the analyses mentioned. The reference values used were: small effect (< 0.08), medium (0.08-0.26) and large (> 0.26), as suggested by Tomczak and Tomczak (2014). The results were presented as mean $\pm$ SD, and significant differences were considered for values of $P < 0.05$.

3. Results

3.1 DPPH and ABTS free radical scavenging activity of CAEO (DPPH and ABTS)

The CAEO showed high inhibition of ABTS and DPPH free radicals. The IC₅₀ values for DPPH and ABTS were 9.37 ± 0.012 mg/mL and 9.29 ± 0.007 mg/mL, respectively, as shown in Table 1.

Table 1. Determination of the total antioxidant activity of the pure ethanolic extract of CAEO, through the ABTS and DPPH radicals scavenging methods.

Method	Sample	Parameters	IC ₅₀ (mg/mL)	R-square
DPPH scavenging assay	CAEO	IC ₅₀ (μg/mL)	9.37 ± 0.012^A	0.996
	AA	IC ₅₀ (μg/mL)	3.50 ± 0.021^B	0.098
ABTS scavenging assay	CAEO	IC ₅₀ (μg/mL)	9.29 ± 0.007^a	0.996
	AA	IC ₅₀ (μg/mL)	2.95 ± 0.013^b	0.098

3.2 Effects of CAEO on follicular morphology

Histological evaluation revealed a significant increase in the percentage of normal follicles in ovarian tissues cultured with 1, 10, and 100 μg/mL CAEO related to the cultured control ($P < 0.05$). However, the uncultured group exhibited higher level than cultured groups ($P < 0.05$) (Figure 1). There were no significant differences between CAEO treatments.

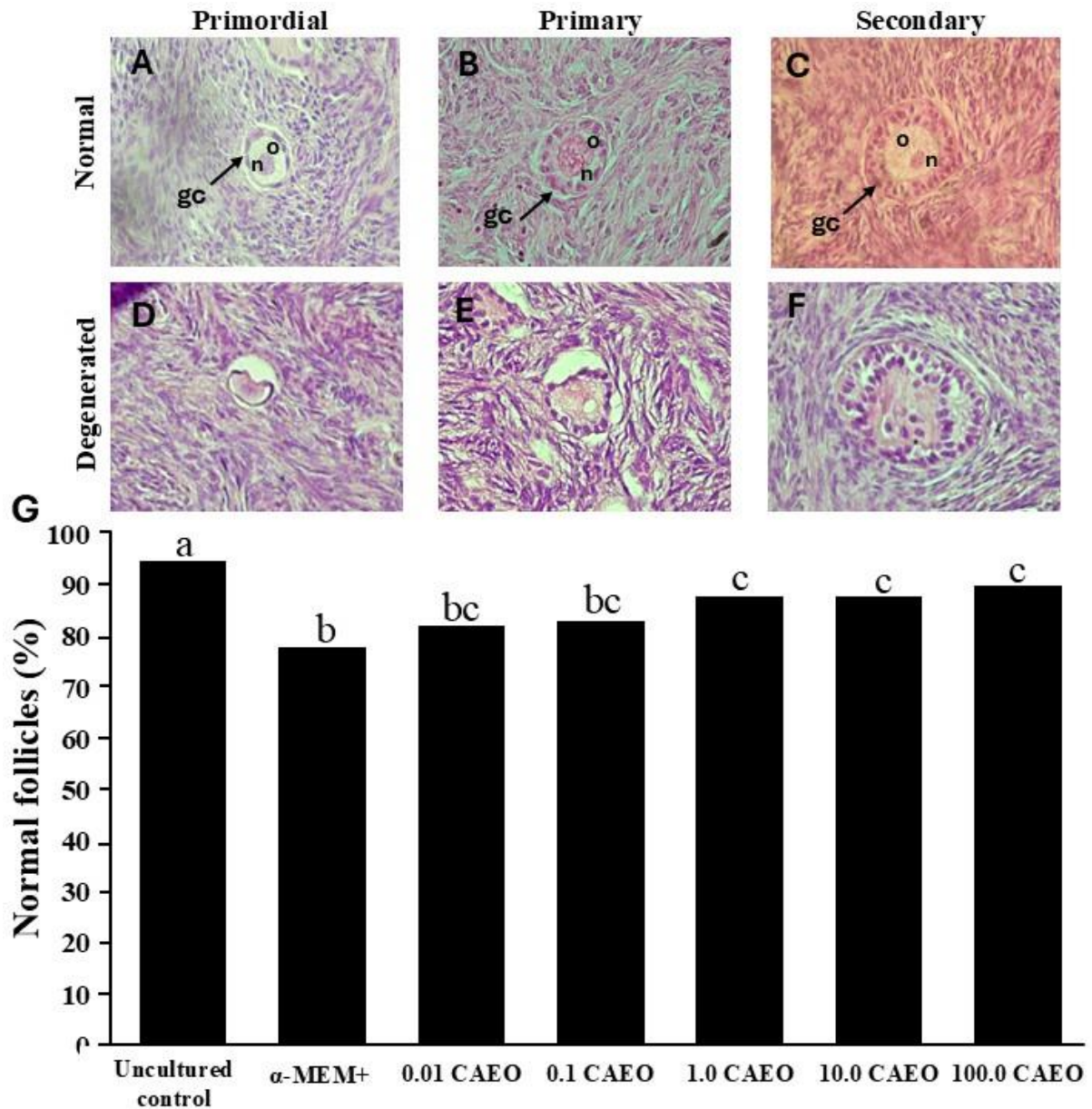


Figure 1. Morphology (A–F) and percentages (G) of normal follicles in uncultured samples and in samples cultured for 6 days in control medium alone (α -MEM⁺) or with 0.01, 0.1, 1.0, 10.0 or 100.0 μ g/mL CAEO. Normal follicles (A–C) degenerated (D–F). Granulosa cells (gc); oocyte (o); oocyte nucleus (n). Scale bar: 100 μ m: a–c: statistically significant differences between treatments.

3.3 Effects of CAEO on activation and development of primordial follicles

After ovarian cortex culture, a reduction in the percentage of primordial follicles and an increase in the percentage of developing follicles were observed in all treatments, when compared to the uncultured control ($P < 0.05$) (Figure 2). However, CAEO supplementation in the culture medium did not exert a significant influence on follicular development ($P > 0.05$).

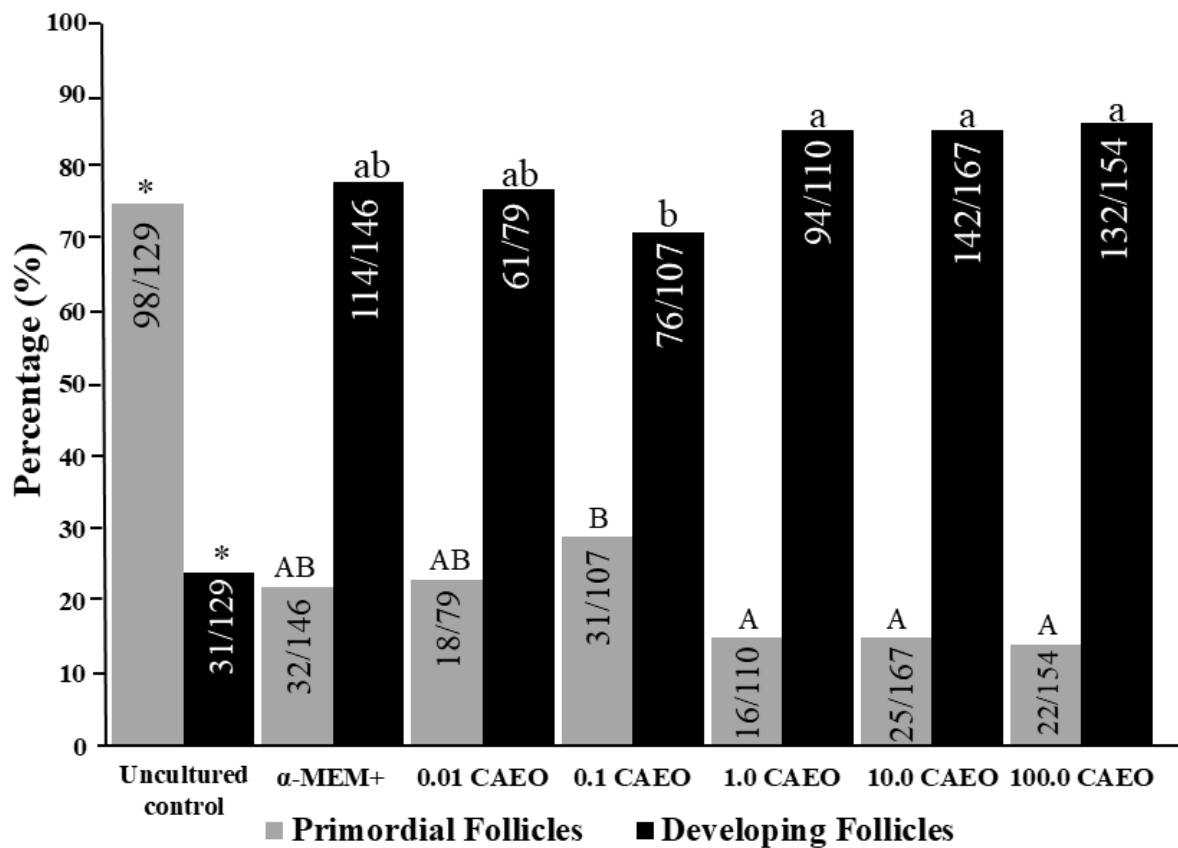


Figure 2. Percentages of primordial and developing follicles in uncultured and in 6-day cultured samples in control medium alone (α -MEM⁺) or with 0.01, 0.1, 1.0, 10.0 or 100.0 μ g/mL CAEO. (A-B) and (a-b): statistically significant differences between treatments. *Differs significantly from uncultured tissues. Numbers of primordial and developing follicles evaluated are shown within each column.

3.4 Assessment of collagen fibers and glycosaminoglycan and stromal cell density

After culturing, the CAEO-treated tissues showed no reduction in the percentage of collagen fibers compared to the uncultured control ($P > 0.05$) (Figure 3). However, both the uncultured control and CAEO-treated tissues showed significant differences compared to the α -MEM⁺ cultured control ($P < 0.05$). No differences were observed between tissues cultured in medium supplemented with different concentrations of CAEO.

