



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

MIGUEL FERNANDES DE LIMA NETO

**EXTRATO DE *Actaea racemosa* (L.) COMO AGENTE PROTETOR DO TECIDO
OVARIANO DE CAMUNDONGOS FÊMEAS INDUZIDAS Á QUIMIOTERAPIA
COM DOXORRUBICINA**

SOBRAL

2023

MIGUEL FERNANDES DE LIMA NETO

EXTRATO DE *Actaea racemosa* (L.) COMO AGENTE PROTETOR DO TECIDO
OVARIANO DE CAMUNDONGOS FÊMEAS INDUZIDAS Á QUIMIOTERAPIA COM
DOXORRUBICINA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de Pesquisa: Análises Integrativas de Sistemas Biológicos. Área temática: Fisiologia Reprodutiva.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Weiny Barbalho Silva.

Coorientadora: Prof. Dra. Jordânia Marques de Oliveira Freire.

SOBRAL

2023

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

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

L699e Lima Neto, Miguel Fernandes de.
EXTRATO DE *Actaea racemosa* (L.) COMO AGENTE PROTETOR DO TECIDO OVARIANO DE CAMUNDONGOS FÊMEAS INDUZIDAS Á QUIMIOTERAPIA COM DOXORRUBICINA / Miguel Fernandes de Lima Neto. – 2023.
94 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2023.

Orientação: Prof. Dr. Anderson Weiny Barbalho Silva.

Coorientação: Prof. Dr. Jordânia Marques de Oliveira Freire.

1. Fitomedicamento. 2. Foliculogênese. 3. Quimioterapia. 4. Apoptose. 5. Ovário. I. Título.

CDD 660.6

MIGUEL FERNANDES DE LIMA NETO

EXTRATO DE *Actaea racemosa* (L.) COMO AGENTE PROTETOR DO TECIDO
OVARIANO DE CAMUNDONGOS FÊMEAS INDUZIDAS À QUIMIOTERAPIA COM
DOXORRUBICINA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de Pesquisa: Análises Integrativas de Sistemas Biológicos. Área temática: Fisiologia Reprodutiva.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dra. Jordânia Marques de Oliveira Freire (Coorientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

Prof. Dra. Alana Nogueira Godinho (Examinadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Alane Pains Oliveira do Monte (Examinadora)
Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF)

*Às pessoas mais especiais.
À minha maravilhosa família, por serem meu
apoio em todos os momentos e a força maior
para conquistar meus objetivos.
Aos meus amigos, por toda contribuição e
parceria em minha jornada.
À minha equipe executora e companheiros de
pesquisa, que fizeram deste momento um dos
mais especiais em minha vida.*

Com gratidão, dedico.

AGRADECIMENTOS

À minha base. Agradeço aos meus amados pais, Auriana Alves Pereira de Lima e José Edimar Fernandes de Lima por todo o apoio, atenção e suporte. Obrigado por existirem e por fazer-me sentir amado e protegido, e por não terem me deixado desistir quando tentei. Espero um dia conseguir retribuir tudo que fizeram e ainda fazem por mim. Amo vocês! Às minhas irmãs Ana Lorena Pereira de Lima e Carla Lohana Pereira de Lima, por serem minhas companheiras e peças fundamentais e importantes em minha vida. A minha avó Auri Alves Pereira (*in memoriam*), por, desde criança, me amar e sempre acreditar e incentivar nos caminhos trilhados através do estudo, e em vida ter sido uma mulher forte, genuína e altruísta. Ao nosso adorável e sempre amado cachorrinho Simon (*in memoriam*) que tanto me trouxe alegria nos melhores e piores momentos e a prova que um amor inocente, puro e verdadeiro pode mudar vidas. Esse momento não é o mesmo sem esses seres de luz que levaram consigo uma parte de mim quando partiram. Aos meus avós paternos, Sr. Miguel Lima e Sra. Ideuzuite Lima por serem uma base de apoio e criação exemplar. Às minhas tias, em especial minha Tia Edilene, tios, primas e primos, em especial a meu primo/irmão Gean Lucas, que sempre estão me apoiando e incentivando. Esse momento é nosso!

Aos meus queridos e amados amigos. Os de infância, os mais distantes, os que vejo quando possível e aos do dia a dia, obrigado por serem fundamentais em minha vida. Agradeço por todos os momentos de apoio, alegria e descontração; pelas palavras amigas e acolhedoras e pelos momentos de diversão. Eu não seria completo sem essas pessoas e todas as histórias e momentos que foram e estão sendo construídos juntos! Agradecimento especial a Clemilson Nobre, que esteve presente durante o desenvolvimento da minha pesquisa e comprometido em manter meu bem-estar físico e emocional, além de ter influenciado diretamente para a realização desse momento.

Agradeço imensamente ao meu querido orientador, professor Dr. Anderson Weiny Barbalho Silva, sem ele nada disso seria possível. Você foi imprescindível durante todo meu caminho dentro da universidade, antes e durante a pós-graduação. Mais do que um orientador, você foi um amigo e suporte. Obrigado por ter abraçado a mim e às minhas ideias, e ter compartilhado comigo seu vasto conhecimento e experiência. Obrigado por ter me incluído, me dado oportunidades, me apoiado e orientado da forma mais magnífica possível. Obrigado por ter me dado o privilégio de conhecê-lo e por ter acreditado em mim. Você é um grande homem e faz a diferença em minha vida. Estendo-lhe minhas mãos, segure-as quando precisar.

Ao Núcleo de Pesquisa em Experimentação Animal (NUPEX) que foi minha casa e rede de apoio durante esses anos de muito aprendizado e companheirismo. Em especial à minha coorientadora, professora Dra. Jordânia Marques de Oliveira Freire e à Dra. Alana Nogueira Godinho, das quais tenho grande admiração e orgulho. Todo esse processo foi muito mais leve com a presença dessas pessoas, no qual me senti seguro, feliz e realizado. Serei eternamente grato por todos os nossos encontros e todo o conhecimento que pude absorver, pelas mentorias, treinamentos, orientações e pelas palavras amigas e acolhedoras nos momentos em que mais precisei. Vocês foram pilares essenciais para que tudo fosse possível!

À minha equipe executora e parceiros que tornaram esse sonho possível. Meus amigos Igo Teixeira e Venância Azevedo que estiveram diretamente envolvidos na execução desse estudo e no dia a dia, dentro e fora da universidade. A Dra. Laís Feitosa que esteve ligada a mim desde a Iniciação Científica e sempre presente com palavras de apoio e incentivo. Às professoras Dra. Mariana Donato e Dra. Chistina Peixoto do Laboratório de Ultraestrutura do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ- Pernambuco; às professoras Dra. Alane Pains e Dra. Maria Helena do grupo de pesquisa Biotecnologia Aplicada ao Desenvolvimento de Folículos Ovarianos (BIOFOV) da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF) e Dra. Ana Liza e Dr. Ricássio Barberino. Vocês são uma inspiração!

Agradeço ao Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia da Reprodução (LABIREP), na pessoa do professor Dr. José Roberto Viana Silva, por ter me dado a oportunidade de ingressar na Iniciação Científica e toda a orientação e ensinamentos que ajudaram na minha construção acadêmica e profissional. Sou um fã e admirador do seu trabalho e me sinto orgulhoso de fazer parte desse time. A todos os membros do LABIREP por direta ou indiretamente terem contribuído com esse momento: meu amigo Pedro Alves, à Efigênia Cordeiro, Allana Freire, Danisvânia Ripardo, Bianca Silva, Felipe Silva, Moisés Marinho, Francisco Costa, Francisco Freire, Vitória Bezerra, Laryssa Barroso, Paloma Santana, Jonas Monteiro, Ivana Brandão, Emanuel Félix, Mesley Portela, Andreza Aguiar, Thiago Henrique, Alex Farias, Érica Costa, Mara Brena e Raimundo Filho.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFC (PPGB) pela oportunidade oferecida e todo o suporte técnico e estrutural disponibilizado. E aos funcionários da UFC que são nossos companheiros no dia a dia e peças fundamentais para o funcionamento da universidade.

À Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA) e ao Curso de Ciências Biológicas por todo o amparo e contribuição grandiosa à minha formação. Tenho orgulho em dizer que fiz

parte dessa história e orgulho de não ter apenas passado pela universidade, mas tê-la vivido integralmente.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro para as pesquisas e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos durante a realização do Curso de Mestrado, fundamentais para a concretização das minhas atividades de pesquisa.

Aos animais, parte fundamental deste trabalho, que contribuíram grandiosamente para este estudo e para a Ciência.

Agradeço, enfim, a todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a minha formação acadêmica e profissional.

RESUMO

Diante dos problemas causados pelo uso de quimioterápicos no tratamento contra o câncer, é necessária a busca por biotécnicas reprodutivas que possibilitem a manutenção da fertilidade feminina. A doxorubicina (DOX) é um antineoplásico utilizados na prática médica. Todavia, há evidências da sua capacidade em provocar prejuízos sobre o ovário, abrindo possibilidades de estudos de plantas medicinais que, potencialmente, apresentem um efeito protetivo no desenvolvimento folicular, tal como a *Actaea racemosa* L. (AR). Dessa forma, considerando os efeitos negativos da DOX sobre a função ovariana, este estudo objetivou investigar a ação da AR como um potencial fator capaz de reduzir os danos ovarianos *in vivo*. Este estudo foi aprovado pela CEUA-UFC sob número 01/21. No **experimento 1**, foi avaliada a ação do extrato de AR (0.5, 5 e 50 mg/kg, v.o.) sobre o crescimento e sobrevivência de folículos ovarianos de camundongos fêmeas tratadas por 10 dias. No **experimento 2**, foi avaliada a ação protetora de AR (0.5 e 5 mg/kg) em ovários de camundongos após indução de quimioterapia com DOX (10 mg/kg). Para isso, os camundongos foram pré-tratados com solução salina (controle, 0,15 M, v.o.) ou com AR (0.5 ou 5 mg/kg, v.o.) e receberam solução salina (controle, 0,15 M, i.p.) ou DOX (10 mg/kg, i.p.), em seguida foram tratados com solução salina (controle, 0,15 M, i.p.) ou AR (0.5 ou 5 mg/kg, v.o) uma vez ao dia por 10 dias. As porcentagens de folículos normais, primordiais e em desenvolvimento foram avaliadas pelo teste qui-quadrado. Os dados de distribuição das fibras colágenas e densidade celular do estroma foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação de Dunn. Dados foram definidos como a média e erro padrão da média (média±E.P.M) e $p \leq 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os dados obtidos sugerem que o extrato de AR (0.5, 5 e 50 mg/kg) não possui efeitos tóxicos sobre os folículos ou tecido ovariano em camundongos e contribui aumentando as taxas de crescimento e sobrevida folicular *in vivo*. Quando administrado associado a DOX (10 mg/kg), a AR (0.5 e 5 mg/kg) foi capaz de diminuir a apoptose em células do estroma ovariano. A AR (0.5 mg/kg) também foi capaz de manter a ultraestrutura de células da granulosa e oócitos de folículos ovarianos pré-antrais. Houve um maior padrão de imunocoloração para TNF- α em DOX (10 mg/kg), enquanto AR (0.5 mg/kg) marcou de forma moderada. Investigações sobre a capacidade de produtos naturais, como os derivados de AR, em amenizar os efeitos adversos causados pela DOX, poderá contribuir para a identificação de uma nova abordagem terapêutica para a preservação da fertilidade frente aos tratamentos quimioterápicos.

Palavras-chave: Fitomedicamento. Foliculogênese. Quimioterapia. Apoptose. Ovário.

