



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

SUELINE CAVALCANTE CHAVES

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia sidoides* NA
CRIOPRESERVAÇÃO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIIS INCLUSOS EM CÓRTEX
OVARIANO BOVINO

SOBRAL-CE
2026

SUELINE CAVALCANTE CHAVES

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia sidoides* NA
CRIOPRESERVAÇÃO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS INCLUSOS EM CÓRTEX
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

SUELINE CAVALCANTE CHAVES

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia sidoides* NA
CRIOPRESERVAÇÃO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS INCLUSOS EM CÓRTEX
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

Aprovado em : / /

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dra. Valdevane Rocha Araújo
Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDPAr)

Prof. Dr. Gildas Mbemba Tetaping
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

A Deus, por todas as graças concedidas. A minha mãe Sandra pelo dom da vida e ajuda incansável. Aos meus filhos Alexia e João pela paciência e companhia. Às minhas irmãs Aline e Gesline, pelo carinho e motivação. Aos demais familiares e amigos.

Com amor e gratidão, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as graças concedidas.

À minha mãe, Sandra Cavalcante, por todo o amor, apoio incondicional e força, que foram essenciais para que eu pudesse seguir adiante mesmo nos momentos mais desafiadores.

Aos meus filhos, Alexia e João, minha maior motivação, razão do meu esforço diário e fonte constante de amor e inspiração.

Às minhas irmãs, Aline e Gesline, pelo companheirismo, incentivo e presença constante em minha vida.

Ao meu querido orientador, Prof. Dr. José Roberto Viana Silva, por sua acolhida, atenção, dedicação e disponibilidade inigualáveis. Agradeço, sobretudo, por sua trajetória inspiradora, pelas palavras constantes de encorajamento e pelos ensinamentos pautados no respeito, na confiança, na disciplina, na honestidade e na generosidade, que foram fundamentais para minha formação científica e pessoal ao longo deste percurso realizado.

Aos meus amigos inseparáveis, Andreza Aguiar, Erica Costa, Leopoldo Rugieri (Léo) e Francisco Costa, que me acompanharam desde a execução dos experimentos até a escrita deste trabalho, oferecendo apoio, incentivo, amizade e auxílio técnico, os quais foram indispensáveis para a concretização desta pesquisa.

À toda a equipe do Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia da Reprodução (LABIREP), pelo ambiente acolhedor, colaborativo e pelo suporte científico ao longo do desenvolvimento deste estudo. Em especial, agradeço as colegas Regislane Ribeiro, Laryssa Barrozo, Elizabeth Castro e Amanda Rocha, pela convivência, troca de conhecimentos e colaboração constante.

Aos meus colegas de mestrado, bem como aos colaboradores e funcionários da Faculdade de Medicina - FAMED/UFC, Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA), Universidade Estadual do Ceará (UECE), Núcleo de Biotecnologia de Sobral (NUBIS), da Prefeitura de Forquilha e do Abatedouro Público de Sobral, pelos conhecimentos compartilhados, pelas amizades firmadas,

pelo compromisso, pela atenção, disponibilidade de equipamentos e por todo o apoio técnico oferecido durante a realização desta pesquisa.

Aos órgãos de fomentos: À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pelo apoio financeiro que viabilizou o desenvolvimento das atividades de pesquisa durante a pesquisa.

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

Aos Professores Valdevane Rocha Araújo e Gildas Mbemya Tetaping que gentilmente aceitaram o convite para compor a banca examinadora desta dissertação, pela disponibilidade e valiosas contribuições que certamente engrandeceram este trabalho.

Agradeço, por fim, a todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste propósito.

A todos, minha sincera gratidão.

RESUMO

A criopreservação do tecido ovariano é uma estratégia importante para a preservação da fertilidade em mamíferos. No entanto, sua eficiência pode ser comprometida por danos estruturais, celulares e bioquímicos decorrentes do estresse oxidativo gerado durante os processos de congelamento e aquecimento. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de diferentes concentrações do óleo essencial de *Lippia sidoides* sobre a viabilidade de células do cumulus bovinas e sobre a criopreservação do tecido ovariano bovino. Para isso, foram conduzidos dois experimentos independentes.

No primeiro experimento, células do cumulus bovinas foram cultivadas *in vitro* na presença de diferentes concentrações do óleo essencial de *L. sidoides* (4, 40 e 400 µg/mL). A viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio de fluorescência com calceína-AM e etídio homodímero-1. No segundo experimento, ovários bovinos foram coletados em abatedouro local, e fragmentos do córtex ovariano foram submetidos à vitrificação na ausência (controle vitrificado) ou na presença do óleo essencial de *L. sidoides* nas concentrações de 4, 40 e 400 µg/mL. Após o aquecimento, os fragmentos foram cultivados *in vitro* por 24 horas a 38,5°C, em atmosfera com 5% de CO₂. Em seguida, foram avaliadas a viabilidade celular do tecido ovariano, a integridade morfológica e a ativação folicular, a densidade celular estromal e o conteúdo de colágeno da matriz extracelular. O status redox foi analisado por meio das atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPX), além dos níveis de tióis reduzidos. Os resultados demonstraram que os efeitos do óleo essencial de *L. sidoides* foram dependentes da concentração. As concentrações de 4 e 40 µg/mL favoreceram a preservação da viabilidade das células do cumulus e do tecido ovariano. Também promoveram a manutenção da morfologia e da ativação folicular, da organização do estroma ovariano e do equilíbrio redox após a vitrificação e o cultivo *in vitro*. Por outro lado, a concentração de 400 µg/mL não promoveu benefícios adicionais. Essa condição esteve associada à menor proporção de folículos morfológicamente normais e à ausência de estímulo à ativação folicular, quando comparada às concentrações mais baixas. Conclui-se que o óleo essencial de *L. sidoides* apresenta potencial como agente adjuvante em protocolos de vitrificação do tecido ovariano bovino. Entre as concentrações avaliadas, 4 µg/mL se destaca por promover um perfil mais equilibrado, contribuindo para a preservação estrutural e funcional do tecido após o aquecimento.

Palavras-chave: criopreservação; estresse oxidativo; óleo essencial; *Lippia sidoides*; vitrificação.

ABSTRACT

Cryopreservation of ovarian tissue is an important strategy for preserving fertility in mammals; however, its efficiency can be compromised by structural, cellular, and biochemical damage resulting from oxidative stress generated during the freezing and thawing processes. In this context, the present study aimed to evaluate the effects of different concentrations of *Lippia sidoides* essential oil on the viability of bovine cumulus cells, as well as during the vitrification of bovine ovarian tissue. Bovine cumulus cells were cultured in vitro with different concentrations of *Lippia sidoides* essential oil (4, 40, and 400 µg/mL), and cell viability was evaluated using the calcein-AM and ethidium homodimer-1 fluorescence assay. Bovine ovaries were collected at a local slaughterhouse, and fragments of the ovarian cortex were subjected to vitrification in the absence (vitrified control) or in the presence of *L. sidoides* essential oil at concentrations of 4, 40, and 400 µg/mL. After warming, the fragments were cultured in vitro for 24 hours at 38.5°C with 5% CO₂. Subsequently, ovarian tissue cell viability, morphological integrity and follicular activation, stromal cell density, extracellular matrix collagen content, and oxidative profile were evaluated through the activities of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), and reduced thiol levels. The results demonstrated that the effects of *L. sidoides* essential oil were concentration-dependent. Concentrations of 4 and 40 µg/mL, especially 40 µg/mL, favoured the preservation of cumulus cell and ovarian tissue viability, follicular morphology and activation, ovarian stromal organisation, and redox balance after vitrification and in vitro culture. On the other hand, the concentration of 400 µg/mL did not promote additional benefits and was associated with a lower proportion of morphologically normal follicles and the absence of stimulation of follicular activation when compared to lower concentrations. It is concluded that *L. sidoides* essential oil, at a concentration of 40 µg/mL, has potential as an adjuvant agent in bovine ovarian tissue vitrification protocols, contributing to the structural and functional preservation of the tissue after warming.

Keywords: ovarian tissue; vitrification; oxidative stress; essential oil; *Lippia sidoides*.

LISTA DE FIGURAS

DISSERTAÇÃO

Figura 1 - Representação esquemática da morfologia e fisiologia do ovário de mamíferos, evidenciando as regiões cortical e medular, bem como os principais estágios do desenvolvimento folicular (folículos primordiais, primários, secundários e antrais) e o oócito.	21
Figura 2 - Representação esquemática das etapas do desenvolvimento folicular ovariano, ilustrando a progressão morfológica desde o folículo primordial, passando pelos estágios primário e secundário, até o folículo antral.....	24
Figura 3 - Diferença dos tipos de técnicas da criopreservação.....	27
Figura 4 - Estresse oxidativo da célula.....	31
Figura 5 - <i>Lippia sidoides</i>	33
Figura 6 - Fórmula estrutural dos componentes majoritários do óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i>	35

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figure 1 - Mechanisms of action of permeable and non-permeable cryoprotectants during the cryopreservation of ovarian tissue, oocytes and follicles..... 46

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

- Figure 1 - Cumulus cell viability after exposure to *Lippia sidoides* essential oil. (A) Percentage of viable cumulus cells (calcein-positive) after 48 h of exposure to *L. sidoides* essential oil at concentrations of 4, 40, and 400 µg/mL. (B) Percentage of non-viable cumulus cells (ethidium homodimer-positive). Data are presented as mean ± SEM. Asterisks indicate statistically significant differences ($P < 0.05$) 62
- Figure 2 - Morphological evaluation of cumulus cells after treatment with *Lippia sidoides* essential oil. Representative fluorescence micrographs of cumulus cells cultured in α-MEM (control) and treated with *L. sidoides* essential oil at concentrations of 4 and 40 µg/mL for 48 h. Viable cells were stained with calcein-AM (green), and non-viable cells were stained with ethidium homodimer-1 (red)..... 63
- Figure 3 - Follicular activation after vitrification and in vitro culture of bovine ovarian tissue. Percentage distribution of follicular classes (primordial, transitional, primary, and secondary follicles) after vitrification, warming, and 24 h of in vitro culture in the absence (vitrified control) or presence of *L. sidoides* essential oil at concentrations of 4, 40, and 400 µg/mL. Data are expressed as mean ± SEM. Statistical significance was set at $P < 0.05$ 64
- Figure 4 - Follicular morphological integrity after vitrification of bovine ovarian tissue. Percentage of morphologically normal and degenerated follicles after

vitrification, warming, and in vitro culture in the absence (vitrified control) or presence of *L. sidoides* essential oil at concentrations of 4, 40, and 400 µg/mL. Statistical differences between groups are indicated by **P < 0.001 and ***P < 0.0001..... 65

Figure 5 - Stromal cell density of bovine ovarian tissue after vitrification and in vitro culture.

Stromal cell density after vitrification, warming, and in vitro culture in the presence of different concentrations of *L. sidoides* essential oil. Data are expressed as mean ± SEM. Asterisks indicate statistically significant differences between groups (*P < 0.05; ***P < 0.0001) 66

Figure 6 - Extracellular matrix collagen content in bovine ovarian tissue after vitrification and in vitro culture.

Percentage of collagen fibers in the ovarian stromal extracellular matrix after vitrification, warming, and in vitro culture in the absence or presence of *L. sidoides* essential oil (40 and 400 µg/mL). The non-vitrified control group showed higher collagen deposition compared with vitrified groups (P < 0.01). Data are presented as mean ± SEM. Statistical differences were determined using the Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s post hoc test (P < 0.05) 68

Figure 7 - Extracellular matrix collagen content in bovine ovarian tissue after vitrification and in vitro culture.

Percentage of collagen fibers in the ovarian stromal extracellular matrix after vitrification, warming, and in vitro culture in the absence or presence of *L. sidoides* essential oil (40 and 400 µg/mL). The non-vitrified control group showed higher collagen deposition compared with vitrified groups (P < 0.01). Data are presented as mean ± SEM. Statistical differences were determined using the Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s post hoc test (P < 0.05) 69

LISTA DE TABELA

DISSERTAÇÃO

TABELA 1-	Tipos de crioprotetores comumente utilizados na criopreservação de células.....	29
TABELA 2-	Principais componentes (%) do óleo essencial das folhas de <i>Lippia sidoides</i>	34

CAPÍTULO I

TABLE 1 -	Main cryoprotectants used in the cryopreservation of ovarian tissue, oocytes and follicles in mammals.....	44
TABLE 2 -	Comparative characteristics of permeable and non-permeable cryoprotectants used in ovarian tissue, oocyte, and follicle cryopreservation.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACPs	Agentes Crioprotetores
ABTS	ácido 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico
ANOVA	Análise de Variância
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina Trifosfato
BSA	Albumina Sérica Bovina
CAT	Catalase
CCs	Células do cúmulus
CGPs	Células germinativas primordiais
COCs	Complexo cúmulus - oócito
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EG	Etilenoglicol
EGCG	Epigalocatequina galato
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EROs	Espécies Reativas do Oxigênio
FIV	fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GPX	Glutathione Peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
IA	inseminação artificial
ITS	Insulina, Transferrina e Selênio
LH	Hormônios Luteinizantes
Ls	<i>Lippia sidoides</i>
MEC	Matriz extracelular
MEM	Meio Essencial Mínimo
PBS	Phosphate Buffered Saline (Tampão Fosfato Salino)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PEG	Polietileno glicol
PG	Propilenoglicol
PRDX6	Peroxiredoxin 6

PVP	Polivinilpirrolidona
RNA	Ácido Ribonucleico
SOD	Superóxido Dismutase
TE	transferência de embriões
Ter-S	Trehalose functionalized with sulfoxide groups
UV	Ultravioleta
VS	Vitrification solution

LISTA DE SÍMBOLOS

HO•	Radical hidroxila
¹O₂	Oxigênio singlete
O₂•⁻	Ânion superóxido
ONOO⁻	Peroxinitrito
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
μM	Micromolar
μg	Micrograma
mL	Mililitro
α-MEM	Meio Essencial Mínimo Alfa
°C	Grau Celsius
mm	Milímetro
mol/L	Mol por litro
M	Molar
pH	Medida da acidez ou alcalinidade
mM	Milimolar
nm	Nanômetr
U	Unidade (geralmente usada para medir a atividade enzimática)
mg	Miligrama
μg	Micrograma
Δ-Δ-CT	Método de quantificação relativa de expressão gênica
<	Menor que
±	Mais ou menos (indica incerteza ou variação)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1	Morfologia e fisiologia ovariana	20
2.2	Oogênese e foliculogênese.....	21
2.3	Avanços em biotécnicas reprodutivas aplicadas à preservação da fertilidade.....	24
2.3.1	<i>Classificação e mecanismos de ação dos agentes crioprotetores</i>	28
2.4	Estratégias antioxidantes e o estresse oxidativo durante a criopreservação celular.....	29
2.5	Caracterização química e atividade antioxidante do óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i>	32
3	JUSTIFICATIVA	36
4	HIPÓTESES	38
5	OBJETIVOS	39
5.1	Objetivos gerais.....	39
5.2	Objetivos específicos.....	39
6	CAPÍTULO I: Cryoprotectants in the cryopreservation of ovarian tissue, oocytes and follicles in mammals: a narrative review	40
7	CAPÍTULO II: <i>Lippia sidoides</i> essential oil improves follicular integrity and redox balance during vitrification of bovine ovarian cortex	56
8	CONCLUSÕES GERAIS.....	77
9	PERSPECTIVAS.....	78
	REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa posição de destaque no cenário mundial da pecuária bovina, figurando entre os maiores produtores e exportadores de carne bovina. Esse protagonismo resulta de investimentos contínuos em tecnologia, manejo e melhoramento genético. Esses fatores têm promovido avanços na produtividade e na qualidade dos produtos de origem animal, garantindo competitividade internacional. (Romanenghi; Silva; Ortin, 2022). Dessa forma, o agronegócio consolida-se como um dos principais pilares da economia nacional, contribuindo de forma expressiva para o Produto Interno Bruto (PIB), além de desempenhar papel relevante na geração de empregos e na atração de investimentos (Oliveira et al., 2025).

A modernização da pecuária bovina está associada à incorporação de biotécnicas reprodutivas capazes de otimizar o uso do material genético e acelerar o ganho genético dos rebanhos. Técnicas como a inseminação artificial (IA), a transferência de embriões (TE) e a fertilização in vitro (FIV) permitem não apenas a disseminação de características zootécnicas desejáveis, mas também a conservação de germoplasma de elevado valor genético ou sob risco de perda (Sena Carvalho et al., 2023). Assim, a criopreservação assume papel estratégico, com aplicações consolidadas, tanto na produção animal quanto na medicina reprodutiva humana (Nascimento, 2025).

Na saúde reprodutiva, a criopreservação do tecido ovariano tem sido empregada como estratégia clínica e experimental para a preservação da fertilidade, especialmente em mulheres submetidas a tratamentos gonadotóxicos, como quimioterapia e radioterapia, ou em indivíduos com risco de insuficiência ovariana precoce (Santos et al., 2025). Apesar de sua relevância, a preservação eficiente de tecidos ovarianos permanece desafiadora, sobretudo, em função da complexidade estrutural e funcional desse tecido.

Dentre as diferentes técnicas de criopreservação disponíveis, a vitrificação tem sido progressivamente adotada como método preferencial em protocolos experimentais, por basear-se no congelamento ultrarrápido, capaz de reduzir a formação de cristais de gelo intra e extracelulares, considerados os principais responsáveis por danos estruturais às células e aos tecidos (Martins et al., 2026). Essa característica favorece a manutenção da integridade celular e tecidual, viabilizando a utilização futura do material biológico quando as condições fisiológicas do indivíduo forem restabelecidas (Santos et al., 2025). Mesmo assim, a eficiência da vitrificação apresenta limitações, especialmente quando aplicada à criopreservação de tecidos complexos, como o tecido ovariano, nos quais diferentes tipos celulares e componentes da matriz extracelular respondem de maneira heterogênea ao estresse criogênico.

Entre os fatores mais associados à redução da viabilidade celular após a criopreservação, destaca-se o aumento excessivo da produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs). Durante os processos de congelamento e reaquecimento, o desequilíbrio entre a geração dessas espécies e a capacidade antioxidante celular favorece o estabelecimento do estresse oxidativo, condição relacionada à degeneração folicular e ao envelhecimento precoce do tecido ovariano (Len; Koh; Tan, 2019). Esse desequilíbrio é, particularmente, relevante em tecidos ovarianos, nos quais a elevada atividade metabólica e a diversidade celular existente ali favorecem a geração de EROs.

O estresse oxidativo compromete vários aspectos da funcionalidade celular, incluindo a atividade mitocondrial, a organização do fuso meiótico, a integridade do material genético e a correta configuração cromossômica (He et al., 2016). Como consequência, podem ocorrer danos ao DNA, perda da seletividade das membranas celulares e redução da produção de adenosina trifosfato (ATP), causando alterações estruturais e fisiológicas que comprometem a sobrevivência e o potencial de desenvolvimento dos folículos ovarianos após a criopreservação. Adicionalmente, a disfunção do sistema antioxidante endógeno intensifica os danos celulares, reduzindo a eficiência dos protocolos crioprotetores empregados (Hori et al., 2013).

Diante dessa situação, diferentes estratégias têm sido investigadas com o objetivo de reduzir os efeitos do estresse oxidativo durante a criopreservação do tecido ovariano. Nesse cenário, o uso de antioxidantes naturais tem sido avaliado como alternativa complementar aos antioxidantes sintéticos, com destaque para os compostos bioativos derivados de espécies do gênero *Lippia*. Estudos recentes mostram que óleos essenciais obtidos de diferentes espécies desse gênero apresentam elevada atividade antioxidante, atribuída, principalmente, a presença de compostos fenólicos, como timol e carvacrol, reconhecidos por sua capacidade de neutralizar EROs, conforme evidenciado por análises químicas e quimiométricas (Silva et al., 2022).

Entre essas espécies, *Lippia sidoides* Cham., popularmente conhecida como alecrim-pimenta, destaca-se por seu uso tradicional e por suas propriedades farmacológicas, incluindo atividades antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória. Pertencente à família Verbenaceae e nativa da região Nordeste do Brasil, essa espécie apresenta óleo essencial rico em metabólitos secundários biologicamente ativos, como flavonoides, quinonas, triterpenos, lignanas, esteroides livres e glicosilados, além de ácidos orgânicos, os quais contribuem para sua elevada capacidade antioxidante (Oliveira et al., 2024).

Evidências experimentais recentes em modelo bovino indicam que a suplementação do meio de cultivo in vitro com óleo essencial de *Lippia sidoides* ou com seu principal componente bioativo, o timol, pode influenciar a viabilidade folicular e a atividade de enzimas antioxidantes

em folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano, reforçando o potencial biotecnológico desse fitocomposto em sistemas reprodutivos (Caetano Filho, 2023). Apesar desses achados promissores, a aplicação do óleo essencial de *L. sidoides* em protocolos de criopreservação do tecido ovariano ainda permanece pouco explorada, especialmente no que se refere a preservação de folículos pré-antrais bovinos inclusos no córtex do tecido ovariano.

Considerando a importância da criopreservação para a biotecnologia reprodutiva bovina, os efeitos deletérios do estresse oxidativo sobre a viabilidade folicular e o potencial antioxidante do óleo essencial de *Lippia sidoides*, torna-se necessária a investigação de sua aplicação como aditivo em protocolos crioprotetores, visando à melhoria da preservação estrutural e funcional de folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano bovino. Diante desse contexto, a revisão de literatura a seguir aborda os principais aspectos relacionados à temática.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Morfologia e Fisiologia Ovariana

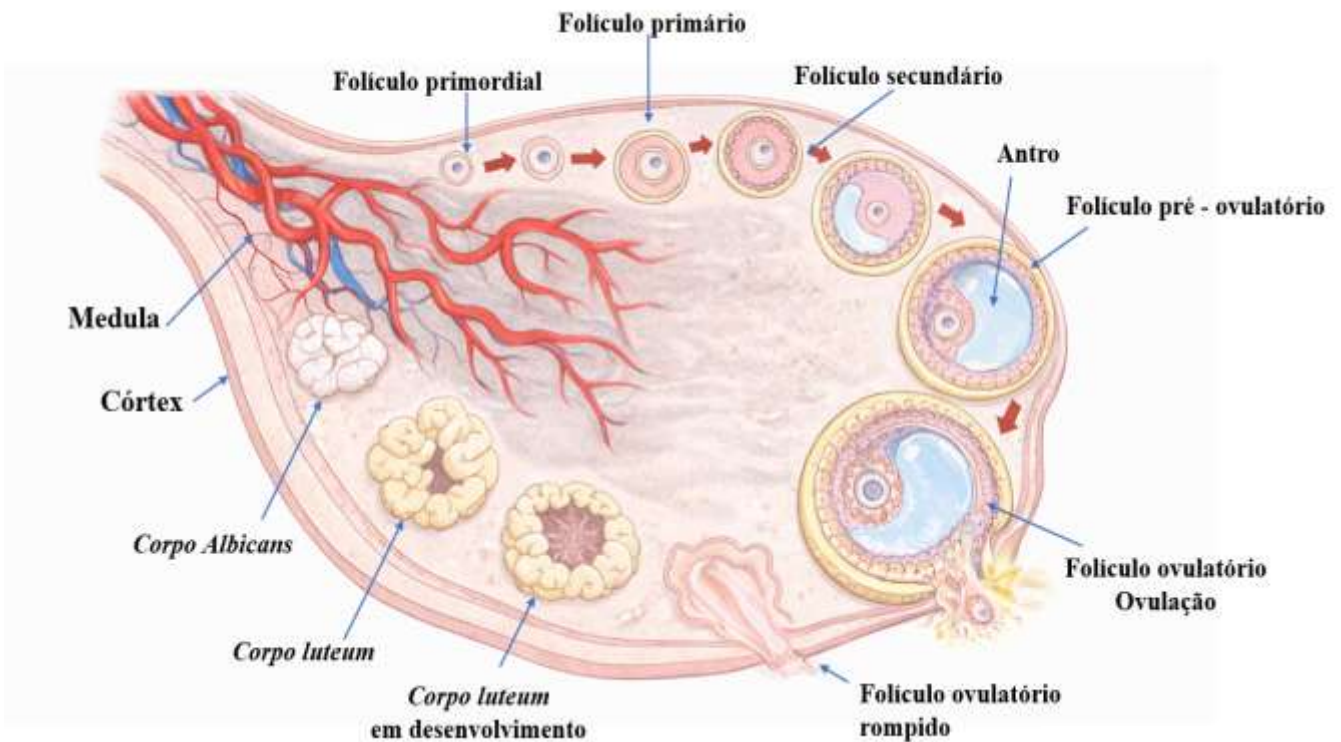
O ovário mamífero desempenha duas funções essenciais: a produção e liberação de oócitos maduros, competentes para fertilização, e a síntese e secreção de hormônios esteroides, os quais são fundamentais para regular a ovulação, a gestação e o desenvolvimento das características sexuais secundárias, além de influenciar funções sistêmicas, como a saúde óssea, cerebral, imunológica, cardiovascular e o metabolismo (Fletcher et al., 2025; Xiao & Lai, 2025). No ovário, os folículos constituem a unidade funcional básica, sendo responsáveis tanto pelo desenvolvimento e maturação oocitária quanto pela produção hormonal necessária para a manutenção da homeostase reprodutiva. A Figura 1 apresenta as principais estruturas ovarianas, assim como os diferentes estágios do desenvolvimento folicular (Matsushige et al., 2024).