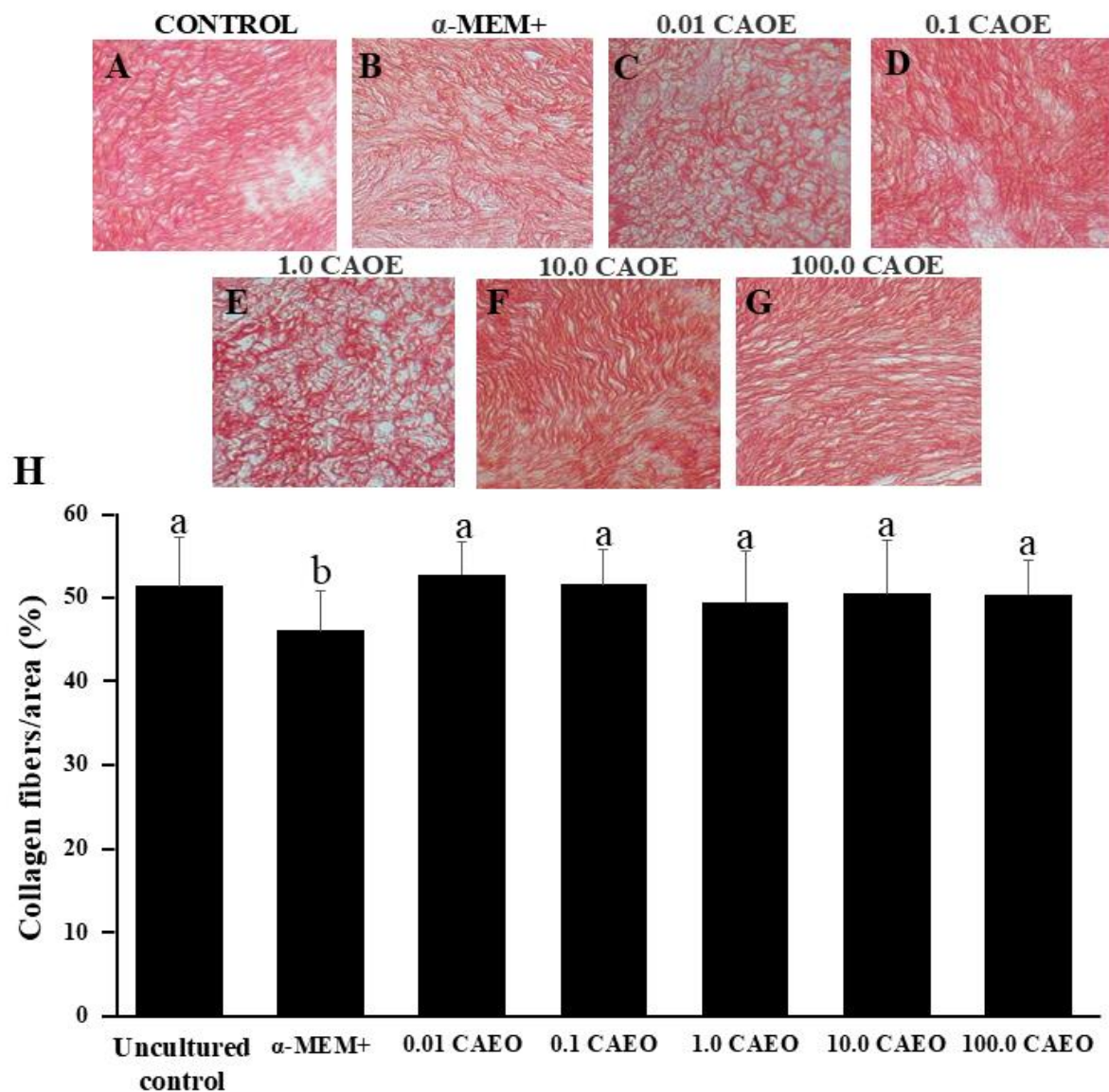


Figure 3. Morphology (A: Control, B: MEM⁺, C: 0.01 CAEO, D: 0.1 CAEO, E: 1.0 CAEO, F: 10.0 CAEO and G: 100.0 CAEO) and percentages (H) of collagen fiber area (mean $\pm$ SD) in uncultured samples and in samples cultured for 6 days in control medium alone (α -MEM⁺) or with 0.01, 0.1, 1.0, 10.0 or 100.0 μ g/mL CAEO. a, b: statistically significant differences between treatments. Scale bar = 100 μ m.

The table 2 shows the effect sizes (ϵ^2), confidence intervals (95% CI) and magnitude of the effects observed for collagen fibers after ovarian tissue culture. Overall, stronger effects were observed when compared to the α -MEM⁺ control, especially when compared to the CAEO-treated groups and the uncultured control.

Table 2. Effect size (ϵ^2) and confidence intervals (95% CI) for the density of collagen fibers in the different treatments.

Treatments	Size effect (ϵ^2)	IC 95% Lower-Upper	Magnitude of effect
Uncultured control vs. α -MEM ⁺	0.304	0.186 – 0.075	Large
Uncultured control vs. 0.01 CAEO	0.057	0.007 – 1.61×10^{-5}	Small
Uncultured control vs. 0.1 CAEO	0.032	1.04×10^{-6} – 3.17×10^{-5}	Small
Uncultured control vs. 1 CAEO	0.046	9.54×10^{-6} – 0.003	Small
Uncultured control vs. 10 CAEO	0.051	2.8×10^{-5} – 0.005	Small
Uncultured control vs. 100 CAEO	0.069	2.42×10^{-5} – 0.119	Small
α -MEM ⁺ vs. 0.01 CAEO	0.495	0.233 – 0.360	Large
α -MEM ⁺ vs. 0.1 CAEO	0.383	0.135 – 0.252	Large
α -MEM ⁺ vs. 1 CAEO	0.405	0.173 – 0.28	Large
α -MEM ⁺ vs. 10 CAEO	0.324	0.090 – 0.198	Large
α -MEM ⁺ vs. 100 CAEO	0.314	0.083 – 0.186	Large
100 CAEO vs. 0.01 CAEO	0.154	0.007 – 0.058	Large
100 CAEO vs. 0.1 CAEO	0.075	5.67×10^{-5} – 0.014	Small

100CAEO vs. 1 CAEO	0.102	0.0005 – 0.0292	Large
100 CAEO vs. 10 CAEO	0.039	7.44×10^{-6} – 0.0016	Small
10 CAEO vs. 0.01 CAEO	0.043	0.0028 – 0.0123	Small
10 CAEO vs. 0.1 CAEO	0.005	1.72×10^{-5} – 0.0595	Small
10 CAEO vs. 1 CAEO	0.050	0.0040 – 0.136	Small
1 CAEO vs. 0.01 CAEO	0.0376	0.0002 – 0.136	Small
1 CAEO vs. 0.1 CAEO	0.614	7.55×10^{-6} – 0.36	Large
0.1 CAEO vs. 0.01 CAEO	0.064	0.0123 – 0.0648	Small

After culturing the ovarian tissue, there was a significant reduction in the percentage of collagen fibers surrounding the primary follicles compared to the primordial follicles in the CAEO, α -MEM⁺ (cultured control), and uncultured control groups ($P < 0.05$) (Figure 4). However, no significant differences were observed between follicles at the same stage of development in the different experimental groups.

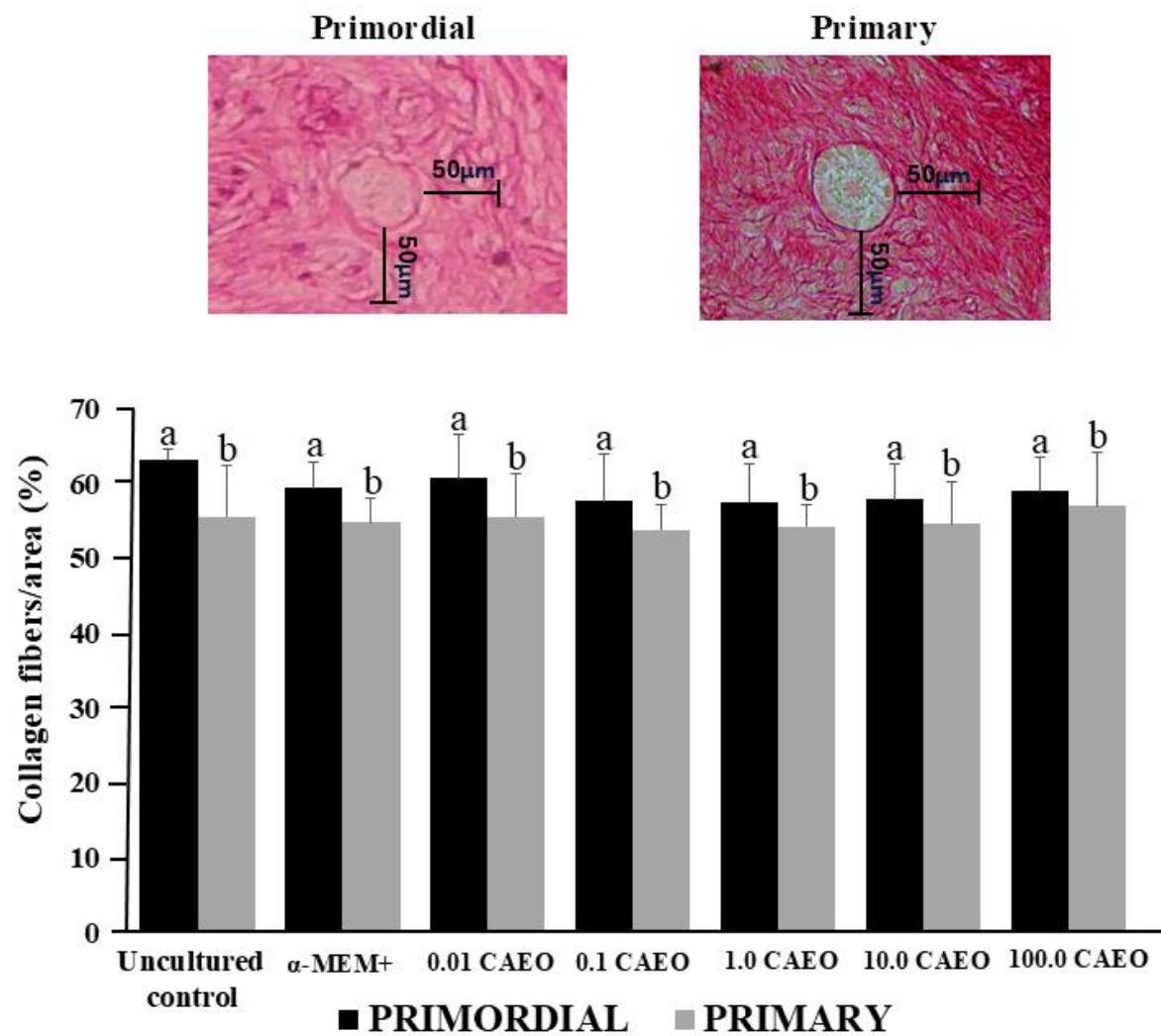


Figure 4. Quantitative measurements of collagen density in a 50 μm^2 area around primordial and primary follicles before and after cultured for 6 days in control medium alone (α -MEM⁺) or with 0.01, 0.1, 1.0, 10.0 or 100.0 $\mu\text{g/mL}$ CAEO. (a-b: statistically significant differences between treatments or follicular categories)

After six days of culture, the percentage of GAGs in the tissues cultured with CAEO or α -MEM⁺ (cultured control) did not differ from the uncultured control ($P > 0.05$) (Figure 5). Furthermore, no difference was found in the percentage of GAGs between the tissues cultured with CAEO and α -MEM⁺ (cultured control), nor between the different treatments with CAEO.