ABSTRACT

In view of the problems caused by chemotherapy drugs in the cancer treatment, its necessary to search for reproductive biotechniques that allow the maintenance of female fertility. Doxorubicin (DOX) is an antineoplastic agent used in medical practice. However, there is evidence of its ability to cause damage to the ovary, opening possibilities for studies of medicinal plants that potentially have a protective effect on follicular development, such as *Actaea racemosa* L. (AR). Thus, considering the negative effects of DOX on ovarian function, this study aimed to investigate the action of AR extract as a potential factor capable of reducing ovarian damage *in vivo*. This study was approved by CEUA-UFC under number 01/21. In **experiment 1**, the action of AR extract (0.5, 5 and 50 mg/kg, p.o.) on the growth and survival of ovarian follicles from female mice treated for 10 days was evaluated. In **experiment 2**, the protective action of AR (0.5 and 5 mg/kg) in mouse ovaries after induction of chemotherapy with DOX (10 mg/kg) was evaluated. For this, the mice were pretreated with saline solution (control, 0.15 M, p.o.) or with AR (0.5 or 5 mg/kg, p.o.) and received saline solution (control, 0.15 M, i.p.) or DOX (10 mg/kg, i.p.), then treated with saline (control, 0.15 M, i.p.) or AR (0.5 or 5 mg/kg, p.o) once daily for 10 days. The percentages of normal, primordial and developing follicles were evaluated using the chi-square test. Data on collagen fiber distribution and stromal cell density were analyzed using the Kruskal-Wallis test, followed by the Dunn's comparison test. Data were defined as the mean and standard error of the mean (mean \pm SE) and $p \leq 0.05$ was considered statistically significant. The obtained data suggest that the AR extract (0.5, 5 and 50 mg/kg) has no toxic effects on follicles or ovarian tissue in mice and contributes to increasing follicular growth and survival rates *in vivo*. When administered associated with DOX (10 mg/kg), AR (0.5 and 5 mg/kg) was able to decrease apoptosis in ovarian stromal cells. AR (0.5 mg/kg) was also able to maintain the ultrastructure of granulosa cells and oocytes from preantral ovarian follicles. There was a greater immunostaining pattern for TNF- α in DOX (10 mg/kg), while AR (0.5 mg/kg) stained moderately. Investigations on the ability of natural products, such as AR derivatives, to mitigate the adverse effects caused by DOX, may contribute to the identification of a new therapeutic approach for the preservation of fertility in the face of chemotherapy treatments.

Keywords: Phytomedicine. Folliculogenesis. Chemotherapy. Apoptosis. Ovary.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Esquema ilustrativo do ovário e suas principais estruturas..... | 23 |
| Figura 2 – Imagem representativa da estrutura básica de folículos ovarianos: A) primordial, B) primário, C) secundário e D) antral | 25 |
| Figura 3 – Mecanismo geral das vias apoptóticas na célula. A via do fator de morte, ou via extrínseca, é ativada por fatores de morte. A ligação de um fator de morte ao seu receptor específico causa o processamento do domínio de morte e recrutamento de FADD, para ativar CASP 8 e 3. Na via extrínseca, proteínas pró apoptóticas são ativadas transcricionalmente e induzem direta ou indiretamente a ativação de efetoras apoptóticas que fazem a mitocôndria liberar citocromo c. O conjunto formado por Apaf-1 e e citocromoc formam um complexo para mediar a CASP9. A CASP 8 ativada na via extrínseca e a CASP 9 na via intrínseca clivam a procaspase 3 em CASP 3 ativa | 32 |
| Figura 4 – Fórmula estrutural da molécula de doxorubicina | 35 |
| Figura 5 – Mecanismo de ação da DOX no DNA. A) TOP2b relaxa o enrolamento do DNA para facilitar a replicação e a síntese do DNA; B) a DOX forma um complexo pelo DNA através das bases de G e C em ambas as cadeias de DNA e impede a atividade da TOP2b e a síntese de DNA. TOP2b: Topoisomerase 2b, G: guanina, C: citosina. | 36 |
| Figura 6 – Mecanismo geral de ação da DOX nas células. A DOX leva à formação de ERO, peroxidação lipídica, dano ao DNA e às mitocôndrias, desbalanço do cálcio e indução de vias apoptóticas. A concentração citoplasmática e mitocondrial de cálcio aumenta, levando a edema celular. Após a ativação da via P53, a aumenta expressão de proteínas pró-apoptóticas o que desencadeia o efluxo de Cyt-C e desencadeia a ativação de caspases. Além disso, as ERO gerados disparam a ativação de caspases e induz a apoptose. A DOX bloqueia a síntese de DNA. DOX: doxorubicina, ERO: espécies reativas de oxigênio, Cyt-C: citocromo C, Ca ⁺² : cálcio citoplasmático..... | 38 |
| Figura 7 – Imagens representativas da <i>Actaea racemosa</i> (L.). A: visão geral da planta mostrando folhagem e inflorescências. B: inflorescência. C: raízes e rizomas, parte de maior interesse farmacológico | 43 |

LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO 1

- Figure 1** – Experimental design. AR: *Actaea racemosa*; NaCl: saline solution 61
- Figure 2** – The percentage (mean \pm SE) of normal follicles (A), primordial follicles (B) and developing follicles (C) in mice ovaries mice treated for 10 days with AR extract at different doses (0.5, 5 or 50 mg/kg) or SHAM (untreated control group). The percentage of primordial and developing follicles was compared by chi-square test and no significant differences were observed between treatments ($p > 0.05$). Numbers of follicles evaluated are shown within each column 64
- Figure 3** – The levels of collagen fibers (mean \pm SD) in the mouse ovaries ($n = 4$ ovaries per treatment) treated for 10 days with AR extract at different doses (0.5, 5 or 50 mg/kg) or SHAM (untreated control group). Collagen fiber distribution was analyzed by the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's comparison. a, b and c different lowercase letters indicate statistically significant differences between treatments ($p < 0.05$) 65
- Figure 4** – Stromal cell density on mice ovarian tissues after treated for 10 days with AR extract at different doses (0.5, 5 or 50 mg/kg) or SHAM (untreated control group). Stromal density was analyzed using the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's comparison. a and b different lowercase letters indicate statistically significant differences between treatments ($p < 0.05$) . 66
- Figure 5** – The percentage (mean \pm SE) of normal follicles in ovaries of mice induced to chemotherapy with DOX (10 mg/kg) or induced and treated with AR (0.5 and 5 mg/kg). The percentages of normal follicles was calculated as the fraction of normal follicles number/total follicles number in each treatment ($\times 100$). Data were compared using Fisher's exact test and expressed as percentages. a, b and c different lowercase letters indicate statistically significant differences between treatments ($p < 0.05$) 67
- Figure 6** – Representative images of ovarian sections of mouse treated for 10 days showing a morphologically normal (A–D) and degenerated (E–H) follicles from different stages of development stained with haematoxylin and eosin. (A) Normal and (E) degenerated primordial follicles; (B) Normal and (F) degenerated primary follicles; (C) Normal and (G) degenerated secondary follicle; (D) Normal and (H) degenerated antral follicle. Granulosa cells (GC); Oocyte (O); Oocyte nucleus (N); Antrum (A); Cumulus oocyte complex (COC); Theca cells (TC) (400 \times , Scale bar: 100 μ m) 67

Figure 7 – The percentage (mean \pm SE) of normal follicles per category (primordial, primary, secondary or antral) in ovaries of mice induced to chemotherapy with DOX (10 mg/kg) or induced and treated with AR (0.5 and 5 mg/kg). The proportion of follicles at different developmental stages was defined as a percentage of normal follicles in each stage over the total follicle count. Data were compared using Fisher's exact test and expressed as percentages. a and b different lowercase letters indicate statistically significant differences between treatments ($p < 0.05$) 68

Figure 8 – (A) The levels of collagen fibers (mean \pm SD) in mice ovaries induced to chemotherapy with DOX (10 mg/kg) or induced and treated with AR (0.5 and 5 mg/kg). Data were compared using one way analysis of variance (ANOVA) and no significant differences were observed between treatments ($p > 0.05$). (B, A-F) Representative images of collagen fibers labeled by Picosirius red: (A) control group; (B) DOX (10 mg/kg); (C) AR (0.5 mg/kg); (D) AR (0.5 mg/kg) + DOX (10 mg/kg); (E) AR (5 mg/kg) and (F) AR (5 mg/kg) + DOX (10 mg/kg). Scale bar: 100 μ m (400 \times) 69

Figure 9 – Stromal cell density in mice ovaries induced to chemotherapy with DOX (10 mg/kg) or induced and treated with AR (0.5 and 5 mg/kg). Data were compared using one way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test. a, b and c different lowercase letters indicate statistically significant differences between treatments ($p < 0.05$) 70

Figure 10 – Representative images of ovarian stromal density in: (A) control group; (B) DOX (10 mg/kg); (C) AR (0.5 mg/kg); (D) AR (0.5 mg/kg) + DOX (10 mg/kg); (E) AR (5 mg/kg) and (F) AR (5 mg/kg) + DOX (10 mg/kg). Scale bar: 100 μ m (400 \times) 70

Figure 11 – Immunohistochemical staining for TNF- α in mice ovaries (A and B) reaction negative control group; (C and D) control group; (E and F) DOX (10 mg/kg); (G and H) AR (0.5 mg/kg); (I and J) AR (0.5 mg/kg) + DOX (10 mg/kg). Scale bar: 100 μ m (100 \times and 400 \times) 71

Figure 12 – Representative ultrastructural micrographs in mice ovaries: (A,B) control group; (C,D) DOX (10 mg/kg); (E,F) AR (0.5 mg/kg) and (G,H) AR (0.5 mg/kg) + DOX (10 mg/kg). M: mitochondria; Nu: nucleus; ZP: zona pellucida, L: lipid; O: oocyte; Gr: granulosa cells; Re: endoplasmic reticulum; GC: golgi complex; Mv: microvillus 72

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Alguns compostos farmacologicamente ativos encontrados no gênero <i>Actaea</i> e/ou <i>Cimicifuga</i> e seus efeitos terapêuticos | 45 |
|--|----|

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------------------|--|
| Akt | Proteína quinase B |
| AMH | Hormônio antimüleriano |
| AMPc | Monofosfato cíclico de adenosina |
| ANOVA | Análise de variância |
| Apaf-1 | Fator ativador de protease da apoptose |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| Bax | Bcl-2 associado X |
| Bcl-2 | Célula B de linfoma 2 |
| BMP-7 | Proteína morfogenética óssea-7 |
| BMP-15 | Proteína morfogenética óssea-15 |
| <i>A. racemosa</i> | <i>Actaea racemosa</i> (L.) |
| CaCl ₂ | Cloreto de cálcio |
| CAD | DNase ativada por caspase. |
| CASP | Caspase |
| CAT | Catalase |
| cDNA | DNA complementar |
| CEUA | Comissão de Ética no Uso de Animais |
| CGP | Células germinativas primordiais |
| Cit-C | Citocromo C |
| CONCEA | Conselho Nacional de Controle na Experimentação Animal |
| CREB | Proteína de ligação de resposta ao AMPc |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DOX | Doxorrubicina |
| E2 | Estradiol |
| EGFR | Fator de crescimento epidérmico |
| ERO | Espécies reativas de oxigênio |
| FADD | Domínio de morte associado ao receptor de Fas |
| FCFb | Fator básico de crescimento de fibroblastos |
| FGF-2 | Fator de crescimento fibroblástico-2 |

| | |
|-------------------------------|--|
| FGF-10 | Fator de crescimento fibroblástico-10 |
| Figl α | Fator de linhagem germinativa α |
| FOP | Falência ovariana prematura |
| FOX | Proteína de <i>forkhead</i> |
| FOXL2 | Proteína <i>forkhead</i> L2 |
| FOXO3a | Fator de transcrição <i>forkhead</i> BOX O3 |
| FSH | Hormônio folículo-estimulante |
| FSHR | Receptor de FSH |
| GH | Hormônio do crescimento |
| GDF-9 | Fator de crescimento e diferenciação-9 |
| GnRH | Agonista do hormônio liberador de gonadotrofina |
| GPx | Glutationa peroxidase |
| GSH | Glutationa |
| HO-1 | Heme oxigenase |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrogênio |
| ICAD | Inibidor de DNase ativada por caspase |
| IGF-1 | Fator de crescimento semelhante à insulina 1 |
| IL1 β | Interleucina 1 beta |
| i.p | Intraperitoneal |
| KL | Kit ligante |
| LH | Hormônio luteinizante |
| LHR | Receptor de LH |
| LHRH-a | Análogo do hormônio liberador do hormônio luteinizante |
| LIF | Fator inibidor de leucemia |
| mTORC1 | Alvo mecânico do complexo rapamicina-1 |
| MAPK | Proteína quinase ativada por mitogenia clássica |
| MDA | Malondialdeído |
| MET | Microscopia eletrônica de transmissão |
| MEC | Matriz extracelular |
| MII | Metáfase II |