Do ponto de vista morfológico, o ovário é revestido externamente por uma cápsula de tecido conjuntivo denso, denominada túnica albugínea, que confere proteção e sustentação estrutural ao órgão. Internamente, o tecido ovariano é organizado em duas regiões distintas: o córtex e a medula. O córtex ovariano abriga a maior parte dos folículos em diferentes estágios de desenvolvimento, desde os folículos primordiais até o folículo pré-ovulatório, enquanto a medula é composta, predominantemente, por tecido conjuntivo frouxo ricamente vascularizado e innervado, responsável pelo aporte de nutrientes, oxigênio e sinais endócrinos essenciais a atividade ovariana (Fletcher et al., 2025).

A fisiologia ovariana está intimamente relacionada à dinâmica morfológica dos folículos. Durante o ciclo reprodutivo, os folículos sofrem profundas alterações estruturais e funcionais, envolvendo proliferação e diferenciação das células da granulosa, organização das células da teca e modificações no microambiente folicular. Essas mudanças são essenciais para a aquisição da competência oocitária, bem como para a produção coordenada de esteroides ovarianos, especialmente estrógenos e progesterona, que regulam o eixo hipotálamo-hipófise-ovário e sustentam a ciclicidade reprodutiva (Kawada et al., 2025; Xiao & Lai, 2025). Além disso, o ovário apresenta elevada atividade metabólica e intensa interação celular, o que o torna, particularmente, sensível a alterações no equilíbrio fisiológico. A integridade estrutural do tecido ovariano, incluindo o estroma, a vascularização e a matriz extracelular, é determinante para a manutenção da viabilidade folicular e da função endócrina. Dessa forma, qualquer intervenção que afete a morfologia ovariana como procedimentos de manipulação *in vitro* ou criopreservação pode comprometer a fisiologia do órgão, reforçando a importância do

entendimento detalhado dos aspectos morfofuncionais do ovário para o desenvolvimento de biotécnicas reprodutivas eficientes (Matsushige et al., 2024; Fletcher et al., 2025).

Figura 1. Representação esquemática da morfologia do ovário de mamífero, evidenciando as regiões cortical e medular, bem como estágios do desenvolvimento folicular dos folículos pré-antrais aos folículos antrais e o oócito.



Fonte: Elaborada pela autora

2.2 Oogênese e Foliculogênese

A oogênese e a foliculogênese são processos interdependentes que ocorrem no ovário e constituem a base da reprodução em mamíferos. O desenvolvimento adequado do oócito é determinante para a progressão folicular, enquanto o microambiente fornecido pelo folículo é essencial para a aquisição da competência oocitária. Esses processos integrados desencadeiam uma cascata coordenada de eventos moleculares, celulares e morfológicos, responsáveis por promover alterações estruturais e funcionais no folículo, culminando na diferenciação celular e no desenvolvimento do oócito (Pei et al., 2023).

A oogênese inicia-se ainda durante a vida fetal e é caracterizada pela formação, migração e proliferação das células germinativas primordiais (CGPs) na gônada primitiva

(He. et al., 2021). Inicialmente, as CGPs migram para as gônadas em desenvolvimento, onde se diferenciam em ovogônias. Durante o período fetal, as ovogônias iniciam a meiose e se transformam em oócitos primários, os quais entram em um período de interrupção na prófase I, conhecido como estágio diplóteno. Essa fase de quiescência pode se estender por longos períodos, permanecendo até a puberdade. Durante esse intervalo, os oócitos são envolvidos, protegidos e nutridos por folículos primordiais, garantindo sua viabilidade e preservação (Ducreux et al., 2023).

A partir do início da puberdade, uma fração dos folículos primordiais é recrutada em cada ciclo estral, permitindo que os oócitos retomem o processo meiótico. Esse recrutamento e crescimento inicial são modulados principalmente pelas gonadotrofinas, com destaque para o hormônio folículo-estimulante (FSH), que estimula a proliferação das células da granulosa e a maturação oocitária (Barbalho et al., 2024). Ao completar a primeira divisão meiótica, o oócito primário divide-se de forma assimétrica, originando um oócito secundário que retém a maior parte do citoplasma, essencial para o desenvolvimento embrionário e um corpúsculo polar, estruturalmente reduzido e funcionalmente inativo. O oócito secundário inicia a segunda divisão meiótica, permanecendo bloqueado na metáfase II até que ocorra a fertilização. Caso seja fecundado, a meiose é concluída, resultando na fusão dos pronúcleos e na formação do zigoto, célula inicial do desenvolvimento embrionário (Nemcova, 2026).

A foliculogênese corresponde ao processo de desenvolvimento e maturação dos folículos ovarianos e é essencial tanto para a produção de um gameta feminino competente quanto para a síntese de hormônios gonadais responsáveis pela manutenção da função endócrina ovariana (Moraes, 2023). Durante a vida reprodutiva da fêmea, esse processo envolve a ativação progressiva dos folículos primordiais, constituídos por um oócito primário circundado por uma única camada de células da granulosa achatadas (Zhang et al., 2023). À medida que se desenvolvem, os folículos primordiais tornam-se folículos primários, caracterizados pela presença de células da granulosa cúbicas, evoluindo posteriormente para folículos secundários, nos quais se observa o aumento no número de camadas dessas células e o início da diferenciação da teca folicular.

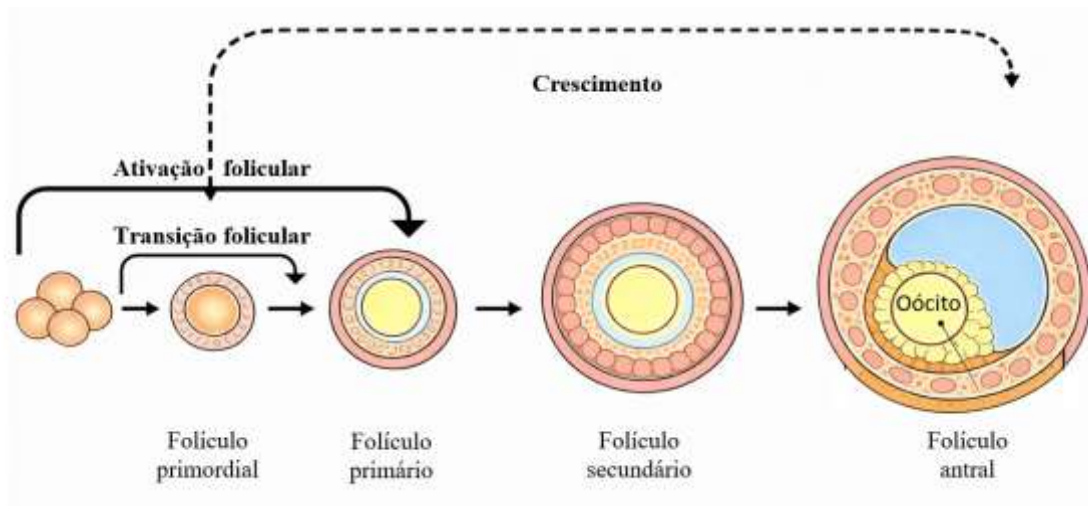
O estroma ovariano e a matriz extracelular exercem papel fundamental na sustentação estrutural e na comunicação entre as células foliculares ao longo da foliculogênese. As células estromais, associadas a componentes como fibras colágenas, contribuem para a integridade tecidual e influenciam diretamente a dinâmica do crescimento folicular (Grosbois et al., 2025). Em estágios mais avançados, formam-se os folículos terciários ou antrais, caracterizados pela presença do antro, uma cavidade preenchida por fluido folicular. O folículo dominante, ao

atingir o estágio de pré-ovulatório, torna-se apto à ovulação e à liberação do oócito (Wang, 2025; Grosbois et al., 2025).

Durante a foliculogênese, estima-se que aproximadamente 99,9% dos folículos sofram atresia, afetando principalmente os folículos antrais (Araújo et al., 2021). Apesar da elevada perda folicular, a atresia é um processo fisiológico essencial para a homeostase ovariana e para a manutenção da ciclicidade reprodutiva em mamíferos (Moraes, 2023). Esse fenômeno pode ocorrer por apoptose, necrose e autofagia. No apoptose a via predominante de morte celular programada no ovário, caracteriza-se por alterações morfológicas específicas, como retração celular e fragmentação do DNA, diferindo da necrose, que decorre de danos celulares irreversíveis e está associada à inflamação local, como consequência, a atresia reduz significativamente o potencial reprodutivo da fêmea (Stringer et al., 2023). Já a autofagia é um processo intracelular, de degradação e reciclagem de proteínas e organelas (Barbalho et al., 2024).

Do ponto de vista morfológico, os folículos ovarianos são classificados em dois grandes grupos: (a) folículos pré-antrais ou não cavitários e (b) folículos antrais ou cavitários conforme demonstrado na Figura 2. Aproximadamente 90% dos oócitos presentes no ovário encontram-se inclusos em folículos pré-antrais, que representam o principal reservatório folicular das fêmeas de mamíferas. Esses folículos permanecem em estado quiescente até serem ativados, embora apenas uma fração extremamente reduzida (cerca de 0,01%) atinja a ovulação, enquanto a grande maioria é eliminada por atresia (Chesnokov et al., 2024).

Figura 2. Representação esquemática das etapas do desenvolvimento folicular ovariano, ilustrando a progressão morfológica desde o folículo primordial, passando pelos estágios primário e secundário, até o folículo antral.



Fonte: Elaborada pela autora

Durante a onda de crescimento folicular, três fases principais são observadas: recrutamento, seleção/dominância e ovulação. O recrutamento corresponde ao crescimento inicial de um grupo de folículos sob estímulo do FSH. Na fase seguinte, um único folículo é selecionado e se torna dominante, inibindo o desenvolvimento dos demais por meio da produção de estrógenos, especialmente o 17β -estradiol, e pela dependência de pulsos basais de LH (Findlay et al., 2019). A ovulação é desencadeada pelo pico pré-ovulatório de LH, liberado pela hipófise, ocorrendo apenas quando o folículo dominante produz elevados níveis de estrógeno na ausência de concentrações elevadas de progesterona. Na presença de um corpo lúteo funcional, o pico de LH é inibido, e os folículos não ovulados entram em atresia (Holesh et al., 2024).

Em bovinos, o ciclo estral é caracterizado por duas a três ondas de crescimento folicular, porém, na ausência de níveis elevados de progesterona, apenas uma delas culmina na ovulação. Dessa forma, geralmente apenas um folículo ovula por ciclo estral, liberando um único oócito (Tortorella et al., 2025). O microambiente ovariano, composto por células estromais, matriz extracelular e uma complexa rede vascular, é determinante para o desenvolvimento e a maturação dos folículos, fornecendo suporte estrutural, nutrientes e sinais hormonais e parácrinos essenciais. A integridade desse microambiente é fundamental para assegurar a qualidade oocitária e a eficiência dos processos reprodutivos, evidenciando sua relevância na biologia reprodutiva de diferentes espécies (Costa, 2025).

Em bovinos, o ciclo estral é caracterizado por duas a três ondas de crescimento folicular, porém, na ausência de níveis elevados de progesterona, apenas uma delas culmina na ovulação. Dessa forma, geralmente apenas um folículo ovula por ciclo estral, liberando um único oócito (Tortorella et al., 2025). O microambiente ovariano, composto por células estromais, matriz extracelular e uma complexa rede vascular, é determinante para o desenvolvimento e a maturação dos folículos, fornecendo suporte estrutural, nutrientes e sinais hormonais e parácrinos essenciais. A integridade desse microambiente é fundamental para assegurar a qualidade oocitária e a eficiência dos processos reprodutivos, evidenciando sua relevância na biologia reprodutiva de diferentes espécies (Costa, 2025).

2.3 Avanços em Biotécnicas Reprodutivas Aplicadas à Preservação da Fertilidade

As biotécnicas reprodutivas representam um marco evolutivo na reprodução animal, consolidando-se como ferramentas indispensáveis para atender às crescentes demandas por eficiência produtiva, qualidade genética e sustentabilidade no setor agropecuário (Treur et al., 2023). Sua aplicação transcende os avanços técnicos, constituindo a base para sistemas

produtivos mais competitivos, inovadores e resilientes, capazes de enfrentar desafios globais relacionados à segurança alimentar, à conservação ambiental e à preservação da biodiversidade (Khan et al., 2021).

Para concretizar os benefícios proporcionados pelas biotécnicas reprodutivas, técnicas específicas têm sido amplamente aplicadas. Entre elas, a inseminação artificial (IA) destaca-se por possibilitar a disseminação rápida, segura e economicamente viável do material genético de reprodutores de alta valor genético. Essa estratégia reduz custos associados ao manejo de machos, acelera o progresso genético dos rebanhos e contribui para a produção de animais mais produtivos, saudáveis e adaptados às condições regionais (Mansour, 2025). Em níveis mais avançados, a fertilização *in vitro* (FIV) e a transferência de embriões (TE) ampliam significativamente o potencial reprodutivo e a maximização do valor genético individual (Baruselli et al., 2018). Adicionalmente, a FIV possibilita a utilização de oócitos oriundos de fêmeas com limitações reprodutivas, idade avançada ou em condições fisiológicas desfavoráveis, bem como o uso de sêmen de machos com fertilidade reduzida, garantindo a preservação de características genéticas de alto valor zootécnico (Choe & Shanks, 2022). Esses avanços são fundamentais para atender a um mercado cada vez mais exigente quanto à qualidade, rastreabilidade e origem dos produtos de origem animal (Khan et al., 2021; Treur et al., 2023).

No contexto da produção animal, a criopreservação consolidou-se como uma ferramenta estratégica para o melhoramento genético, a sustentabilidade e a segurança dos programas reprodutivos. A preservação de gametas, embriões e tecidos reprodutivos de fêmeas de alto valor genético possibilita sua utilização em momentos estratégicos, otimizando protocolos de reprodução assistida e reduzindo custos operacionais (Comizzoli & Holt, 2022). Além disso, essa técnica facilita o transporte de material genético entre diferentes regiões, minimizando riscos sanitários e impactos ambientais associados ao deslocamento de animais vivos. Em situações emergenciais, como doenças, acidentes ou morte de fêmeas geneticamente valiosas, a criopreservação assume papel essencial na manutenção da continuidade genética (Aljaser, 2022). Dessa forma, essa biotécnica ultrapassa o conceito de simples armazenamento biológico, consolidando-se como uma estratégia indispensável para enfrentar desafios globais, contribuindo para a segurança alimentar, a conservação ambiental e o avanço científico de forma ética e sustentável (Comizzoli & Holt, 2022).

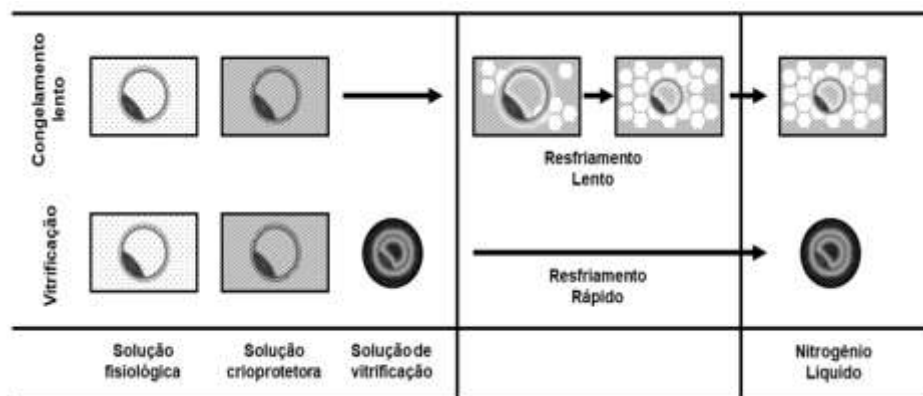
A criopreservação representa, ainda, um divisor de águas no manejo reprodutivo ao permitir o armazenamento de gametas e embriões por longos períodos, conferindo maior flexibilidade ao planejamento reprodutivo e viabilizando o uso global de material genético,

independentemente de limitações temporais ou geográficas (Mota, 2021). Além disso, essa técnica desempenha papel central na conservação de espécies ameaçadas, possibilitando a formação de bancos genéticos e a proteção do patrimônio genético frente às crescentes perdas de biodiversidade (Bolton et al., 2022).

Do ponto de vista técnico, a criopreservação baseia-se no armazenamento de células e tecidos em temperaturas extremamente baixas, geralmente em nitrogênio líquido, o que interrompe os processos metabólicos celulares e preserva a viabilidade e a integridade genética a longo prazo (Flahaut et al., 2024). Na pecuária, essa abordagem favorece o armazenamento estratégico de material genético de animais superiores, promovendo o melhoramento contínuo dos rebanhos, a adaptação a condições ambientais em constante mudança e a manutenção da diversidade genética necessária para enfrentar desafios futuros (Aweke et al., 2024).

Entre as técnicas de criopreservação disponíveis, destacam-se o congelamento lento e a vitrificação. O congelamento lento, embora amplamente utilizado, apresenta limitações, especialmente, em estruturas celulares sensíveis, como oócitos, embriões e tecidos ovarianos, devido à formação de cristais de gelo intracelulares, ao uso prolongado de crioprotetores potencialmente tóxicos e à variabilidade nos resultados (Zeng et al., 2024). Em contrapartida, a vitrificação tem se destacado por empregar taxas de resfriamento ultrarrápidas, prevenindo a formação de cristais de gelo e proporcionando maiores taxas de sobrevivência celular após o aquecimento (Mota, 2021). Essa diferença nos mecanismos de preservação reflete diretamente na aplicação prática dessas técnicas, especialmente na criopreservação do tecido ovariano, que abriga folículos em diferentes estágios de desenvolvimento. Tal abordagem amplia ainda mais o escopo de utilização das biotécnicas, permitindo estratégias como xenotransplantes e maturação folicular *in vitro* (Rodrigues et al., 2025). As principais diferenças entre o congelamento lento e a vitrificação estão ilustradas na Figura 3.

Figura 3. Diferença dos tipos de técnicas da criopreservação



Fonte: Silva Júnior, 2022

A vitrificação, em particular, representa um avanço significativo na criopreservação de oócitos, embriões e tecidos ovarianos, devido à sua eficiência, simplicidade operacional e elevados índices de viabilidade celular (Treur et al., 2023). Diferentemente do congelamento lento, que exige controle rigoroso da taxa de resfriamento e equipamentos específicos, a vitrificação utiliza altas concentrações de agentes crioprotetores associadas ao resfriamento ultrarrápido, promovendo a transição do meio aquoso para um estado vítreo, sem formação de cristais de gelo (Martins et al., 2026). Essa abordagem resulta em taxas superiores de sobrevivência e preservação funcional após o descongelamento, tornando-se a técnica de escolha em programas modernos de reprodução assistida (Casciani et al., 2023). No caso do tecido ovariano, a vitrificação permite a preservação simultânea dos folículos e da matriz extracelular, assegurando a integridade estrutural e funcional do tecido (Amorim & Dolmans, 2022).

Apesar de suas vantagens, a criopreservação ainda enfrenta desafios importantes, especialmente relacionados aos danos mecânicos decorrentes da formação de cristais de gelo e aos efeitos do estresse osmótico e oxidativo induzidos durante os processos de congelamento e descongelamento (Martins et al., 2026). Nesse contexto, o uso de agentes crioprotetores (ACPs) torna-se indispensável para minimizar esses efeitos adversos, sendo um dos focos centrais de aprimoramento dos protocolos de criopreservação contemporâneos.

2.3.1 Classificação e mecanismos de ação dos agentes crioprotetores

Os agentes crioprotetores (ACPs) são classificados, de forma geral, em permeáveis e não permeáveis, conforme sua capacidade de atravessar a membrana plasmática. Essa distinção é fundamental, uma vez que determina não apenas o mecanismo de proteção celular durante a criopreservação, mas também os riscos associados à toxicidade e ao estresse osmótico (Rodrigues et al., 2025).

Os ACPs permeáveis apresentam baixo peso molecular e elevada afinidade pela água, o que lhes permite difundir-se rapidamente para o meio intracelular. Sua principal função consiste na substituição parcial da água citoplasmática, reduzindo o ponto de congelamento e limitando a formação de cristais de gelo intracelulares, considerados um dos principais fatores de dano celular durante o congelamento (Whaley et al., 2021). Entre os compostos mais utilizados destacam-se o dimetilsulfóxido (DMSO), o etilenoglicol (EG), o glicerol e o 1,2-propanodiol (Matsumura et al., 2020).

Apesar de sua elevada eficácia, os ACPs permeáveis apresentam como principal limitação a citotoxicidade dependente da concentração, da temperatura e do tempo de

exposição. O DMSO, por exemplo, embora amplamente empregado na criopreservação de oócitos e tecidos ovarianos, tem sido associado a alterações ultraestruturais, incluindo danos mitocondriais, vacuolização citoplasmática e comprometimento da matriz extracelular, especialmente em protocolos de vitrificação que utilizam altas concentrações do agente (Martins et al., 2026). Ainda assim, suas propriedades físico-químicas, como a capacidade de aumentar a fluidez das membranas celulares, justificam sua ampla utilização (Best, 2015).

Em contraste, os ACPs não permeáveis atuam predominantemente no meio extracelular e não atravessam a membrana plasmática devido ao seu maior peso molecular. Esses compostos exercem efeito osmótico, promovendo desidratação celular controlada e reduzindo a quantidade de água livre disponível para cristalização. Além disso, contribuem para a estabilização das membranas celulares e da matriz extracelular durante os ciclos de congelamento e descongelamento (Whaley et al., 2021). Açúcares como sacarose, trealose, glicose e rafinose, bem como polímeros como a polivinilpirrolidona (PVP) e o polietileno glicol (PEG), figuram entre os principais representantes dessa classe.

Os dissacarídeos, têm recebido destaque devido à sua capacidade de preservar a organização lipídica e proteica das membranas celulares, além de atuarem como reguladores da pressão osmótica. No entanto, a resposta celular à presença desses compostos pode variar significativamente entre espécies e tipos celulares (Patist & Zoerb, 2005). Enquanto a sacarose demonstrou efeitos benéficos sobre a motilidade espermática em equinos (Moura et al., 2022), sua exclusão de soluções vitrificantes resultou em melhores taxas de maturação nuclear em oócitos de búfalas submetidos à maturação *in vitro* evidenciando que a eficácia dos ACPs não permeáveis é altamente dependente do contexto biológico (Hossain et al., 2021).

Diante das limitações associadas ao uso isolado de ACPs, estratégias combinatórias têm sido amplamente exploradas. A associação de agentes permeáveis e não permeáveis têm demonstrado efeitos sinérgicos, permitindo reduzir a concentração individual de cada composto e, conseqüentemente, minimizar a toxicidade, sem comprometer a eficiência crioprotetora (Sieme et al., 2016)

Assim, a classificação dos ACPs (Tabela 1.) não deve ser interpretada de forma isolada, mas integrada à compreensão de seus mecanismos de ação, limitações e interações, sendo essencial para o desenvolvimento de protocolos de criopreservação mais eficientes, seguros e adaptados às particularidades celulares e teciduais.

Tabela 1 Tipos de crioprotetores comumente utilizados na criopreservação de células.