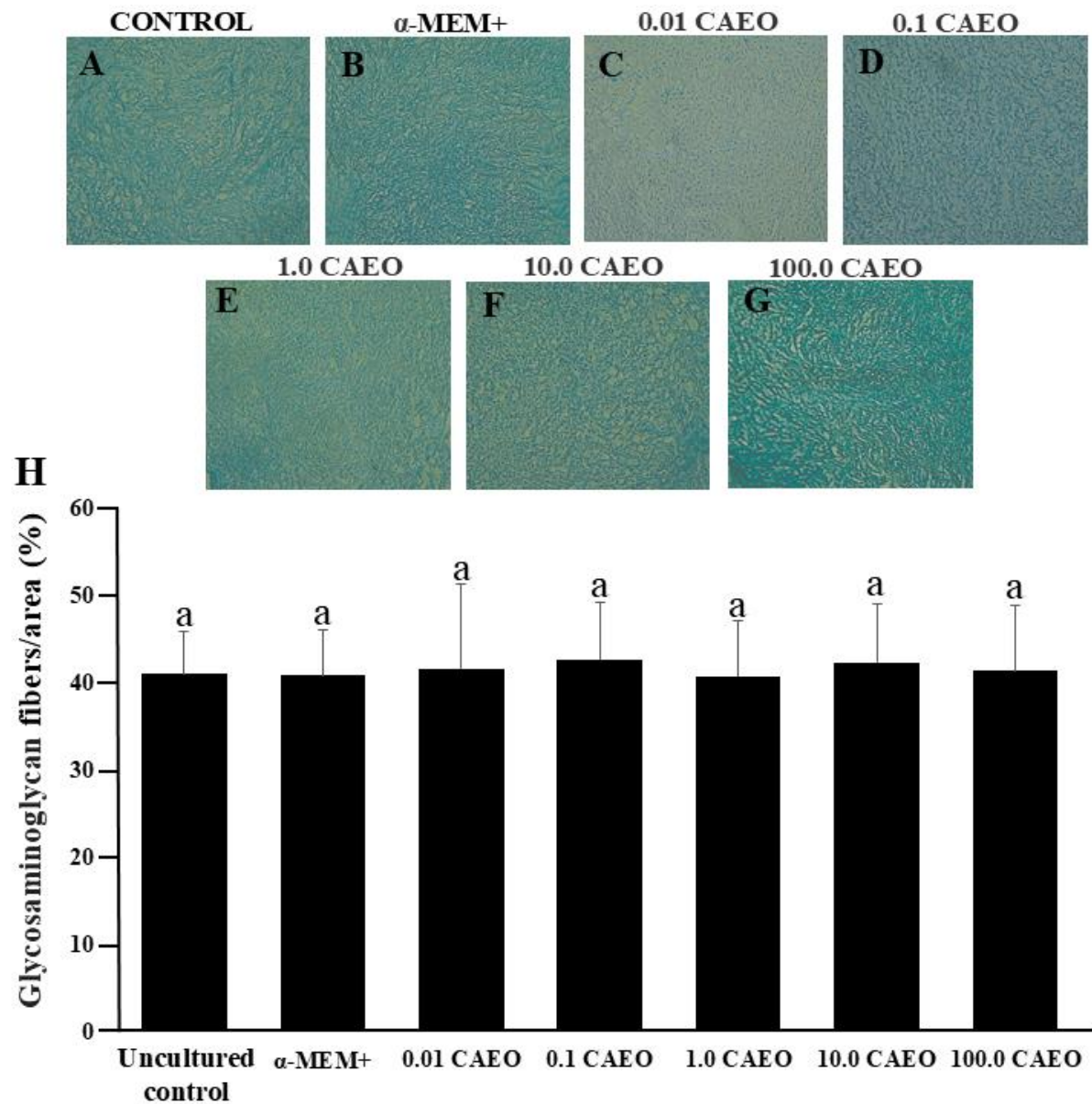


Figure 5. Morphology (A: Uncultured Control, B: α -MEM⁺, C: 0.01 CAEO, D: 0.1 CAEO, E: 1.0 CAEO, F: 10.0 CAEO and G: 100.0 CAEO) and percentages (**H**) of GAGs area (mean $\pm$ SD) in uncultured samples and in samples cultured for 6 days in control medium alone (α -MEM⁺) or with 0.01, 0.1, 1.0, 10.0 or 100.0 μ g/mL CAEO. a-b: statistically significant differences between treatments. Scale bar = 100 μ m.

The table 3 shows the effect sizes (ϵ^2), 95% CI and magnitude of the observed effects on the percentage of GAGs after ovarian tissue culture. The analysis showed small effect sizes, indicating that the addition of CAEO did not promote significant changes in GAG levels

compared to both α -MEM⁺ and the uncultured control.

Table 3. Effect size (ϵ^2) and confidence intervals (95% CI) for the GAGs in the different treatments.

Treatments	Size effect (ϵ^2)	IC 95% Lower-Upper	Magnitude of effect
Uncultured control vs. α -MEM ⁺	0.055	$6.15 \times 10^{-6} - 0.003$	Small
Uncultured control vs. 0.01 CAEO	0.004	$1.66 \times 10^{-5} - 0.055$	Small
Uncultured control vs. 0.1 CAEO	0.074	$1.97 \times 10^{-5} - 0.012$	Small
Uncultured control vs. 1 CAEO	0.079	$5.25 \times 10^{-5} - 0.135$	Small
Uncultured control vs. 10 CAEO	0.051	$1.05 \times 10^{-5} - 0.005$	Small
Uncultured control vs. 100 CAEO	0.035	$1.08 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-4}$	Small
α -MEM ⁺ vs. 0.01 CAEO	0.03	$9.37 \times 10^{-6} - 0.0009$	Small
α -MEM ⁺ vs. 0.1 CAEO	0.023	$0.0001 - 0.0936$	Small
α -MEM ⁺ vs. 1 CAEO	0.049	$4.92 \times 10^{-6} - 0.002$	Small
α -MEM ⁺ vs. 10 CAEO	0.067	$6.093 \times 10^{-5} - 0.114$	Small
α -MEM ⁺ vs. 100 CAEO	0.036	$7.69 \times 10^{-6} - 0.463$	Small
100 CAEO vs. 0.01	0.057	$2.16 \times 10^{-5} - 0.007$	Small
100 CAEO vs. 0.1 CAEO	0.732	$2.37 \times 10^{-5} - 0.00008$	Small
100 CAEO vs. 1 CAEO	0.044	$1.8 \times 10^{-5} - 0.0028$	Small
100 CAEO vs. 10 CAEO	0.023	$0.0001 - 0.0932$	Small
10 CAEO vs. 0.01 CAEO	0.012	$3.71 \times 10^{-5} - 0.0725$	Small
10 CAEO vs. 0.1 CAEO	9.73×10^{-5}	$6.59 \times 10^{-6} - 0.0325$	Small
10 CAEO vs. 1 CAEO	0.021	$0.0001 - 0.086$	Small
1 CAEO vs. 0.01 CAEO	0.040	$4.92 \times 10^{-6} - 0.0403$	Small
1 CAEO vs. 0.1 CAEO	0.119	$0.0004 - 0.031$	Large
0.01 CAEO vs. 0.1 CAEO	0.0366	$6.89 \times 10^{-6} - 0.0001$	Small

Cultured ovarian tissues showed a reduction in stromal cell density compared to uncultured tissues (Figure 6). However, ovarian tissues cultured with 100.0 μ g/mL CAEO were able to increase stromal density when compared to tissues cultured with α -MEM⁺ ($P < 0.05$).

There was no significant difference between treatments with different concentrations of CAEO ($P > 0.05$).

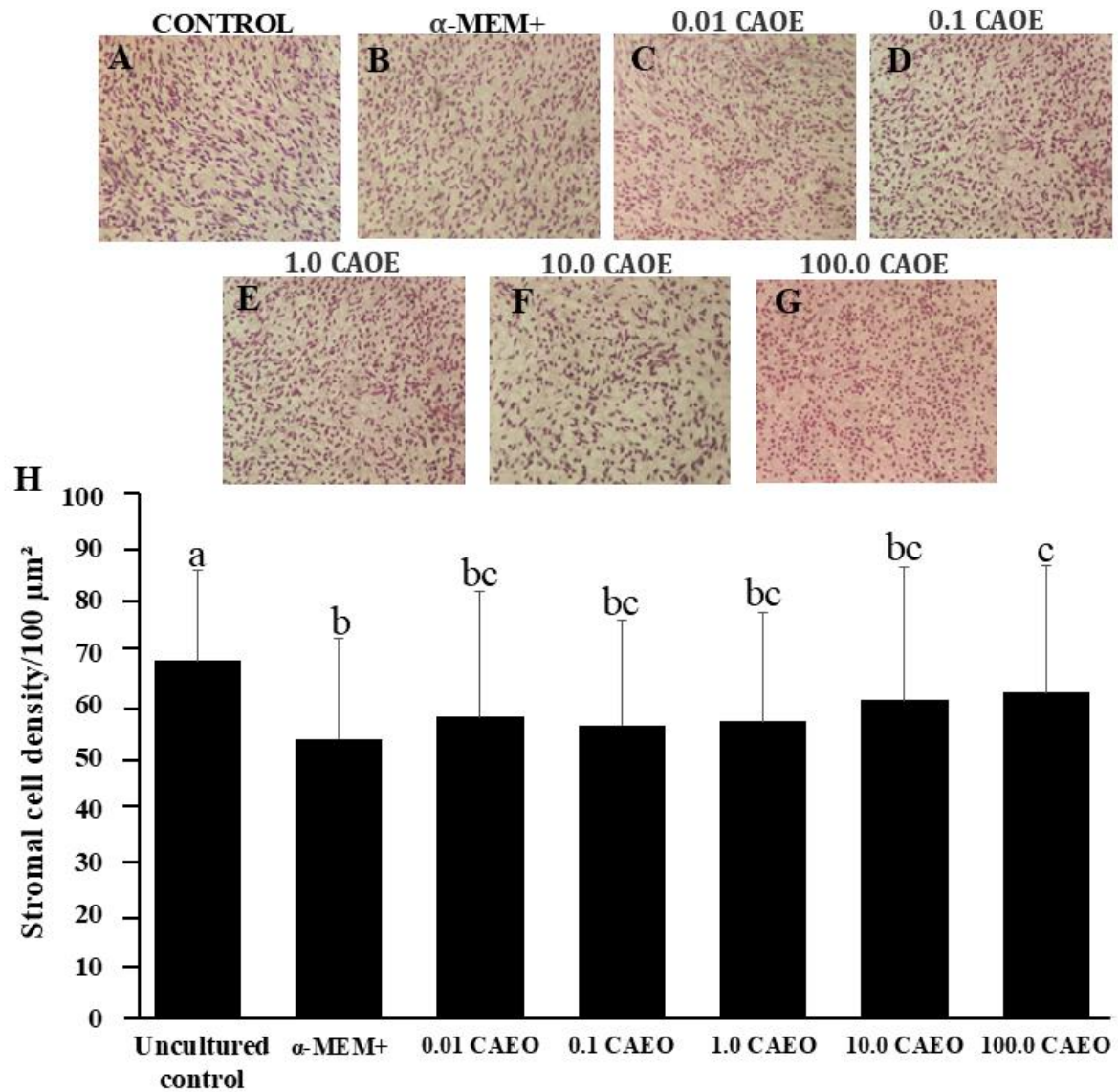


Figure 6. Morphology (A: Control, B: α -MEM⁺, C: 0.01 CAEO, D: 0.1 CAEO, E: 1.0 CAEO, F: 10.0 CAEO and G: 100.0 CAEO) and number (mean $\pm$ SD) of stromal cells (H) in uncultured samples and in samples cultured for 6 days in control medium alone (α -MEM⁺) or with 0.01, 0.1, 1.0, 10.0 or 100.0 $\mu\text{g/mL}$ CAEO. a–c statistically significant differences between treatments. Scale bar = 100 μm .

Table 4. Shows the effect sizes (ϵ^2), 95% CI and the magnitude of the effects observed for stromal cells. The comparison between the uncultured control and the CAEO treated groups showed moderate effect sizes at the lower concentrations and small ones at the higher concentrations. The effect between the uncultured control and the α -MEM⁺ group was moderate. On the other hand, all concentrations of CAEO showed large effects compared to α -MEM⁺. The effect sizes of the CAEO treatments were small.

Table 4. Effect size (ϵ^2) and confidence intervals (95% CI) for the stromal cells in the different treatments.