| | |
|------------------|---|
| MLKL | Proteína do tipo domínio da quinase de linhagem mista |
| NaCl | Cloreto de sódio/Solução Salina |
| Nrf2 | Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 |
| NT | Neurotrofinas |
| O ₂ | Oxigênio |
| PBS | Tampão fosfato salino |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| P4 | Progesterona |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| PDK1 | Quinase-1 dependente de PI3K |
| PI3K | Fosfatidilinositol-3-quinase |
| PTEN | Fosfatase e homólogo de tensina |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| RNA _m | RNA mensageiro |
| RT | Temperatura ambiente |
| RT-qPCR | PCR quantitativa em tempo real |
| SOD | Superóxido dismutase |
| SOP | Síndrome do ovário policístico |
| TBS | Solução salina tamponada com tris |
| TGF- α | Fator de crescimento transformador alfa |
| TGF- β | Fator de crescimento transformador beta |
| TNF- α | Fator de necrose tumoral alfa |
| TOP-II | Topoisomerase II |
| TRA | Tecnologias de reprodução assistida |
| TRAIL | Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF |
| UV | Ultravioleta |
| v.o | Via oral (Gavagem) |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|----|------------------|
| < | Menor que |
| % | Porcentagem |
| ® | Marca Registrada |
| ≈ | Aproximadamente |
| nm | Nanometro |
| μm | Micrometros |
| mm | Milímetros |
| μg | Micrograma |
| mg | Miligrama |
| g | Gramas |
| kg | Quilograma |
| μL | Microlitro |
| mL | Mililitro |
| mM | Milimolar |
| °C | Grau Celsius |
| α | Alfa |
| β | Beta |
| γ | Gama |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 20 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 22 |
| 2.1 | Ovário mamífero, foliculogênese e oogênese | 22 |
| 2.2 | Folículos primordiais e ativação folicular | 26 |
| 2.3 | Atresia folicular e morte celular programada | 29 |
| 2.4 | Efeitos dos antineoplásicos na fertilidade feminina | 32 |
| 2.4.1 | <i>Doxorrubicina e sua gonadotoxicidade</i> | 34 |
| 2.5 | Produtos naturais com efeito protetor contra à quimioterapia | 39 |
| 2.5.1 | <i>Actaea racemosa</i> (L.) | 42 |
| 2.6 | Murinos como modelo na experimentação animal | 50 |
| 3 | JUSTIFICATIVA | 52 |
| 4 | HIPÓTESES | 53 |
| 5 | OBJETIVOS | 54 |
| 5.1 | Objetivo Geral | 54 |
| 5.2 | Objetivos Específicos | 54 |
| 6 | Capítulo 1: Protective effect of <i>Actaea racemosa</i> (L.) on mice ovarian induced toxicity by doxorubicin chemotherapy | 55 |
| 7 | CONCLUSÕES GERAIS | 80 |
| 8 | PERSPECTIVAS | 81 |
| | REFERÊNCIAS | 82 |
| | ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS | 94 |

1 INTRODUÇÃO

Diante do aumento dos problemas de fertilidade em mulheres, a investigação acerca do aprimoramento das biotecnologias existentes ou a busca por biotécnicas alternativas está cada vez mais evidente (BELLVER; DONEZZ, 2019). Experimentações *in vivo* em murinos e humanos estão sendo utilizadas como uma ferramenta de estudo da biologia reprodutiva e toxicologia. No entanto, apesar da grande quantidade de informações produzidas nas últimas décadas sobre a fisiologia ovariana e reprodutiva, o entendimento completo dos mecanismos que controlam o desenvolvimento folicular ainda não foi totalmente elucidado (HSUEH et al., 2015; SILVA et al., 2020).

A ativação e o crescimento folicular são regulados por diversos fatores intra e extraovarianos, como genes, enzimas, hormônios e fatores de crescimento (YE et al., 2019). No entanto, sua morte por apoptose pode ser ocasionada também por múltiplos fatores, incluindo regimes terapêuticos de patologias, como o câncer. É de conhecimento que os agentes quimioterápicos rotineiramente utilizados no tratamento do câncer danificam a função ovariana e a fertilidade feminina (GRIFFITHS; WINSHIP; HUTT et al., 2020). Por exemplo, a doxorrubicina (DOX), que é amplamente usada para o tratamento de diferentes cânceres, incluindo sarcomas (MARUZZO et al., 2013), câncer de ovário (ARMSTRONG et al., 2021), câncer nas tubas uterinas e peritônio (TOKUNAGA et al., 2021) e tumores de mama (KHALLAF; ROSHDY; IBRAHIM, 2020), possui efeitos deletérios sobre a fertilidade feminina. Os efeitos adversos desse antineoplásico incluem toxicidade ovariana em humanos e camundongos, através de danos oxidativos ao ovário e ao útero (NIRINGIYUMUKIZA et al., 2019; GRIFFITHS; WINSHIP; HUTT, 2020) diminuindo a reserva ovariana por meio da superativação e/ou apoptose folicular (WANG et al., 2019a; TITUS et al., 2021), o que pode ocasionar a menopausa precoce e aumento da taxa de infertilidade em mulheres após quimioterapia (LETOURNEAU et al., 2012).

A investigação acerca de substâncias que possam inibir ou amenizar os efeitos adversos causados por quimioterápicos, como a DOX, possui alta relevância. Nesse sentido, o uso de produtos alternativos, como fitoterápicos, tem sido apontado como um caminho promissor, como é o caso do medicamento fitoterápico Aplause®, produzido a partir da planta *Actaea racemosa* (L.). O Aplause® é indicado para aliviar os sintomas da pré e pós-menopausa, como rubor, ondas de calor, sudorese, palpitações e alterações depressivas de humor e do sono. A *A. racemosa* é uma planta herbácea da família Ranunculaceae, originária do Canadá e costa

atlântica dos Estados Unidos (BORRELLI; ERNST, 2008). Esta planta é comumente utilizada na medicina popular para aliviar dor e inflamação, para o tratamento de cólicas menstruais e nos sintomas da menopausa (CASTELO-BRANCO et al., 2021). No entanto, ainda há pouca investigação sobre a utilização de medicamentos produzidos a base do extrato de *A. racemosa* sobre a fertilidade feminina. Dada a importância do estudo de redirecionamento de fármacos, é importante a investigação acerca da segurança (toxicidade) do uso deste medicamento sobre a fertilidade feminina quando administrado no período reprodutivo e ainda se esta substância é capaz de reduzir os efeitos adversos causados pela administração da DOX. Um estudo *in vitro* recente demonstrou que o extrato de *A. racemosa* (5ng/mL), quando adicionado ao meio de cultivo, diminuiu os efeitos negativos da DOX em ovários de camundongos fêmeas (DE ASSIS, 2022).

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi de investigar a ação do extrato de *A. racemosa* sobre os efeitos negativos nos ovários de camundongos fêmeas induzidas à quimioterapia com doxorrubicina utilizando um modelo *in vivo*. Assim, para um maior esclarecimento da importância deste estudo, a revisão de literatura a seguir irá abordar aspectos relacionados aos ovários dos mamíferos, bem como os processos de desenvolvimento folicular e oocitário, a ativação e atresia folicular, ao câncer e seus impactos na saúde reprodutiva feminina, ao efeito de agentes quimioterápicos na fisiologia reprodutiva e produtos naturais, como o extrato de *A. racemosa*, além do modelo animal utilizado na experimentação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

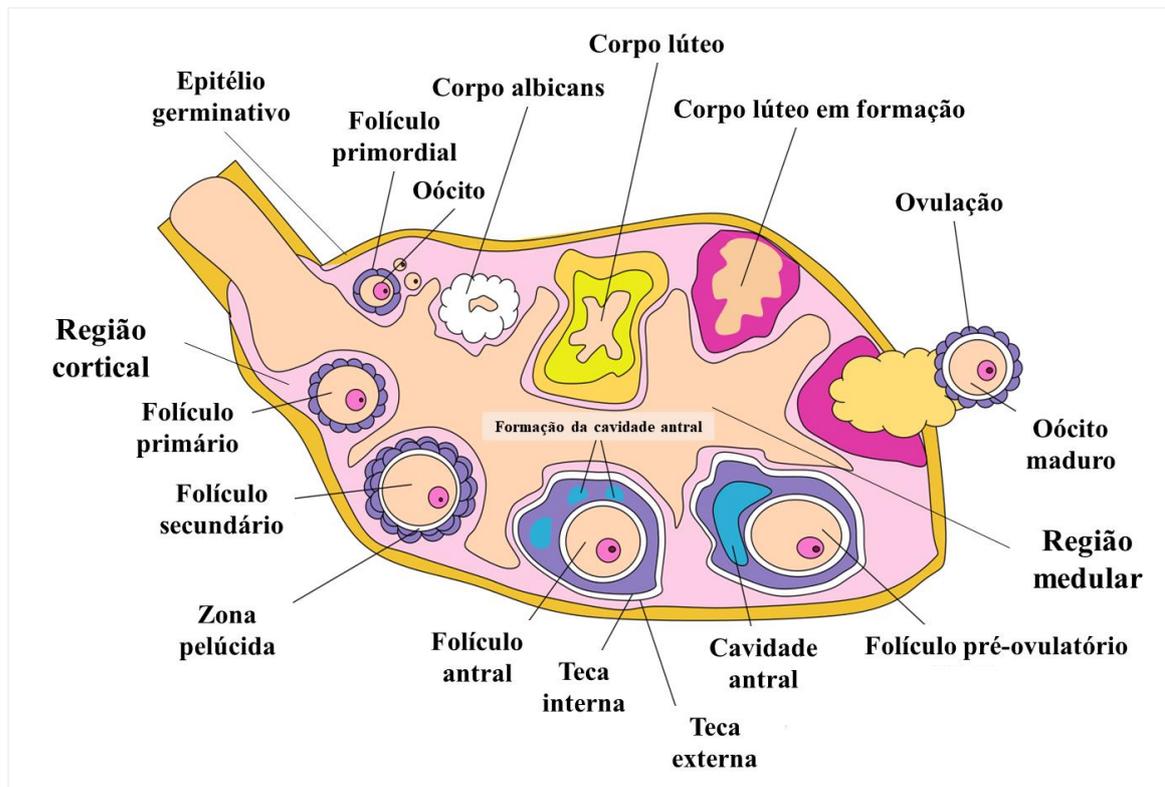
2.1 Ovário mamífero, foliculogênese e oogênese

O ovário é o principal órgão do sistema reprodutor feminino, apresentando duas funções básicas: uma endócrina, caracterizada pela produção de hormônios e fatores de crescimento, e outra gametogênica, relacionada ao desenvolvimento de folículos e maturação dos oócitos. Neste órgão, destacam-se duas regiões: região medular e região cortical (Figura 1). A primeira é localizada mais internamente ao órgão e é composta de muitos vasos sanguíneos, nervos e tecido conjuntivo, sendo principalmente responsável pela sustentação e nutrição. Já na região cortical, é onde se encontram as células germinativas e a maior parte dos folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento (FENG et al., 2018). No microambiente ovariano ocorrem dois processos biológicos importantes: a oogênese e a foliculogênese. Esses processos são coordenados por uma série de eventos aos quais promovem mudanças morfológicas e funcionais do oócito e folículo, conduzindo à diferenciação de células, ao desenvolvimento folicular e a maturação oocitária (BONNET et al., 2013).

A oogênese compreende o desenvolvimento e diferenciação das células germinativas primordiais (CGP) ainda na vida fetal até a formação do oócito fecundado durante a vida reprodutiva (RÜSSE, 1983). Assim, diz-se que a oogênese inicia-se antes da foliculogênese e termina após essa. Depois do processo marcado pelo crescimento celular e pela redistribuição de organelas citoplasmáticas, as CGP multiplicam-se e diferenciam-se em oogônias. Em camundongos fêmeas, as CGP continuam a proliferar por mitose até 14 dias após a fecundação, formando grupos de células germinativas conhecidas como cistos ou ninhos (oogônias) (JAGARLAMUDI; RAJKOVIC, 2012). Antes de entrar na primeira divisão meiótica, aproximadamente 5 dias após o nascimento em camundongos, as oogônias aumentam de tamanho e se diferenciam em oócitos primários imaturos, que sofrem uma parada no seu desenvolvimento em prófase I no estágio de diplóteno ou vesícula germinativa (JAGARLAMUDI; RAJKOVIC, 2012; RIMON-DAHARI et al., 2016). Neste momento, é caracterizado o início da foliculogênese com a formação do folículo primordial (SILVA et al., 2016). Os oócitos interrompem seu desenvolvimento na etapa de diplóteno da prófase I; somente após a fêmea atingir a maturação sexual próximo à ovulação (50-60 dias após o nascimento em camundongos), os oócitos retomarão sua divisão meiótica para tornarem-se oócitos secundários haplóides (n) ou maduros e, assim, atingirem a segunda parada da meiose

na fase de metáfase II (MII), na qual estão aptos a serem ovulados. O processo de formação dos oócitos primários é regulado negativamente pelo estradiol (E2) e pelo hormônio antimülleriano (AMH) e é controlado positivamente pela ativina, um membro da superfamília do fator de crescimento transformador- β (TGF- β), neurotrofinas (NT), fator de linhagem germinativa α (Figl α); Kit ligante (KL) e fator de transcrição Forkhead box L2 (FOXL2) (RIMON-DAHARI et al., 2016). Após a segunda parada meiótica, os oócitos retomam seu desenvolvimento somente se forem fertilizados. Em camundongos, a segunda parada meiótica ocorre por volta da 5ª semana de vida (HUTT; ALBERTINI, 2007; SÁNCHEZ; SMITZ, 2012).