PERMEÁVEIS (Intracelular) Baixa massa molecular (Mp)	IMPERMEÁVEIS (Extracelular) Alta massa molecular (Mp)
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Sacarose
Etilenoglicol (EG)	Glicose
Glicerol	Trealose
Propilenoglicol (PG)	Rafinose
Metanol	Manitol
Acetamida	Polivinilpirrolidona (PVP)
1,2-Propanodiol	Polietileno glicol (PEG)

Fonte: Elaborado pela autora

Diante da relevância dos agentes crioprotetores na preservação da integridade estrutural e funcional de tecidos ovarianos, oócitos e folículos, bem como da diversidade de compostos e mecanismos envolvidos, torna-se evidente a necessidade de uma abordagem mais aprofundada sobre o tema. Visando aprofundar a discussão, apresenta-se a seguir uma análise fundamentada no artigo de revisão “Cryoprotectants in the cryopreservation of ovarian tissue, oocytes and follicles in mammals: a narrative review”, explorando criticamente os avanços e limitações desses compostos.

2.4 Crioprotetores na criopreservação de tecido ovariano, oócitos e folículos em mamíferos: uma revisão narrativa

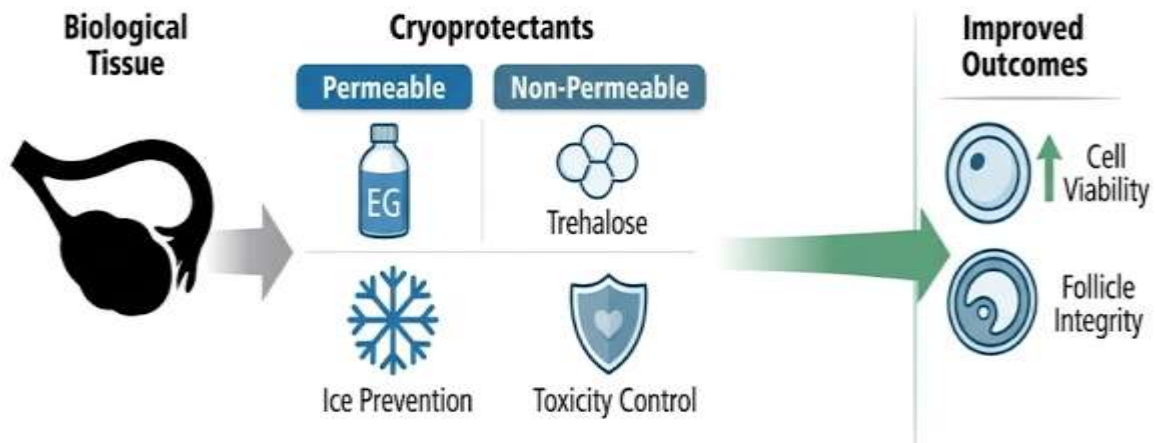
ARTIGO I

Cryoprotectants in the cryopreservation of ovarian tissue, oocytes and follicles in mammals: a narrative review

Sueline Cavalcante Chaves¹, Leopoldo Rugieri Vaz da Silva¹, Andreza de Aguiar Silva¹, Érica Costa Marcelino¹, Francisco das Chagas Costa¹, Amanda Fernandes Rocha Gonçalves¹, José Roberto Viana Silva¹.

¹Laboratory of Biotechnology and Reproductive Physiology (LABIREP), Federal University of Ceará, Ceará, Brazil.

Graphical abstract



Abstract: Cryopreservation of ovarian tissue, oocytes and follicles in mammals represents a key strategy for fertility preservation and genetic resource conservation. The success of these techniques largely depends on the selection of cryoprotectants capable of preventing ice crystal formation, controlling osmotic stress and maintaining cellular and tissue integrity. This narrative review aimed to critically analyze the main cryoprotectants used in the cryopreservation of ovarian tissue, oocytes and follicles, focusing on their mechanisms of action, efficacy and associated limitations. Current evidence indicates that no single cryoprotectant is universally optimal for all ovarian materials and species. Combined protocols using permeable cryoprotectants, such as dimethyl sulfoxide and ethylene glycol, in association with non-permeable agents, including sucrose and trehalose, have demonstrated improved post-thaw viability and preservation of follicular structure, mainly due to reduced cytotoxic effects. Among permeable cryoprotectants, ethylene glycol shows advantages related to its high membrane permeability and comparatively lower toxicity. Overall, the choice of cryoprotectants should be tailored to the type of ovarian material, species-specific characteristics and freezing protocol, with combined strategies currently representing the most effective approach.

Keywords: cryopreservation; ovarian tissue; oocytes; follicles; cryoprotectants

Introduction

The cryopreservation of oocytes, follicles, and ovarian tissue in mammals has established itself as a fundamental strategy for preserving fertility, especially in patients undergoing gonadotoxic treatments, as well as in assisted reproduction and genetic conservation programs for domestic and wild species (Ramírez & Pavone, 2024; Zeng et al., 2025). Cryogenic storage of these biological materials enables the maintenance of reproductive potential and genetic diversity, playing a central role in both human reproductive medicine and animal biotechnology (Comizzoli & Wildt, 2013; Wang et al., 2025).

Despite significant advances in slow-freezing and vitrification techniques, the success of cryopreservation of oocytes and ovarian tissues remains closely associated with the choice and appropriate combination of cryoprotectants (Kometas et al., 2021; Zeng et al., 2024). These agents are responsible for reducing ice crystal formation, controlling osmotic stress, and preserving the structural and functional integrity of germ cells and ovarian stroma during cooling and warming processes (Baust, Gao & Baust, 2009).

Permeable cryoprotectants, such as dimethyl sulfoxide (DMSO) and ethylene glycol (EG), are widely used in the cryopreservation of oocytes and ovarian tissue due to their ability to cross the cell membrane and partially replace intracellular water, reducing nucleation and ice crystal growth (Fuller, 2004; Varghese et al., 2024; Rodrigues et al., 2025). However, the dose-dependent toxicity of these compounds remains one of the main challenges, especially in highly sensitive structures such as oocytes and preantral follicles, in which subcellular changes can compromise developmental competence after thawing (Whaley et al., 2021; Sharma et al., 2025).

In parallel, non-permeable cryoprotectants, such as sucrose and trehalose, have been used as auxiliary agents in the cryopreservation of oocytes and ovarian tissue, acting predominantly in the extracellular compartment. These compounds promote controlled cell dehydration, stabilize membranes, and reduce extracellular ice formation, generally presenting lower direct toxicity when compared to permeable cryoprotectants (Li et al., 2023; Xie et al., 2024). Growing evidence indicates that the combination of permeable and non-permeable cryoprotectants reduces the concentrations of intracellular agents, attenuating their toxic effects without compromising cryoprotective efficacy (Bizarro-Silva et al., 2024).

The response to different cryoprotectants varies according to the cryopreserved biological material, with oocytes, isolated follicles, and cortical ovarian tissue characterized by particular sensitivity to osmotic, thermal, and chemical changes (Sanson-Riofrio., 2025; Leal

et al., 2025; Wang et al., 2025). Studies in animal models, as well as in human clinical applications, demonstrate that effective protocols for a given cell type or species are not always directly transferable to other contexts, reinforcing the need for specific comparative analyses (Rodrigues et al., 2025; Xião et al., 2025).

Given this scenario, it remains under debate which cryoprotectant, or combination of cryoprotectants, offers the best balance between effectiveness in preventing ice formation and biological safety for the cryopreservation of oocytes, follicles, and ovarian tissue in mammals. Thus, this article aims to critically review the available scientific literature on the main cryoprotectants used in these biological materials, comparing their mechanisms of action, advantages, and limitations. These differences in the performance of cryoprotectants become even more evident when analyzed in different biological contexts, such as experimental models, domestic animals, wild species, and humans.

For the development of this narrative review, a comprehensive literature search was conducted in international scientific databases, including PubMed, Scopus and Web of Science. The search strategy was based on combinations of keywords related to cryopreservation, cryoprotectants, ovarian tissue, oocytes and follicles in mammals. Original research articles and review papers published mainly in the last decade were considered, prioritizing studies that addressed the mechanisms of action, efficiency and toxicity of permeable and non-permeable cryoprotectants. The selected studies were critically analyzed and integrated to provide an updated and comparative overview of cryoprotective strategies applied to ovarian tissue, oocytes and follicles.

Comparison of cryoprotectants used in the cryopreservation of oocytes, follicles, and ovarian tissue

The efficiency of cryopreservation of oocytes, follicles, and ovarian tissue in mammals depends directly on the type of cryoprotectant used, its concentration, and how these agents interact with specific cellular and extracellular structures of the ovary (Pantos et al., 2024; Leal et al., 2025). In general, cryoprotectants used in these protocols are classified as permeable (intracellular) and non-permeable (extracellular), which have distinct mechanisms of action and complementary biological effects (Fuller, 2004; Varghese et al., 2024).

The main cryoprotectants used, the cryopreserved biological materials, and the principal outcomes reported across different mammalian species are summarized in Table 1.

Table 1. Main cryoprotectants used in the cryopreservation of ovarian tissue, oocytes and follicles in mammals

Species / Group	Cryopreserved material	Cryoprotectants used	Main findings	References
Rats (experimental model)	Cortical ovarian tissue / follicles	DMSO + trehalose; Tre-S	Improved cell viability and preservation of follicular organization, with reduced toxicity.	Xie et al., 2024; Liu et al., 2024
Cattle	Oocytes / preantral follicles	Ethylene glycol + sucrose	Higher oocyte maturation rates and lower cytotoxicity.	Rodrigues et al., 2025;
Wild species (felines, primates)	Oocytes / ovarian tissue	DMSO or EG + non-permeable sugars	Preservation of follicular morphology and post-thaw cell viability.	Wang et al., 2023; Ribeiro et al., 2025
Humans	Mature oocytes / cortical ovarian tissue	DMSO and/or EG + sucrose or trehalose	Effective fertility preservation with established clinical protocols.	Ramírez & Pavone, 2024; Zeng et al., 2025; Marco et al., 2024

Fonte: Elaborada pela autora

Permeable cryoprotectants: efficacy and limitations in oocytes and ovarian tissue

Permeable cryoprotectants, such as dimethyl sulfoxide (DMSO) and ethylene glycol (EG), diffuse through the plasma membrane and act by partially replacing intracellular water, reducing the freezing point and the formation of ice crystals within germ cells and ovarian tissue (Baust et al., 2009; Massiah et al., 2021). These agents are used in both slow freezing and vitrification of oocytes and cortical ovarian tissue, showing high efficacy in preserving cell viability after thawing (Kometas et al., 2021; Zeng et al., 2024).

However, the toxicity associated with the use of permeable cryoprotectants remains a significant limitation, especially in oocytes and preantral follicles, structures that are highly sensitive to osmotic and chemical changes (Whaley et al., 2021; Ribeiro et al., 2025). Studies show that prolonged exposure or the use of high concentrations of DMSO can result in membrane changes, protein denaturation, and DNA damage, compromising developmental competence after thawing (Bizarro-Silva et al., 2024).

The effectiveness and safety of permeable cryoprotectants are strongly dependent on the concentration used, exposure time and temperature during equilibration. High concentrations or prolonged exposure to agents such as dimethyl sulfoxide and ethylene glycol may lead to osmotic stress, mitochondrial dysfunction and cytoskeletal alterations, particularly in highly

sensitive cells such as oocytes (Fuller, 2004). Therefore, the establishment of safe concentration and exposure windows has been widely emphasized to balance cryoprotective efficiency with minimal cytotoxicity. Current protocols commonly adopt short exposure times, stepwise equilibration and reduced concentrations, often combined with non-permeable cryoprotectants, to mitigate toxic effects and preserve post-thaw viability (Comizzoli & Holt, 2024).

Ethylene glycol, in turn, has higher permeability and lower relative toxicity when compared to DMSO and is used in oocyte and ovarian tissue vitrification protocols in different mammalian species (Varghese et al., 2024; Rodrigues et al., 2025). However, even EG can induce osmotic stress when used in high concentrations, reinforcing the need for strategic associations with non-permeable cryoprotectants (Liu et al., 2025).

In clinical and translational protocols, the practical use of permeable cryoprotectants is limited by their dose-dependent toxicity and by the intrinsic sensitivity of the biological material. In human-assisted reproduction and fertility preservation programs, dimethyl sulfoxide and ethylene glycol are generally applied at carefully controlled concentrations and exposure times, often following stepwise equilibration protocols to minimize osmotic shock and cellular damage (Rienzi et al., 2017; Comizzoli & Holt, 2024). Excessive concentrations or prolonged exposure are avoided due to the risk of impaired spindle organization, mitochondrial dysfunction and reduced developmental competence, particularly in oocytes. Consequently, clinical protocols prioritize the combination of permeable cryoprotectants with non-permeable agents and rapid cooling techniques, such as vitrification, to maximize cryoprotection while maintaining cellular safety (Kuwayama, 2007).

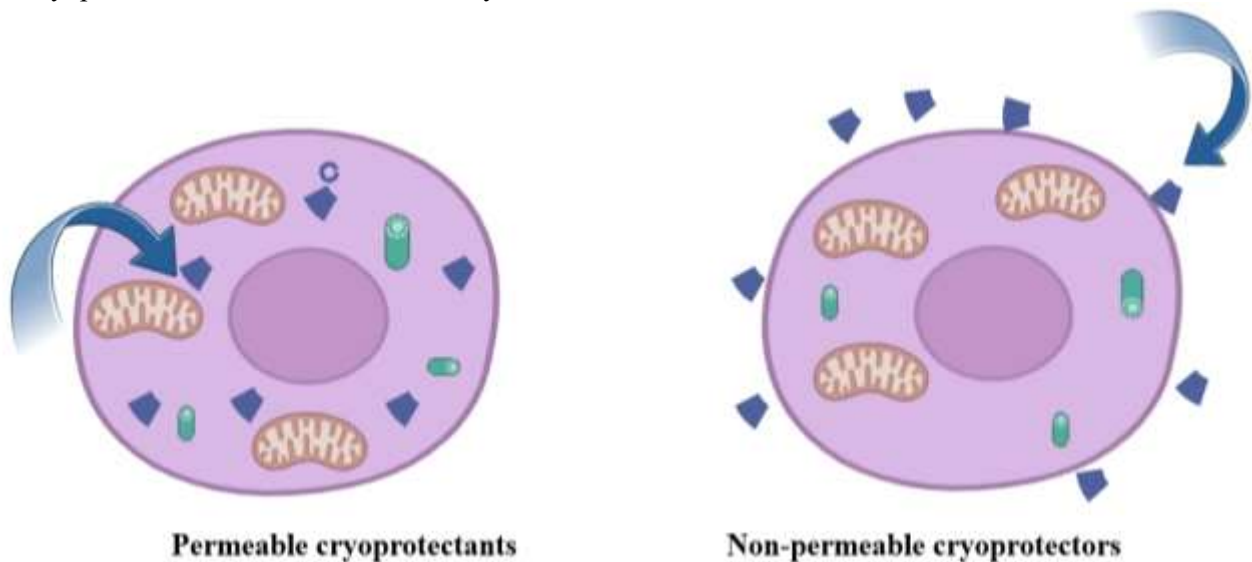
Non-permeable cryoprotectants: extracellular protection and osmotic support

Non-permeable cryoprotectants, such as sucrose and trehalose, remain predominantly in the extracellular environment and play a key role in the cryopreservation of oocytes and ovarian tissue by promoting controlled cell dehydration and plasma membrane stabilization (Li et al., 2023; Fuller, 2004). These agents reduce extracellular ice formation and help control the osmotic gradient during the cooling and warming stages (Ye et al., 2025).

In experimental models and applications in different mammalian species, the addition of sucrose or trehalose to vitrification and slow-freezing protocols has been associated with improved morphological integrity of follicles and increased oocyte survival rates after thawing (Marco et al., 2024; Wang et al., 2025). Despite these advantages, non-permeable cryoprotectants do not offer direct protection to the intracellular compartment and are

insufficient when used alone in oocytes and ovarian tissue (Li et al., 2023; Assadi et al., 2025). The mechanisms of action of permeable and non-permeable cryoprotectants during the cryopreservation process are illustrated in Figure 1 e Table 2.

Figure 1. Mechanisms of action of permeable and non-permeable cryoprotectants during the cryopreservation of ovarian tissue, oocytes and follicles.



Fonte: Elaborada pela autora

Table 2. Comparative characteristics of permeable and non-permeable cryoprotectants used in ovarian tissue, oocyte, and follicle cryopreservation

Characteristic	Permeable cryoprotectants (e.g., DMSO, ethylene glycol)	Non-permeable cryoprotectants (e.g., sucrose, trehalose)
Molecular size	Low	High
Membrane permeability	High (cross the plasma membrane)	Absent or negligible
Primary site of action	Intracellular	Extracellular
Main mechanism	Partial replacement of intracellular water and reduction of freezing point	Osmotic dehydration and stabilization of the extracellular environment
Control of ice crystal formation	Mainly intracellular	Mainly extracellular
Osmotic stress modulation	Moderate (dose-dependent)	High (extracellular control)
Cytotoxicity	Moderate to high, depending on concentration and exposure time	Low
Use as a single agent	Limited	Insufficient
Best application	In combination with non-permeable cryoprotectants	As adjuncts to permeable cryoprotectants
Biological relevance in ovarian tissue	Protects follicular cells but may induce toxicity	Preserves stromal integrity and extracellular matrix

Fonte: Elaborada pela autor

Combined strategies: evidence of greater efficacy and lower toxicity

Growing evidence indicates that the combination of permeable and non-permeable cryoprotectants represents the most effective approach for the cryopreservation of oocytes, follicles, and ovarian tissue in mammals (Bizarro-Silva et al., 2024). This strategy allows for a reduction in the concentrations of permeable agents, minimizing their toxic effects while maintaining adequate protection against ice crystal formation and recrystallization during warming (Li et al., 2023).

Recent studies in different species demonstrate that protocols based on the association of DMSO or EG with non-permeable sugars result in better preservation of follicular morphology, greater cell viability, and more consistent maintenance of post-thaw development competence when compared to the isolated use of permeable cryoprotectants (Rodrigues et al., 2025; Ribeiro et al., 2025; Marco et al., 2024).

Applications of cryopreservation of oocytes, follicles, and ovarian tissue in mammals

The application of cryopreservation of oocytes, follicles, and ovarian tissue in different mammalian species has contributed significantly to understanding the effectiveness of cryoprotectants used in these biological materials. Studies conducted in experimental models, domestic animals, wild species, and humans allow us to identify patterns of response to cryoprotectants, as well as specific limitations related to ovarian structure and cell sensitivity (Silva et al., 2025; Sanson-Riofrio et al., 2025).

Experimental models: controlled evidence on cryoprotectants

Experimental models, especially rodents, have been widely used to evaluate the effectiveness of different cryoprotectants in the cryopreservation of ovarian tissue and follicles, due to the possibility of strict control of experimental variables (Ye et al., 2025; Wang et al., 2025). In these models, the combination of permeable cryoprotectants, such as DMSO, with impermeable sugars, such as trehalose, has been associated with higher cell survival rates and better preservation of follicular organization after thawing (Ye et al., 2025).

In addition, recent studies have shown that alternative formulations, such as trehalose functionalized with sulfoxide groups (Tre-S), can offer efficient cryoprotective protection with lower toxicity when compared to DMSO alone, preserving the integrity of cell membranes and reducing ice formation (Liu et al., 2024). These findings reinforce the current trend toward developing combined or modified cryoprotectants with a focus on reducing toxicity.

Domestic animals: implications for assisted reproduction

In domestic species, such as cattle, cryopreservation of oocytes and preantral follicles plays a strategic role in assisted reproduction and genetic conservation programs. Studies indicate that ethylene glycol, especially when combined with non-permeable cryoprotectants such as sucrose, performs better than DMSO alone, resulting in higher rates of oocyte maturation, *in vitro* fertilization, and maintenance of follicular viability after thawing (Rodrigues et al., 2025).

These results suggest that, in bovine oocytes, ethylene glycol may represent a safer alternative with lower relative toxicity, provided it is used in combined protocols and carefully adjusted in terms of concentration and exposure time (Varghese et al., 2024).

Wild and human species: challenges and convergences

The cryopreservation of oocytes and ovarian tissue in wild species and humans presents additional challenges related to biological variability, the size and density of the ovarian stroma, and ethical and clinical requirements (Ramírez & Pavone, 2024; Romero et al., 2026). In these contexts, vitrification using combinations of permeable cryoprotectants (DMSO and/or EG) with non-permeable sugars has been employed, resulting in the maintenance of follicular morphology and cell viability after thawing (Romero et al., 2026).

In humans, protocols based on the combination of DMSO or EG with sucrose or trehalose are considered standard, especially for the cryopreservation of cortical ovarian tissue and mature oocytes, allowing the preservation of fertility in cancer patients (Ramírez & Pavone, 2024; Zeng et al., 2025). However, even in these established protocols, concerns remain about the toxicity of permeable cryoprotectants, reinforcing the need for strategies that prioritize less aggressive combinations and the development of new agents (Kong et al., 2025).

Challenges and limitations in the cryopreservation of oocytes, follicles, and ovarian tissue

Despite significant advances in the cryopreservation of oocytes, follicles, and ovarian tissue in mammals, choosing the most suitable cryoprotectant remains a central challenge, as cryoprotective efficacy is often associated with adverse effects related to chemical toxicity and osmotic stress (Whaley et al., 2021; Pantos et al., 2024). Ovarian structures, especially oocytes and preantral follicles, are highly sensitive to physicochemical variations, which limits the use

of high concentrations of permeable cryoprotectants, even when they are effective in preventing ice crystal formation (Vickram et al., 2025; Kong et al., 2025).

The dose-dependent toxicity of permeable cryoprotectants, such as dimethyl sulfoxide and ethylene glycol, remains one of the main limitations of current protocols. Although these agents are widely used due to their high cell penetration capacity, studies show that inadequate exposure can result in damage to the plasma membrane, cell organelles, and DNA, compromising the developmental competence of oocytes and follicular integrity after thawing (Baust et al., 2009; Bizarro-Silva et al., 2024).

Another relevant challenge concerns interspecies and intertissue variability in response to cryoprotectants. Effective protocols for bovine oocytes, for example, do not always produce equivalent results in rodents, primates, or humans due to differences in ovarian stromal composition, cell volume, and membrane permeability (Rodrigues et al., 2025; Ribeiro et al., 2025; Wang et al., 2025). This variability limits the direct extrapolation of results and reinforces the need for specific protocols for each biological material and species.

Furthermore, evaluating cryoprotective efficacy based exclusively on morphological parameters or cell survival rates may be insufficient. Evidence indicates that high post-thaw viability rates do not always translate into maintenance of functional competence, such as oocyte maturation, fertilization, and embryonic development (Diaz-Muñoz et al., 2025). In this context, factors such as oxidative stress play a relevant role, and adjuvant strategies, including the use of antioxidants during cryopreservation and subsequent *in vitro* culture, have been proposed to mitigate these effects (Barrozo et al., 2021).

Finally, in the context of clinical application in humans and the conservation of endangered species, ethical and safety aspects must also be considered when choosing cryoprotectants. The search for agents with lower toxicity and greater biocompatibility has driven the development of new compounds and alternative formulations, although many are still in the experimental phase (Vickram et al., 2025; Kong et al., 2025). Thus, current challenges reinforce that the definition of the “best” cryoprotectant should not be based on a single agent, but on strategies that balance efficacy, safety, and biological specificity.

Recent advances in cryopreservation and prospects for the use of cryoprotectants in oocytes, follicles, and ovarian tissue

In recent years, significant advances in reproductive cryobiology have directed research toward the development of safer cryoprotectants and the optimization of protocols applicable

to the cryopreservation of oocytes, follicles, and ovarian tissue in mammals (Agca et al., 2025). These innovations reflect a paradigm shift, in which the focus is no longer on the isolated efficacy of a single agent but rather on strategies that combine protection against ice formation, reduced toxicity, and functional preservation of ovarian material (Nizharadze et al., 2024).

Among the most relevant advances is the exploration of alternative or modified cryoprotectants, which are less toxic than classic agents such as DMSO. Compounds based on functionalized sugars, such as trehalose modified with sulfoxide groups (Tre-S), have demonstrated the ability to inhibit ice formation and preserve the integrity of cell membranes, offering efficient protection to oocytes and ovarian tissues with less cytotoxic impact (Liu et al., 2024). Although still in the experimental phase, these results point to the potential for partial replacement or reduction of traditional permeable cryoprotectant concentrations.