Treatments	Size effect (ϵ^2)	IC 95% Lower-Upper	Magnitude of effect
Uncultured control vs. MEM ⁺	0.149	0.082 – 0.226	Moderate
Uncultured control vs. 0.01 CAEO	0.087	0.035 – 0.161	Moderate
Uncultured control vs. 0.1 CAEO	0.106	0.050 – 0.179	Moderate
Uncultured control vs. 1 CAEO	0.068	0.023– 0.127	Small
Uncultured control vs. 10 CAEO	0.038	0.007 – 0.090	Small
Uncultured control vs. 100 CAEO	0.029	0.003 – 0.077	Small
α -MEM ⁺ vs. 0.01 CAEO	0.534	0.404 – 0.650	Large
α -MEM ⁺ vs. 0.1 CAEO	0.525	0.381 – 0.635	Large
α -MEM ⁺ vs. 1 CAEO	0.462	0.313 – 0.589	Large
α -MEM ⁺ vs. 10 CAEO	0.377	0.234 – 0.530	Large
α -MEM ⁺ vs. 100 CAEO	0.600	0.476 – 0.686	Large
100 CAEO vs. 0.01 CAEO	0.0103	0.0001 – 0.042	Small
100 CAEO vs. 0.1 CAEO	0.0135	0.0002 – 0.053	Small
100 CAEO vs. 1 CAEO	0.0279	0.002 – 0.071	Small
100 CAEO vs. 10 CAEO	0.0013	3.59×10^{-6} – 0.021	Small
10 CAEO vs. 0.01 CAEO	0.004	1.91×10^{-5} – 0.029	Small
10 CAEO V 0.1 CAEO	0.005	2.34×10^{-5} – 0.033	Small
10 CAEO vs. 1 CAEO	0.015	0.0002 – 0.055	Small
1 CAEO vs. 0.01	0.002	9.91×10^{-6} – 0.023	Small
1 CAEO vs. 0.1 CAEO	0.002	9.72×10^{-6} – 0.027	Small

0.01 CAEO vs. 0.1 CAEO	4.58×10^{-7}	$1.94 \times 10^{-6} - 0.015$	Small
------------------------	-----------------------	-------------------------------	-------

4. Discussion

This study shows the high antioxidant activity of CAEO against DPPH and ABTS radicals. According to Da Silva et al. (2024), the main compounds present in essential oils are crucial in determining their biological properties. In this sense, Vasconcelos et al. (2023) show that α -pinene (54.74%) is the main constituent followed by bicyclogermacrene (15.96%) in CAEO. Alpha-pinene has been shown to attenuate oxidative stress by increasing the activity of antioxidant enzymes and reducing apoptosis in PC12 cells (Porres-Martinez et al., 2016). Furthermore, the synergism between α -pinene and the other compounds such as bicyclogermacrene can improve the biological properties in CAEO, as shown in previous studies where bicyclogermacrene was present in high concentrations in essential oils (Formagio et al., 2022; Zhao et al., 2024).

In our study, concentrations of 1.0, 10.0 and 100.0 $\mu\text{g/mL}$ of CAEO showed higher rates of morphologically healthy follicles when compared to the cultured control. Azevedo et al. (2024) reported that α -pinene promoted greater follicular survival in bovine ovarian tissue cultured in vitro. These benefits could be due to the regulation of redox homeostasis by CAEO. The action of ROS, particularly hydrogen peroxide (H_2O_2), has been shown to cause damage to granulosa cells, leading to a reduction in anti-apoptotic agents such as Bcl-2, Bcl-xL and Mcl-1 in ovarian follicles (Yang et al., 2017). Many studies have demonstrated the antioxidant capacity of secondary metabolites, such as phenolic compounds, to prevent ROS-induced lipid peroxidation (Da Silva et al., 2024; Araújo et al., 2014; Costa, M. et al., 2017).

Our results show that CAEO at all concentrations maintains collagen fibres in the extracellular matrix of bovine ovarian tissue cultured in vitro compared to the uncultured control, promoting tissue support for follicular growth. The ovarian ECM responds to

biomechanical stimuli that effect the structural support required for follicular development (Shah et al., 2018). The antioxidant effect of CAEO may have contributed to the preservation of the ECM, as reactive oxygen species cause significant damage to proteins, compromising their integrity (Feng et al., 2021). Costa et al. (2025) reported that in vitro culture of bovine ovarian tissue significantly reduced collagen fibers in regions parallel to the ovarian follicles and that the use of antioxidants improved collagen fibril density. The ECM is critical for maintaining ovarian tissue function and is involved in regulating follicle development and facilitating cell aggregation to restore cell-cell interactions for oocyte survival (Nason-Tomaszewski et al., 2023; Shuyuan et al., 2023). It also actively participates in the mechanotransduction process within the tissue environment, promoting tissue remodeling through cell-cell and cell-ECM interactions (Muncie and Weaver, 2020). As reviewed by d'Angelo et al. (2019), this mechanism involves integrin-mediated focal adhesions that connect cells to the ECM and associate with the cytoskeleton, resulting in the formation of focal adhesion zones (FAZs) that promote mechanical cell-ECM coupling. In addition, we observed a lower collagen density immediately around primary follicles compared to primordial follicles. This peri-follicular remodelling has been suggested to facilitate follicular activation by reducing mechanical tension (Nagamatsu et al., 2019). Furthermore, the transition from primordial to primary follicle is influenced by the ECM composition of the ovarian follicle, including integrins and collagens, highlighting the importance of mechanotransduction and cell-matrix-mediated signaling at this stage of follicular development (Bernabé et al., 2020). Previous in vitro studies in cattle and mice suggest that the decrease in collagen density around developing follicles and in the stromal environment is related to the balance between quiescence and follicular development (Nagamatsu et al., 2019; Parkes et al., 2021). Lind et al. (2006) reported collagen remodeling in human ovaries under physiological conditions, with a reduction in collagens I and III around dominant follicles in the pre-ovulatory stage, which is essential for

ovulation. A similar phenomenon has been observed in mice, with degradation of the ECM (~40 μm) around pre-ovulatory follicles (Zhang et al., 2024). These findings highlight the critical role of the ECM in regulating follicular development.

In the present study, CAEO in all concentrations maintained high levels of GAG levels in all concentrations culture period compared to the uncultured control and cultured, regardless of treatment. In contrast to our results, Costa et al. (2025), when evaluating the composition of GAGs in bovine ovarian tissue after culture, reported a reduction in GAGs in tissues cultured only with $\alpha\text{-MEM}^+$ base medium, highlighting oxidative stress as a limiting factor in culture without the use of antioxidants. In this context, the use of CAEO as an antioxidant was shown to be effective in attenuating the ROS-induced decrease in GAGs. GAGs play a crucial role in the ECM, regulating fluid homeostasis, lubrication, and mechanical resistance, as well as influencing the formation and properties of collagen fibers (Kalbitzer et al., 2015).

Our results show that 100.0 $\mu\text{g/mL}$ CAEO preserved stromal cells after six-day-culture. These findings are relevant considering the critical importance of autocrine and paracrine interactions in the transition from primordial to primary follicles, a complex phase to replicate in vitro due to the high number of intercellular communications (Bernabé et al., 2020). Furthermore, Grubliauskaitė et al. (2023) observed that during 7 days of in vitro culture, stromal cells play an essential role in follicle health and activation producing specific cytokines and growth key-factors. Our findings agree with Azevedo et al. (2024) that reported that the α -pinene, improved stromal density and ECM integrity of bovine ovarian tissue cultured in vitro. In addition, α -pinene maintained cell viability and morphology in U373-MG cells (Porres-Martinez et al., 2015).

5. Conclusions

The presence of 100.0 $\mu\text{g/mL}$ CAEO in culture medium improved follicle survival,

maintenance of collagen and glycosaminoglycan levels, and contributed to keep ECM integrity. In addition, CAEO increased the stromal cell density during in vitro culture of bovine ovarian tissue, enhanced essential interactions between follicle and somatic cells. These findings support the use of CAEO as a promising supplement for improving in vitro ovarian tissue culture conditions in reproductive biotechnology.

Author contribution statement

Emanoel da S. Félix: in vitro culture of tissues and preparation of first draft. **Venância A. N. Azevedo:** contributed to the experiment with ovarian tissue, contributed to the statistical analysis of the data and the evaluation of collagen fibers. **Ernando I. T.:** de Assis contributed to the experiment with ovarian tissue. **Felipe F. da Silva:** worked on the experiment with ovarian tissue, histological processing and analysis of stromal cells. **Solano D. Martins,** data collection and acquisition. **Valdevane R. Araujo,** data collection and acquisition. **Geovany A. Gomes,** data collection and acquisition. **José R. V. Silva:** planned the experiment and performed the critical review of the manuscript. All authors participated in the review, reading and approval of the final version of the manuscript.

Financial support

This work was supported by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

Declaration of Competing Interest

The authors report no declarations of interest

References

- Agarwal, A., Majzoub, A. (2017). Role of antioxidants in assisted reproductive techniques. *The World Journal of Men's Health*, 35(2), 77–93. <https://doi.org/10.5534/wjmh.2017.35.2.77>.
- Araújo, S. S., Aidar, F. J., Matos, D. G. D., Santos, J. L. D., Vieira Souza, L. M., Silva, A. N. D., Estevam, C. D. S. (2019). Does *Croton argyrophyllus* extract have an effect on muscle damage and lipid peroxidation in rats submitted to high-intensity strength exercise? *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(21), 4237. <https://doi.org/10.3390/ijerph16214237>.
- Araújo, S. S., Santos, M. I. S., Dias, A. S., Ferro, J. N. S., Lima, R. N., Barreto, E. O., Corrêa, C. B., Araújo, B. S., Lauton-Santos, S., Shan, A. Y. K., Alves, P. B. Santana, A. E. G., Thomazzi, S. M., Antonioli, A. R. Estevam, C. S. (2014). Chemical composition and cytotoxicity analysis of the essential oil from leaves of *Croton argyrophyllus* Kunth. *Journal of Essential Oil Research*, 26(6), 446–451. <https://doi.org/10.1080/10412905.2014.956233>.
- Azevedo, V. A. N., De Assis, E. I. T., Silva, A. W. B., Costa, F. D. C., Souza, L. F., Silva, J. R. V. (2024). α -Pinene improves follicle morphology and increases the expression of mRNA for nuclear factor erythroid 2-related factor 2 and peroxiredoxin 6 in bovine ovarian tissues cultured *in vitro*. *Animals (Basel)*, 14(10), 1443. <https://doi.org/10.3390/ani14101443>.
- Bannister, J. V., & Calabrese, L. (1987). Assays for superoxide dismutase. *Methods of Biochemical Analysis*, 32, 279–312. <https://doi.org/10.1002/9780470110539.ch5>.
- Brito, S. S., Silva, F., Malheiro, R., Baptista, P., & Pereira, J. A. (2018). *Croton argyrophyllus* Kunth and *Croton heliotropiifolius* Kunth: Phytochemical characterization and bioactive properties. *Industrial crops and products*, 113, 308–315. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.01.044>.
- Becker, M. M., Nunes, G. S., Ribeiro, D. B., Silva, F. E., Catanante, G., Marty, J. L. (2019). Determination of the antioxidant capacity of red fruits by miniaturized spectrophotometry assays. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 30(5), 1108–1114. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190003>.
- Barrozo LG, Paulino LRFM, Silva BR, Barbalho EC, Nascimento DR, Neto MFL, Silva JRV (2021). N-acetyl-cysteine and the control of oxidative stress during *in vitro* ovarian follicle growth, oocyte maturation, embryo development and cryopreservation. *Anim Reprod Sci*. Aug;231:106801. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106801>.
- Bernabé, B. P., Woodruff, T., Broadbelt, L. J., Shea, L. D. (2020). Ligantes, receptores e fatores de transcrição que mediam a comunicação intercelular e intracelular durante o desenvolvimento do folículo ovariano. *Reproductive Sciences*, 27(5), 690–703. <https://doi.org/10.1007/s43032-019-00075-8>.
- Bizarro-Silva, C., & Seneda, M. M. (2021). Cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais bovinos: revisão, desafios, conquistas e perspectivas futuras. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 45(3), 131–147. <https://doi.org/10.21451/1809-3000.RBRA2021.017>.