Figura 1: Esquema ilustrativo do ovário mamífero e suas principais estruturas.



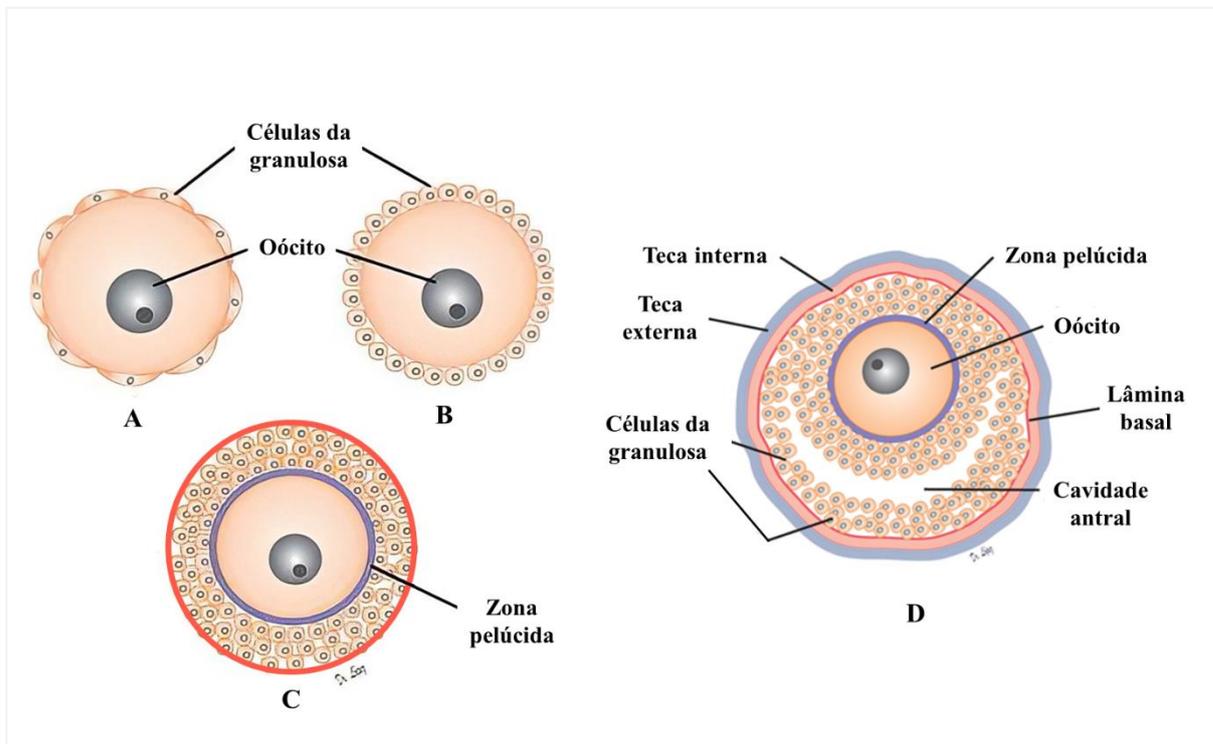
Fonte: Adaptado de Wikiand.com.

Os folículos ovarianos são as unidades morfológicas e funcionais da biologia reprodutiva em fêmeas e são formados pelo processo de foliculogênese. Nesse processo, os folículos crescem, amadurecem e são levados à ovulação; seu início é caracterizado pela primeira parada meiótica do oócito na prófase I, com a formação do folículo primordial. Após a formação, esses folículos podem imediatamente iniciar o seu crescimento ou permanecer quiescentes até serem estimulados a iniciar seu desenvolvimento (VAN DEN HURK; ZHAO,

2005). Esse evento é denominado de ativação folicular e é marcado por alterações morfológicas e funcionais, incluindo o aumento do diâmetro oocitário, a proliferação das células da granulosa e a diferenciação do formato destas células de pavimentosas para cúbicas. O número de folículos ovarianos que geralmente chegam ao estágio ovulatório é muito pequeno, já que a grande maioria morre pelo processo de atresia folicular (FIGUEIREDO et al., 2008). Os folículos ovarianos são importantes para auxiliar a oogênese e também são essenciais para a produção de hormônios sexuais femininos, como o E2 e a progesterona (P4), que são responsáveis pelas características sexuais secundárias femininas e manutenção da gestação (RIMON-DAHARI et al., 2016).

O folículo ovariano é composto por um oócito circundado por células da granulosa e da teca, cuja função é proporcionar um ambiente ideal para o crescimento, sobrevivência e maturação do oócito (CORTVRINDT; SMITZ, 2001). De acordo com o grau de desenvolvimento, os folículos podem ser classificados em primordiais, primários e secundários, caracterizando os grupos de folículos pré-antrais ou não-cavitários. Além disso, podem ser classificados em folículos terciários e pré-ovulatórios, àqueles caracterizados pela presença de uma cavidade antral (FIGUEIREDO et al., 2008) (Figura 2). Em roedores, os folículos primordiais são formados em torno do terceiro ao quinto dia de idade e a primeira onda de recrutamento folicular acontece ao longo das três semanas subsequentes, ou seja, por volta de 21 dias (HIRSHFIELD, 1989). Em humanos, o processo de desenvolvimento folicular tem duração de 180 dias (GOUGEON, 2010). Os estágios de transição pré-antral inicial e pré-antral para antral inicial podem ocorrer independentemente do suporte de gonadotrofina extraovariana. Camundongos geneticamente desprovidos de gonadotrofinas exibiram folículos nos estágios iniciais de desenvolvimento, mas camundongos deficientes para hormônio folículo estimulante (FSH) ou o gene do receptor de FSH (FSHR) exibiram parada do desenvolvimento folicular no estágio pré-antral (DURLINGER et al., 2001; KUMAR et al., 1997) e camundongos nocaute do receptor de hormônio luteinizante (LHR) exibiram um bloqueio no desenvolvimento folicular no estágio antral (ZHANG et al., 2001). O FSHR está presente nas células da granulosa desde o estágio inicial do folículo pré-antral e LHR são expressos nas células da teca dos folículos pré-antrais e antrais, sendo o hormônio luteinizante (LH) um fator de sobrevivência e diferenciação que facilita o desenvolvimento do oócito na presença de FSH. Esses achados inferem que, embora as gonadotrofinas não sejam essenciais para os estágios iniciais do crescimento folicular, elas podem ter um efeito benéfico na fase inicial do crescimento folicular.

Figura 2: Imagem representativa da estrutura básica de folículos ovarianos A) primordial, B) primário, C) secundário e D) antral.



Fonte: Adaptado de Norberto López Serna: *Biología del desarrollo. Cuaderno de trabajo*. Direitos © McGraw-Hill Education.

A população folicular que forma a reserva ovariana é variável entre as espécies, sendo estimada em 1.500 em camundongos e 1.000.000 em mulheres ao nascimento (WALLACE; KELSEY, 2010). Porém, o número e a distribuição dos diferentes tipos foliculares nos ovários de animais são marcados por uma grande variação individual, além de ser afetado pela raça, idade, níveis hormonais, genética, fatores ambientais, bem como o status reprodutivo e nutricional (IRELAND et al., 2007). Na maioria dos mamíferos, a foliculogênese é iniciada no ovário fetal, no entanto, em camundongos, a formação de folículos primordiais pode ocorrer até 5 dias após o nascimento. Para estes animais, duas populações de folículos primordiais são descritas: os folículos primordiais iniciais e os folículos primordiais adultos (NIU; SPRADLING, 2020). As duas populações exibem dinâmicas de desenvolvimento distintas e contribuem de maneira diferente para a fisiologia e funcionalidade ovariana. Os folículos primordiais iniciais, diferentemente dos folículos primordiais adultos, amadurecem em períodos diferentes e podem persistir por longos períodos no ovário até a ovulação (ZHENG et al., 2014). Durante esse período, esses folículos crescidos produzem AMH, inibindo a ativação

precoce de folículos primordiais adulto. Além disso, a produção hormonal inicial desses folículos parecem ser a responsável pelo estabelecimento do eixo hipotalâmico hipofisário gonadal, no entanto, a manutenção desse eixo hormonal depende do desenvolvimento gradativo dos folículos primordiais adultos (OJEDA; URBANSKI; AHMED et al., 1986), que substituem gradativamente os folículos primordiais iniciais até compõem todo o *pool* folicular em camundongos a partir de 3 meses de idade (ZHENG et al., 2014). É a partir dessa população folicular que forma a reserva ovariana que todos os folículos em crescimento e oócitos ovulados serão derivados, diminuindo a reserva naturalmente com a idade, sendo selecionados para o crescimento e/ou levados à atresia folicular (FINDLAY et al., 2019). Mas, para que ocorra a seleção para o crescimento e desenvolvimento, os folículos primordiais precisam ser ativados.

2.2 Folículos primordiais e ativação folicular

A ativação dos folículos primordiais, etapa importante na foliculogênese inicial, é caracterizada no nível morfológico pelo crescimento do oócito e proliferação e diferenciação das células da granulosa circundantes, observando-se a transformação das células com formato pavimentoso para células da granulosa de formato cuboidal (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Porém, uma vez que esse processo é iniciado, ele não pode ser revertido. Com isso, a taxa de ativação dos folículos primordiais deve ser rigorosamente controlada para garantir que reservas suficientes permaneçam para sustentar a fertilidade ao longo da vida reprodutiva. Assim, modelos de falência ovariana prematura (FOP) em camundongos envolve a ativação descontrolada dos folículos primordiais, de modo que a reserva ovariana é esgotada prematuramente (JAGALARMUDI et al., 2010).

Estudos sugerem que a taxa na qual os folículos primordiais são selecionados para ativação e/ou eliminação é dinamicamente regulada e varia desde o nascimento até o final do período fértil, sendo um número maior de folículos ativados no início da vida e depois diminuindo na idade adulta. Estudos em bovinos (IRELAND et al., 2008) e camundongos (LIEW et al., 2014) indicam que uma grande reserva ovariana de folículos primordiais em fêmeas jovens está associada a um maior número de folículos em crescimento do que o observado em fêmeas mais velhas, que possuem menores reservas de folículos primordiais. Porém, há evidências conflitantes sobre a taxa de ativação folicular com o aumento da idade em humanos. Alguns estudos sugerem que a taxa de ativação aumenta nos anos anteriores à

menopausa (HANSEN et al., 2008; FADDY; GOSDEN, 1996). No entanto, um estudo mais recente sugeriu que a taxa de ativação do folículo primordial aumenta desde o nascimento até os 14 anos e depois diminui até a menopausa (WALLACE; KELSEY, 2010).