At the same time, vitrification has established itself as the preferred method for cryopreserving oocytes and ovarian tissue in different mammalian species due to its ability to reduce ice crystal formation through high cooling rates (Pantos et al., 2024; Zeng et al., 2024). The combination of vitrification with optimized combinations of permeable and non-permeable cryoprotectants has been linked to improved cell survival rates and preservation of follicular morphology, reinforcing the importance of synergy between the method and cryoprotective composition (Kong et al., 2025).

Complementary technological advances have also contributed to the improvement of ovarian cryopreservation protocols. The use of controlled delivery systems for cryoprotectants, such as liposomes and nanoparticles, as well as the incorporation of antioxidants into freezing and post-thaw culture media, has shown potential for reducing oxidative stress and subcellular damage in oocytes and follicles (Susa et al., 2021; Barrozo et al., 2021). These approaches reinforce that cryoprotective efficacy does not depend exclusively on the agent used, but on an integrated set of strategies.

Thus, future prospects indicate that advances in the cryopreservation of oocytes, follicles, and ovarian tissue in mammals will be associated with the development of more biocompatible cryoprotectants, reduced dependence on high concentrations of classic permeable agents, and the customization of protocols according to the biological material and species. These advances contribute directly to the definition of safer and more effective approaches, bringing the field closer to a more precise answer to the question of which cryoprotectant offers the best performance in freezing ovarian tissue, oocytes, and follicles.

Conclusion

Based on the analyzed evidence, there is no single cryoprotectant that can be considered universally superior for the cryopreservation of ovarian tissue, oocytes and follicles in mammals. The reviewed studies indicate that strategies based on the combination of permeable cryoprotectants, such as dimethyl sulfoxide or ethylene glycol, with non-permeable agents, including sucrose or trehalose, provide the best balance between effectiveness in preventing ice crystal formation and reduction of cellular toxicity. Among permeable cryoprotectants, ethylene glycol stands out due to its lower relative toxicity and high membrane permeability, particularly when associated with non-permeable sugars. Therefore, the literature supports that the selection of the “best” cryoprotectant should consider the biological material, species and protocol employed, with combined approaches currently representing the most effective and safest strategy.

Reference

AGCA, Y.; KESKINTEPE, L. Cryopreservation in human reproductive medicine. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 71, n. 1, p. 598–617, 2025. DOI: 10.1080/19396368.2025.2588615.

ASADI, E.; NAJAFI, A.; BENSON, J. D. The effects of various synthetic polymers on oxidative stress in ovarian tissue subjected to cryoprotectant exposure and vitrification. **Cryobiology**, v. 119, p. 105243, 2025. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2025.105243.

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. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2021.106801. ISSN 0378-4320.

BAUST, J. G.; GAO, D.; BAUST, J. M. Cryopreservation: an emerging paradigm change. **Organogenesis**, v. 5, n. 3, p. 90–96, 2009. DOI: 10.4161/org.5.3.10021.

BIZARRO-SILVA, C. *et al.* Evaluation of bovine ovarian tissue cryopreservation through analysis of reactive oxygen species, toxicity, morphometry, and morphology. **Veterinary Sciences**, v. 11, n. 11, p. 579, 2024. DOI: 10.3390/vetsci11110579.

COMIZZOLI, P.; HOLT, W. V. Recent advances in fertility preservation and genomic resource storage for rare and endangered animal species. In: NAGY, Z. P.; VARGHESE, A. C.; AGARWAL, A. (eds.). **Criopreservação na reprodução assistida**. Cham: Springer, 2024. DOI: 10.1007/978-3-031-58214-1_26.

COMIZZOLI, P.; WILDT, D. E. Mammalian fertility preservation through cryobiology: value of classical comparative studies and the need for new preservation options. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, n. 1, p. 91–98, 2013. DOI: 10.1071/RD13259.

DIAZ-MUÑOZ, J. *et al.* Enhancing the developmental potential of in vitro matured and vitrified bovine oocytes using extracellular vesicles from large follicles. **Scientific Reports**, v. 15, p. 33243, 2025. DOI: 10.1038/s41598-025-17981-4.

FULLER, B. J. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. **CryoLetters**, v. 25, n. 6, p. 375–388, 2004. Disponível em: <https://www.ingentaconnect.com/content/cryo/cryo/2004/00000025/00000006/art00001>. Acesso em: 05/01/2026.

KHOSRAVI, F. *et al.* Ovarian tissue cryopreservation and follicular survival. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 30, n. 11, p. 1397–1406, 2013. DOI: 10.1007/s10815-013-0088-2.

KOMETAS, M. *et al.* Methods of ovarian tissue cryopreservation. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 38, n. 8, p. 1937–1946, 2021. DOI: 10.1007/s43032-021-00591-6.

KONG, Q. *et al.* Comparison of ovarian tissue cryopreservation quality by conventional slow cryopreservation and vitrification: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Ovarian Research**, v. 18, p. 62, 2025. DOI: 10.1186/s13048-024-01561-7.

KUWAYAMA, M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. **Theriogenology**, v. 67, n. 1, p. 73–80, 2007. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2006.09.014.

LEAL, G. R. *et al.* The domestic cat oocyte: strategies and challenges in IVM and cryopreservation. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 49, n. 1, 2025. DOI: 10.21451/1809-3000.RBRA2025.001.

LEE, S.; OZKAVUKCU, S.; KU, S. Y. Current and future perspectives for improving ovarian tissue cryopreservation and transplantation outcomes for cancer patients. **Reproductive Sciences**, v. 28, n. 6, p. 1746–1758, 2021. DOI: 10.1007/s43032-021-00517-2.

LI, X. *et al.* Visualization of ice crystal behavior in mouse oocytes during high-speed quench cooling and ice inhibition by antifreezing hydrogels. **Biopreservation and Biobanking**, v. 22, n. 4, p. 404–412, 2024. DOI: 10.1089/bio.2023.0108.

LIU, M. *et al.* Sulfoxide-functional trehalose enhances DMSO-free cryopreservation of mammalian cells. **Chemical Engineering Journal**, v. 495, p. 153706, 2024. DOI: 10.1016/j.cej.2024.153706.

LIU, Z. *et al.* Multidisciplinary, nature-inspired strategies for the cryopreservation of tissues and organs. **Advanced Materials**, v. 37, n. 51, e10982, 2025. DOI: 10.1002/adma.202510982.

MARCO, A. *et al.* Current fertility preservation measures in young women with cancer and future perspectives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 8, p. 4360, 2024. DOI: 10.3390/ijms25084360.

MASSIAH, G. *et al.* Cryopreservation of adipose tissue: implications for ovarian tissue protocols. **Cryobiology**, v. 103, p. 141–146, 2021. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2021.07.016.

NIZHARADZE, N. Innovations in oocyte preservation techniques. **Medical Times**, v. 2, n. 1, p. 50–58, 2024. DOI: 10.71419/mtggrc.2024.17.

PANTOS, K. *et al.* The effect of open and closed oocyte vitrification systems on embryonic development: a systematic review and network meta-analysis. **Journal of Clinical Medicine**, v. 13, n. 9, p. 2651, 2024. DOI: 10.3390/jcm1309265.

RAMIREZ, T.; PAVONE, M. Exploring the frontiers of ovarian tissue cryopreservation. **Journal of Clinical Medicine**, v. 13, n. 15, p. 4513, 2024. DOI: 10.3390/jcm13154513.

RIBEIRO, R. B. *et al.* Evaluation of different combinations of cryoprotectants in vitrification and slow freezing for ovarian tissue preservation in domestic cats. **Reproduction in Domestic Animals**, 2025. DOI: 10.1111/rda.70064.

RIENZI, L. *et al.* Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification. **Human Reproduction Update**, v. 23, n. 2, p. 139–155, 2017. DOI: 10.1093/humupd/dmw038.

RODRIGUES, A. P. R. *et al.* Advances in the cryopreservation of oocytes and ovarian follicles in ruminants. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 49, n. 1, p. 26–37, 2025. DOI: 10.21451/1809-3000.RBRA2025.002.

ROMERO, P. *et al.* Standardization of cryopreservation of bovine ovarian cortex. **Animals**, v. 16, p. 266, 2026. DOI: 10.3390/ani16020266.

SANSON-RIOFRIO, J. *et al.* Uterus cryopreservation from experimental models to clinical application: a translational review. **Cureus**, v. 17, n. 12, e100012, 2025. DOI: 10.7759/cureus.100012.

SHARMA, O.; PANDEY, G. Understanding the impact of triazoles on female fertility and embryo development. **Toxicology Reports**, v. 14, p. 101948, 2025. DOI: 10.1016/j.toxrep.2025.101948.

SILVA, A. M. *et al.* Ovarian tissue cryopreservation in mammals: recent advances. **Animal Reproduction Science Reports**, v. 6, suppl. 1, p. 50–54, 2025. DOI: 10.1016/j.xfre.2025.01.009.

SUSA, F. *et al.* Antioxidant-based strategies in cryopreservation. **Cryobiology**, v. 98, p. 46–56, 2021. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2020.12.009.

VARGHESE, A. C.; NAGY, Z. P.; AGARWAL, A. Cryopreservation in a global perspective: editors' considerations. In: NAGY, Z. P.; VARGHESE, A. C.; AGARWAL, A. (eds.). **Criopreservação em reprodução assistida**. Cham: Springer, 2024. DOI: 10.1007/978-3-031-58214-1_1.

VICKRAM, A. S. *et al.* Advances in cryopreservation techniques for human gametes and embryos. **CryoLetters**, v. 46, n. 4, p. 213–230, 2025. DOI: 10.54680/fr25410110112.

WANG, Y. *et al.* Advances in mammalian ovarian tissue cryopreservation. **Animals and Zoonoses**, v. 1, 2025. DOI: 10.1016/j.azn.2025.02.004.

WHALEY, D. *et al.* Cryopreservation: an overview of the principles and specific considerations for each cell type. **Cell Transplantation**, v. 30, 2021. DOI: 10.1177/0963689721999617.

XIAO, S. *et al.* Review of applications of deep learning in veterinary diagnostics and animal health. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 12, 2025. DOI: 10.3389/fvets.2025.1511522.

YE, Z. *et al.* Study on the competitive mechanism between cellular osmotic damage and mechanical damage under curve-controlled freezing.. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 150, p. 6925–6937, 2025. DOI: 10.1007/s10973-024-13981-0.

ZENG, Y. *et al.* Comparative efficacy of cryoprotectants in ovarian tissue vitrification. **BMC Women's Health**, v. 24, p. 654, 2024. DOI: 10.1186/s12905-024-03505-1.

2.5 Estratégias Antioxidantes e o Estresse Oxidativo Durante a Criopreservação Celular

As EROs são subprodutos inevitáveis do metabolismo celular aeróbio e exercem funções fisiológicas essenciais, atuando como mediadores de vias de sinalização envolvidas na proliferação, diferenciação celular e resposta inflamatória (Hong et al., 2024; Halliwell et al., 2000). Entre as principais EROs destacam-se o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), o radical hidroxila ($\text{HO}\bullet$), além de espécies não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o peroxinitrito (ONOO^-) (Martemucci et al., 2022). Em condições fisiológicas, essas moléculas são rigidamente controladas por sistemas antioxidantes celulares, garantindo a homeostase redox.

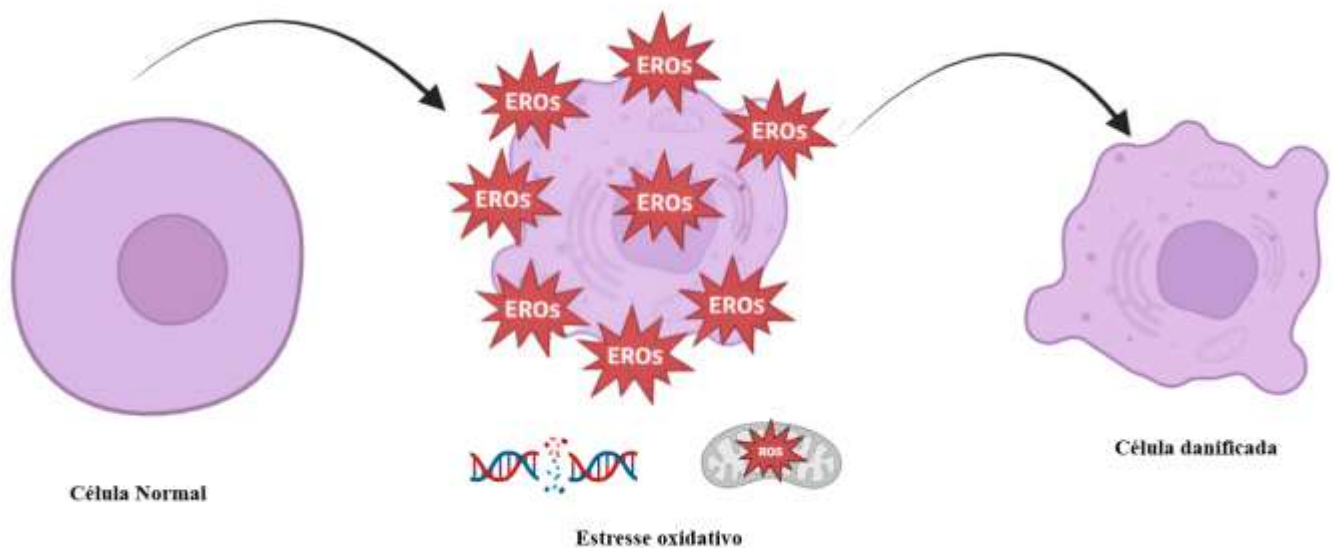
O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de EROs e a capacidade antioxidante da célula, levando à oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, com conseqüente comprometimento da integridade e viabilidade celular (Halliwell, 2006). As mitocôndrias representam uma das principais fontes endógenas de EROs, especialmente durante a fosforilação oxidativa, na qual o superóxido é gerado e rapidamente convertido em H_2O_2 pelas enzimas superóxido dismutases (SODs) (Tirichemnet al., 2021). Em condições de sobrecarga oxidativa, entretanto, os sistemas antioxidantes tornam-se insuficientes, favorecendo danos celulares progressivos (Fernandez & Ricardo Jesus, 2021).

Os mecanismos de defesa antioxidante incluem enzimas como SOD, catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPX), além de antioxidantes não enzimáticos, como glutathiona reduzida (GSH), vitaminas C e E (Parcheta et al., 2021). Embora essenciais para a sobrevivência celular, esses sistemas são particularmente vulneráveis durante procedimentos de criopreservação, nos

quais alterações abruptas de temperatura, osmolaridade e exposição a agentes crioprotetores (ACPs) intensificam a geração de EROs (Baliou et al., 2021).

Durante a vitrificação, a disfunção mitocondrial associada ao estresse osmótico e químico induzido pelos ACPs resulta em aumento significativo da produção de EROs, especialmente $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , concomitante à redução da eficiência dos sistemas antioxidantes endógenos (Akhtarshenas et al., 2024). Esse desequilíbrio redox compromete a integridade estrutural de membranas celulares, a função mitocondrial e a estabilidade do DNA, afetando diretamente a viabilidade e a competência funcional das células após o aquecimento (Halliwell, 2006; Parcheta et al., 2021) conforme esquematizado na Figura 4.

Figura 4. Estresse oxidativo na célula



Fonte: Elaborado pela autora

Nesse contexto, a suplementação de antioxidantes aos meios de vitrificação, aquecimento e cultivo têm emergido como uma estratégia promissora para mitigar os efeitos deletérios do estresse oxidativo. Diversos compostos antioxidantes, incluindo resveratrol, curcumina, quercetina, rutina, anetol, ácido gálico, epigallocatequina galato (EGCG), astaxantina e sulfato de zinco, demonstraram eficácia na redução da produção de EROs e na preservação da integridade celular durante a criopreservação (Ñaupas et al., 2024).

Estudos recentes indicam que a suplementação antioxidante pode manter elevadas taxas de viabilidade celular após a vitrificação, variando entre 70,6% e 83,9%, sem diferenças significativas em relação a tecidos frescos (Ñaupas et al., 2024). Contudo, análises

histomorfológicas revelam que, apesar da manutenção da viabilidade, a porcentagem de folículos estruturalmente íntegros permanece superior nos controles não criopreservados, evidenciando que os antioxidantes atenuam, mas não eliminam completamente, os danos induzidos pelo processo. Resultados semelhantes foram observados com o uso de anetol e rutina, que preservaram a integridade de folículos pré-antrais, reduziram os níveis intracelulares de EROs e mantiveram a atividade mitocondrial após o aquecimento (Morais, 2018). Compostos fenólicos, como o ácido gálico e a EGCG, também demonstraram efeitos protetores relevantes, especialmente na manutenção da morfologia celular e na redução do estresse oxidativo pós-descongelamento (Akbarzadeh-Jahromi et al., 2022). A astaxantina, por sua vez, tem se destacado pela elevada capacidade antioxidante e pela promoção de maior viabilidade celular durante a vitrificação (Berean et al., 2024).

Outros antioxidantes clássicos, como a vitamina C e a vitamina E, também apresentaram efeitos benéficos, contribuindo para a redução do apoptose, preservação da função mitocondrial e melhora da integridade estrutural de oócitos, embriões e células germinativas submetidas à criopreservação (Zarbakhsh et al., 2021). Ademais, estratégias baseadas na combinação de antioxidantes têm demonstrado resultados superiores em comparação ao uso isolado, uma vez que diferentes compostos atuam em vias complementares do sistema redox celular (Martins et al., 2026).

Em síntese, embora a suplementação antioxidante represente uma abordagem promissora para minimizar os danos oxidativos induzidos pela criopreservação, os resultados ainda dependem fortemente do tipo celular, espécie, concentração, tempo de exposição e combinação dos compostos utilizados. Assim, a otimização de estratégias antioxidantes permanece um desafio central para o aprimoramento dos protocolos de criopreservação, exigindo abordagens integradas e baseadas em evidências para maximizar a viabilidade e funcionalidade celular pós-descongelamento (Murray & Gibson, 2022).

2.5 Caracterização Química e Atividade Antioxidante do Óleo Essencial de *Lippia sidoides*.

O gênero *Lippia* (Verbenaceae) compreende numerosas espécies de importância medicinal e econômica, amplamente empregadas na medicina tradicional brasileira e reconhecidas por apresentarem diversas atividades biológicas relevantes, como ações antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante (Mesa -Arango et al., 2009; Almeida et al., 2020). Dentre essas espécies, destaca-se *Lippia sidoides* Cham., (Figura 5) popularmente conhecida como alecrim-pimenta, uma planta aromática nativa do Brasil, com ocorrência predominante na região Nordeste, especialmente, nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte,

além do norte de Minas Gerais e do Vale do Jequitinhonha (Melo, 2012). O óleo essencial extraído das partes aéreas de *L. sidoides* é caracterizado por elevada concentração de compostos fenólicos, sendo o timol e o carvacrol os constituintes majoritários mais frequentemente relatados (Khwaza & Aderibigbe, 2025). Esses monoterpenos fenólicos são amplamente associados às propriedades biológicas do óleo essencial, incluindo atividades antimicrobiana, antifúngica, anti-inflamatória e antioxidante (Khwaza & Aderibigbe, 2025). Nesse contexto, *L. sidoides* representa um importante recurso fitogenético, cujo potencial terapêutico e econômico sustentável justifica a ampliação dos estudos de caracterização fitoquímica e funcional.

Figura 5. *Lippia sidoides* Cham.



Fonte: aplantadavez.com

Os primeiros estudos de caracterização fitoquímica do óleo essencial de *L. sidoides* relataram rendimento aproximado de 4%, com predominância de timol (43,5%) e α -felandreno (22,4%) (de Souza, 2015). Investigações subsequentes confirmaram teores de óleo essencial de até 4,5% nas folhas, mantendo o timol ou o carvacrol como os principais componentes, ambos reconhecidos por seu elevado potencial biológico. Entretanto, a composição química do óleo essencial apresenta variações significativas em função de fatores como origem geográfica, condições edafoclimáticas, estágio fenológico e práticas de cultivo (de Souza, 2015). De modo geral, amostras oriundas do Nordeste brasileiro apresentam o timol como componente majoritário, enquanto espécimes cultivados na região Sudeste do Brasil têm revelado perfis

químicos distintos, com predominância de carvacrol, 1,8-cineol, isoborneol ou acetato de bornila (Moura et al., 2025). Esses achados reforçam a existência de diferentes quimiotipos de *L. sidoides*, embora o timol permaneça como o constituinte majoritário mais recorrente nos estudos realizados no território nacional (de Souza, 2015). Portanto, é provável que existam diferentes quimiotipos em relação à composição química de seu óleo essencial como demonstrado na (Tabela 2) que lista os constituintes majoritários encontrados no óleo essencial extraído das folhas de *Lippia sidoides* coletadas em diferentes lugares do Brasil.

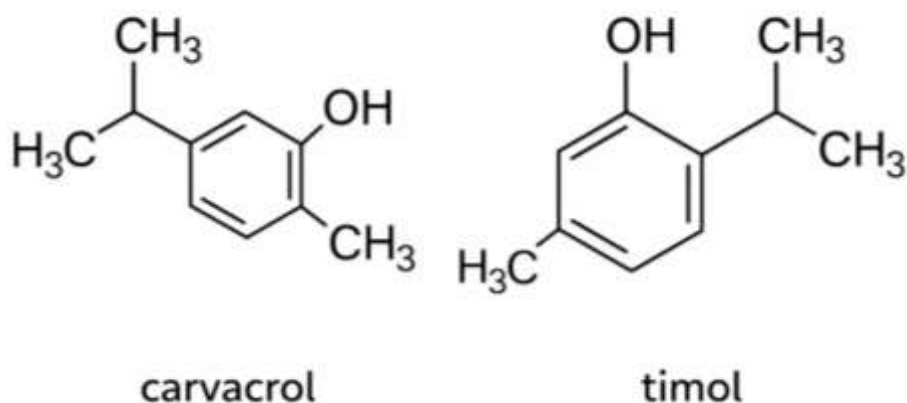
Tabela 2. Principais componentes (%) do óleo essencial das folhas de *L. sidoides*.

Espécie	Principais constituintes majoritários	Região de ocorrência / origem	Principais atividades biológicas	Referência
<i>Lippia sidoides</i> Cham.	Timol; Carvacrol	Nordeste do Brasil (CE, RN)	Antimicrobiana, antifúngica, anti-inflamatória, antioxidante	Mesa-Arango et al., 2009; Almeida et al., 2020
<i>Lippia sidoides</i> Cham.	Timol; α -felandreno	Nordeste do Brasil	Atividades biológicas associadas a compostos fenólicos	de Souza, 2015
<i>Lippia sidoides</i> Cham.	Timol ou Carvacrol	Nordeste brasileiro	Antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória	Khwaza & Aderibigbe, 2025
<i>Lippia sidoides</i> Cham.	Carvacrol; 1,8-cineol; isoborneol; acetato de bornila	Sudeste do Brasil	Atividades biológicas dependentes do perfil químico	Moura et al., 2025
<i>Lippia sidoides</i> Cham.	Timol (constituente recorrente)	Brasil (diversas regiões)	Elevado potencial terapêutico e econômico	de Souza, 2015

Fonte: Elaborado pela autora

A Figura 6 ilustra as fórmulas estruturais dos principais compostos majoritários identificados no óleo essencial de *L. sidoides*, destacando o timol e o carvacrol como moléculas-chave associadas às suas atividades biológicas.

Figura 6. Fórmula estrutural dos componentes majoritários do óleo essencial de *L. sidoides*.



Fonte: Sousa, 2016

Além da reconhecida ação antimicrobiana frente a bactérias e fungos com aplicações promissoras, por exemplo, no controle de microrganismos patogênicos relacionados à saúde bucal, o óleo essencial de *L. sidoides* tem despertado crescente interesse científico devido ao seu potencial antioxidante. Estudos demonstram que seus constituintes são capazes de neutralizar radicais livres, protegendo as células contra danos oxidativos e contribuindo para a manutenção da homeostase celular (Caetano Filho, 2023).