- Cavalcante, B. N., Matos-Brito, B. G., Paulino, L. R. F. M., Silva, B. R., Aguiar, A. W. M., DE Almeida, E. F. M., Souza, A. L. P., Vasconcelos, G. L., De Assis, E. I. T., Silva, A. W. B. and Silva, J. R. V. (2019). Effects of melatonin on morphology and development of primordial follicles during in vitro culture of bovine ovarian tissue. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(12), 1567–1573. <https://doi.org/10.1111/rda.13565>.
- Celestino, J. J. H., Santos, R. R., Martins, F. S., Matos, M. H. T., Figueiredo, J. R., Costa, S. H. F., Silva, J. R. V., Rodrigues, A. P. R. (2007). Preservation of bovine preantral follicles in 0.9% saline solution or TCM 199. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 59(3), 591–599. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352007000300007>.
- Costa, F. C., Silva, B. R., Filho, F. F. C., Bezerra, V. S., Azevedo, V. A. N., Silva, A. A., & Silva, J. R. V. (2025). Ascorbic acid and resveratrol improve the structural integrity of the extracellular matrix and enhance follicular survival in cultured bovine ovarian tissue. *Theriogenology*, 235, 231-244. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2025.01.020>.
- Costa F. C, Vasconcelos EM, Azevedo VAN, Teixeira de Assis EI, Paulino LRFM, Silva AWB, Silva JRV, Batista ALPS (2022b). *Aloe vera* increases collagen fibres in extracellular matrix and mRNA expression of peroxiredoxin-6 in bovine ovarian cortical tissues cultured *in vitro*. *Zygote*. 365-372. <https://doi.org/10.1017/S0967199421000824>.
- Costa, M., Santos, R., Gualberto, S., Silva, S. L. (2017). Fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de extratos de *Croton argyrophyllus* Kunth (Euphorbiaceae). *Enciclopédia Biosfera*, 14(25). https://doi.org/10.18677/EnciBio_2017A53.
- D'Angelo, M., Benedetti, E., Tupone, M. G., Catanesi, M., Castelli, V., Antonosante, A., & Cimini, A. (2019). The role of stiffness in cell reprogramming: a potential role for biomaterials in inducing tissue regeneration. *Cells*, 8(9), 1036. <https://doi.org/10.3390/cells8091036>.
- Da Silva, F. F., das Chagas Costa, F., Azevedo, V. A. N., et al. (2024). *Croton grewoides* essential oil and anethole reduce oxidative stress and improve growth of bovine primordial follicles during culture of ovarian tissue. *J Pharmacy Pharmacology*, 76(12), 1609–1619. <https://doi.org/10.1093/jpp/rgae093>.
- Feng J, Li Y, Jin X, Gong R, Xia Z. ATF3 regulates oxidative stress and extracellular matrix degradation via p38/Nrf2 signaling pathway in pelvic organ prolapse. *Tissue Cell*. 2021 Dec;73:101660. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2021.101660>.
- Figueiredo, J. D., & Lima, L. D. (2017). Artificial ovary technology: applications, state of art, limitations and prospects.
- Formagio, A. S. N., Vilegas, W., Volobuff, C. R. F., et al. (2022). Exploration of essential oil from *Psychotria poeppigiana* as an anti-hyperalgesic and anti-acetylcholinesterase agent: Chemical composition, biological activity and molecular docking. *Journal of Ethnopharmacology*, 296, 115220. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115220>.
- Grubliauskaitė M, Vlieghe H, Moghassemi S, Dadashzadeh A, Camboni A, Gudlevičienė Ž, Amorim CA (2023). Influence of ovarian stromal cells on human ovarian follicle growth in a 3D environment. *Hum Reprod Open*. <https://doi.org/10.1093/hropen/hoad052>.

- Grosbois J, Bailie EC, Kelsey TW, Anderson RA, Telfer EE (2023). Spatio-temporal remodelling of the composition and architecture of the human ovarian cortical extracellular matrix during in vitro culture. *Human Reproduction*, 38(3), 444–458. <https://doi.org/10.1093/humrep/dead008>.
- Kalbitzer, L., Franke, K., Möller, S., Schnabelrauch, M., Pompe, T. (2015). Glycosaminoglycan functionalization of mechanically and topologically defined collagen I matrices. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(45), 8902–8910. <https://doi.org/10.1039/C5TB01737H>.
- Kinnear HM, Tomaszewski CE, Chang AL, Moravek MB, Xu M, Padmanabhan V, Shikanov A. The ovarian stroma as a new frontier (2020). *Reproduction*. Sep;160(3):R25-R39. <https://doi.org/10.1530/rep-19-0501>.
- Lind, A. K., Weijdegård, B., Dahm-Kähler, P., Mölne, J., Sundfeldt, K., Brännström, M. (2006). Collagens in the human ovary and their changes in the perifollicular stroma during ovulation. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 85(12), 1476–1484. <https://doi.org/10.1080/00016340601033741>.
- Luderer, U. (2014). Ovarian toxicity from reactive oxygen species. *Vitamins & Hormones*, 94, 99–127. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800095-3.00004-3>.
- Muncie, J. M., Ayad, N. M. E., Lakins, J. N., Xue, X., Fu, J., & Weaver, V. M. (2020). Mechanical tension promotes formation of gastrulation-like nodes and patterns mesoderm specification in human embryonic stem cells. *Developmental Cell*, 55(6), 679–694.e11. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.10.015>.
- Nagamatsu, G., Shimamoto, S., Hamazaki, N., Nishimura, Y., Hayashi, K. (2019). Mechanical stress accompanied with nuclear rotation is involved in the dormant state of mouse oocytes. *Science Advances*, 5(4), eaav9960. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav9960>.
- Nason-Tomaszewski, C. E., Thomas, E. E., Matera, D. L., Baker, B. M., Shikanov, A. (2023). Extracellular matrix-templating fibrous hydrogels promote ovarian tissue remodeling and oocyte growth. *Bioactive Materials*, 32, 292–303. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2023.10.001>.
- Porres-Martínez, M., González-Burgos, E., Carretero, M. E., Gómez-Serranillos, M. P. (2015). Major selected monoterpenes α -pinene and 1,8-cineole found in *Salvia lavandulifolia* (Spanish sage) essential oil as regulators of cellular redox balance. *Pharmaceutical Biology*, 53(6), 921–929. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.950672>.
- Porres-Martínez, M., González-Burgos, E., Carretero, M.E., Gómez-Serranillos, M. P. (2016). In vitro neuroprotective potential of the monoterpenes α -pinene and 1,8-cineole against H₂O₂-induced oxidative stress in PC12 cells. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 71(7-8), 191–199. <https://doi.org/10.1515/znc-2014-4135>.
- Parkes, W.S., Amargant, F., Zhou, L.T., Villanueva, C.E., Duncan, F.E., Pritchard, M.T., 2021. Hyaluronan and collagen are prominent extracellular matrix components in bovine and porcine ovaries. *Genes (Basel)* 12 (8), 1186. <https://doi.org/10.3390/genes12081186>.

- Pascoletti G, Di Nardo M, Fragomeni G, Barbato V, Capriglione T, Gualtieri R, Zanetti EM (2020). Dynamic characterization of the biomechanical behaviour of bovine ovarian cortical tissue and its short-term effect on ovarian tissue and follicles. *Materials*, 13(17), 3759. <https://doi.org/10.3390/ma13173759>.
- Quintarelli, G., Dellovo, M.C. The chemical and histochemical properties of Alcian blue. *Histochemie* 5, 196–209 (1965). <https://doi.org/10.1007/BF00306128>.
- Rafie, H., Soheila, H., Grant, E. (2017). *Rosmarinus officinalis* (rosemary): A novel therapeutic agent for antioxidant, antimicrobial, anticancer, antidiabetic, antidepressant, neuroprotective, anti-inflammatory, and anti-obesity treatment. *Journal of Herbal Medicine*, 3(2), 8. <https://doi.org/10.21767/2472-0151.100028>.
- Ramos, J. M. O., Santos, C. A. D., Santana, D. G., Antoniolli, A. R., Santos, D. A., Alves, P. B., Thomazzi, S. M. (2017). Impact of *Croton argyrophyllus* essential oil on behavioral models of nociception. *Flavour and Fragrance Journal*, 32(1), 40–45. <https://doi.org/10.1002/ffj.3343>.
- Ramos, J. M. O., Santos, C. A., Santana, D. G., Santos, D. A., Alves, P. B., Thomazzi, S. M. (2013). Chemical constituents and potential anti-inflammatory activity of the essential oil from the leaves of *Croton argyrophyllus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23(4), 644–650. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000045>.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3).
- Riella, K. R., Marinho, R. R., Santos, J. S., Pereira-Filho, R. N., Cardoso, J. C., Albuquerque-Junior, R. L. C., & Thomazzi, S. M. (2012). Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 143(2), 656–663. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.07.028>.
- Rittié, L. (2017). Method for picrosirius red-polarization detection of collagen fibers in tissue sections. In *Fibrosis: Methods and Protocols* (pp. 395–407). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7113-8_26.
- RStudio Team. (2020). RStudio: Integrated development for R.
- Shah, J. S., Sabouni, R., Cayton Vaught, K. C., et al. (2018). Biomecânica e sinalização mecânica no ovário: uma revisão sistemática. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 35(8), 1135–1148. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1180-y>.
- Shuyuan, Y., Meimei, W., Fenghua, L., Huishan, Z., Min, C., Hongchu, B., & Xuemei, L. (2023). hUMSC transplantation restores follicle development in ovary damaged mice via re-establishment of extracellular matrix (ECM) components. *Journal of Ovarian Research*, 16(1), 172. <https://doi.org/10.1186/s13048-023-01217-y>.
- Scott JE, Carlsson IB, Bavister BD, Hovatta O (2004). Human ovarian tissue cultures:

- extracellular matrix composition, coating density and tissue dimensions. *Reproductive Biomedicine Online*, 9(3), 287–293. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)62143-8](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)62143-8).
- Telfer, E. E., Binnie, J. P., McCaffery, F. H., Campbell, B. K. (2000) In vitro development of oocytes from porcine and bovine primary follicles. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 25;163(1-2):117-23. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(00\)00216-1](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(00)00216-1).
- Telfer, E. E., McLaughlin, M., Ding, C., Thong, K. J. (2008). A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. *Human Reproduction*, 23(5), 1151–1158. <https://doi.org/10.1093/humrep/den070>.
- Tomczak, M., Tomczak, E. (2014). The need to report effect size estimates revisited. An overview of some recommended measures of effect size. *Trends in Sport Sciences*, 1(21): 19-25.
- Touyz, R. M., Rios, F. J., Alves-Lopes, R., Neves, K. B., Camargo, L. L., Montezano, A. C. (2020). Oxidative stress: A unifying paradigm in hypertension. *Canadian Journal of Cardiology*, 36(5), 659–670. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2020.02.081>.
- Tumilaar, S. G., Hardianto, A., Dohi, H., Kurnia, D. (2024). A comprehensive review of free radicals, oxidative stress, and antioxidants: Overview, clinical applications, global perspectives, future directions, and mechanisms of antioxidant activity of flavonoid compounds. *Journal of Chemistry*, (1), 5594386. <https://doi.org/10.1155/2024/5594386>.
- Vasconcelos, B. M., Pereira, A. M. G., Coelho, P. A. T., Cavalcante, R. M. B., Carneiro-Torres, D. S., Bandeira, P. N., Da Silva, F. F., Rodrigues, T. H. S., Gomes, G. A., Carneiro, V. A. (2023). Enhancement of chlorhexidine activity against planktonic and biofilm forms of oral streptococci by two *Croton* spp. essential oils from the Caatinga biome. *Biofouling*, 1–10. <https://doi.org/10.1080/08927014.2022.2159393>.
- Yang, H., Xie, Y., Yang, D., Ren, D. (2017). Oxidative stress-induced apoptosis in granulosa cells involves JNK, p53 and Puma. *Oncotarget*, 11;8(15):25310-25322. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15813>.
- Zhang, J., Xia, W., Zhou, J., Qin, S. Lin, L., Zhao, T., Wang, H., Mi, C., Hu, Y., Chen, Z., Tianhua, Z., Yang, X., Zhang, T., Xia, G., Ke, Y., Wang, C. (2024). Participation of preovulatory follicles in the activation of primordial follicles in mouse ovaries. *International Journal of Biological Sciences*, 20(10), 3863–3880. <https://doi.org/10.7150/ijbs.95020>.
- Zhou, J, Peng, X, Mei, S. (2019) Autophagy in ovarian follicular development and atresia. *International Journal of Biological Sciences*, 15(4):726. <https://doi.org/10.7150/ijbs.30369>.
- Zhao, T., Qin, W., Kang, S., Shu, X., Tai, Y., & Fan, G. (2024). Chemical composition and antioxidant, antimicrobial, enzyme inhibitory, and antiproliferative activities of *Lindera communis* leaf essential oil. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 27(1), 82–93. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2024.2311115>