Mesmo que todos os mecanismos moleculares que envolvem o processo de ativação e transição dos folículos primordiais de um estado de dormência para um de crescimento não tenham sido totalmente elucidados, um progresso significativo foi feito para caracterizar as vias moleculares que o governam. Sabe-se que a via de sinalização PTEN/PI3K/Akt é essencial para a ativação dos folículos primordiais. Em particular, diversos estudos revelaram a importância da cascata PTEN/PI3K/Akt no controle do crescimento do oócito associado à ativação ou supressão do folículo primordial (KIM et al., 2015; MAIDARTI; ANDERSON; TELFER, 2020). A cascata de sinalização intracelular para ativação da molécula fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) é iniciada pela ligação de fatores de crescimento a receptores de tirosina quinase, presentes na membrana da célula. A PI3K ativada catalisa a fosforilação de mensageiros para ativação da quinase-1 dependente de PI3K (PDK1). A PDK1 fosforila e ativa a proteína quinase B (AKT), que é essencial para a sobrevivência, crescimento e proliferação celular ao inibir proteínas pró-apoptóticas (como BAX, BAD, *forkhead* e p53) e ativar proteínas anti-apoptóticas, como a Bcl-2 (CECCONI et al., 2012). A fosfatase e homólogo de tensina (PTEN) é um regulador negativo antagonizando a atividade da PI3K, inibindo indiretamente a fosforilação e/ou ativação de AKT (PULIDO, 2018). Portanto, a superexpressão de PTEN pode efetivamente inibir a proliferação de células foliculares, enquanto sua regulação negativa induz o crescimento celular e inibe a apoptose (FU et al., 2017; GOTO et al., 2019). A deleção do PTEN em oócitos de camundongos induz uma dramática ativação e perda prematura de folículos primordiais (REDDY et al., 2008).

Acredita-se que os fatores de crescimento e hormônios produzidos no microambiente ovariano resultado da interação entre células foliculares e estroma sejam os principais reguladores da ativação folicular. Em particular, a produção de KL por células da granulosa é um importante sinal de pró-ativação (ZHANG et al., 2014). Nesse mesmo estudo, a inibição da sinalização mTORC1 (alvo mecanístico do complexo rapamicina-1; regula o crescimento celular e metabolismo em resposta a fatores de crescimento e nutrientes) em células da granulosa de folículos primordiais levou ao impedimento da ativação folicular, enquanto a ativação promoveu efeito inverso. Além disso, estudos já demonstraram a participação de fatores de crescimento na ativação folicular, como o fator de crescimento e diferenciação-9 (GDF-9), proteína morfogenética óssea-7 e 15 (BMP-7; BMP-15), fator de crescimento

semelhante à insulina-1 (IGF-1), fator inibidor de leucemia (LIF) fator de crescimento fibroblástico-2 e 10 (FGF-2; FGF-10) e TGF- β . Ademais, alguns hormônios também são fundamentais para esse processo, como E2 e P4 e hormônio do crescimento (GH) (SILVA; VAN DEN HURK; FIGUEIREDO, 2016). Além da necessidade de ativadores, os folículos primordiais são mantidos em estado de repouso por fatores inibitórios. Por exemplo, a produção de AMH e ativina pelos folículos em crescimento tem papéis na supressão da taxa de ativação (SON et al., 2011), os níveis de AMH diminuem à medida que o tamanho do folículo aumenta. Moléculas como as proteínas de *forkhead box* (FOX), PTEN e inibidores de quinase dependente de ciclina (p27Kip1) foram identificados como fatores inibidores (REDDY et al., 2009; KIM, 2015). Com a influência de fatores inibidores intrínsecos e extrínsecos, a maioria dos folículos primordiais é mantida em estado quiescente.

Quando o ovário é exposto a agentes quimioterápicos, a secreção de inibidores do folículo primordial diminui devido ao dano aos folículos em desenvolvimento, e isso acelera o recrutamento dos folículos primordiais pelas vias de ativação PI3K/PTEN/Akt e a redução da reserva ovariana resultando na entrada maciça de folículos na fase de crescimento, o chamado efeito “*burnout*” (CHANG et al., 2015). Esse efeito tem sido evidenciado por estudos com camundongos que mostraram diminuição no número de folículos primordiais e números aumentados de folículos em desenvolvimento precoce em grupos tratados com DOX e cisplatina nos primeiros 4 e 5 dias, respectivamente (WANG et al., 2019a; CHANG et al., 2015). No entanto, um estudo mais recente demonstrou que a exposição aguda (12h) a ciclofosfamida foi capaz de promover a diminuição da reserva de folículos primordiais humanos por vias pró-apoptóticas, mas sem ativação de crescimento do folículo primordial (TITUS et al., 2021). Através de análises transcriptômicas individuais dos oócitos desses folículos, foi observado que, em decorrência de danos ao DNA (aumento da expressão de γ H2AX), a via de ativação PI3K/PTEN/Akt foi suprimida enquanto a apoptose foi desencadeada mediada por proteínas anti e pró-apoptóticas (Bcl2 e BAD), aumentando a expressão de Caspase 3 ativada. Dessa maneira, as evidências sugerem que a superativação de folículos primordiais pela via PI3K/PTEN/Akt depende do tempo de exposição inicial, se aguda ou tardia, ao antineoplásico. Porém, independente do mecanismo ou tempo de exposição, o uso de antineoplásicos, seja na pesquisa ou prática clínica, é capaz de induzir a perda celular principalmente através de danos diretos ou indiretos que culminem com a morte celular por apoptose, principal forma de atresia de folículos ovarianos.

2.3 Atresia folicular e morte celular programada

Os ovários de mamíferos possuem folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento, sendo a maior parte classificados como folículos pré-antrais. No entanto, apenas um pequeno número dos folículos presentes no ovário ($\approx 1\%$) chegará ao ápice do seu desenvolvimento e culminar com a ovulação; a grande maioria é perdida através de um processo fisiológico de morte programada chamado de atresia folicular (FIGUEIREDO; LIMA, 2017; MATSUDA et al., 2012). A atresia faz parte da dinâmica folicular, sendo essencial na função e desenvolvimento ovariano, uma vez que esse processo é importante por auxiliar na homeostase, controlando a fecundidade, selecionando folículos para o recrutamento, um ‘controle de qualidade’ eliminando anomalias meióticas, além de garantir a remoção dos remanescentes foliculares pós-ovulatórios para preparar o ovário para o próximo ciclo (KUMAR; JOY, 2015; HUSSEIN, 2005).

Em folículos primordiais, o processo de atresia se inicia no oócito; já em folículos em desenvolvimento (primários, secundários e antrais), é sinalizado pelas células da granulosa localizadas na superfície interna do folículo, indicando um papel iniciador da granulosa na apoptose (MATSUDA et al., 2012; FINDLAY et al., 2019). Embora os sinais exatos, receptores e vias de sinalização intracelular que levam à atresia folicular por intermédio da apoptose das células da granulosa não sejam claros, é provável que múltiplas moléculas (como Fas, Caspases, TNF, p53, c-Myc) e fatores de crescimento (como gonadotrofinas, [IGF-1], interleucina-1 β [IL1 β], fator de crescimento epidérmico [EGFR], fator básico de crescimento de fibroblastos [FCFb], fator de crescimento transformador alfa [TGF- α]) estejam envolvidos (HUSSEIN, 2005). Assim, apesar da atresia ser um processo natural e contínuo, ela pode ser acelerada devido a perturbações à fisiologia ovariana, como no uso de medicamentos para o tratamento de câncer (MORGAN et al., 2012). Dessa maneira, quando a morte folicular acontece de forma rápida e descontrolada, podem ocorrer problemas como FOP (SPEARS et al., 2019).

A atresia folicular pode ocorrer por processos de necrose, necroptose, autofagia e/ou apoptose (FINDLAY et al., 2019; CHAUDHARY et al., 2019; ZHOU; PENG; MEI, 2019). A necrose e necroptose apresentam características semelhantes, no qual as células aumentam de volume, aumentam a permeabilização e culminam com a ruptura da membrana plasmática (CHAUDHARY et al., 2019). Geralmente, a necrose é iniciada por mecanismos não celulares como isquemia, deficiência de níveis de adenosina trifosfato (ATP) e traumas, levando a danos irreversíveis na célula (MCCULLY et al., 2004). Já a necroptose é iniciada pelo fator de necrose

tumoral- α (TNF- α) e operada através das proteínas quinase-1 e 3, que interagem com seus receptores, bem como pela proteína do tipo domínio da quinase de linhagem mista (MLKL) (CHAUDHARY et al., 2018). Na autofagia, ocorre o sequestro de materiais celulares residuais por autofagossomos, os quais se unem aos lisossomos que os degradam (ZHOU; PENG; MEI, 2019). Essa via pode ser estimulada por privação de nutrientes ou fatores de crescimento, hipóxia, estresse oxidativo, danos ao DNA, organelas danificadas ou patógenos intracelulares (KROEMER; MARIÑO; LEVINE, 2010). Vários fatores, incluindo as vias PI3K/PKA/mTOR, transdução do sinal de cálcio, mitocôndrias e alteração de citoesqueleto, participam da regulação da autofagia durante o desenvolvimento folicular (ZHOU; PENG; MEI, 2019).

A apoptose, também chamada de morte celular programada, é a principal responsável pela perda da reserva ovariana e a mais conhecida (HUSSEIN, 2005; SPEARS et al., 2019). Trata-se de um processo altamente regulado e importante para a manutenção e desenvolvimento de processos fisiológicos nos seres vivos, e pode ocorrer em situações fisiológicas ou patológicas. Em situações fisiológicas, a apoptose está envolvida, por exemplo, durante o desenvolvimento embrionário, em resposta imunológica a agentes biológicos e no recrutamento de folículos ovarianos (NAGATA, 2018; HUSSEIN, 2005). Já nas situações patológicas, o seu envolvimento está relacionado a resposta à danos celulares, como lesões no DNA, estresse oxidativo, hipóxia e/ou isquemia (NAGATA, 2018; MORGAN et al., 2012), sendo alguns desses efeitos relacionados aos danos causados por antineoplásicos no ovário.

Durante a apoptose, a célula sofre alterações morfológicas como perda de aderência com a matriz extracelular, retração celular devido a quebras do citoesqueleto, condensação e fragmentação da cromatina e formação de corpos apoptóticos; e, após o processo, são fagocitadas por macrófagos para prevenir a liberação de componentes intracelulares, como fatores inflamatórios (NAGATA, 2018; HUSSEIN, 2005). Em folículos ovarianos de ratos, os sinais morfológicos e ultraestruturais de apoptose inclui retração das células da granulosa e do oócito, diminuição das mitocôndrias e perda das cristas mitocondriais, segmentação do oócito e vacuolização citoplasmática (DEVINE et al., 2000).

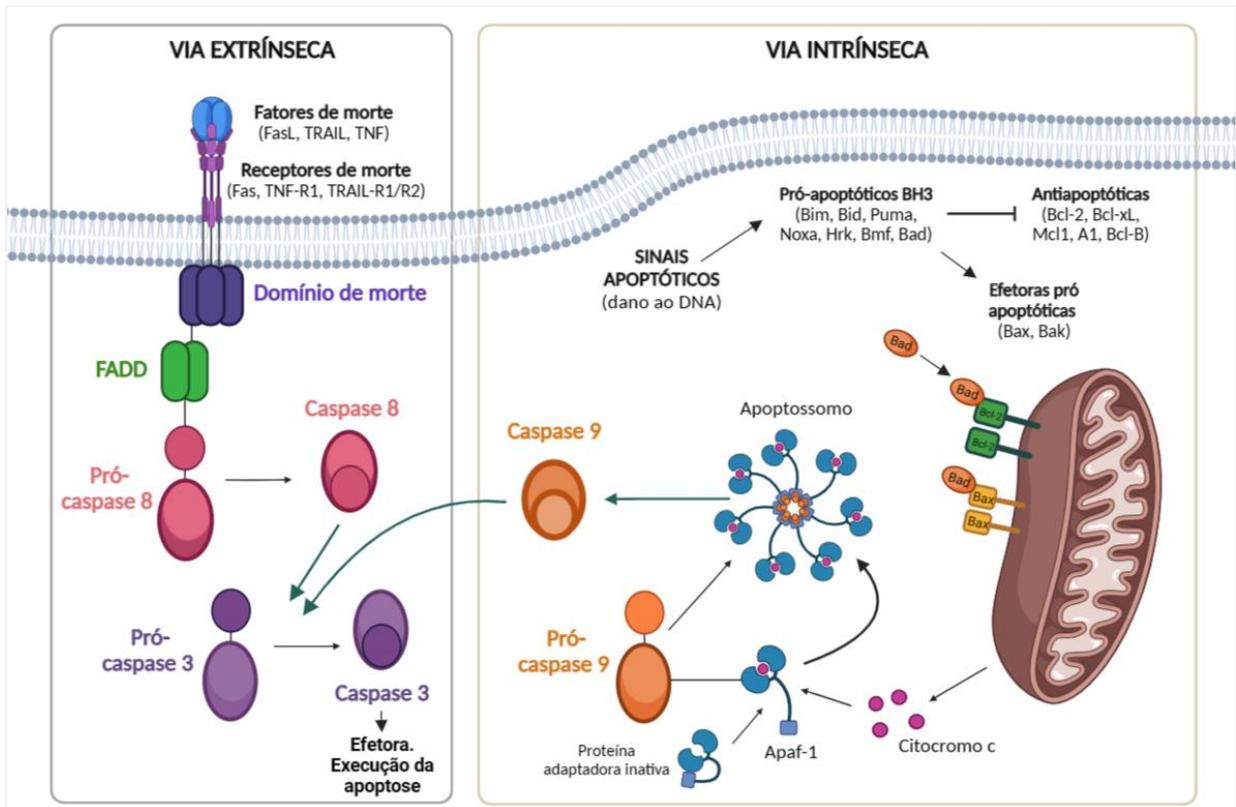
Muitas moléculas estão envolvidas no controle da apoptose, seja promovendo sua ativação ou supressão. Dentre elas, estão proteínas antiapoptóticas (como Bcl-2) e pró-apoptóticas (como Bax), além de outros membros da família Bcl e proteínas Caspases. Essas últimas desempenham um papel crucial para a sinalização e efetivação do processo apoptótico. Além disso, a apoptose pode ser desencadeada por duas vias: a via extrínseca (ou via do receptor de morte) e via intrínseca (ou via mitocondrial) (NAGATA, 2005; 2018). Na via extrínseca, há