Adicionalmente, os componentes majoritários timol e carvacrol têm sido avaliados isoladamente, demonstrando elevada capacidade antioxidante. Estudos indicam que esses compostos apresentam desempenho superior ao de outros quimiotipos e, em determinados ensaios, à própria vitamina C, especialmente nos testes de ABTS e redução de Fe^{3+} (Huang et al., 2025). Observa-se ainda uma relação direta entre a concentração desses monoterpenos fenólicos e a intensidade da atividade antioxidante, com o quimiotipo carvacrol exibindo os melhores resultados globais (Chroho et al., 2024). Em conjunto, essas evidências sustentam o potencial do óleo essencial de *Lippia sidoides* como uma fonte natural de compostos bioativos com ação antioxidante relevante. O efeito sinérgico entre seus constituintes, aliado à capacidade de modular processos oxidativos e inflamatórios, reforça sua aplicabilidade em estratégias destinadas à proteção celular frente ao estresse oxidativo aspecto particularmente relevante no contexto da criopreservação de tecidos e células, tema central do presente estudo.

3 JUSTIFICATIVA

Em bovinos, a preservação da fertilidade por meio da criopreservação do tecido ovariano tem se consolidado como estratégia relevante tanto para programas de reprodução assistida quanto para a conservação genética, uma vez que possibilita a manutenção de uma ampla reserva de folículos pré-antrais em diferentes estágios de desenvolvimento. Esses folículos representam a maior fração da população folicular ovariana e apresentam resistência relativa aos danos mecânicos, característica que os torna alvos promissores para protocolos de criopreservação (Ramirez & Pavone, 2024).

Apesar dessas vantagens, os processos de congelamento e aquecimento do tecido ovariano estão associados a diferentes tipos de injúrias celulares e teciduais. Entre elas destacam-se o choque térmico e osmótico, a formação de cristais de gelo e a toxicidade dos crioprotetores utilizados. Esses fatores podem comprometer a integridade morfológica e funcional dos folículos pré-antrais, do oócito e das células somáticas associadas, além de afetarem negativamente o estroma ovariano e a matriz extracelular, componentes essenciais para a manutenção da viabilidade folicular e para o desenvolvimento subsequente (Najafi, Asadi & Benson, 2023).

Um dos principais mecanismos envolvidos nesses danos está relacionado ao desequilíbrio na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), o qual favorece o estabelecimento do estresse oxidativo e a redução da capacidade antioxidante celular. O excesso de EROs pode desencadear peroxidação lipídica, danos ao DNA e disfunção mitocondrial, culminando em apoptose celular e comprometendo a sobrevivência e a ativação folicular após a criopreservação. Esse efeito não é uniforme e pode variar conforme o tipo celular e o microambiente tecidual envolvido. Ainda assim, o estresse oxidativo permanece como um dos principais fatores limitantes para a eficiência dos protocolos de preservação do tecido ovariano (Barberino et al., 2023; Santos, Bababerino & Matos, 2023).

Estratégias capazes de minimizar o estresse oxidativo tornam-se fundamentais para o aprimoramento dos protocolos de criopreservação. Nesse contexto, a utilização de substâncias antioxidantes tem sido investigada como abordagem complementar, com destaque para os compostos de origem natural. Esses compostos despertam interesse não apenas por sua ampla disponibilidade, mas também por apresentarem menor toxicidade e diversidade de atividades biológicas quando comparados a antioxidantes sintéticos (Costa, 2025; Guseva et al., 2024).

Entre os antioxidantes naturais, o óleo essencial de *Lippia sidoides* destaca-se por apresentar elevada concentração de monoterpenos fenólicos, como timol e carvacrol, reconhecidos por suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias. Esses

compostos possuem potencial para atuar na neutralização de EROs e na proteção de estruturas celulares sensíveis ao estresse oxidativo, como membranas, mitocôndrias e componentes do estroma ovariano.

Apesar do crescente interesse pelo uso de antioxidantes naturais na criopreservação, ainda são escassos os estudos que avaliam o potencial do óleo essencial de *Lippia sidoides* como agente citoprotetor associado à criopreservação do tecido ovariano. Essa lacuna é particularmente evidente no que se refere à preservação da morfologia folicular, do estroma e da matriz extracelular após o aquecimento. Assim, a investigação do efeito antioxidante desse composto pode fornecer subsídios científicos relevantes para o desenvolvimento de protocolos de criopreservação mais eficientes e biologicamente seguros, contribuindo para a melhoria da preservação da fertilidade em bovinos.

4 HIPOTÉSES

- A adição do óleo essencial de *L. sidoides* nas concentrações de 4, 40 e 400 µg/mL à solução de vitrificação contribui para a preservação da integridade morfológica dos folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano bovino, favorecendo a ativação folicular, bem como a manutenção da organização do estroma e da matriz extracelular.
- A suplementação da solução de vitrificação com o óleo essencial de *L. sidoides* modula a atividade do sistema antioxidante enzimático, contribuindo para a redução do estresse oxidativo e para a preservação estrutural do tecido ovariano bovino após a vitrificação e o cultivo *in vitro*.
- A adição do óleo essencial de *L. sidoides* à solução de vitrificação reduz atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPX, e aumenta os níveis de tióis reduzidos no tecido ovariano bovino vitrificado, de forma dependente da concentração.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

- Avaliar a influência da adição do óleo essencial de *L. sidoides* como agente antioxidante na solução de vitrificação de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano bovino.

5.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de *L. sidoides* (4, 40 e 400 µg/mL) na viabilidade de células do *cumulus* bovinas cultivadas *in vitro*.
- Avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações do óleo essencial de *L. sidoides* (4, 40 e 400 µg/mL) durante a vitrificação do tecido ovariano bovino sobre a ativação e a integridade morfológica dos folículos pré-antrais, bem como sobre a organização do estroma e da matriz extracelular ovariana.
- Analisar a integridade estrutural celular e tecidual do tecido ovariano bovino após a vitrificação suplementada com o óleo essencial de *L. sidoides*, com ênfase na preservação das células foliculares, estromais e da matriz extracelular ovariana.
- Determinar a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPX, bem como os níveis de tióis reduzidos, no tecido ovariano bovino submetido à vitrificação na presença do óleo essencial de *L. sidoides*.

6 ARTIGO II

***Lippia sidoides* essential oil improves follicular integrity and redox balance during vitrification of bovine ovarian cortex**

***Lippia sidoides* essential oil improves follicular integrity and redox balance during vitrification of bovine ovarian cortex**

Sueline Cavalcante Chaves¹, Leopoldo Rugieri Vaz da Silva¹, Andreza de Aguiar Silva¹, Érica Costa Marcelino¹, Francisco das Chagas Costa¹, Solano Dantas Martins², Valdevane Rocha Araújo², José Roberto Viana Silva¹.

¹Laboratory of Biotechnology and Reproductive Physiology (LABIREP), Federal University of Ceará, Ceará, Brazil.

²Laboratory of Research in Reproductive Physiology (FisioRep Lab), Parnaíba Delta Federal University, Brazil.

Abstract

Ovarian tissue cryopreservation is a key strategy for fertility preservation in mammals; however, its efficiency remains limited by structural and functional damage associated with oxidative stress induced during vitrification. In this context, natural antioxidants have emerged as promising adjuvants to mitigate cryoinjury. This study aimed to evaluate the effects of *Lippia sidoides* essential oil supplementation during vitrification of bovine ovarian tissue. Bovine cumulus cells were cultured in vitro with different concentrations of *Lippia sidoides* essential oil (4, 40, and 400 µg/mL), and cell viability was assessed using a fluorescence assay with calcein-AM and ethidium homodimer-1. Cortical ovarian fragments were subjected to vitrification in the absence (vitrified control) or presence of the essential oil at concentrations of 4, 40, or 400 µg/mL, followed by warming and 24 h of in vitro culture. Cumulus cell viability, follicular activation and development, follicular morphological integrity, stromal cell density, extracellular matrix collagen content, and pro-oxidant and antioxidant profiles were assessed. Supplementation of culture medium with 4 and 40 µg/mL significantly improved cumulus cell viability, as well as enhanced follicular activation and developmental progression, and increased the proportion of morphologically normal follicles vitrified compared with the control group. In addition, these concentrations contributed to the preservation of stromal organization and extracellular matrix integrity without inducing redox imbalance. The highest concentration tested (400 µg/mL) did not confer additional benefits. In conclusion, 4 and 40 µg/mL *Lippia sidoides* essential oil acts as a modulator of the ovarian microenvironment and represents a promising adjuvant strategy to improve bovine ovarian tissue vitrification outcomes.

Keywords: Cryopreservation; Ovarian tissue; Vitrification; Oxidative stress; Essential oils; Cattle

1 Introduction

Ovarian tissue cryopreservation is a well-established strategy for fertility preservation, with applications in both animal production and human reproductive medicine. This approach is particularly relevant in situations in which ovarian function is threatened or compromised, such as in females exposed to gonadotoxic treatments, allowing the long-term preservation of reproductive potential for future use (Ezzati et al., 2025; Zhang et al., 2026). Among the available cryopreservation methods, vitrification has gained prominence due to its ability to induce ultra-rapid cooling, thereby minimizing ice crystal formation and reducing mechanical damage to ovarian tissue (Jugulytė & Bartkevičienė, 2026).

Despite technical advances, the efficiency of ovarian tissue cryopreservation remains limited by cellular and molecular alterations that occur during freezing and warming. One of the main factors involved in cryoinjury is the excessive generation of reactive oxygen species (ROS), which disrupts redox homeostasis and compromises tissue integrity after vitrification (Isachenko et al., 2025). Increased ROS levels are associated with lipid peroxidation, DNA damage, mitochondrial dysfunction, and activation of apoptotic pathways, ultimately leading to reduced follicular survival and structural alterations in both follicular and stromal compartments (Kobayashi et al., 2025; Najafi et al., 2023).

Given the central role of oxidative balance in follicular survival, strategies aimed at modulating redox status have been widely investigated to mitigate cryopreservation-induced damage. The supplementation of antioxidants during vitrification protocols has emerged as a promising approach, particularly considering the high sensitivity of preantral follicles to oxidative and osmotic stress (Najafi et al., 2023; Kurutas, 2015). In this context, natural compounds have attracted increasing interest due to their antioxidant capacity and lower cytotoxic potential compared with synthetic agents (Gecer et al., 2026).

Among these compounds, the essential oil of *Lippia sidoides*, a plant species native to northeastern Brazil, has been extensively reported for its antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial properties (Oliveira et al., 2024; Monteiro et al., 2007). The biological activity of *L. sidoides* essential oil is mainly attributed to its high content of phenolic compounds, particularly thymol, as well as flavonoids and other bioactive metabolites capable of scavenging reactive species and modulating cellular responses to oxidative stress (Ben Miri., 2025).

Considering that ovarian tissue exhibits high metabolic activity, intense cell–cell communication, and a microarchitecture highly dependent on redox balance for the maintenance of follicular viability, the application of natural antioxidants may be particularly relevant in this system (Ghantabpour et al., 2025; Zhao et al., 2025). However, despite the recognized biological potential of *L. sidoides* essential oil, its application in ovarian tissue cryopreservation protocols remains poorly explored, especially with respect to the preservation of follicular morphology, stromal organization, and extracellular matrix integrity following vitrification.

Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of *Lippia sidoides* essential oil supplementation during vitrification and subsequent in vitro culture of bovine ovarian tissue. We tested the hypothesis that the addition of this essential oil could attenuate oxidative stress–related damage and contribute to the preservation of follicular integrity, stromal organization, and redox balance after warming.

2 Materials and Methods

Ethics Committee and Ovarian Collection

The experimental proposal was submitted to and approved by the Ethics and Animal Welfare Committee of the Federal University of Ceará (UFC), under opinion no. P08/25. Bovine ovaries (n = 12 pairs) from adult cyclic cows were collected at a local slaughterhouse immediately after slaughter. The ovaries were washed in 70% ethanol for approximately 10 seconds, followed by two washes in 0.9% saline solution supplemented with penicillin (100 mg/mL) and streptomycin (100 mg/mL). They were then transported to the laboratory within a maximum of 1 hour, immersed in α -MEM medium at 4 °C.

Obtaining *Lippia sidoides* Essential Oil

Lippia sidoides essential oil was purchased commercially from Terraflor Aromaterapia (<https://terra-flor.com/loja>). The chemical characterisation of the essential oil was performed by the Organic Chemistry Laboratory of the Vale do Acaraú State University (UVA).

Culture of Cumulus Cells and Cell Viability Assay

Cumulus cells (CCs) were obtained from bovine cumulus–oocyte complexes (COCs) collected from antral follicles (2–8 mm in diameter). The COCs were aspirated using a syringe and needle (18–20 G), and the CCs were isolated by mechanical pipetting in α -MEM medium.

After centrifugation ($300 \times g$ for 5 minutes), the CCs were resuspended in α -MEM supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin (100 μ g/mL) and glutamine (2 mM). The cells were seeded in culture plates and maintained at 38.5 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

After cell stabilisation, the cultures were exposed to *L. sidoides* essential oil at concentrations of 4, 40, and 400 μ g/mL for 48 hours. Cell viability was assessed using the fluorescent markers calcein-AM and ethidium homodimer, according to the manufacturer's instructions. Viable (calcein-AM⁺) and non-viable (ethidium⁺) cells were quantified under a fluorescence microscope, and the results were expressed as a percentage of viable cells relative to the total number of cells analysed.

Vitrification of Ovarian Tissue in the Presence of *Lippia sidoides*

In the laboratory, the ovarian cortex of each pair of ovaries was fragmented into pieces measuring approximately 3 \times 3 \times 1 mm. Two fragments from each pair were assigned to the non-vitrified control group, while the others underwent the vitrification process.

The fragments were initially exposed to the vitrification solution (VS) composed of α -MEM supplemented with 10% foetal bovine serum, 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) and 0.25 mol/L sucrose, in the absence (vitrified control) or presence of *Lippia sidoides* essential oil at concentrations of 4, 40, and 400 $\mu\text{g/mL}$. Exposure to SV occurred for 5 minutes at room temperature.

The fragments were then subjected to solid surface vitrification, as described by Costa et al. (2021), with adaptations. For this purpose, a metal plate was placed in direct contact with liquid nitrogen, and the fragments were positioned on the opposite surface of the plate, promoting immediate vitrification. Subsequently, the fragments were placed in 2 mL cryotubes (2 fragments/cryotube) and stored in liquid nitrogen ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) for approximately 30 days.

Warming of Ovarian Tissue

After storage, the fragments were reheated by removing the cryotubes from liquid nitrogen and leaving them at room temperature for 1 minute, followed by immersion in a water bath at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Subsequently, the fragments were sequentially incubated in α -MEM medium supplemented with 10% SFB and decreasing concentrations of sucrose (0.5, 0.25, and 0 mol/L) for 5 minutes at each.

In vitro culture of post-vitrification ovarian tissue

After warming, the fragments were cultured in vitro for 24 hours in α -MEM medium supplemented with bovine serum albumin (BSA; 1.25 mg/mL), glutamine (2 mM), hypoxanthine (2 mM), penicillin/streptomycin (100 $\mu\text{g/mL}$), insulin (10 $\mu\text{g/mL}$), transferrin (5.5 $\mu\text{g/mL}$) and selenium (10 $\mu\text{g/mL}$). The culture conditions were maintained at $38.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 .

Morphological Analyses and Follicular Development Assessment

Histological analyses were performed as described by Bizarro-Silva et al. (2018). The fragments were fixed in 4% paraformaldehyde for 24 hours, dehydrated, embedded in paraffin, sectioned at 6 μm , and stained with haematoxylin and eosin. Follicular classification (primordial, transitional, primary, and secondary; normal or degenerate) was performed under optical microscopy (400 \times), according to criteria established by Telfer et al. (2008).

Evaluation of Ovarian Stromal Cell Density and Analysis of Collagen

Ovarian stromal cell density was determined by counting the number of cells in an area

of 100 μm^2 , as described by Cavalcante et al. (2019). Fifteen random fields per slide were analysed, with evaluations performed by a single observer blinded to the experimental groups.

Collagen content was assessed by staining with Picrosirius Red, according to the methodology described by Rittié (2017). The percentage of area occupied by collagen fibres was quantified by image analysis using ImageJ software (version 1.51p).

Pro-Oxidant and Antioxidant Profile Analyses

Ovarian tissue fragments were homogenised in potassium phosphate buffer (K_2HPO_4 ; pH 7.5) at a ratio of 1:9 (w/v) and centrifuged at $1,500 \times g$ for 15 minutes at 4 °C. The supernatants were used for biochemical analyses.

Total sulfhydryl group (thiol) levels were determined according to the method described by Ellman (1959). Superoxide dismutase (SOD) activity was determined according to the spectrophotometric method previously described in the literature. Catalase (CAT) activity was evaluated according to the method of Aebi (1984), while glutathione peroxidase (GPX) activity was determined according to standardised protocols described in the literature. The results were expressed as units of enzyme activity per milligram of protein. The concentration of total proteins was determined by the Bradford method (1976), using Coomassie blue, with absorbance reading at 595 nm.

Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (version 9.0). Data normality was assessed using the Shapiro–Wilk test. Percentage data were analysed using the chi-square test, while continuous variables were analysed using ANOVA or the Kruskal–Wallis test, as appropriate. Results were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM), considering statistical significance when $P < 0.05$.

3 Results

Cell viability of cumulus cells

The cytotoxicity of *Lippia sidoides* essential oil in bovine cumulus cells (CCs) was assessed by calcein-AM fluorescence (viable cells) and ethidium homodimer (non-viable cells) after 48 hours of exposure to the different concentrations tested (Figure 1).

The CCs exposed to a concentration of 4 $\mu\text{g/mL}$ showed a significant increase in calcein-AM fluorescence compared to the control group cultured only in α -MEM ($P < 0.05$), indicating greater cell viability under this condition (Figure 1A). In turn, exposure to the 40

$\mu\text{g/mL}$ concentration resulted in a significant reduction in ethidium homodimer fluorescence when compared to both the control group and the 4 $\mu\text{g/mL}$ treatment ($P < 0.05$), evidencing a lower proportion of non-viable cells (Figure 1B).

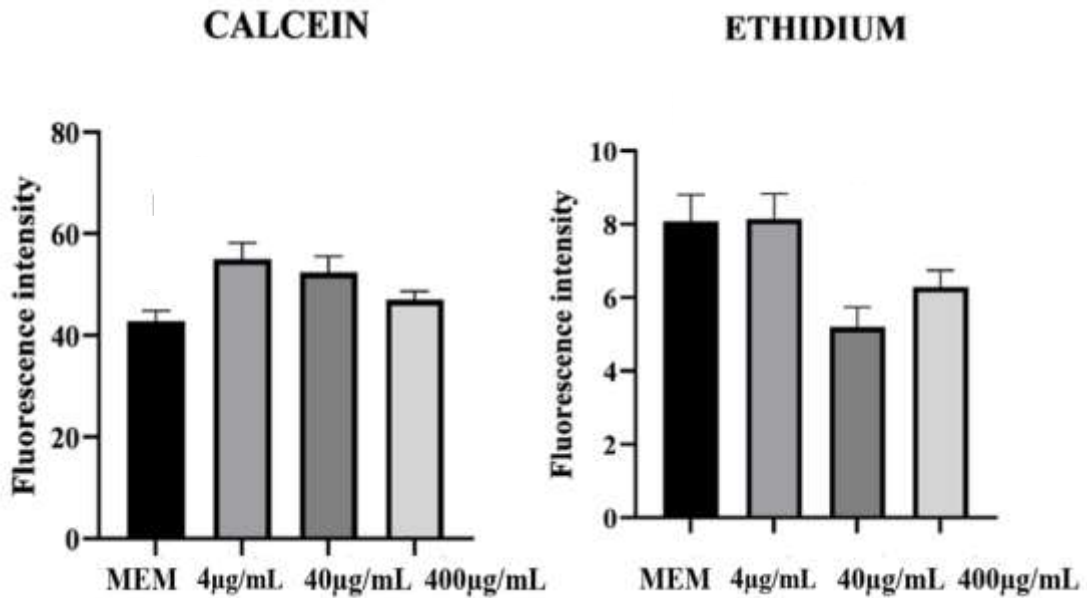


Figure 1. Cumulus cell viability after exposure to *Lippia sidoides* essential oil.

(A) Percentage of viable cumulus cells (calcein-positive) after 48 h of exposure to *L. sidoides* essential oil at concentrations of 4, 40, and 400 $\mu\text{g/mL}$. (B) Percentage of non-viable cumulus cells (ethidium homodimer-1 positive). Data are presented as mean \pm SEM. Asterisks indicate statistically significant differences ($P < 0.05$).

Morphological analyses corroborated the quantitative data, demonstrating that CCs treated with 4 and 40 $\mu\text{g/mL}$ of essential oil showed better cell integrity and preservation of morphology when compared to the control group (Figure 2). The concentration of 400 $\mu\text{g/mL}$ did not promote additional improvements in cell viability.

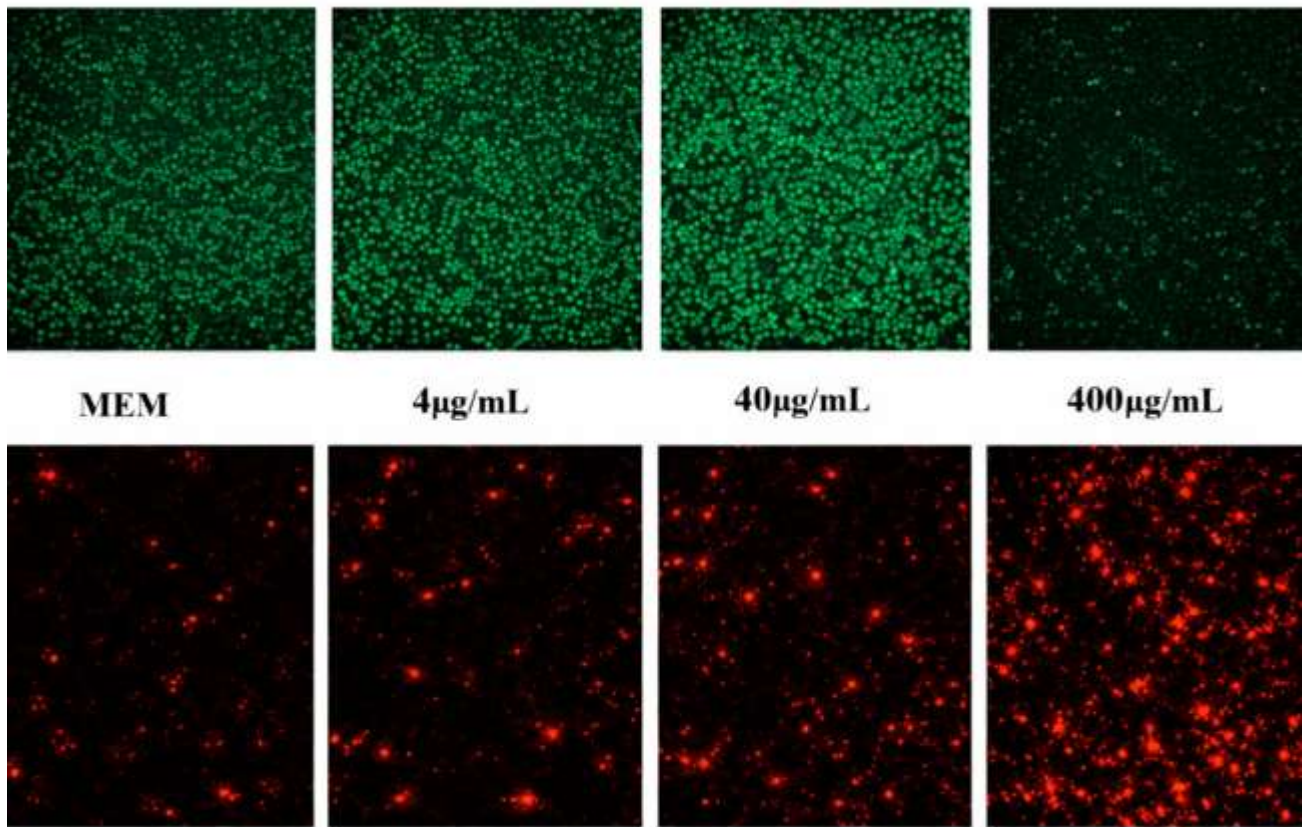


Figure 2. Morphological evaluation of cumulus cells after treatment with *Lippia sidoides* essential oil. Representative fluorescence micrographs of cumulus cells cultured in α -MEM (control) and treated with *L. sidoides* essential oil at concentrations of 4 and 40 $\mu\text{g/mL}$ for 48 h. Viable cells were stained with calcein-AM (green), and non-viable cells were stained with ethidium homodimer-1 (red).