8 CONCLUSÕES GERAIS

- A ativação folicular está associada com a remodelação da matriz extracelular do colágeno ao redor dos folículos (primordial e primário).
- O OECA, nas concentrações de 1,0; 10,0 e 100,0 µg/mL, preserva a morfologia dos folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano bovino durante o cultivo *in vitro*, em comparação ao meio controle (α -MEM⁺).
- O OECA independente da concentração mantém a quantidade de glicosaminoglicanos durante o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano bovino.
- O OECA independente da concentração mantém a quantidade de fibras colágenas durante o cultivo *in vitro* de tecido ovariano bovino, em comparação ao meio controle (α -MEM⁺).
- A presença de 100.0 µg/mL de OECA no meio preserva o estroma tecidual durante o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano bovino, em comparação ao meio controle (α -MEM⁺).

9 PERSPECTIVAS

Considerando os desafios para controlar o estresse oxidativo durante o cultivo folicular *in vitro*, à preservação morfológica dos folículos, células estromais e matriz extracelular em meio suplementado com óleo essencial de *Croton argyrophyllus* Kunth representa um importante avanço na melhoria do protocolo de cultivo *in vitro*. Os resultados apresentados no trabalho poderão auxiliar na compreensão dos efeitos do óleo essencial de *Croton argyrophyllus* Kunth como antioxidante na suplementação do meio de cultivo *in vitro* de folículos inclusos em tecido ovariano, na morfologia folicular, células estromais e matriz extracelular.

REFERÊNCIAS

- AERTS, J. M. J.; BOLS, P. E. J. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 1, p. 171-179, 2010.
- AGARWAL, A. et al. Oxidative stress and assisted reproduction: A comprehensive review of its pathophysiological role and strategies for optimizing embryo culture environment. **Antioxidants**, v. 11, n. 3, p. 477, 2022.
- AGARWAL, Ashok et al. Loupe-assisted vasovasostomy using a prolene stent: a simpler vasectomy reversal technique. **The World Journal of Men's Health**, v. 35, n. 2, p. 115-119, 2017.
- ARAÚJO, S. S. et al. Does *Croton argyrophyllus* extract has an effect on muscle damage and lipid peroxidation in rats submitted to high-intensity strength exercise? **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 21, p. 4237, 2019.
- ARAÚJO, V. R. et al. Addition of Medium Without Change Improves the Development of Bovine Preantral Follicles Cultured In Vitro. **Biology Reproduction**. 2012.
- ARAÚJO, V. R. et al. In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 12, p. 1-14, 2014.
- BARBATO, V. et al. Dynamic in vitro culture of bovine and human ovarian tissue enhances follicle progression and health. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 11773, 2023.
- BARRETTA, M. et al. Impact of human ovarian tissue manipulation on follicles: evidence of a potential first wave of follicle activation during fertility preservation procedures. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 40, n. 12, p. 2769-2776, 2023.
- BARROS, F. D. A. et al. Oxidative homeostasis in oocyte competence for in vitro embryo development. **Animal Science Journal**, v. 90, n. 10, p. 1343-1349, 2019.
- BARROZO, L. G. et al. N-acetyl-cysteine and the control of oxidative stress during in vitro ovarian follicle growth, oocyte maturation, embryo development and cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 231, p. 106801, 2021.
- BENOMARI, F. Z. et al. Essential oils from Algerian species of *Mentha* as new bio-control agents against phytopathogen strains. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 29889-29900, 2018.
- BIZARRO-SILVA, C.; SENEDA, M. M. Cultivo in vitro de folículos pré-antrais bovinos: revisão, desafios, conquistas e perspectivas futuras. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 45, n. 3, p. 131-147, 2021.
- BIZZO, H. R.; REZENDE, C. M. O mercado de óleos essenciais no Brasil e no mundo na última década. **Química Nova**, v. 45, p. 949-958, 2022.
- BOLDURA, O. M. et al. Utilization of rosmarinic and ascorbic acids for maturation culture media in order to increase sow oocyte quality prior to IVF. **Molecules**, v. 26, n. 23, p. 7215, 2021.
- BRITO, S. S. et al. *Croton argyrophyllus* Kunth and *Croton heliotropiifolius* Kunth: phytochemical characterization and bioactive properties. **Industrial Crops and Products**, v.

113, p. 308-315, 2018.

BAILLET, A.; MANDON-PEPIN, B. Mammalian ovary differentiation—a focus on female meiosis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 356, n. 1-2, p. 13-23, 2012.

BUNSE, M. et al. Essential oils as multicomponent mixtures and their potential for human health and well-being. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 956541, 2022.

BUTNARIU, M.; SARAC, I. Essential oils from plants. **Journal of Biotechnology and Biomedical Science**, v. 1, n. 4, p. 35-43, 2018.

CAJAS, Y. N. et al. Antioxidant nobiletin enhances oocyte maturation and subsequent embryo development and quality. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 15, p. 5340, 2020.

CARNEIRO, N. S. et al. Essential oil of flowers from *Eugenia klotzschiana* (Myrtaceae): chemical composition and in vitro trypanocidal and cytotoxic activities. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, p. 1381-1392, 2017.

CAVALCANTE, B. N. et al. Effects of melatonin on the morphology and development of primordial follicles during in vitro culture of bovine ovarian tissue. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, p. 1567-1573, 2019.

CAVALCANTI, D. F. G.; DA SILVEIRA, D. M.; DA SILVA, G. C. Aspectos e potencialidades biológicas do gênero *Croton* (Euphorbiaceae). **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 45931-45946, 2020.

CHATZIVASILEIOU, A. O. et al. Two-step pathway for isoprenoid synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 2, p. 506-511, 2019.

CHEN, J. et al. Ovarian tissue bank for fertility preservation and anti-menopause hormone replacement. **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, p. 950297, 2022.

CHEN, R. et al. STRIPAK integrates upstream signals to initiate the Hippo kinase cascade. **Nature Cell Biology**, v. 21, n. 12, p. 1565-1577, 2019.

CHEN, Y. et al. The factors and pathways regulating the activation of mammalian primordial follicles in vivo. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 575706, 2020.

CHENG, Y. et al. Promotion of ovarian follicle growth following mTOR activation: synergistic effects of AKT stimulators. **PloS One**, v. 10, n. 2, p. e0117769, 2015.

COLLIN, F. Chemical basis of reactive oxygen species reactivity and involvement in neurodegenerative diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 10, p. 2407, 2019.

CORDEIRO, I. et al. *Croton* in Lista de espécies da flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 201, 2014.

COSTA, C. B.; FAIR, T.; SENEDA, M. M. Ambiente do folículo ovulatório: modificações e uso de biotecnologias para aumentar a competência oocitária e a fertilidade em bovinos. **Animal**, v. 17, p. 100866, 2023.

COSTA, F. et al. Influência das espécies reativas de oxigênio durante o cultivo in vitro de oócitos e folículos ovarianos de mamíferos domésticos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 46, n. 1, p. 28-42, 2022.

- COSTA, M. et al. Fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de extratos de *Croton argyrophyllus* Kunth (Euphorbiaceae). **Enciclopédia Biosfera**, v. 14, n. 25, 2017.
- CROWE, A. D.; LONERGAN, P.; BUTLER, S. T. Invited review: Use of assisted reproduction techniques to accelerate genetic gain and increase the value of beef production in dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 12, p. 12189-12206, 2021.
- CRUZ, R. C. D. et al. Toxicological evaluation of essential oil from the leaves of *Croton argyrophyllus* (Euphorbiaceae) on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and *Mus musculus* (Rodentia: Muridae). **Journal of Medical Entomology**, v. 54, n. 4, p. 985-993, 2017.
- DA CRUZ, R. C. D. et al. Phytochemical and toxicological evaluation of a blend of essential oils of *Croton* species on *Aedes aegypti* and *Mus musculus*. **South African Journal of Botany**, v. 132, p. 188-195, 2020.
- DE SOUSA, D. P. et al. Essential oils: Chemistry and pharmacological activities. **Biomolecules**, v. 13, n. 7, p. 1144, 2023.
- DE SOUZA, M. R. et al. Caracterização florística e fitossociológica do componente lenhoso de um fragmento florestal de Caatinga em Serra do Mel, Rio Grande do Norte, Brasil. **Nativa**, v. 8, n. 3, p. 329-335, 2020.
- DEWICK, P. M. The mevalonate and methylerythritol phosphate pathways: terpenoids and steroids. **Medicinal Natural Products**, v. 5, p. 187-310, 2009.
- DEY, P. et al. Method of isolation and in vitro culture of primordial follicles in bovine animal model. In: **Germ Cell Development: Methods and Protocols**. New York, NY: Springer US, 2024. p. 171-182.
- DHIFI, W. et al. Caracterização química dos óleos essenciais e investigação de algumas atividades biológicas: uma revisão crítica. **Medicamentos**, v. 3, n. 4, p. 25, 2016.
- DIASS, K. et al. Biological and pharmaceutical properties of essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. and *Lavandula officinalis* L. Materials Today: **Proceedings**, v. 45, p. 7768-7773, 2021.
- DIVEKAR, P. A. et al. Plant secondary metabolites as defense tools against herbivores for sustainable crop protection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 5, p. 2690, 2022.
- DJILANI, Abdelouaheb; DICKO, Amadou. The therapeutic benefits of essential oils. **Nutrition, well-being and health**, v. 7, p. 155-179, 2012.
- ELKO, E. A. et al. Peroxiredoxins and beyond; redox systems regulating lung physiology and disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 31, n. 14, p. 1070-1091, 2019.
- EPPIG, J. J.; O'BRIEN, M. J. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. **Biology of Reproduction**, v. 54, n. 1, p. 197-207, 1996.
- FABREGUES GASOL, F. et al. In vitro follicular activation and stem cell therapy as novel treatment strategies in diminished ovarian reserve and primary ovarian insufficiency. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, p. 617704, 2021.
- FELICI, M.; KLINGER, F. G. PI3K/PTEN/AKT signaling pathways in germ cell development and their involvement in germ cell tumors and ovarian dysfunctions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 18, p. 9838, 2021.

FIGUEIREDO, J. R. et al. Advances in in vitro folliculogenesis in domestic ruminants. **Animal Reproduction**, v. 16, n. 1, p. 52, 2019.