o envolvimento de fatores de morte (FasL, TNF- α e TRAIL) e receptores de morte (Fas [ou APO-1/CD95], TNF-R1, TRAIL-R1 [ou DR4] e TRAIL-R2 [ou DR5]). O domínio de morte resultante da interação ligante-receptor, recruta o Domínio de Morte Associado ao Receptor de Fas (FADD) e Procaspase 8, no qual serão associados ao outro por meio de seus domínios efetores de morte. O complexo formado dessa associação (Fas, FADD, Procaspase 8) é chamado de complexo de sinalização indutor de morte (DISC), responsável pela clivagem da Procaspase 8 em Caspase 8 ativa (iniciadora), esta responsável por clivar a Procaspase 3 em Caspase 3 ativada (efetora). A Caspase 3 ativada é responsável pela clivagem de fatores para executar a apoptose; por exemplo, ICAD (Inibidor da DNase ativada por caspase) é clivado para liberar CAD (DNase ativada por caspase) para fragmentação do DNA (NAGATA, 2005; 2018). Assim, há a degradação de macromoléculas importantes, como outras proteínas ou o próprio DNA.

Na via intrínseca, a apoptose é desencadeada por agentes genotóxicos e regulada por membros da família de proteínas Bcl. Essa, por sua vez, é dividida em três subfamílias: membros pró-apoptóticos BH3 (Bim, Bid, Puma, Noxa, Hrk, Bmf e Bad), moléculas efetoras pró-apoptóticas (Bax e Bak) e proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl1, A1 e Bcl-B) (CZABOTAR et al., 2014; NAGATA, 2018). Em resposta a um estímulo, os membros pró-apoptóticos BH3, como o Bad, são regulados e ativados por de-fosforilação, atuando nos efetores pró-apoptóticos Bak e Bax ou dimerizando com proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2 (NAGATA, 2018; TITUS et al., 2021). Bax e Bad estimulam o efluxo de citocromo C da mitocôndria, no qual liga-se a proteínas adaptadoras para formação do Fator Ativador de Protease da Apoptose (Apaf-1) e recruta a Procaspase 9; esse complexo de interação (Apaf-1 e Procaspase 9) é chamado de apoptossomo. A ativação da Procaspase 9 dentro no apoptossomo ativa a efetora Caspase 3, responsável por clivar substratos e executar a morte celular, como já mencionado no mecanismo da via extrínseca.

O mecanismo geral das vias apoptóticas descritas estão representados Figura 3.

Figura 3: Mecanismo geral das vias apoptóticas na célula. A via do fator de morte, ou via extrínseca, é ativada por fatores de morte. A ligação de um fator de morte ao seu receptor específico causa o processamento do domínio de morte e recrutamento de FADD, para ativar CASP 8 e 3. Na via intrínseca, proteínas pró apoptóticas são ativadas transcricionalmente e induzem direta ou indiretamente a ativação de efetoras apoptóticas que fazem a mitocôndria liberar citocromo c. O conjunto formado por Apaf-1 e citocromoc formam um complexo para mediar a CASP9. A CASP 8 ativada na via extrínseca e a CASP 9 na via intrínseca clivam a procaspase 3 em CASP 3 ativa.



Fonte: Elaborada pelo autor. Criada com biorender.com

Nesse sentido, os tratamentos atuais usados para o câncer, como a quimioterapia, possuem efeitos sobre a fisiologia ovariana causando danos, principalmente, através do mecanismo intrínseco da apoptose celular. Os antineoplásicos são capazes de causar danos diretos ao DNA, desencadeando a morte celular e influenciando na saúde reprodutiva de mulheres.

2.4 Efeitos dos antineoplásicos na fertilidade feminina

O câncer é definido como uma doença genômica e surge a partir de alterações cumulativas no material genético de células normais do organismo. Essas alterações conferem uma vantagem de crescimento à célula cancerosa, levando à sua proliferação, invasão nos

tecidos circundantes e disseminação para órgãos distantes. Em tecidos normais, as taxas de crescimento e de morte celular estão em equilíbrio; no câncer, esse equilíbrio é rompido por perda no controle do crescimento celular e/ou mecanismos de apoptose (CORN; EL-DEIRY, 2002). As causas que contribuem para o desenvolvimento do câncer são multifatoriais, incluindo fatores ambientais, endógenos e genéticos (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Avanços na detecção precoce do câncer e esquemas terapêuticos para a doença têm oferecido aos pacientes maiores chances de cura e de sobrevivência. Porém, apesar desses avanços significativos, a sobrevida pode ter sua qualidade diminuída devido aos efeitos colaterais dos tratamentos e suas consequências em diversos campos, inclusive na saúde reprodutiva (BELLVER; DONNEZ, 2019). Assim, a qualidade de vida e a preservação da fertilidade são questões que devem ser cuidadosamente discutidas em pacientes submetidos ao tratamento de câncer.

Dados atualizados mostram que o câncer de mama é o mais comumente diagnosticado em mulheres, com uma estimativa de 24,5% do número total de casos de câncer (SUNG et al., 2021). Foi relatado que antraciclina e taxanos, grupos de antineoplásicos, aumentam as taxas de amenorréia em mulheres submetidas a quimioterapia para câncer de mama (HAN et al. 2009). Além disso, estudos mais recentes destacaram a ocorrência de menopausa precoce induzida por quimioterapia em mulheres após ou durante o tratamento para câncer de mama (YEO et al. 2020; SHIN et al., 2019). Esses distúrbios são justificados pela ação direta ou indireta dos agentes quimioterápicos à fisiologia ovariana.

Os efeitos tóxicos prejudicam a fertilidade por meio de danos ao útero, diminuição da função ovariana e danos aos folículos ovarianos por meio da apoptose celular, danos ao DNA, danos mitocondriais e à formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (SPEARS et al., 2019; MORGAN et al. 2012). Além disso, estudos têm demonstrado que os tratamentos com antineoplásicos em mulheres afetam o útero, promovendo a perda do volume (VAN DE LOO et al. 2019; BENEVENTI et al. 2015). Há evidências de danos causados pela quimioterapia à vasculatura uterina e às células formadoras do endométrio e miométrio (GRIFFITHS; WINSHIP; HUTT, 2020). Em um estudo com camundongos, o agente quimioterápico doxorrubicina (DOX), usado para tratar diversos tipos de câncer, atingiu diretamente o útero e alterou a expressão gênica em resposta à síntese de estrogênio (ANDERSEN et al. 2019). Além disso, a DOX atinge o ovário e pode diminuir a reserva folicular ovariana por meio de superativação e atresia de folículos em camundongos (WANG et al. 2019a). Dessa forma, o risco de FOP e infertilidade tornam-se muito evidentes.

Os folículos primordiais formam o reservatório do ovário, e são recrutados ao longo da vida reprodutiva de fêmeas. No entanto, quando essa ativação é acelerada fora do normal, a reserva ovariana pode ser seriamente afetada (FORD et al., 2020). Nesse sentido, os antineoplásicos causam a morte dos folículos por atuarem por meio de um mecanismo com sensibilidade particular para células em divisão. Estudos em camundongos mostram que agentes antineoplásicos causam a ativação desses folículos primordiais através da via PI3K/PTEN/Akt/FOXO3a, o que pode causar a depleção da reserva ovariana (CHANG et al., 2015; WANG et al. 2019a; LINS et al., 2020). No entanto, isso ainda não está totalmente elucidado. Um estudo recente mostrou que a quimioterapia com ciclofosfamida desencadeia a perda de folículos primordiais por vias apoptóticas sem promover a ativação folicular (TITUS et al., 2021).

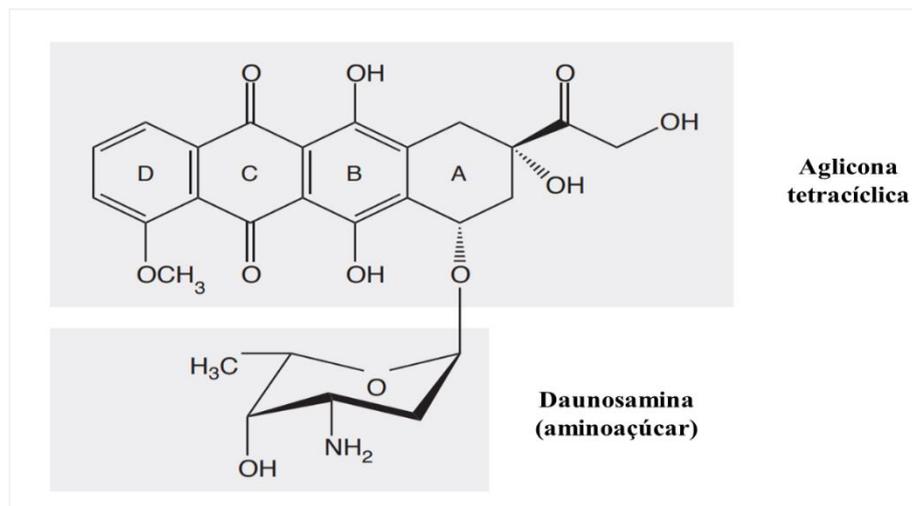
O principal mecanismo de ação dos antineoplásicos é através do dano ao DNA, que conseqüentemente ativa as vias de apoptose. Além disso, há evidências de morte folicular indireta por dano vascular e estromal, além de diminuição do fluxo sanguíneo de ovários em mulheres (BEN-AHARON et al., 2012). Essa morte de células estromais, bem como os danos microvasculares, induzem hipóxia tecidual, o que pode contribuir para a perda indireta tardia de folículos ovarianos. Outro mecanismo de dano é o estresse oxidativo por meio da geração de ERO e diminuição da glutatona (GSH), uma vez que os agentes antineoplásicos também estão associados a danos mitocondriais e vias de estresse oxidativo (LINS et al. 2020; GORINI et al. 2019). Além disso, os quimioterápicos podem atuar diretamente sobre o oócito ou sobre as células da granulosa. Assim, a morte do oócito pode ocorrer de forma direta ou resultar da morte das células da granulosa, uma vez que a sobrevivência do oócito depende de fatores secretados por essas células (MORGAN et al., 2012). Dentre os quimioterápicos com alto potencial terapêutico e com conhecida toxicidade ovariana, destaca-se a doxorrubicina.

2.4.1 Doxorrubicina e sua gonadotoxicidade

A doxorrubicina (DOX) é um antibiótico antitumoral pertencente à classe das antraciclina e é prescrita, sozinha ou combinada, para o tratamento de diferentes cânceres, incluindo sarcomas (MARUZZO et al., 2013), câncer de ovário (ARMSTRONG et al., 2021) câncer nas tubas uterinas e peritônio (TOKUNAGA et al., 2021) e tumores de mama (KHALLAF; ROSHDY; IBRAHIM, 2020). Sua estrutura química possui duas porções principais: uma aglicônica (aglicona tetracíclica) consistindo em um anel tetracíclico com

grupos adjacentes quinino-hidroquinona com cadeia lateral curta metoxilo e grupos carbonil, e uma porção chamada daunosamina (aminoaçúcar) que está ligada a um dos anéis por uma ligação glicosídica (MINOTTI et al., 2004) (Figura 4). A aglicona é essencial para a intercalação de DOX entre as fitas de DNA, enquanto o aminoaçúcar estabiliza a intercalação por interações eletrostáticas com os grupos fosfato carregados negativamente na cadeia de DNA (SOLOMAN; GABIZON, 2008).