Follicular activation and development after ovarian tissue vitrification

After vitrification, warming, and in vitro culture for 24 hours, both primordial and developing follicles were observed in all experimental groups, indicating the preservation of follicular integrity and activation capacity following the cryobiological process (Figure 3).

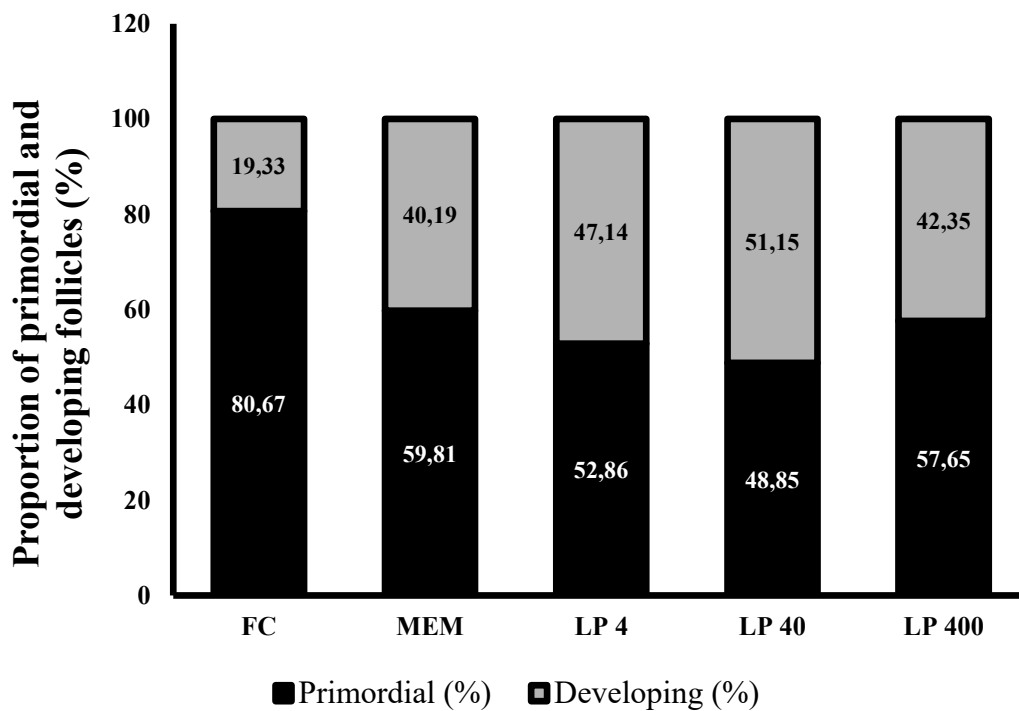


Figure 3. Follicular activation after vitrification and in vitro culture of bovine ovarian tissue. Percentage distribution of follicular classes (primordial and developing (transitional, primary, and secondary) follicles) after vitrification, warming, and 24 h of in vitro culture in the absence (vitrified control) or presence of *L. sidoides* essential oil at concentrations of 4, 40, and 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Data are expressed as mean \pm SEM. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

Analysis of follicular activation, based on the proportion of primordial and developing follicles, revealed differences among treatments. The vitrified control group showed a predominance of primordial follicles, with a lower proportion of developing follicles, whereas all cultured groups exhibited increased follicular activation.

Tissues supplemented with *Lippia sidoides* at 4 and 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ showed a clear increase in the proportion of developing follicles, indicating enhanced follicular activation compared to the vitrified control group ($P < 0.05$). Although the 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration resulted in the highest proportion of developing follicles, the 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ treatment demonstrated a more balanced profile, achieving effective activation without the potential drawbacks associated with higher concentrations.

In contrast, the highest concentration tested (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) did not improve follicular activation, showing values closer to the control group. These findings suggest that increasing the concentration does not confer additional benefits.

Overall, the results indicate that lower concentrations of *Lippia sidoides*, particularly 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, are more advantageous, promoting follicular activation in a more controlled and potentially less harmful manner.

Follicular morphological integrity

Morphological evaluation revealed the presence of structurally normal and degenerated follicles in all experimental groups (Figure 4). The vitrified control group had a higher proportion of degenerated follicles compared to the groups treated with *Lippia sidoides* essential oil.

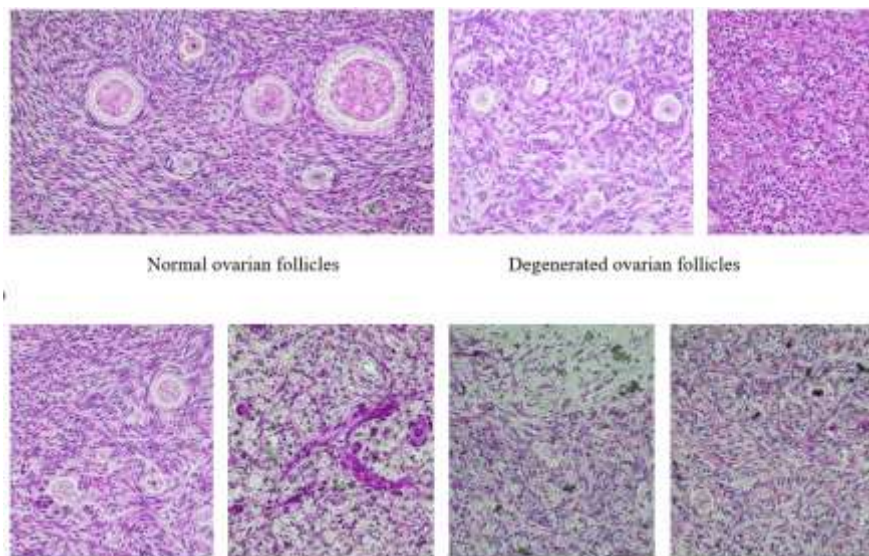
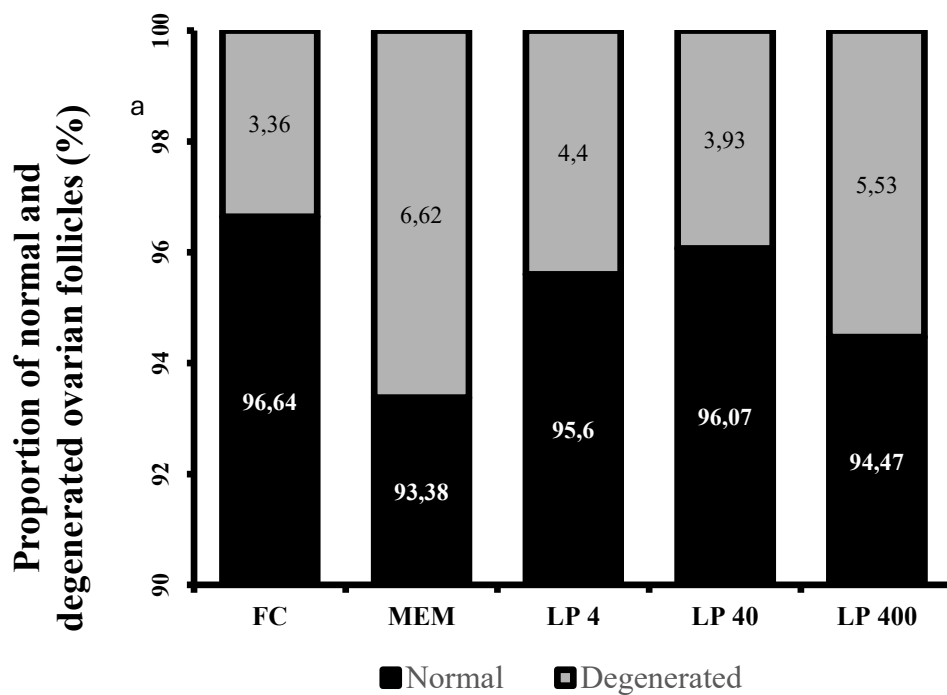


Figure 4. Follicular morphological integrity after vitrification of bovine ovarian tissue. Percentage of morphologically normal and degenerated follicles after vitrification, warming, and in vitro culture in the absence (vitrified control) or presence of *L. sidoides* essential oil at concentrations of 4, 40, and 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Statistical differences between groups are indicated by $**P < 0.001$ and $***P < 0.0001$.

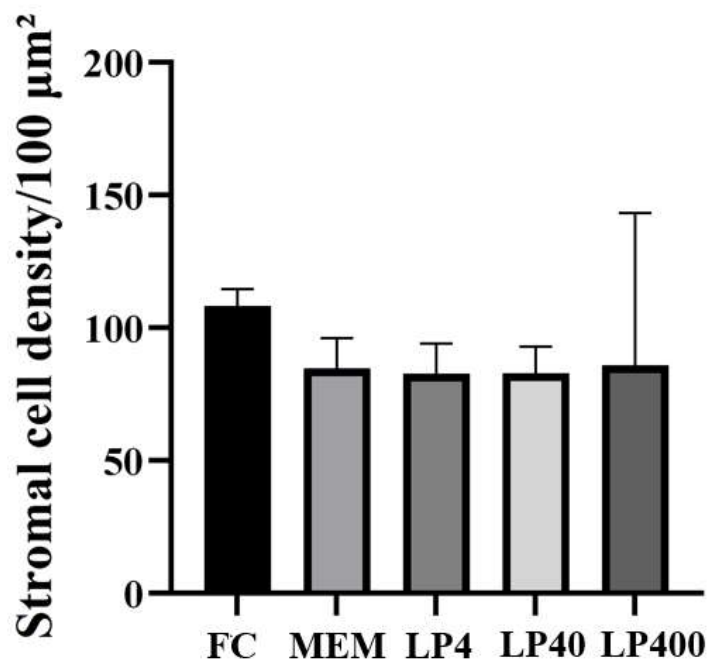
The treatments with 4 and 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ resulted in a higher percentage of morphologically normal follicles, indicating a protective effect of the essential oil on follicular structural integrity after vitrification and in vitro culture ($P < 0.05$). The highest concentration evaluated (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) showed intermediate percentages of normal and degenerated follicles, with no significant differences in relation to the other supplemented groups.

Ovarian stromal cell density

Ovarian stromal cell density was assessed after vitrification, warming, and in vitro culture of bovine ovarian tissue (Figure 5).

In general, the groups supplemented with *Lippia sidoides* showed stromal density values comparable to the vitrified control group. However, treatment with 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ resulted in a significant increase in stromal cell density when compared to the vitrified control, 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ groups ($P < 0.05$).

The concentrations of 4 and 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ maintained stromal density values similar to the vitrified control group, indicating preservation of stromal organisation without inducing marked structural changes.



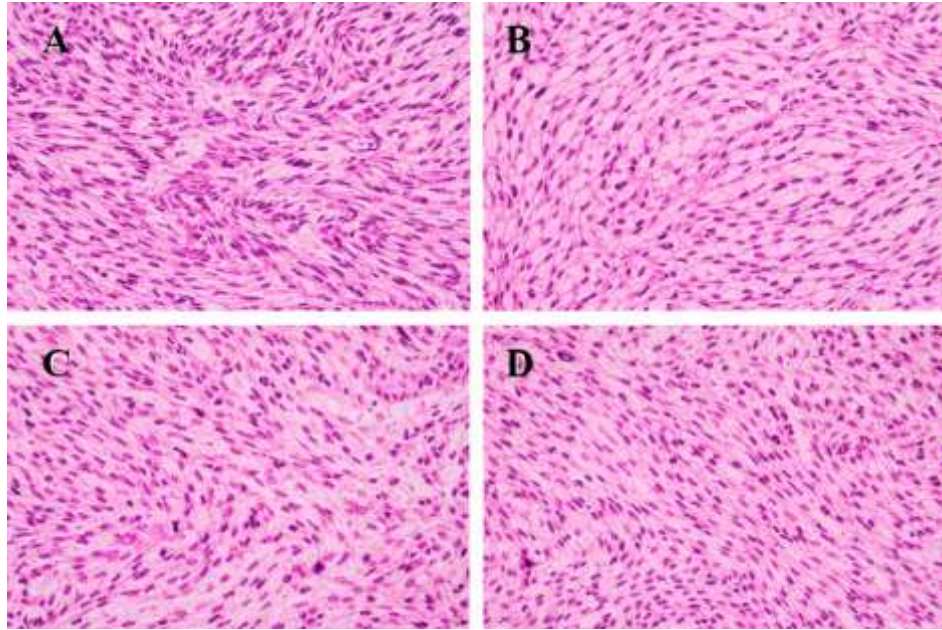


Figure 5. Stromal cell density of bovine ovarian tissue after vitrification and in vitro culture. Stromal cell density after vitrification, warming, and in vitro culture in the presence of different concentrations of *L. sidoides* essential oil. Data are expressed as mean \pm SEM. Asterisks indicate statistically significant differences between groups (* $P < 0.05$; *** $P < 0.0001$). (A) MEM; (B) 4 $\mu\text{g/mL}$ (C) 40 $\mu\text{g/mL}$ (D) 400 $\mu\text{g/mL}$

Evaluation of collagen in the ovarian extracellular matrix

Analysis of collagen content revealed significant differences between the non-vitrified control tissue and the vitrified groups (Figure 6). The non-vitrified control group had a higher percentage of collagen fibres when compared to the vitrified control groups, 40 $\mu\text{g/mL}$ and 400 $\mu\text{g/mL}$ of *Lippia sidoides* ($P < 0.01$).

Among the vitrified groups, no significant differences were observed in the collagen content of the extracellular matrix, regardless of supplementation with essential oil. These results indicate that, although vitrification reduces collagen content compared to fresh tissue, the addition of *Lippia sidoides* did not intensify the deleterious effects of the cryobiological process on the ovarian extracellular matrix.

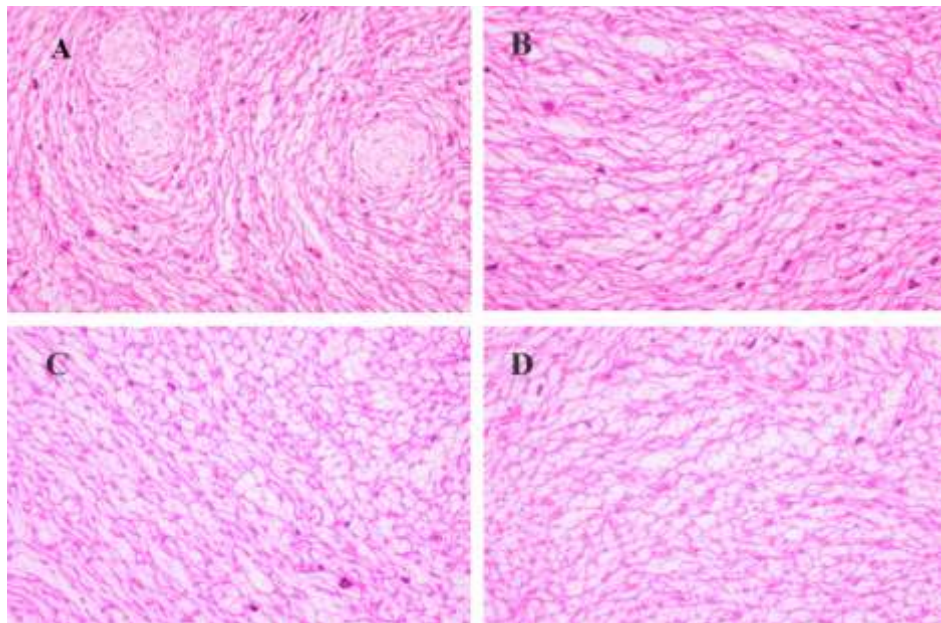
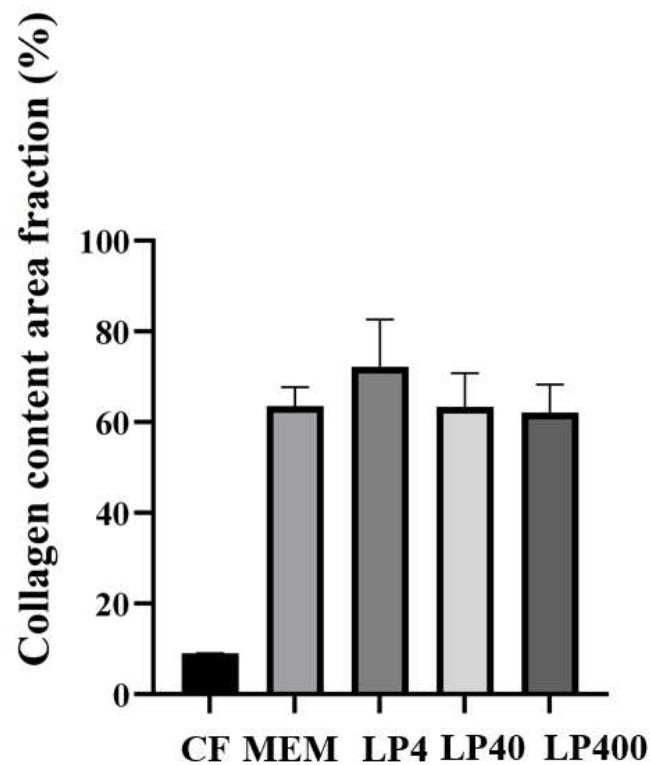


Figure 6. Extracellular matrix collagen content in bovine ovarian tissue after vitrification and in vitro culture.

Percentage of collagen fibers in the ovarian stromal extracellular matrix after vitrification, warming, and in vitro culture in the absence or presence of *L. sidoides* essential oil (40 and 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The non-vitrified control group showed higher collagen deposition compared with vitrified groups ($P < 0.01$). Data are presented as mean \pm SEM. Statistical differences were determined using the Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s post hoc test ($P < 0.05$). (A)MEM;(B)4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (C) 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (D) 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Pro-oxidant and antioxidant profile of ovarian tissue

The pro-oxidant and antioxidant profile of bovine ovarian tissue was evaluated after vitrification, warming, and in vitro culture by quantifying the levels of total sulphhydryl groups (thiol) and the activities of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPX) (Figure 7).

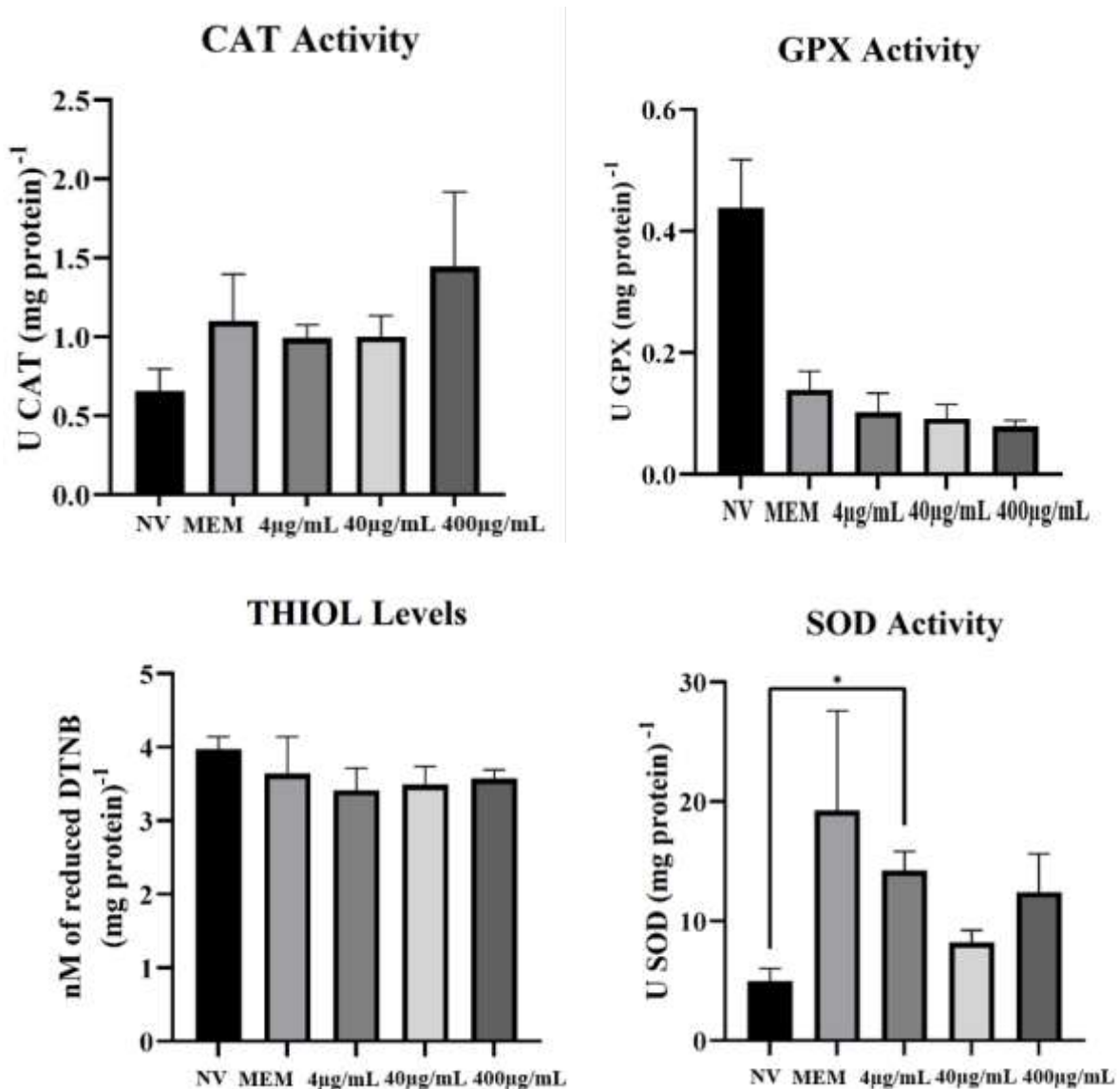


Figure 7. Extracellular matrix collagen content in bovine ovarian tissue after vitrification and in vitro culture.

Percentage of collagen fibers in the ovarian stromal extracellular matrix after vitrification, warming, and in vitro culture in the absence or presence of *L. sidoides* essential oil (40 and 400 µg/mL). The non-vitrified control group showed higher collagen deposition compared with vitrified groups ($P < 0.01$). Data are presented as mean \pm SEM. Statistical differences were determined using the Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s post hoc test ($P < 0.05$).

Catalase (CAT) activity showed a slight increase in all vitrified groups compared to the non-vitrified control (NV). The highest CAT activity was observed in the group treated with 400 µg/mL of *Lippia sidoides*. However, no statistical significance is indicated among the groups.

Glutathione peroxidase (GPX) activity was markedly higher in the non-vitrified control (NV) compared to all vitrified groups. All vitrified treatments, including MEM and those supplemented with *Lippia sidoides*, showed reduced GPX activity, with no apparent recovery across increasing concentrations.

Thiols levels remained relatively stable across all experimental groups. Although slight variations were observed, no significant differences are indicated among treatments.

Superoxide dismutase (SOD) activity was significantly higher in the vitrified control group (MEM) compared to the non-vitrified control (NV), as indicated by the statistical marker (*). Treatment with *Lippia sidoides* reduced SOD activity compared to MEM. The 4 µg/mL and 40 µg/mL groups showed lower SOD levels, while the 400 µg/mL group presented intermediate values, suggesting partial modulation of oxidative stress.

Overall, vitrification altered the antioxidant profile, characterized by reduced GPX activity and increased SOD activity in the control vitrified group. Supplementation with *Lippia sidoides* appeared to modulate SOD activity but did not restore GPX levels.

4 Discussion

Essential oils consist of complex mixtures of biologically active secondary metabolites, widely investigated as additives in cell culture and preservation systems due to their antioxidant and cell microenvironment-modulating properties (Diogo Gonçalves et al., 2025). In the present study, supplementation with *Lippia sidoides* essential oil during vitrification bovine ovarian tissue exerted concentration-dependent beneficial effects, positively influencing cell viability, follicular activation and morphological integrity, as well as structural aspects of the stroma and extracellular matrix.

Prior assessment of cytotoxicity in cumulus cells demonstrated that concentrations of 4 and 40 µg/mL of essential oil were compatible with maintaining cell viability, while the higher concentration did not provide additional benefits. This concentration-dependent behaviour is consistent with previous studies involving essential oils of the genus *Lippia*, in which low to intermediate concentrations have cytoprotective effects, while high concentrations tend not to confer additional advantages or may limit cellular responses (Monteiro et al., 2007; De Junya et al., 2012).