FIGUEIREDO, J. R. et al. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção *in vitro* de embriões em larga escala. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p. 143-152, 2007.

FIGUEIREDO, J. R. et al. Preservation of oocyte and granulosa cell morphology in bovine preantral follicles cultured in vitro. **Theriogenology**, v. 41, n. 6, p. 1333-1346, 1994.

FIGUEIREDO, J. R.; LIMA, L. F. Tecnologia do ovário artificial: aplicações, estado da arte, limitações e perspectivas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, n. 1, p. 248-253, 2017.

FLEMING, A. et al. Invited review: Reproductive and genomic technologies to optimize breeding strategies for genetic progress in dairy cattle. **Animal Breeding Archives**, v. 61, n. 1, p. 43-57, 2018.

FU, V.; PLOUFFE, S. W.; GUAN, K. L. The Hippo pathway in organ development, homeostasis, and regeneration. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 49, p. 99-107, 2017.

FUJII, J.; HOMMA, T.; OSAKI, T. Superoxide radicals in the execution of cell death. **Antioxidants**, v. 11, n. 3, p. 501, 2022.

GERSHON, E.; DEKEL, N. Newly identified regulators of ovarian folliculogenesis and ovulation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 12, p. 4565, 2020.

GHEZELAYAGH, Z.; KHOSHDEL-RAD, N.; EBRAHIMI, B. Human ovarian tissue in-vitro culture: primordial follicle activation as a new strategy for female fertility preservation. **Cytotechnology**, v. 74, n. 1, p. 1-15, 2022.

GOMES, D.; RODRIGUES, L. R.; RODRIGUES, J. L. Perspectives on the design of microbial cell factories to produce prenylflavonoids. **International Journal of Food Microbiology**, v. 367, p. 109588, 2022.

GROSBOIS, J.; DEVOS, M.; DEMEESTERE, I. Implicações da ativação não fisiológica do folículo primordial ovariano para preservação da fertilidade. **Endocrine Reviews**, v. 41, n. 6, p. 847-872, 2020.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. **Oxford University Press**, USA, 2015.

HANNON, P. R.; FLAWS, J. A. The effects of phthalates on the ovary. **Frontiers in Endocrinology**, v. 6, p. 8, 2015.

HAO, J. et al. Culture of human ovarian tissue in xeno-free conditions using laminin components of the human ovarian extracellular matrix. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 37, p. 2137-2150, 2020.

HU, Bai et al. Prospects for fertility preservation: the ovarian organ function reconstruction techniques for oogenesis, growth and maturation in vitro. **Frontiers in Physiology**, v. 14, p. 1177443, 2023.

HAO, X. et al. Ovarian follicle depletion induced by chemotherapy and the investigational stages of potential fertility-protective treatments—a review. **International Journal of**

Molecular Sciences, v. 20, n. 19, p. 4720, 2019.

HARDY, M. L. M.; DAY, M. L.; MORRIS, M. B. Redox regulation and oxidative stress in mammalian oocytes and embryos developed in vivo and in vitro. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 21, p. 11374, 2021.

HELD-HOELKER, E. et al. Cryosurvival of in vitro produced bovine embryos supplemented with l-Carnitine and concurrent reduction of fatty acids. **Theriogenology**, v. 96, p. 145-152, 2017.

HERMAN, R. A. et al. Essential oils and their applications—a mini review. **Advances in Nutrition & Food Science**, v. 4, n. 4, p. 1-13, 2019.

HERNANSANZ-AGUSTÍN, P.; ENRÍQUEZ, J. A. Generation of reactive oxygen species by mitochondria. **Antioxidants**, v. 10, n. 3, p. 415, 2021.

HERTA, A. C.; LOLICATO, F.; SMITZ, J. E. J. In vitro follicle culture in the context of IVF. **Reproduction**, v. 156, n. 1, p. F59-F73, 2018.

HSUEH, A. J. W. et al. Intraovarian control of early folliculogenesis. **Endocrine Reviews**, v. 36, n. 1, p. 1-24, 2015.

HSUEH, A. J. W.; KAWAMURA, K. Hippo signaling disruption and ovarian follicle activation in infertile patients. **Fertility and Sterility**, v. 114, n. 3, p. 458-464, 2020.

HUANG, Qiao-yi et al. Therapeutic options for premature ovarian insufficiency: an updated review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 20, n. 1, p. 28, 2022.

ICC Trade Map. Disponível em: <https://www.trademap.org/Index.aspx>. Acesso em: mar. 2022.

IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants—superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 54, n. 4, p. 287-293, 2018.

JAGANNATHAN, L.; CUDDAPAH, S.; COSTA, M. Oxidative stress under ambient and physiological oxygen tension in tissue culture. **Current Pharmacology Reports**, v. 2, p. 64-72, 2016.

JIMENEZ, Carolina Rodriguez et al. The base medium affects ultrastructure and survival of bovine preantral follicles cultured in vitro. **Theriogenology**, v. 85, n. 6, p. 1019-1029, 2016.

KAWAMURA, K.; KAWAMURA, N.; HSUEH, A. J. W. Activation of dormant follicles: a new treatment for premature ovarian failure? **Current Opinion in Obstetrics & Gynecology**, v. 28, n. 3, p. 217, 2016.

KHARE, S. et al. Plant secondary metabolites synthesis and their regulations under biotic and abiotic constraints. **Journal of Plant Biology**, v. 63, p. 203-216, 2020.

KHAZAEI, M.; AGHAZ, F. Reactive oxygen species generation and use of antioxidants during in vitro maturation of oocytes. **International Journal of Fertility & Sterility**, v. 11, n. 2, p. 63, 2017.

KONG, X.-X. et al. Resveratrol, an effective regulator of ovarian development and oocyte apoptosis. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 34, p. e374-e381, 2011.

KRAJNIK, Kornelia et al. Oogenesis in women: from molecular regulatory pathways and maternal age to stem cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 7, p. 6837, 2023.

LAFTOUHI, A. et al. The Impact of Environmental Stress on the Secondary Metabolites and the Chemical Compositions of the Essential Oils from Some Medicinal Plants Used as Food Supplements. **Sustainability**, Suíça, v. 15, n. 10, p. 7842, maio 2023.

LAN, K. C. et al. Limited relationships between reactive oxygen species levels in culture media and zygote and embryo development. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 36, p. 325-334, 2019.

LEE, H. N.; CHANG, E. M. Primordial follicle activation as new treatment for primary ovarian insufficiency. **Clinical and Experimental Reproductive Medicine**, v. 46, n. 2, p. 43, jun. 2019.

LI, L. et al. The signaling pathways involved in ovarian follicle development. **Frontiers in Physiology**, v. 12, p. 730196, 2021.

LI, Qian; ZHAO, Zhenjun. Influence of N-acetyl-L-cysteine against bisphenol a on the maturation of mouse oocytes and embryo development: in vitro study. **BMC Pharmacology and Toxicology**, v. 20, p. 1-9, 2019.

LIANG, J. et al. Reactive oxygen species and ovarian diseases: antioxidant strategies. **Redox Biology**, p. 102659, 2023.

LIEW, Seng H. et al. The ovarian reserve is depleted during puberty in a hormonally driven process dependent on the pro-apoptotic protein BMF. **Cell Death & Disease**, v. 8, n. 8, p. e2971-e2971, 2017.

LIM, M.; THOMPSON, J. G.; DUNNING, K. R. Hypoxia and reproductive health: follicle development, ovulation, oocyte maturation. **Reproduction**, v. 161, n. 1, p. F33-F40, 2021.

LIMA, L. F. et al. Importância das comunicações intercelulares para o desenvolvimento de folículos ovarianos. **Reprodução & Climatério**, v. 31, n. 2, p. 93-104, 2016.

LINS, T. L. B. G. et al. Rutin can replace the use of three other antioxidants in the culture medium, maintaining the viability of sheep isolated secondary follicles. **Theriogenology**, v. 89, p. 263-270, 2017.

LIU, G. et al. Effect of animal-sourced bioactive peptides on the in vitro development of mouse preantral follicles. **Journal of Ovarian Research**, v. 13, p. 1-11, 2020.

LU, J. et al. A novel and compact review on the role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 16, p. 1-18, 2018.

LUDERER, U. Toxicidade ovariana por espécies reativas de oxigênio. **Vitamins and Hormones**, v. 94, p. 99-127, 2014.

LUNARDI, F. O. et al. Restoring fertility after ovarian tissue cryopreservation: a half century of research. **Zygote**, v. 21, n. 4, p. 394-405, 2013.

LV, X. et al. Timely expression and activation of YAP1 in granulosa cells is essential for ovarian follicle development. **The FASEB Journal**, v. 33, n. 9, p. 10049, 2019.

MA, S. et al. The Hippo pathway: biology and pathophysiology. **Annual Review of Biochemistry**, v. 88, n. 1, p. 577-604, 2019.

- MA, Y. Y.; CHEN, H. W.; TZENG, C. R. Low oxygen tension increases mitochondrial membrane potential and enhances expression of antioxidant genes and implantation protein of mouse blastocyst cultured in vitro. **Journal of Ovarian Research**, v. 10, n. 1, p. 1-11, jan. 2017.
- MAIDARTI, M.; ANDERSON, R. A.; TELFER, E. E. Crosstalk between PTEN/PI3K/Akt signalling and DNA damage in the oocyte: implications for primordial follicle activation, oocyte quality and ageing. **Cells**, v. 9, n. 1, p. 200, 2020.
- MAURYA, R.; NAMDEO, M. Superoxide dismutase: a key enzyme for the survival of intracellular pathogens in host. **Reactive Oxygen Species**, 2021.
- McLAUGHLIN, M. et al. Activin promotes follicular integrity and oogenesis in cultured pre-antral bovine follicles. **Molecular Human Reproduction**, v. 16, n. 9, p. 644-653, 2010.
- McLAUGHLIN, M.; TELFER, E. E. Oocyte development in bovine primordial follicles is promoted by activin and FSH within a two-step serum-free culture system. **Reproduction**, v. 139, n. 6, p. 971-978, 2010.
- MENG, Z.; MOROISHI, T.; GUAN, K. L. Mechanisms of Hippo pathway regulation. **Genes & Development**, v. 30, n. 1, p. 1-17, 2016.
- MOREMI, M. P. et al. A review of biological activities and phytochemistry of six ethnomedicinally important South African Croton species. **Journal of Ethnopharmacol**, v. 280, p. 114416, 2021.
- NIETO, Gema. Biological activities of three essential oils of the Lamiaceae family. **Medicines**, v. 4, n. 3, p. 63, 2017.
- O'BRIEN, M. J.; PENDOLA, J. K.; EPPIG, J. J. A revised protocol for in vitro development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 5, p. 1682-1686, 2003.
- ORISAKA, M. et al. The role of pituitary gonadotropins and intraovarian regulators in follicle development: A mini review. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 20, n. 2, p. 169-175, 2021.
- OSAILI, T. M. et al. A Status Review on Health-Promoting Properties and Global Regulation of Essential Oils. **Molecules**, v. 28, n. 4, p. 1809, 2023.
- PAIXÃO, M. S. **Avaliação da Toxicidade do extrato Hidroalcoólico da entrecasca de Croton argyrophyllus Kunth**. 2018. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.
- PAN, D. The hippo signaling pathway in development and cancer. **Developmental Cell**, v. 19, n. 4, p. 491-505, 2010.
- PANWAR, V. et al. Multifaceted role of mTOR (mammalian target of rapamycin) signaling pathway in human health and disease. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 8, n. 1, p. 375, 2023.
- PLAZAS, D. C. S. Efeito dos extratos de Spirulina maxima e Kefir no cultivo de folículos pré-antrais de suíno. **Revista de Biotecnologia Aplicada**, 2015.
- POŁEĆ, K. et al. On the synergy/antagonism of selected terpenes in the effect on lipid membranes studied in model systems. **Journal of Molecular Liquids**, v. 349, p. 118473, 2022.