Figura 4: Fórmula estrutural da molécula de doxorubicina.

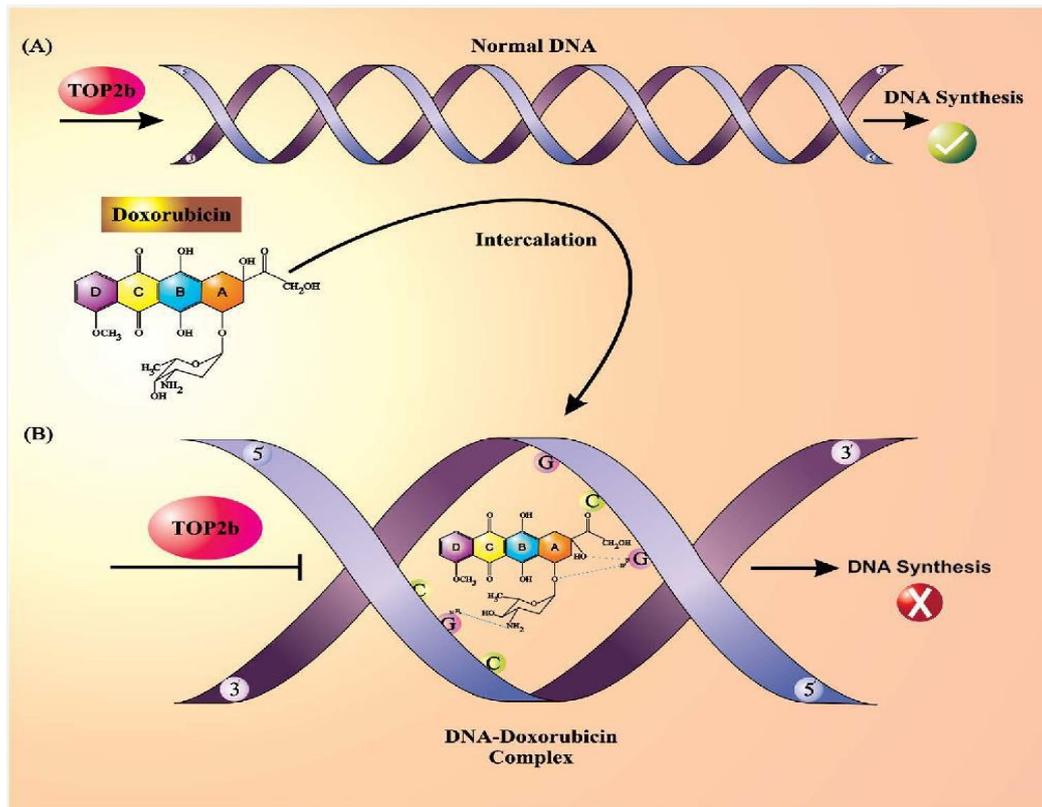


Fonte: Adaptado de KUBEČEK et al. (2015).

A estrutura planar da DOX permite que se ligue ao DNA e consequentemente, provoque a quebra das cadeias, interferindo nos processos de replicação e transcrição (MOBARAKI et al., 2017). Ademais, seu efeito tóxico também está associado a interrupção da ação de reparo mediado pela topoisomerase-II (TOP-II) e promove danos ao próprio DNA, a produção de radicais livres e danos às membranas celulares e proteínas, gerando uma resposta para a apoptose celular. A intercalação ao DNA é responsável pela deformação da dupla hélice e inibição da TOP-II através da estabilização de complexos entre DNA e TOP-II (complexos DOX-DNA-TOP-II) (MINOTTI et al., 2004; MOBARAKI et al., 2017) (Figura 5). A atividade desta enzima é necessária para a replicação, transcrição, recombinação e remodelação da cromatina do DNA; sua função consiste em criar quebras transitórias de DNA que são liberadas consecutivamente após a alteração da conformação do DNA. Um estudo que analisou as interações DOX-DNA, concluiu que a DOX interage com o DNA por intercalação simples (sem agregação) e/ou formando dímeros, além disso pode ocorrer uma auto associação DOX-DOX

formando agregados compostos por 3 a 4 moléculas ligadas ao longo da dupla hélice (SILVA et al. 2017).

Figura 5: Mecanismo de ação da DOX no DNA. A) TOP2b relaxa o enrolamento do DNA para facilitar a replicação e a síntese do DNA; B) a DOX forma um complexo pelo DNA através das bases de G e C em ambas as cadeias de DNA e impede a atividade da TOP2b e a síntese de DNA. TOP2b: Topoisomerase 2b, G: guanina, C: citosina.



Fonte: MOBARAKI et al. (2017).

Além de dano ao DNA, a DOX também é capaz de se difundir através da membrana mitocondrial e se acumular em seu interior, perturbando a integridade funcional da cadeia respiratória, produzindo ERO e resultando em disfunção mitocondrial por diminuição de ATP e aumento de citocromo c (Cit-C), ocasionando a apoptose e alterações no metabolismo energético (MOBARAKI et al., 2017; GORINI et al., 2019). A DOX alterou a homeostase mitocondrial e o metabolismo energético em células de câncer de mama humano, mediando a geração de radicais livres (WIGNER et al., 2021). Além disso, a DOX também atua aumentando a inflamação e a autofagia e interfere na homeostase do cálcio (VARELA-LÓPEZ et al., 2019). No entanto, devido a sua alta toxicidade, não apenas as células cancerosas são afetadas, mas

também as células saudáveis do organismo, o que justifica os efeitos colaterais dos tratamentos contra o câncer, bem como a toxicidade ao sistema reprodutivo.

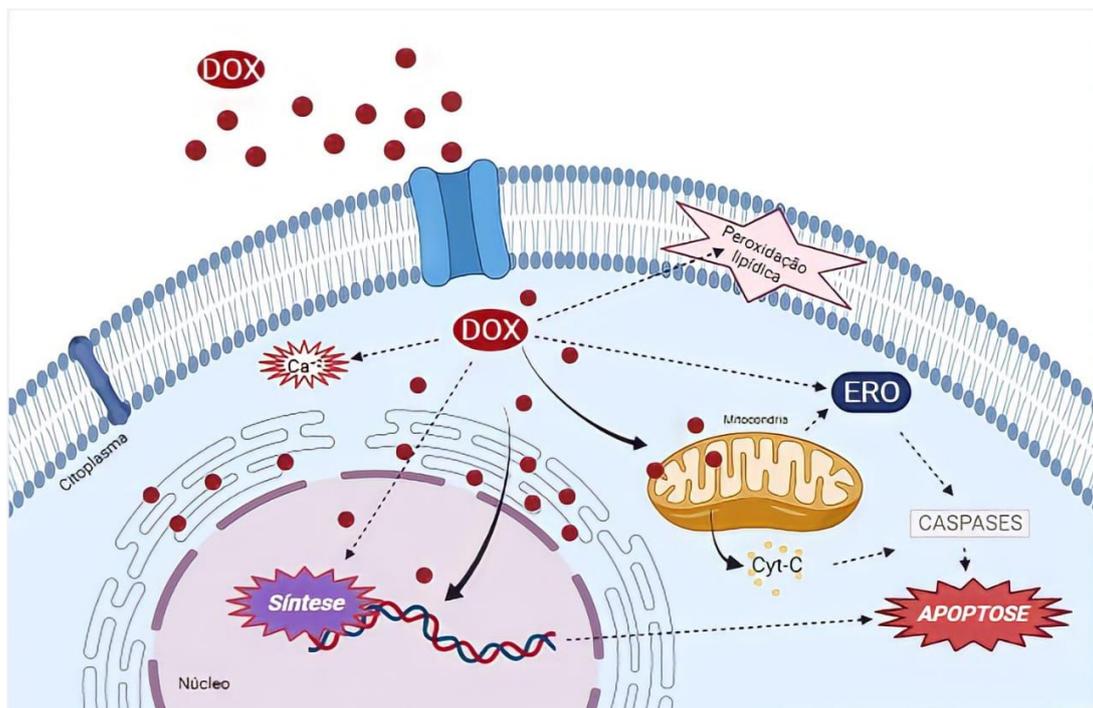
Esse antineoplásico apresenta toxicidade sistêmica, afetando múltiplos órgãos e sistemas incluindo coração, sistema digestivo, sistema nervoso, sistema urinário e sistema reprodutivo (PUGAZHENDHI et al., 2018). Os efeitos adversos no sistema reprodutivo incluem toxicidade ovariana em camundongos, diminuindo a reserva ovariana por meio da superativação e atresia folicular (WANG et al., 2019a), além de danos oxidativos aos folículos ovarianos (NIRINGIYUMUKIZA et al., 2019), danos aos vasos sanguíneos e morte de células do estroma ovariano humano, causando hipóxia tecidual e danos indiretos aos folículos (SOLEIMANI et al., 2011; OKTEM; OKTAY, 2007), bem como a menopausa precoce e aumento da taxa de infertilidade em mulheres que mantêm a atividade ovariana após quimioterapia (LETOURNEAU et al., 2012). Além disso, foi demonstrado que a DOX pode atingir diretamente o útero e tem um impacto de longo prazo nas respostas uterinas ao E2, alterando a expressão gênica uterina em resposta aos hormônios em camundongos fêmeas (ANDERSEN et al., 2019). Estudos recentes mostraram que o tecido ovariano criopreservado de mulheres jovens submetidas à quimioterapia com este antineoplásico, apresentaram muitos folículos atrésicos e após o cultivo *in vitro* desse mesmo tecido, observou-se uma diminuição na produção de E2 e P4 (PAMPANINI et al., 2019). Além disso, a administração de uma dose única de doxorrubicina (10 mg/kg) em camundongos interferiu na maturação meiótica (XIAO et al., 2017) e aumentou a apoptose, principalmente, em células da granulosa de folículos em crescimento e oócitos de folículos primordiais (WANG et al., 2019a).

A apoptose é regulada pelo equilíbrio entre moléculas pró-apoptóticas e antiapoptóticas, como Bax e Bcl2, respectivamente, além do envolvimento de biomarcadores de dano, como γ -H2AX e Tap63 α e de proteínas caspases (CASP). CASP são proteínas essenciais no processo de apoptose (HUSSEIN et al., 2005; MATSUDA et al., 2012). Um estudo recente em camundongos demonstrou que a DOX diminuiu a reserva ovariana através da apoptose e superativação de folículos primordiais com o envolvimento da via de dano ao DNA Tap63 α -C-CASP3 (WANG et al., 2019a). Além disso, a DOX causou quebras no DNA em folículos primordiais, oócitos e células da granulosa revelado pela expressão de γ -H2AX, além de danos vasculares e estromais no ovário humano (SOLEIMANI et al., 2011). Com a finalidade de entender melhor os mecanismos moleculares de atuação dos antineoplásicos, pesquisadores afirmaram ainda que a perda folicular induzida por esses medicamentos antineoplásicos, como a cisplatina, é mediada por membros da via PI3K, como a proteína quinase B (AKT), a fosfatase

e homólogo de tensina (PTEN) e o forkhead box O3 (FOXO3a) (CHANG et al., 2015; LINS et al. 2020).

O mecanismo geral de ação da DOX, descrito ao longo do texto, está representado na Figura 6.

Figura 6: Mecanismo geral de ação da DOX nas células. A DOX leva à formação de ERO, peroxidação lipídica, dano ao DNA e às mitocôndrias, desbalanço do cálcio e indução de vias apoptóticas. A concentração citoplasmática e mitocondrial de cálcio aumenta, levando a edema celular. Aumenta expressão de proteínas pró-apoptóticas; desencadeia o efluxo de Cyt-C e desencadeia a ativação de caspases. Além disso, as ERO geradas disparam a ativação de caspases e induz a apoptose. A DOX bloqueia a síntese de DNA. DOX: doxorubicina, ERO: espécies reativas de oxigênio, Cyt-C: citocromo c, Ca^{+2} : íons cálcio citoplasmático.