In vitrified ovarian tissue, supplementation with *Lippia sidoides* at concentrations of 4 and 40 $\mu\text{g/mL}$ favoured the activation and progression of follicular development after in vitro culture, as evidenced by an increase in the proportion of transitional and primary follicles. Preserving follicular activation capacity after cryopreservation is one of the main challenges of vitrification protocols. This limitation is associated with the differential cryo-resistance among follicular classes, as antral follicles, characterized by a fully developed, fluid-filled antrum, do not survive the freezing process. Consequently, after warming, follicular development and oocyte formation occur only from preantral follicles, which remain highly sensitive to osmotic and oxidative changes (Isachenko et al., 2025; Najafi et al., 2023) (Isachenko et al., 2025; Najafi et al., 2023). Thus, the results suggest that the essential oil contributed to maintaining the functional competence of the follicles, possibly by promoting an ovarian microenvironment less susceptible to damage induced by oxidative stress.

Follicular morphological integrity was also favoured by treatments with 4 and 40 $\mu\text{g/mL}$, reflected by the higher proportion of structurally normal follicles compared to the vitrified control group. The maintenance of follicular morphology has been described as an important indicator of the quality of cryopreserved ovarian tissue, as structural alterations may precede the activation of degenerative and apoptotic pathways (Najafi et al., 2023; Caetano Filho et al., 2026). However, it should be considered that morphological evaluation alone does not fully reflect the ultrastructural and functional status of the follicles. In this context, the present findings suggest that supplementation with *Lippia sidoides* may have contributed to reducing the morphological damage associated with the cryobiological process. In this context, the data indicate that supplementation with *Lippia sidoides* attenuated the morphological damage associated with the cryobiological process.

The ovarian stroma plays a fundamental role in the structural and metabolic support of preantral follicles, directly influencing their survival and development (Marks et al., 2025). In the present study, concentrations of 4 and 40 $\mu\text{g/mL}$ maintained stromal cell density at levels similar to the vitrified control group, indicating maintenance of stromal cell density. In contrast, the concentration of 400 $\mu\text{g/mL}$ promoted a significant increase in stromal cell density when compared to the vitrified control group, suggesting that high concentrations of essential oil can induce distinct cellular responses in this compartment. Previous studies have shown results similar to those described in in vitro culture media (Caetano Filho et al., 2026). However, this increase was not reflected in additional benefits for follicular activation or integrity, reinforcing the existence of a functional threshold for the action of essential oil.

Although *L. sidoides* essential oil is rich in thymol and carvacrol compounds, renowned

for their high free radical scavenging capacity, the 400 µg/mL concentration did not enhance tissue protection. Conversely, the increased stromal density observed at this dose may be associated with extracellular matrix retraction or incipient cellular toxicity. This finding supports the hypothesis that phenolic antioxidants may exhibit pro-oxidant behavior at supraphysiological concentrations (Halliwell, 2008; Sotler et al., 2019).

Analysis of the extracellular matrix showed that vitrification reduced collagen content compared to non-vitrified tissue, confirming the impact of the cryobiological process on ovarian microarchitecture (Zhao et al., 2023). However, supplementation with *Lippia sidoides* did not intensify this reduction, indicating that the essential oil did not exert additional deleterious effects on the extracellular matrix. Partial preservation of the matrix is relevant, considering its essential role in biochemical signalling and mechanotransduction involved in follicular growth and activation (Félix, 2025).

The effects observed on the different compartments of ovarian tissue may be associated with the modulation of redox balance promoted by the essential oil. Oxidative stress is recognised as one of the main mechanisms of damage during ovarian tissue cryopreservation, characterised by increased production of reactive oxygen species and compensatory activation of endogenous antioxidant systems (Isachenko et al., 2025; Najafi et al., 2023). In the present study, vitrification induced an increase in superoxide dismutase activity in the vitrified control group, reflecting an adaptive response to oxidative stress.

Supplementation with *Lippia sidoides* modulated this antioxidant response in a concentration-dependent manner without promoting changes in total sulphhydryl group levels, suggesting an absence of protein damage associated with reversible oxidation. Although glutathione peroxidase activity was reduced in vitrified tissues compared to non-vitrified tissue, the maintenance of the balance between antioxidant systems indicates that the essential oil contributed to preventing an excessively oxidising environment, consistent with the structural and functional preservation observed in the follicles (Martins et. al., 2026).

Taken together, the results demonstrate that *Lippia sidoides* essential oil acts as a modulator of the ovarian microenvironment during vitrification and in vitro culture, promoting cytoprotective effects when used at low to intermediate concentrations. The scarcity of studies that directly evaluate the application of this essential oil in ovarian tissue cryopreservation protocols gives this study an innovative character and reinforces the potential of natural compounds as adjuvant strategies for optimising fertility preservation in mammals.

5 Conclusion

The supplementation of vitrification media with *Lippia sidoides* essential oil effectively preserved the morphological integrity and viability of bovine preantral follicles, with the most consistent and balanced effects observed at 4 µg/mL. Although the 40 µg/mL concentration also promoted follicular preservation, the lower concentration demonstrated a more favorable profile, likely due to reduced risk of cytotoxic or pro-oxidant effects.

These beneficial outcomes appear to be associated with the modulation of the antioxidant enzymatic system, particularly SOD activity, contributing to the attenuation of oxidative stress during cryopreservation.

In contrast, the highest concentration tested (400 µg/mL) did not enhance tissue protection and was associated with increased stromal density, which may reflect extracellular matrix retraction and early signs of cellular stress or toxicity, rather than a true increase in stromal cell proliferation.

Overall, these findings indicate that *Lippia sidoides* essential oil is a promising natural antioxidant for ovarian tissue cryopreservation, particularly at lower concentrations, with 4 µg/mL representing the most suitable condition among those tested.

6 Future Perspective

The findings of the present study indicate that *Lippia sidoides* essential oil has potential as an adjuvant in bovine ovarian tissue vitrification protocols, particularly when used at low to intermediate concentrations. Nevertheless, further investigations are required to deepen the understanding of the cellular and molecular mechanisms underlying its cytoprotective effects.

Future studies may focus on a more detailed characterization of the antioxidant pathways modulated by the essential oil, as well as its interaction with specific components of the ovarian microenvironment, including stromal cells and the extracellular matrix. In addition, evaluating the effects of *L. sidoides* supplementation during extended periods of in vitro culture may provide valuable insights into its influence on follicular viability maintenance and long-term developmental competence.

Another relevant perspective involves the application of this compound in cryopreservation protocols for other domestic and wild species, as well as its association with different permeable and non-permeable cryoprotectants, aiming to optimize fertility preservation strategies. Collectively, these approaches may contribute to the development of more efficient and biologically safe protocols for ovarian tissue cryopreservation in mammals.

7 References

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1984. DOI: 10.1016/S0076-6879(84)05016-3.
- BARBOSA, L. F. *et al.* Oxidative stress and redox imbalance: implications for cellular damage and survival. **Redox Biology**, v. 2, p. 233–241, 2014. DOI: 10.1016/j.redox.2013.12.008.
- BEN MIRI, Y. Essential oils: chemical composition and diverse biological activities: a comprehensive review. **Natural Product Communications**, v. 20, n. 1, 2025. DOI: 10.1177/1934578X241311790.
- BIZARRO-SILVA C, SANTOS MM, GEREZ JR, GONZÁLEZ SM, LISBOA LA, SENEDA MM. Influence of follicle-stimulating hormone concentrations on the integrity and development of bovine follicles cultured in vitro. **Zigoto**. 2018;26(5):417-423. doi:10.1017/S0967199418000497
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- 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
- CELESTINO, J. J. *et al.* Vitrification of bovine ovarian tissue by the solid-surface vitrification method. **Biopreservation and Biobanking**, v. 8, n. 4, p. 219–221, 2010. DOI: 10.1089/bio.2010.0019.
- DE, J. *et al.* Chemical composition and antioxidant activity of Lippia species. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, 2012. DOI: 10.5897/JMPR12.533.
- ELLMAN G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. **Archives of biochemistry and biophysics**, 82(1), 70–77. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)
- EZZATI, M. *et al.* Advances in ovarian tissue engineering: strategies for fertility preservation and restoration. **Regenerative Engineering and Translational Medicine**, 2025. DOI: 10.1007/s40883-025-00477-y.
- FÉLIX, E. da S.; SILVA, J. R. V. Characteristics of collagen in ovarian extracellular matrix and its relationship with the development of primordial follicles up to ovulation. **Animal Reproduction Science**, v. 283, p. 108029, 2025. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2025.108029. ISSN 0378-4320.
- GECER, E. N.; ERENLER, R.; TUZEN, M Easy and efficient synthesis of silver nanoparticles using viscous Stachys with phenolic profile, antioxidant potential and cytotoxic activity. **Scientific Reports**, v. 16, p. 4758, 2026. DOI: 10.1038/s41598-026-35093-5.

GHANTABPOUR, T.; GOUDARZI, N.; PARSAEI, H Overview of Nrf2 as a target in the ovary and ovarian dysfunctions, focusing on its antioxidant properties. **Journal of Ovarian Research**, v. 18, p. 60, 2025. DOI: 10.1186/s13048-025-01639-w.

GONÇALVES, D. S.; PAIVA-CARDOSO, M. de N.; CAMELO, A. Green conservation strategies: the role of essential oils in sustainable food preservatives. **Sustainability**, v. 17, p. 7326, 2025. DOI: 10.3390/su17167326.

HALLIWELL, B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we know from cell culture and in vivo studies? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 476, n. 2, p. 107–112, 2008. DOI: 10.1016/j.abb.2008.01.028.

ISACHENKO, V. *et al* Cryopreservation and transplantation of ovarian tissue as post-cancer tissue therapy and activator of oogenesis. **Journal of Ovarian Research**, v. 18, p. 128, 2025. DOI: 10.1186/s13048-025-01680-9.

JUGULYTĚ, N.; BARTKEVIČIENĚ, D Reproductive longevity: innovative approaches beyond hormone replacement therapy. **Medicina**, v. 62, p. 157, 2026. DOI: 10.3390/medicina62010157.

KOBAYASHI, H. *et al*. Molecular basis of ovarian aging and reproductive outcomes: exploring biomarkers based on follicular fluid. **Biology of Reproduction**, 2025. ioaf291. DOI: 10.1093/biolre/ioaf291.

KURUTAS, E. B The importance of antioxidants playing a role in the cellular response against oxidative/nitrosative stress: current status. **Nutrition Journal**, v. 15, p. 71, 2016. DOI: 10.1186/s12937-016-0186-5.

MARKS, B.; NAGASHIMA, J. B.; KEEFER, C. L.; SONGSASEN, N. Media conditioned with ovarian stromal cells, but not co-culture, improve survival in feline follicles. **Animals**, v. 15, p. 1539, 2025. DOI: 10.3390/ani15111539.

MARTINS, S. D. *et al*. Punica granatum L. modulates antioxidant activity in vitrified bovine ovarian tissue. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 27, p. 903, 2026. DOI: 10.3390/ijms27020903.

MONTEIRO, M.V.B., CAVALCANTE, G.M., LIMA, E.O. Antioxidant effects of *Lippia sidoides* essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p. 378–382, 2007. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.11.036>

NAJAFI, A.; ASADI, E.; BENSON, J. D. Cryopreservation and transplantation of ovarian tissue: a review on the generation of reactive oxygen species and antioxidant therapy. **Cell and Tissue Research**, v. 393, p. 401–423, 2023. DOI: 10.1007/s00441-023-03794-2.

OLIVEIRA, M. A. *et al*. Chemical composition, antifungal activity and toxicological evaluation of *Lippia sidoides* Cham. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 18, p. 101333, 2024. DOI: 10.1016/j.jafr.2024.101333. ISSN 2666-1543.

SOTLER, R. *et al*. Prooxidant activities of antioxidants and their impact on health. **Acta Clinica Croatica**, v. 58, n. 4, p. 726–736, 2019. DOI: 10.20471/acc.2019.58.04.20.

SOTLER, R.; ITANE, B.; PIRC, K.; PRIJATELJ, V. Prooxidant activities of antioxidants and their impact on health. **Slovenian Journal of Public Health**, v. 58, n. 2, p. 50–58, 2019. DOI: 10.2478/sjph-2019-0006.

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** (*Oxford, England*), 23(5), 1151–1158. <https://doi.org/10.1093/humrep/den070>

ZHANG, Y. *et al.* Optimizing ovarian tissue preparation methods for vitrification: a two-part study on slicing methods and tissue size effects. **Cryobiology**, v. 122, p. 105572, 2026. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2025.105572.

ZHAO, B. *et al.* Integrative single-cell transcriptomics of sheep ovarian development reveal dynamic transcriptional programs relevant to reproductive traits. **iScience**, v. 28, n. 5, 2025. DOI: 10.1016/j.isci.2025.112422.

8 CONCLUSÕES GERAIS

- A suplementação com óleo essencial de *L. sidoides* durante a vitrificação do tecido ovariano bovino apresentou efeitos dependentes da concentração.
- Concentrações de 4 e 40 µg/mL de óleo essencial de *L. sidoides* favoreceram a viabilidade celular, a integridade folicular, a organização estromal e o equilíbrio oxidativo, enquanto concentrações elevadas não proporcionaram benefícios adicionais.
- Os resultados reforçam o potencial de compostos naturais como adjuvantes em protocolos de criopreservação e contribuem para estratégias mais eficientes e seguras de preservação da fertilidade em mamíferos.
- Destaca-se a importância de estudos futuros para consolidar e ampliar essas abordagens.

9 PERSPECTIVAS

Os resultados do presente estudo indicam que o óleo essencial de *L. sidoides* apresenta potencial como adjuvante em protocolos de vitrificação do tecido ovariano bovino, especialmente quando utilizado em concentrações baixas a intermediárias. No entanto, são necessárias investigações adicionais para aprofundar a compreensão dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos em seus efeitos citoprotetores.

Estudos futuros poderão focar na caracterização mais detalhada das vias antioxidantes moduladas pelo óleo essencial, bem como em sua interação com componentes específicos do microambiente ovariano, incluindo as células estromais e matriz extracelular ovariana. Além disso, a avaliação dos efeitos da suplementação com *L. sidoides* durante períodos prolongados de cultivo *in vitro* poderá fornecer informações relevantes sobre sua influência na manutenção da viabilidade folicular e na competência de desenvolvimento a longo prazo.

Outra perspectiva relevante envolve a aplicação desse composto em protocolos de criopreservação de outras espécies domésticas e silvestres, bem como sua associação com diferentes crioprotetores permeáveis e não permeáveis, visando à otimização das estratégias de preservação da fertilidade. De forma integrada, essas abordagens poderão contribuir para o desenvolvimento de protocolos mais eficientes e biologicamente seguros para a criopreservação do tecido ovariano em mamíferos.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1984. DOI: 10.1016/S0076-6879(84)05016-3.
- AGCA, Y.; KESKINTEPE, L. Cryopreservation in human reproductive medicine. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 71, n. 1, p. 598–617, 2025. DOI: 10.1080/19396368.2025.2588615.
- AKBARZADEH-JAHROMI, M. *et al.* Evaluation of supplementation of cryopreservation medium with gallic acid as an antioxidant in quality of post-thaw human spermatozoa. **Andrologia**, v. 54, n. 11, e14571, 2022. DOI: 10.1111/and.14571.
- AKHTARSHENAS, B. *et al.* Nanoparticles of *p*-coumaric acid–zinc oxide improves post-thaw quality of goat sperm and developmental competence of in vitro fertilized oocytes. **Scientific Reports**, v. 14, p. 1–15, 2024. DOI: 10.1038/s41598-024-83585-z.
- ALJASER, F. S. Cryopreservation methods and frontiers in the art of freezing life in animal models. In: BOZKURT, Y.; BUCAK, M. N. (eds.). **Animal reproduction**. London: IntechOpen, 2022. cap. 2. DOI: 10.5772/intechopen.101750.
- ALMEIDA, J.; PRATES, P.; ALMEIDA, D.; REGINA, S.; GHERARDI, S. Antimicrobial potential of essential oils. 2020. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/339513003_Potencial_antimicrobiano_de_oleos_essenciais. Acesso em: 02/02/2026
- AMORIM, C. A.; DOLMANS, M. M. Current status and future directions of ovarian tissue cryopreservation. **Human Reproduction Update**, v. 25, n. 1, p. 45–65, 2019. DOI: 10.1093/humupd/dmy042.
- ARAÚJO, V. R.; CELESTINO, J. J. de H.; CHAVES, R. N. Qualitative and quantitative aspects of atresia during folliculogenesis in mammals. **Ciência Animal**, Fortaleza, v. 31, n. 3, p. 112–128, 2021. ISSN 0104-3773.
- ASADI, E.; NAJAFI, A.; BENSON, J. D. The effects of various synthetic polymers on oxidative stress in ovarian tissue subjected to cryoprotectant exposure and vitrification. **Cryobiology**, v. 119, p. 105243, 2025. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2025.105243.
- AWEKE, E.; TEKLEWOLD, B.; TESFALEM, A. The role of reproductive technologies and cryopreservation of genetic materials in the conservation of animal genetic resources. **Ecological Genetics and Genomics**, v. 31, p. 100250, 2024. DOI: 10.1016/j.egg.2024.100250.
- BALIOU, S. *et al.* Protective role of taurine against oxidative stress (Review). **Molecular Medicine Reports**, v. 24, n. 2, p. 605, 2021. DOI: 10.3892/mmr.2021.12242.
- BARBALHO, E. C. *et al.* Acquisition of gonadotropin dependence by early antral follicles and the challenges of promoting their growth in vitro. **Ciência Animal Brasileira**, v. 25, p. e75908P, 2024. DOI: 10.1590/1809-6891v25e-75908P.

- BARBERINO, R. S.; SILVA, R. L. S.; PALHETA JUNIOR, R. C.; SMITZ, J. E. J.; MATOS, M. H. T. Protective effects of antioxidants on cyclophosphamide-induced ovarian toxicity. **Biopreservation and Biobanking**, v. 21, n. 2, p. 121–141, 2022. DOI: 10.1089/bio.2021.0159. ISSN 1947-5535.
- BARBOSA, L. F. *et al.* Oxidative stress and redox imbalance: implications for cellular damage and survival. **Redox Biology**, v. 2, p. 233–241, 2014. DOI: 10.1016/j.redox.2013.12.008.
- 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. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2021.106801. ISSN 0378-4320.
- BARUSELLI, P. S. *et al.* Relationship between follicle population, AMH concentration and fertility in cattle. **Animal Reproduction**, v. 12, n. 3, p. 487–497, 2018. Disponível em: [http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v12/v12n3/pag487-497%20\(AR758\).pdf](http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v12/v12n3/pag487-497%20(AR758).pdf)
- BAUST, J. G.; GAO, D.; BAUST, J. M. Cryopreservation: an emerging paradigm change. **Organogenesis**, v. 5, n. 3, p. 90–96, 2009. DOI: 10.4161/org.5.3.10021.
- BEN MIRI, Y. Essential oils: chemical composition and diverse biological activities: a comprehensive review. **Natural Product Communications**, v. 20, n. 1, 2025. DOI: 10.1177/1934578X241311790.
- BEREAN, D. I.; BOGDAN, L. M.; CIMPEAN, R. Advances in understanding and improving antioxidant-mediated sperm cryopreservation in small ruminants: challenges and perspectives. **Antioxidants**, v. 13, n. 6, p. 624, 2024. DOI: 10.3390/antiox13060624.
- BEST, B. P. Cryoprotectant toxicity: facts, problems and questions. **Rejuvenation Research**, v. 18, n. 5, p. 422–436, 2015. DOI: 10.1089/rej.2014.1656.
- BIZARRO-SILVA C, SANTOS MM, GEREZ JR, GONZÁLEZ SM, LISBOA LA, SENEDA MM. Influence of follicle-stimulating hormone concentrations on the integrity and development of bovine follicles cultured in vitro. **Zigoto**. 2018;26(5):417-423. doi:10.1017/S0967199418000497
- BIZARRO-SILVA, C. *et al.* Evaluation of bovine ovarian tissue cryopreservation through analysis of reactive oxygen species, toxicity, morphometry, and morphology. **Veterinary Sciences**, v. 11, n. 11, p. 579, 2024. DOI: 10.3390/vetsci11110579.
- BOLTON, R. L. *et al.* Resurrecting biodiversity: advanced assisted reproductive technologies and biobanking. **Reproduction & Fertility**, v. 3, n. 3, p. R121–R146, 2022. DOI: 10.1530/RAF-22-0005.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

CAETANO FILHO, F. F. Avaliação dos efeitos do óleo essencial de *Lippia sidoides* e do timol durante o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano bovino. 2023. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Sobral, 2023. Disponível em: <http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/75192>. Acesso em: 03/01/2026

CASCIANI, V. *et al.* Oocyte and embryo cryopreservation in assisted reproductive technology: past achievements and current challenges. **Fertility and Sterility**, v. 120, p. 1–15, 2023. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2023.06.005.

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

CELESTINO, J. J. *et al.* Vitrification of bovine ovarian tissue by the solid-surface vitrification method. **Biopreservation and Biobanking**, v. 8, n. 4, p. 219–221, 2010. DOI: 10.1089/bio.2010.0019.

CHESNOKOV, M. S. *et al.* A question of new life and cell death: programmed cell death in the mammalian ovary.. **Journal of Biomedical Science**, v. 31, p. 31, 2024. DOI: 10.1186/s12929-024-01017-6.

CHOE, J.; SHANKS, A. L. *In vitro* fertilization. In: STATPEARLS [Internet]. Treasure Island (FL): **StatPearls Publishing**, 2025. Atualizado em: 4 set. 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562266/>. Acesso em: 05/02/2026

CHROHO, M.; ROUPHAEL, Y.; PETROPOULOS, S. A.; BOUISSANE, L. The carvacrol and thymol content affects the antioxidant and antibacterial activity of the essential oils of *Origanum compactum* and *Thymus zygis*. **Antibiotics**, v. 13, n. 2, p. 139, 2024. DOI: 10.3390/antibiotics13020139.

COMIZZOLI, P.; HOLT, W. V. Recent advances in fertility preservation and genomic resource storage for rare and endangered animal species. In: NAGY, Z. P.; VARGHESE, A. C.; AGARWAL, A. (eds.). *Cryopreservation in assisted reproduction*. Cham: **Springer**, 2024. DOI: 10.1007/978-3-031-58214-1_26.

COMIZZOLI, P.; HOLT, W. V. Recent advances in spermatology that contribute to the knowledge and conservation of rare and endangered species. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 10, p. 469–490, 2022. DOI: 10.1146/annurev-animal-020420-040600.

COMIZZOLI, P.; WILDT, D. E. Mammalian fertility preservation through cryobiology: value of classical comparative studies and the need for new preservation options. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 26, n. 1, p. 91–98, 2013. DOI: 10.1071/RD13259.

COSTA, F. D. C. **Remodelação do córtex ovariano durante o cultivo *in vitro* e efeitos de bioandaimos descelularizados e nanopartículas poliméricas carregadas com resveratrol no crescimento e viabilidade de folículos secundários bovinos**. 2025. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2025. Disponível em: <http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/83032>. Acesso em: 25/01/2026

COSTA, M. K. M. E Phenolic compounds as a strategy for mitigating damage induced by oxidative stress: in vitro antioxidant effect of umbu extract (*Spondias tuberosa*). 2025. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10183/293534>. Acesso em: 15/01/2026

CRAVEIRO, A. A. *et al.* Essential oils from Brazilian Verbenaceae. Genus *Lippia*. **Journal of Natural Products**, v. 44, p. 598–601, 1981.

DE SOUZA, L. M. Total flavonoids, antioxidant activity and seasonal variation in the chemical composition of the essential oil of rosemary-pepper (*Lippia origanoides* Kunth.). 2015. Disponível em: <https://hdl.handle.net/1843/NCAP-9XXHP9>. Acesso em: 20/01/2026.

DE, J. *et al.* Chemical composition and antioxidant activity of *Lippia* species. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, 2012. DOI: 10.5897/JMPR12.533.

DIAZ-MUÑOZ, J. *et al.* Enhancing the developmental potential of in vitro matured and vitrified bovine oocytes using extracellular vesicles from large follicles. **Scientific Reports**, v. 15, p. 33243, 2025. DOI: 10.1038/s41598-025-17981-4.