- RAMOS, J. M. O. et al. Chemical constituents and potential anti-inflammatory activity of the essential oil from the leaves of *Croton argyrophyllus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 4, p. 644-650, out. 2013.
- RAMOS, J. M. O. et al. Identificação dos constituintes químicos e estudo farmacológico do óleo essencial das folhas da *Croton argyrophyllus* Kunth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2013.
- RAMOS, J. M. O. et al. Impact of *Croton argyrophyllus* essential oil on behavioural models of nociception. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 32, n. 1, p. 40-45, jan. 2017.
- REHMAN, R. et al. Biosynthesis of essential oils in aromatic plants: A review. **Food Reviews International**, v. 32, n. 2, p. 117-160, mar. 2016.
- RÍOS, J. L. Essential oils: What they are and how the terms are used and defined. In: Essential oils in food preservation, flavor and safety. **Academic Press**, 2016. p. 3-10.
- ROO, C. et al. In-vitro fragmentation of ovarian tissue activates primordial follicles through the Hippo pathway. **Human Reproduction Open**, v. 2020, n. 4, p. hoaa048, 2020.
- ROSA, A. C. et al. Superoxide dismutase administration: a review of proposed human uses. **Molecules**, v. 26, n. 7, p. 1844, abr. 2021.
- ROSSETTO, R. et al. Effect of medium composition on the in vitro culture of bovine pre-antral follicles: morphology and viability do not guarantee functionality. **Zygote**, v. 21, n. 2, p. 125-128, 2013.
- SAHA, S. et al. Comparison of enzymatic and mechanical methods for the collection of bovine preantral follicles. **Animal Science**, v. 74, n. 1, p. 155-161, 2002.
- SAHA, S. et al. In vitro culture of bovine preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 63, n. 1-2, p. 27-39, 2000.
- SAID-AL, A. et al. Essential oils: Biosynthesis, chemistry and biological functions. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 8, p. 190-200, 2017.
- SCIORIO, R.; RAPALINI, E.; ESTEVES, S. C. Air quality in the clinical embryology laboratory: a mini review. **Therapeutic Advances in Reproductive Health**, v. 15, p. 2633494121990684, 2021.
- SHAH, J. S. et al. Biomechanics and mechanical signaling in the ovary: a systematic review. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 35, p. 1135-1148, 2018.
- SHARIFI-RAD, J. et al. Biological activities of essential oils: From plant chemoeology to traditional healing systems. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 70, 2017.
- SHEN, L. et al. The stromal microenvironment and ovarian aging: mechanisms and therapeutic opportunities. **Journal of Ovarian Research**, v. 16, n. 1, p. 237, 2023.
- SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative stress. **Annual Review of Biochemistry**, v. 86, p. 715-748, 2017.
- SANTELLA, L.; LIMATOLA, N.; CHUN, J. T. Cellular and molecular aspects of oocyte maturation and fertilization: an actin cytoskeleton perspective. *Zoological Letters*, v. 6, p. 1-21, 2020.
- SILVA, B. R.; SILVA, J. R. V. Mechanisms of action of non-enzymatic antioxidants to control

oxidative stress during in vitro follicle growth, oocyte maturation, and embryo development. **Animal Reproduction Science**, v. 249, p. 107186, 2023.

SILVA, F. F. et al. *Croton grewoides* essential oil and anethole reduce oxidative stress and improve growth of bovine primordial follicles during culture of ovarian tissue. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 76, n. 12, p. 1609-1619, 2024.

SILVA, R. F. et al. Eugenol improves follicular survival and development during in vitro culture of goat ovarian tissue. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, p. 822367, 2022.

SOUSA, Renata P. et al. Ativação e desenvolvimento in vitro de folículos pré-antrais de cabra envoltos em tecido ovariano co-cultivado com células-tronco mesenquimais. **Reproductive Sciences**, v. 28, p. 1709-1717, 2021.

SILVA, R. L.; BARBERINO, R.; MATOS, M. H. T. Impact of antioxidant supplementation during in vitro culture of ovarian preantral follicles: A review. **Theriogenology**, 2023.

SOFIA, P. et al. The challenge of ovarian tissue culture: 2D versus 3D culture. **Journal of Ovarian Research (Web)**, v. 14, n. 1, p. 1-12, 2021.

SOUTO, E. B. et al. *Croton argyrophyllus* Kunth essential oil-loaded solid lipid nanoparticles: evaluation of release profile, antioxidant activity and cytotoxicity in a neuroblastoma cell line. **Sustainability**, v. 12, n. 18, p. 7697, 2020.

SPECIESLINK NETWORK. **SpeciesLink Search**. 14 mar. 2025. Disponível em: <https://specieslink.net/search>. Acesso em: 14 mar. 2025.

SPISNI, E. et al. Antioxidant, anti-inflammatory, and microbial-modulating activities of essential oils: Implications in colonic pathophysiology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 11, p. 4152, 2020.

STEFANSDDOTTIR, A. et al. Use of ovarian culture techniques in reproductive toxicology. **Reproductive Toxicology**, v. 49, p. 117-135, 2014.

STRATAKOS, A. Ch; KOIDIS, A. Methods for extracting essential oils. **Essential oils in food preservation, flavor and safety**, p. 31-38, 2016.

SUN, X. et al. New strategy for in vitro activation of primordial follicles with mTOR and PI3K stimulators. **Cell Cycle**, v. 14, n. 5, p. 721-731, mar. 2015.

TANIMOTO, R. et al. Insights into in vivo follicle formation: a review of in vitro systems. **Histochemistry and Cell Biology**, p. 1-13, 2021.

TELFER, E. E. et al. A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. **Human Reproduction**, v. 23, n. 5, p. 1151-1158, 2008.

TELFER, E. E. et al. In vitro development of oocytes from porcine and bovine primary follicles. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 163, n. 1-2, p. 117-123, 2000.

TELFER, E. E.; McLAUGHLIN, Marie. Strategies to support human oocyte development in vitro. **Int J Dev Biol**, v. 56, n. 10-12, p. 901-907, 2012.

TELFER, E. E.; ZELINSKI, M. B. Ovarian follicle culture: advances and challenges for human and nonhuman primates. **Fertility and Sterility**, v. 99, n. 6, p. 1523-1533, 2013.

THOMAS, F. H. et al. Effect of ascorbic acid on health and morphology of bovine preantral

- follicles during long-term culture. **Reproduction-Cambridge**, v. 122, n. 3, p. 487-495, 2001.
- THOMAS, F. H.; WALTERS, K. A.; TELFER, E. E. How to make a good oocyte: an update on in-vitro models to study follicle regulation. **Human Reproduction Update**, v. 9, n. 6, p. 541-555, 2003.
- TORRES-OSORIO, V. et al. Oxidative stress and antioxidant use during in vitro mammal embryo production. **Mexican Journal of Livestock Sciences**, v. 10, n. 2, p. 433-459, 2019.
- TOUYZ, R. M. et al. Oxidative stress: a unifying paradigm in hypertension. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 5, p. 659-670, 2020.
- TSOI, M. et al. Lats1 and Lats2 are required for ovarian granulosa cell fate maintenance. **The FASEB Journal**, v. 33, n. 10, p. 10819, 2019.
- TWAIJ, B. M.; HASAN, M. N. Bioactive secondary metabolites from plant sources: Types, synthesis, and their therapeutic uses. **International Journal of Plant Biology**, v. 13, n. 1, p. 4-14, 2022.
- VANHAESEBROECK, B. et al. The emerging mechanisms of isoform specific PI3K signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 5, p. 329-341, 2010.
- VASCONCELOS, E. M. et al. Chemical composition and effects of *Ocimum gratissimum* essential oil (OGEO) on the expression of mRNA for antioxidant enzymes during in vitro culture of bovine ovarian secondary follicles. **Journal of Essential Oil Research**, v. 34, n. 5, p. 446-454, 2022.
- VERDEGUER, M.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A. M.; ARANITI, F. Phytotoxic effects and mechanism of action of essential oils and terpenoids. **Plants**, v. 9, n. 11, p. 1571, 2020.
- VERMA, A.; VERMA, M.; SINGH, A. Animal tissue culture principles and applications. In: **Animal biotechnology**. Academic Press, 2020. p. 269-293.
- VIRANT-KLUN, I. Postnatal oogenesis in humans: a review of recent findings. **Stem cells and cloning: advances and applications**, p. 49-60, 2015.
- VITALE, F. et al. Importance of oxygen tension in human ovarian tissue in vitro culture. **Human Reproduction**, v. 38, n. 8, p. 1538-1546, 2023.
- VO, K. C. T.; KAWAMURA, K. In vitro activation early follicles: from the basic science to the clinical perspectives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 7, p. 3785, 2021.
- VON MENGDEN, L; KLAMT, F.; SMITZ, J. Redox biology of human cumulus cells: basic concepts, impact on oocyte quality, and potential clinical use. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 32, n. 8, p. 522-535, 2020.
- WADA, K. I. et al. Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers. **Development**, v. 138, n. 18, p. 3907-3914, 2011.
- WANG, H. et al. An integrative volatile terpenoid profiling and transcriptomics analysis for gene mining and functional characterization of AvBPPS and AvPS involved in the monoterpenoid biosynthesis in *Amomum villosum*. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 846, 2018.
- WANG, S. et al. The role of antioxidant enzymes in the ovaries. **Oxidative Medicine and**

Cellular Longevity, 2017.

YAHYAZADEH, M. Impact of Aridity on Specialized. **Medicinal Plants: Their Response to Abiotic Stress**, p. 241, 2023.

YANG, M. Y.; FORTUNE, J. E. The capacity of primordial follicles in fetal bovine ovaries to initiate growth in vitro develops during mid-gestation and is associated with meiotic arrest of oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 78, n. 6, p. 1153-1161, 2008.

YOUNUS, H. Therapeutic potentials of superoxide dismutase. **International Journal of Health Sciences**, v. 12, n. 3, p. 88, 2018.

ZHANG, J. et al. Inhibition of mTOR signaling pathway delays follicle formation in mice. **Journal of Cellular Physiology**, v. 232, n. 3, p. 585-595, 2017.

ZHANG, J. et al. Participation of preovulatory follicles in the activation of primordial follicles in mouse ovaries. **International Journal of Biological Sciences**, v. 20, n. 10, p. 3863, 2024.

ZHANG, M.; ZHANG, X. The role of PI3K/AKT/FOXO signaling in psoriasis. **Archives of Dermatological Research**, v. 311, p. 83-91, 2019.

ZHANG, M; XIA, Guoliang. Hormonal control of mammalian oocyte meiosis at diplotene stage. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, p. 1279-1288, 2012.

ZHANG, Y. et al. Current mechanisms of primordial follicle activation and new strategies for fertility preservation. **Molecular Human Reproduction**, v. 27, n. 2, p. gaab005, 2021.

ZHANG, Y.; WONG, H. S. Are mitochondria the main contributor of reactive oxygen species in cells? **Journal of Experimental Biology**, v. 224, n. 5, p. jeb221606, 2021.

ZHOU, D.; SHAO, L.; SPITZ, D. R. Reactive oxygen species in normal and tumor stem cells. In: Advances in cancer research. **Academic Press**, p. 1-67. 2014.

ZHOU, J.; PENG, X.; MEI, S. Autophagy in ovarian follicular development and atresia. **International journal of biological sciences**, v. 15, n. 4, p. 726, 2019.

ZHU, M. et al. The role of Hippo pathway in ovarian development. **Frontiers in Physiology**, v. 14, p. 1198873, 2023.