DUCREUX, B. *et al.* Overview of gene expression dynamics during human oogenesis/folliculogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 1, 2024. DOI: 10.3390/ijms25010033.

ELLMAN G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. **Archives of biochemistry and biophysics**, 82(1), 70–77. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)

EZZATI, M. *et al.* Advances in ovarian tissue engineering: strategies for fertility preservation and restoration. **Regenerative Engineering and Translational Medicine**, 2025. DOI: 10.1007/s40883-025-00477-y.

FÉLIX, E. da S.; SILVA, J. R. V. Characteristics of collagen in ovarian extracellular matrix and its relationship with the development of primordial follicles up to ovulation. **Animal Reproduction Science**, v. 283, p. 108029, 2025. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2025.108029. ISSN 0378-4320.

FERNANDEZ, L. G.; RICARDO JESUS, T. S. Ricinus communis L.: seeds, aging and oxidative stress. In: RICARDO JESUS, T. S.; SANTOS, P. C. (org.). Salvador: **EDUFBA**, 2021. E-book. DOI: 10.7476/9786556302348.

FINDLAY, J. K. *et al.* Follicle selection in mammalian ovaries. In: LEUNG, P. C. K.; ADASHI, E. Y. (eds.). **The ovary**. 3. ed. [S. l.]: **Academic Press**, 2019. p. 3–21. DOI: 10.1016/B978-0-12-813209-8.00001-7.

FLAHAUT, M. *et al.* Reassessing long-term cryopreservation strategies for improved quality, safety, and clinical use of allogeneic dermal progenitor cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 144, n. 10, p. 2125–2135, 2024. DOI: 10.1016/j.jid.2024.06.1285.

FLETCHER, E. J. *et al.* Prenatal exposure to an environmentally relevant phthalate mixture alters oxidative stress, apoptosis, cell cycle regulators, and steroidogenic factors in the ovaries of F1 mice. **Reproductive Toxicology**, v. 132, p. 108858, 2025. DOI: 10.1016/j.reprotox.2025.108858.

FULLER, B. J. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. **CryoLetters**, v. 25, n. 6, p. 375–388, 2004. Disponível em: <https://www.ingentaconnect.com/content/cryo/cryo/2004/00000025/00000006/art00001>. Acesso em: 05/01/2026.

GECER, E. N.; ERENLER, R.; TUZEN, M Easy and efficient synthesis of silver nanoparticles using viscous Stachys with phenolic profile, antioxidant potential and cytotoxic activity. **Scientific Reports**, v. 16, p. 4758, 2026. DOI: 10.1038/s41598-026-35093-5.

GHANTABPOUR, T.; GOUDARZI, N.; PARSAEI, H Overview of Nrf2 as a target in the ovary and ovarian dysfunctions, focusing on its antioxidant properties. **Journal of Ovarian Research**, v. 18, p. 60, 2025. DOI: 10.1186/s13048-025-01639-w.

GONÇALVES, D. S.; PAIVA-CARDOSO, M. de N.; CAMELO, A. Green conservation strategies: the role of essential oils in sustainable food preservatives. **Sustainability**, v. 17, p. 7326, 2025. DOI: 10.3390/su17167326.

GROSBOIS, J. *et al.* Reproductive seasonality influences follicle dynamics and the ovarian extracellular matrix structural properties in ewes. **Reproduction**, v. 169, n. 6, e250010, 2025. DOI: 10.1530/REP-25-0010.

GUSEVA, O. *et al.* The impact of antioxidant supplements on human and mammalian oocytes and pre-implantation embryos, and their potential application in mitigating the consequences of oxidative stress in vitro: a review. **Reproductive and Developmental Medicine**, v. 8, n. 4, p. 252–263, 2024. DOI: 10.1097/RD9.0000000000000100.

HALLIWELL, B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we know from cell culture and in vivo studies? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 476, n. 2, p. 107–112, 2008. DOI: 10.1016/j.abb.2008.01.028.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **Journal of Neurochemistry**, v. 97, n. 6, p. 1634–1658, 2006. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2006.03907.

HALLIWELL, B.; CLEMENT, M.-V.; LONG, L. H. Hydrogen peroxide in the human body. **FEBS Letters**, v. 486, n. 1, p. 10–13, 2000. ISSN 0014-5793. DOI: 10.1016/S0014-5793(00)02197-9.

HE, M. *et al.* Mechanisms of oocyte maturation and related epigenetic regulation. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 654028, 2021. DOI: 10.3389/fcell.2021.654028.

HOLESH, J. E.; BASS, A. N.; LORD, M. Physiology, ovulation. In: STATPEARLS [Internet]. Treasure Island (FL): **StatPearls Publishing**, 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441996/>. Acesso em: 25/01/2026

HONG, Y.; BOITI, A.; VALLONE, D.; FOULKES, N. S. Reactive oxygen species signaling and oxidative stress: transcriptional regulation and evolution. **Antioxidants**, v. 13, n. 3, p. 312, 2024. DOI: 10.3390/antiox13030312.

HORI, Y. S. *et al.* Regulation of FOXOs and p53 by SIRT1 modulators under oxidative stress. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, e73875, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0073875.

HOSSAIN, M. A. *et al.* Effects of sucrose and glycerol on the vitrification of buffalo oocytes.. **International Journal of Reproduction, Contraception, Obstetrics and Gynecology**, v. 10, n. 7, p. 2558–2564, 2021. DOI: 10.18203/2320-1770.ijrcog20212640.

ISACHENKO, V. *et al.* Cryopreservation and transplantation of ovarian tissue as post-cancer tissue therapy and activator of oogenesis. **Journal of Ovarian Research**, v. 18, p. 128, 2025. DOI: 10.1186/s13048-025-01680-9.

JUGULYTĚ, N.; BARTKEVIČIENĚ, D Reproductive longevity: innovative approaches beyond hormone replacement therapy. **Medicina**, v. 62, p. 157, 2026. DOI: 10.3390/medicina62010157.

KAWADA, T. *et al.* Ovarian tachykinin signalling system induces the growth of secondary follicles during the gonadotropin-independent process. **Journal of Biological Chemistry**, p. 108375, 2025. DOI: 10.1016/j.jbc.2025.108375.

KHOSRAVI, F. *et al.* Ovarian tissue cryopreservation and follicular survival. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 30, n. 11, p. 1397–1406, 2013. DOI: 10.1007/s10815-013-0088-2.

KHWAZA, V.; ADERIBIGBE, B. A. Antibacterial activity of selected components of essential oils and their derivatives: a review. **Antibiotics**, v. 14, p. 68, 2025. DOI: 10.3390/antibiotics14010068.

KOBAYASHI, H. *et al.* Molecular basis of ovarian aging and reproductive outcomes: exploring biomarkers based on follicular fluid. **Biology of Reproduction**, 2025. ioaf291. DOI: 10.1093/biolre/ioaf291.

KOMETAS, M. *et al.* Methods of ovarian tissue cryopreservation. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 38, n. 8, p. 1937–1946, 2021. DOI: 10.1007/s43032-021-00591-6.

KONG, Q. *et al.* Comparison of ovarian tissue cryopreservation quality by conventional slow cryopreservation and vitrification: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Ovarian Research**, v. 18, p. 62, 2025. DOI: 10.1186/s13048-024-01561-7.

KURUTAS, E. B The importance of antioxidants playing a role in the cellular response against oxidative/nitrosative stress: current status. **Nutrition Journal**, v. 15, p. 71, 2016. DOI: 10.1186/s12937-016-0186-5.

KUWAYAMA, M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. **Theriogenology**, v. 67, n. 1, p. 73–80, 2007. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2006.09.014.

LEAL, G. R. *et al.* The domestic cat oocyte: strategies and challenges in IVM and cryopreservation. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 49, n. 1, 2025. DOI: 10.21451/1809-3000.RBRA2025.001.

- LEE, S.; OZKAVUKCU, S.; KU, S. Y. Current and future perspectives for improving ovarian tissue cryopreservation and transplantation outcomes for cancer patients. *Reproductive Sciences*, v. 28, n. 6, p. 1746–1758, 2021. DOI: 10.1007/s43032-021-00517-2.
- LEN, J. S.; KOH, W. S. D.; TAN, S.-X. The roles of reactive oxygen species and antioxidants in cryopreservation. *Bioscience Reports*, v. 39, n. 8, BSR20191601, 2019. DOI: 10.1042/BSR20191601.
- LI, X. *et al.* Visualization of ice crystal behavior in mouse oocytes during high-speed quench cooling and ice inhibition by antifreezing hydrogels. *Biopreservation and Biobanking*, v. 22, n. 4, p. 404–412, 2024. DOI: 10.1089/bio.2023.0108.
- LIU, M. *et al.* Sulfoxide-functional trehalose enhances DMSO-free cryopreservation of mammalian cells. *Chemical Engineering Journal*, v. 495, p. 153706, 2024. DOI: 10.1016/j.cej.2024.153706.
- LIU, Z. *et al.* Multidisciplinary, nature-inspired strategies for the cryopreservation of tissues and organs. *Advanced Materials*, v. 37, n. 51, e10982, 2025. DOI: 10.1002/adma.202510982.
- MANSOUR, H. A. E. H. Integration of assisted reproductive technologies and artificial intelligence to optimize fertility and genetic selection in livestock production. *Discover Applied Sciences*, v. 7, p. 1143, 2025. DOI: 10.1007/s42452-025-07380-9.
- MARCO, A. *et al.* Current fertility preservation measures in young women with cancer and future perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 8, p. 4360, 2024. DOI: 10.3390/ijms25084360.
- MARKS, B.; NAGASHIMA, J. B.; KEEFER, C. L.; SONGSASEN, N. Media conditioned with ovarian stromal cells, but not co-culture, improve survival in feline follicles. *Animals*, v. 15, p. 1539, 2025. DOI: 10.3390/ani15111539.
- MARTEMUCCI, G. *et al.* Free radical properties, source and targets, antioxidant consumption and health. *Oxygen*, v. 2, n. 2, p. 1–31, 2022. DOI: 10.3390/oxygen2020006.
- MARTINS, S. D. *et al.* *Punica granatum* L. modulates antioxidant activity in vitrified bovine ovarian tissue. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 27, p. 903, 2026. DOI: 10.3390/ijms27020903.
- MASSIAH, G. *et al.* Cryopreservation of adipose tissue: implications for ovarian tissue protocols. *Cryobiology*, v. 103, p. 141–146, 2021. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2021.07.016.
- MATSUSHIGE, C. *et al.* RGD peptide promotes follicle growth through integrins $\alpha\beta3/\alpha\beta5$ in three-dimensional culture. *Reproduction*, v. 169, n. 1, e240151, 2024. DOI: 10.1530/REP-24-0151.
- MELO, M. T. P. de. Conservação de *Lippia sidoides* do norte de Minas Gerais e Vale do Jequitinhonha: localização, coleta, ecogeografia, crescimento, modo de reprodução e divergência genética. 2012. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, 2012. Disponível em: <https://hdl.handle.net/1843/NCAP-97YJH9>. Acesso em: 05/01/2026

MESA-ARANGO, A. C. *et al.* Citral and carvone chemotypes of essential oils from Colombian *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 6, p. 878–884, 2009. DOI: 10.1590/S0074-02762009000600010.

MONTEIRO, M.V.B., CAVALCANTE, G.M., LIMA, E.O. Antioxidant effects of *Lippia sidoides* essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p. 378–382, 2007. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.11.036>

MORAES, F. P. de. Regulação da foliculogênese antral, ovulação e luteinização em fêmeas bovinas. 2023. Tese (Doutorado em Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023. Disponível em: <https://wp.ufpel.edu.br/ppgveterinaria/files/2023/05/Fabiane-Pereira-de-Moraes.pdf>. Acesso em: 03/02/2026

MOTA, A. H. M.; GARCEZ, R. da S. Cryopreservation of gametes and embryos. **In: Scientific diversity in biomedicine**. [S. l.]: Poisson, [s. d.]. p. 65. Disponível em: https://livros.poisson.com.br/individuais/Biomedicina/volume1/Biomedicina_Vol1.pdf#page=65. Acesso em: 03/02/2026

MOURA, L. F. W. G. *et al.* *Lippia grata* Schauer: essential oil and phytochemical thymol antioxidants and neuroprotectors with inhibition of acetylcholinesterase and depressive behaviors in adult zebrafish (*Danio rerio*). **ACS Chemical Neuroscience**, v. 16, n. 20, p. 3978–3992, 2025. DOI: 10.1021/acchemneuro.5c00331.

MOURA, T. C. M. *et al.* Diluent containing dimethylformamide added with sucrose improves *in vitro* quality after freezing/thawing stallion sperm. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 109, p. 103825, 2022. DOI: 10.1016/j.jevs.2021.103825.

MURRAY, K. A.; GIBSON, M. I. Chemical approaches to cryopreservation. **Nature Reviews Chemistry**, v. 6, p. 579–593, 2022. DOI: 10.1038/s41570-022-00407-4.

NAJAFI, A.; ASADI, E.; BENSON, J. D. Cryopreservation and transplantation of ovarian tissue: a review on the generation of reactive oxygen species and antioxidant therapy. **Cell and Tissue Research**, v. 393, p. 401–423, 2023. DOI: 10.1007/s00441-023-03794-2.

NASCIMENTO, N. C. Transnacionalidade biojurídica e mercadológica dos gametas humanos. 2025. Tese (Doutorado em Direito) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em Direito, Belo Horizonte, 2025. Disponível em: https://bib.pucminas.br/teses/Direito_NayaneCostaNascimento_31735_TextoCompleto.pdf. Acesso em: 25/01/2026.

ÑAUPAS, L. V. S. *et al.* Alpha lipoic acid controls degeneration and ensures follicular development in ovine ovarian tissue cultured *in vitro*. **Theriogenology**, v. 225, p. 55–66, 2024. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2024.05.024.

NEMCOVA, L.; BERRO, F.; KALOUS, J. Protein kinase C regulates meiosis in mammalian oocytes. **BioEssays**, v. 48, n. 1, e70087, 2026. DOI: 10.1002/bies.70087.

NIZHARADZE, N. Innovations in oocyte preservation techniques. **Medical Times**, v. 2, n. 1, p. 50–58, 2024. DOI: 10.71419/mtggrc.2024.17.

OLIVEIRA, A. P. de *et al.* Potencial terapêutico de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. ex Britton & P. Wilson. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, [S. l.], v. 13, n. 1, e4613144732, 2024. DOI: 10.33448/rsd-v13i1.44732. Disponível em: <https://rsdjournal.org/rsd/article/view/44732>. Acesso em: 5 fev. 2026.

OLIVEIRA, C. de Á.; SCHLINDWEIN, M. M.; VASCONCELOS, P. E. A. O papel das políticas públicas no desenvolvimento sustentável do agronegócio brasileiro: impactos e desafios. **Revista Aracê**, 2025. ISSN 2358-2472. DOI: 10.56238/arev7n8-148.

OLIVEIRA, M. A. *et al.* Chemical composition, antifungal activity and toxicological evaluation of *Lippia sidoides* Cham. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 18, p. 101333, 2024. DOI: 10.1016/j.jafr.2024.101333. ISSN 2666-1543.

PANTOS, K. *et al.* The effect of open and closed oocyte vitrification systems on embryonic development: a systematic review and network meta-analysis. **Journal of Clinical Medicine**, v. 13, n. 9, p. 2651, 2024. DOI: 10.3390/jcm1309265.

PARCHETA, M. *et al.* Recent developments in effective antioxidants: structure and antioxidant properties. **Materials**, v. 14, n. 8, p. 1984, 2021. DOI: 10.3390/ma14081984.

PATIST, A.; ZOERB, H. Preservation mechanisms of trehalose in food and biosystems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 40, n. 2, p. 107–113, 2005. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2004.05.003.

PEI, Z. *et al.* The molecular regulatory mechanisms of meiotic arrest and resumption in oocyte development and maturation. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 21, n. 90, p. 1–12, 2023. DOI: 10.1186/s12958-023-01143-0.

RAMIREZ, T.; PAVONE, M. Exploring the frontiers of ovarian tissue cryopreservation. **Journal of Clinical Medicine**, v. 13, n. 15, p. 4513, 2024. DOI: 10.3390/jcm13154513.

RIBEIRO, R. B. *et al.* Evaluation of different combinations of cryoprotectants in vitrification and slow freezing for ovarian tissue preservation in domestic cats. **Reproduction in Domestic Animals**, 2025. DOI: 10.1111/rda.70064.

RIENZI, L. *et al.* Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification. **Human Reproduction Update**, v. 23, n. 2, p. 139–155, 2017. DOI: 10.1093/humupd/dmw038.

RITTIÉ L. (2017). Method for Picrosirius Red-Polarization Detection of Collagen Fibers in Tissue Sections. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, 1627, 395–407. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7113-8_26

RODRIGUES, A. P. R. *et al.* Advances in the cryopreservation of oocytes and ovarian follicles in ruminants. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 49, n. 1, p. 26–37, 2025. DOI: 10.21451/1809-3000.RBRA2025.002.

ROMANENGHI, I. A. D.; SILVA, A. B.; ORTIN, S. M. A. Comércio internacional de carne bovina: análise das exportações no período de pandemia a partir do ano de 2020/2021. In: SIMPÓSIO DE TECNOLOGIA DA FATEC JALES, 6., 2022, Jales, SP. *Anais eletrônicos* [...]. Jales: FATEC Jales, 2022. ISSN 2595-2323. Disponível em: <https://ric.cps.sp.gov.br/handle/123456789/11530>. Acesso em: 05/02/2026.

ROMERO, P. *et al.* Standardization of cryopreservation of bovine ovarian cortex. **Animals**, v. 16, p. 266, 2026. DOI: 10.3390/ani16020266.

SANSON-RIOFRIO, J. *et al.* Uterus cryopreservation from experimental models to clinical application: a translational review. **Cureus**, v. 17, n. 12, e100012, 2025. DOI: 10.7759/cureus.100012.

SANTOS, L. C. B. dos; CARVALHO, B. R. de; ALBUQUERQUE, A. Preservation of fertility in cancer patients from a bioethical perspective in healthcare. **Revista Derecho y Salud**, v. 9, n. 10, jan./jun. 2025. DOI: 10.37767/2591-3476(2025)02.

SENNA CARVALHO, V. H.; PINTO, S. C. C.; DO CARMO, R. B. Impact of animal reproduction biotechnologies and genetic improvement in beef cattle farming. **Pubvet**, v. 17, n. 8, e1427, 2023. Disponível em: <https://ojs.pubvet.com.br/index.php/revista/article/view/3201>. Acesso em: 5 fev. 2026.

SHARMA, O.; PANDEY, G. Understanding the impact of triazoles on female fertility and embryo development. **Toxicology Reports**, v. 14, p. 101948, 2025. DOI: 10.1016/j.toxrep.2025.101948.

SIEME, H.; OLDENHOF, H.; WOLKERS, W. F. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. **Animal Reproduction Science**, v. 169, p. 2–5, 2016. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2016.02.004.

SILVA JÚNIOR, R. A. da *et al.* Use of antifreeze protein from *Tenebrio molitor* (TmAFP) in vitrification of *in vitro*-produced bovine embryos: an ultrastructural study. **Biopreservation and Biobanking**, v. 22, n. 1, p. 51–59, 2024. DOI: 10.1089/bio.2022.0186.

SILVA, A. M. *et al.* Ovarian tissue cryopreservation in mammals: recent advances. **Animal Reproduction Science Reports**, v. 6, supl. 1, p. 50–54, 2025. DOI: 10.1016/j.xfre.2025.01.009.

SILVA, R. L. dos S.; BARBERINO, R. de S.; MATOS, M. H. T. de. Impact of antioxidant supplementation during *in vitro* culture of ovarian preantral follicles: a review. **Theriogenology**, v. 207, p. 110–122, 2023. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2023.05.027.

SOTLER, R. *et al.* Prooxidant activities of antioxidants and their impact on health. **Acta Clinica Croatica**, v. 58, n. 4, p. 726–736, 2019. DOI: 10.20471/acc.2019.58.04.20.

STRINGER, J. M.; ALESI, L. R.; WINSHIP, A. L.; HUTT, K. J. Beyond apoptosis: evidence of other regulated cell death pathways in the ovary throughout development and life. **Human Reproduction Update**, v. 29, n. 4, p. 434–456, 2023. DOI: 10.1093/humupd/dmad005.

SUSA, F. *et al.* Antioxidant-based strategies in cryopreservation. **Cryobiology**, v. 98, p. 46–56, 2021. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2020.12.009.

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** (Oxford, England), 23(5), 1151–1158. <https://doi.org/10.1093/humrep/den070>

TIRICHEN, H. *et al.* Mitochondrial reactive oxygen species and their contribution to the progression of chronic kidney disease through oxidative stress. **Frontiers in Physiology**, v. 12, p. 627837, 2021. DOI: 10.3389/fphys.2021.627837.

TORTORELLA, R. D. *et al.* Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in locally adapted Curraleiro Pé-Duro cows. **Animal Reproduction**, v. 22, n. 4, e20250019, 2025. DOI: 10.1590/1984-3143-AR2025-0019.

TREUR, I. G.; DE BOER, L.; ANDROKOVITCH, J. L. Comparação das técnicas de criopreservação de embriões produzidos *in vitro*. *Arquivos de Ciências da Saúde*. Disponível em: <https://revistas.icesp.br/index.php/Real/article/download/5797/3461>. Acesso em: 20/01/2026

VARGHESE, A. C.; NAGY, Z. P.; AGARWAL, A. Cryopreservation in a global perspective: editors' considerations. In: NAGY, Z. P.; VARGHESE, A. C.; AGARWAL, A. (eds.). **Criopreservação em reprodução assistida**. Cham: Springer, 2024. DOI: 10.1007/978-3-031-58214-1_1.

VICKRAM, A. S. *et al.* Advances in cryopreservation techniques for human gametes and embryos. **CryoLetters**, v. 46, n. 4, p. 213–230, 2025. DOI: 10.54680/fr25410110112.

WANG, H.; YANG, L. Ovarian mechanobiology: understanding the interaction between mechanics and follicular development. **Cells**, v. 14, n. 5, p. 355, 2025. DOI: 10.3390/cells14050355.

WANG, Y. *et al.* Advances in mammalian ovarian tissue cryopreservation. **Animals and Zoonoses**, v. 1, 2025. DOI: 10.1016/j.azn.2025.02.004.

WHALEY, D. *et al.* Cryopreservation: an overview of the principles and specific considerations for each cell type. **Cell Transplantation**, v. 30, 2021. DOI: 10.1177/0963689721999617.

XIAO, C.; LAI, D. Impact of oxidative stress induced by heavy metals on ovarian function. **Journal of Applied Toxicology**, v. 45, n. 1, p. 107–116, 2025. DOI: 10.1002/jat.4664.

XIAO, S. *et al.* Review of applications of deep learning in veterinary diagnostics and animal health. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 12, 2025. DOI: 10.3389/fvets.2025.1511522.

YE, Z. *et al.* Study on the competitive mechanism between cellular osmotic damage and mechanical damage under curve-controlled freezing.. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 150, p. 6925–6937, 2025. DOI: 10.1007/s10973-024-13981-0.

ZARBAKSH, S. Effect of antioxidants on preimplantation embryo development *in vitro*: a review. **Zygote**, v. 29, n. 3, p. 179–193, 2021. DOI: 10.1017/S0967199420000660.

ZENG, Y. *et al.* Comparative efficacy of cryoprotectants in ovarian tissue vitrification. **BMC Women's Health**, v. 24, p. 654, 2024. DOI: 10.1186/s12905-024-03505-1.

ZHANG, T. *et al.* Mechanisms of primordial follicle activation and new pregnancy opportunity for premature ovarian failure patients. **Frontiers in Physiology**, v. 14, p. 1113684, 2023. DOI: 10.3389/fphys.2023.1113684.

ZHANG, Y. *et al.* Optimizing ovarian tissue preparation methods for vitrification: a two-part study on slicing methods and tissue size effects. **Cryobiology**, v. 122, p. 105572, 2026. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2025.105572.

ZHAO, B. *et al.* Integrative single-cell transcriptomics of sheep ovarian development reveal dynamic transcriptional programs relevant to reproductive traits. **iScience**, v. 28, n. 5, 2025. DOI: 10.1016/j.isci.2025.112422.