Fonte: Elaborada pelo autor. Criada com biorender.com

Apesar do sucesso dos tratamentos quimioterápicos, estudos têm indicado mecanismos de resistência às drogas induzida por antineoplásicos, resultando em um pior prognóstico e sobrevida da paciente. Esses mecanismos de resistência estariam relacionados a interação entre vias de sinalização. Christowitz et al. (2019) identificaram uma maior taxa de crescimento de tumor mamário em camundongos tratados com DOX (6 e 15 mg/kg) em comparação com os controles não tratados, ou seja, a DOX falhou em induzir a morte tumoral. Comparou-se os níveis de expressão de marcadores envolvidos na morte celular e nas vias de sinalização de sobrevivência e concluiu-se que a resistência à droga e crescimento tumoral podem ocorrer por meio do papel adaptativo da via MAPK/ERK em um esforço para proteger as células tumorais.

Essa via desempenha um papel essencial na regulação da proliferação, progressão do ciclo celular e apoptose, e estudos anteriores mostraram que a eficácia da DOX é melhorada pela sua inibição (SHUKLA et al., 2010). Além disso, a via PI3K/Akt também pode induzir quimiorresistência e promover a tumorigênese pela fosforilação de vários substratos envolvidos na sobrevivência celular, ciclo celular, metabolismo celular, transcrição de genes e síntese de proteínas (WEST; CASTILLO; DENNIS, 2002). Além disso, o fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) é um importante fator de transcrição que desempenha um papel importante na proteção contra danos oxidativos. Níveis aumentados de ERO ativam a sinalização Nrf2, induzindo a expressão de enzimas antioxidantes, como heme oxigenase (HO-1), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD), que protegem as células contra o estresse oxidativo (TOSSETA et al., 2022). No entanto, a ativação do Nrf2 nas células cancerígenas está associada à quimiorresistência, inativando o estresse oxidativo mediado por drogas que normalmente levaria à morte dessas células (URUNO et al., 2020; ZHOU et al., 2020). Portanto, pesquisadores têm sido direcionados para revelar os mecanismos subjacentes responsáveis pela resistência à DOX e melhorar seus efeitos adversos.

Dados como esses fornecem implicações significativas no entendimento de como a DOX age de forma negativa nas funções ovarianas, ainda que necessite de maiores elucidações quanto aos seus mecanismos. Porém, apesar do seu conhecido papel em causar a morte celular, a quimiorresistência pode acontecer. Assim, é de suma importância conhecer a ação do antineoplásico e fornecer proteção à fertilidade de pacientes em risco de disfunção reprodutiva durante o período da quimioterapia. Nessa perspectiva, investigações acerca de formas alternativas de proteção à fertilidade estão em andamento, como através do uso de produtos naturais com potencial de proteção aos danos causados pela quimioterapia.

2.5 Produtos naturais com efeito protetor contra à quimioterapia

Diversos estudos têm investigado o potencial de extratos vegetais, por meio das suas atividades anticancerígenas, combinados ao tratamento de câncer convencional (ZHANG et al., 2019), como a *Annona muricata* (gravioleira) (YAJID et al., 2018) e a *Punica granatum* (romãzeira) (BASSIRI-JAHROMI, 2018). Mas, para além disso, produtos naturais estão sendo testados com o objetivo de proteger sistemicamente durante ou após o tratamento quimioterápico em machos e fêmeas. A exemplo de três produtos naturais (1,8-cineol, óleo essencial de *Artemisia herba alba*; exopolissacarídeo, obtido de estreptomicetos marinhos e

ácido eláxico) que foram testados com o objetivo de analisar seus efeitos hepatoprotetores e cardioprotetores em ratos machos induzidos a quimioterapia com ciclofosfamida, sendo esta capaz de causar toxicidade hepática e cardíaca acentuada e apoptose (ABDALLAH et al., 2019). O pré-tratamento por 7 dias desses animais com todas as substâncias melhorou as anormalidades de eletrocardiograma, diminuiu os marcadores séricos de hepatotoxicidade e cardiotoxicidade, preveniu o estresse oxidativo e a apoptose celular.

Com a evolução das tecnologias de reprodução assistida (TRA), várias opções de preservação da fertilidade estão sendo estudadas para ajudar mulheres com câncer. Destaque para a criopreservação de embriões e oócitos, criopreservação de tecido ovariano, maturação *in vitro* de oócitos, criação de ovários artificiais, ativação folicular *in vitro* e biotecnologias com células-tronco (CHO et al., 2020; FÀBREGUES et al., 2021). No entanto, a proteção à fertilidade por meio das biotécnicas em reprodução humana assistida acaba, muitas vezes, não sendo acessíveis para a maioria das pacientes ou tornam-se desafiadoras mediante limitações técnicas, financeiras e funcionais. Além disso, devido a efeitos colaterais das drogas sintéticas, o foco no uso de fitoterápicos tem aumentado (BENT; KO, 2004). Portanto, surge a importância de se desenvolver tratamentos alternativos por meio de substâncias capazes de proteger o ovário dos efeitos deletérios dos quimioterápicos, e os fitomedicamentos têm sido alvos de estudos com o propósito de identificar uma possível ação quimioprotetora.

Diante disso, substâncias naturais com propriedades antioxidantes têm sido alvo de estudos. Os produtos naturais possuem uma ampla variedade de antioxidantes e outros compostos bioativos (CARNEIRO et al., 2017), como ácidos fenólicos, lignanas, estilbenos, taninos e flavonoides (AMAROWICZ; PEGG, 2019). A administração de antioxidantes presentes na polpa de açaí (*Euterpe oleracea*) diminuiu as vias pró-inflamatórias e sinalização apoptótica em ovários de camundongos fêmeas em idade mais avançada (KATZ-JAFFE et al. 2020). Nesse estudo, o tratamento aumentou a sinalização β -adrenérgica, diminuiu a apoptose e a sinalização pró-inflamatória e afetou de forma variável o crescimento celular e as vias antioxidantes, mostrando o potencial do extrato vegetal. No sentido de proteção contra antineoplásicos, Lins et al., (2020) avaliaram os efeitos do pré-tratamento com o antioxidante rutina e sua influência após indução da quimioterapia com cisplatina em camundongos fêmeas. Os resultados promissores demonstraram que a substância foi capaz de aumentar o número de folículos morfológicamente normais, diminuir as taxas de apoptose, aumentar a produção de GSH e diminuição de ERO por meio de regulação da atividade mitocondrial. O mecanismo foi analisado pela expressão de p-PTEN e p-FOXO3a, membros da via de ativação AKT/PI3K.

As pesquisas acerca das propriedades terapêuticas de produtos naturais representam um campo de estudo promissor e que vem ganhando grande notoriedade. Mas para além do efeito antioxidante, outras atividades terapêuticas estão relacionadas ao uso de extratos vegetais sobre a proteção à saúde reprodutiva, como síntese hormonal, preservação do tecido ovariano e folículos, proliferação celular, ação antiinflamatória e antiapoptótica. Um estudo realizado com a *Foeniculum vulgare* (erva-doce) concluiu que o extrato vegetal foi capaz de proteger o ovário dos efeitos colaterais da ciclofosfamida, apresentando um aumento nos níveis séricos de hormônios (E2 e P4) e evidenciou o seu potencial efeito protetor contra os efeitos deletérios do antineoplásico no ovário de camundongos (AZAM et al., 2017). Os resultados mostraram que o peso, volume e diâmetro ovariano reduziu significativamente nos grupos tratados com ciclofosfamida, mas aumentou após o tratamento dos camundongos com extrato de erva-doce. Além disso, o extrato auxiliou no aumento do número de folículos normais. Recentemente, demonstrou-se que o extrato de *Nasturtium officinale* (agrião) teve efeitos protetores em ovários de ratas tratadas por 21 dias com o extrato e induzidas à quimioterapia com DOX (dose única, 10mg/kg). O extrato auxiliou na função ovariana por meio da regulação hormonal e proliferação celular, além de ter mostrado efeitos protetores na peroxidação lipídica (RAD et al., 2021). Um estudo em ratas induzidas a quimioterapia com DOX e tratadas com quercetina ou vitamina E mostrou melhoras nos parâmetros morfológicos e hormonais nos ovários desses animais (SAMARE-NAJAF; ZAL; SAFARI, 2020). Houve diminuição de alterações patológicas (erupção cutânea, atrofia, hemorragia e ascite) no tecido ovariano e diferença no volume do ovário nos grupos tratados com quercetina e vitamina E em comparação com a DOX, além disso quercetina e vitamina E foram capazes de promover a diminuição no número de folículos atresicos e o ganho de peso nos animais enquanto DOX diminuiu. Outro estudo analisou o potencial antiinflamatório e antiapoptótico do zingerone, uma substância encontrada no gengibre, em ovários e úteros de ratas induzidas a quimioterapia com cisplatina (KAYGUSUZOGLU et al., 2018). Os resultados mostraram que a substância manteve a arquitetura e integridade histológica ovariana e uterina e reduziu os níveis de marcadores inflamatórios (NF- κ B, TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX-2 e iNOS). Também inibiu a apoptose e reduziu os marcadores de dano oxidativo ao DNA pela regulação negativa da expressão de caspase-3 e 8, juntamente com um nível de Bcl-2 regulado positivamente.

Dentre os compostos naturais com potencial de aplicação na fisiologia reprodutiva, com ênfase na preservação da fertilidade, pode-se destacar a planta *Actea racemosa* (L.). O extrato

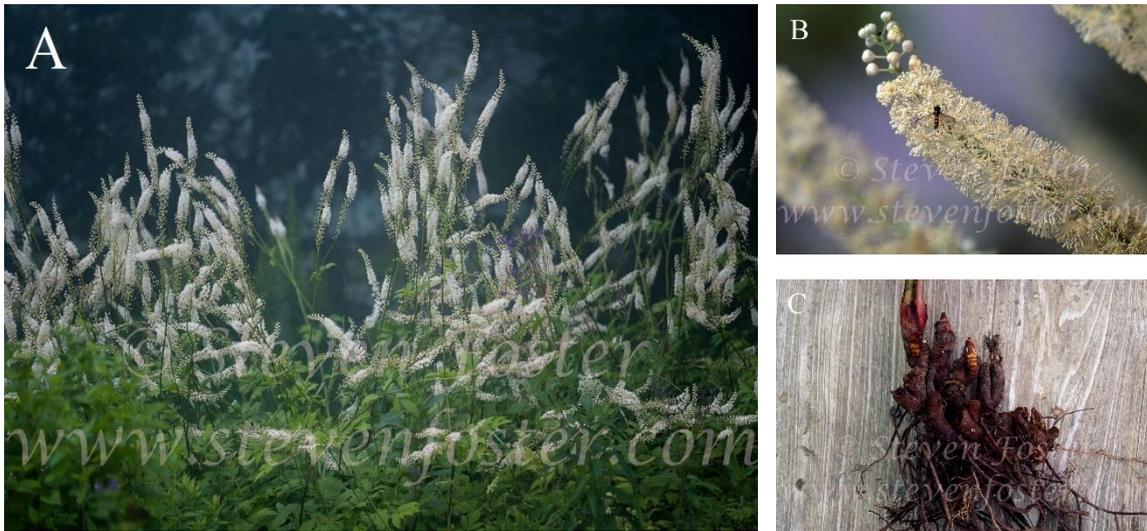
dessa planta já demonstrou possuir ação terapêutica em mulheres e em experimentações *in vitro* e *in vivo*.

2.5.1 *Actaea racemosa* (L.)

O gênero *Actaea* é o primeiro válido na classificação genérica estipulada por Linnaeus. Porém, Nuttall (1818) transferiu *Actaea racemosa* L., para o gênero *Cimicifuga* como *Cimicifuga racemosa* (L.) Nutt., mudando assim a circunscrição genérica de Linnaeus. Posteriormente, autores consideraram que os caracteres morfológicos não são tão determinantes a ponto de diferenciar em gêneros diferentes, juntando em um único gênero com várias sessões (*Actaea*, *Souliea* e *Cimicifuga*). Na nova organização dos táxons e baseado em evidências genéticas, passou-se a chamar *Actaea racemosa*, e *Cimicifuga racemosa* passou a ser sinônimo e basinônimo da espécie (COMPTON; CULHAM; JURY, 1998). Assim, para esse estudo, e tendo em vista a nomenclatura padronizada no medicamento Aplause®, será utilizado, na maior parte do texto, o termo *Actaea racemosa* (L.) ou apenas *A. racemosa*.

A *Actaea racemosa* (L.) é uma planta herbácea da família Ranunculaceae, originária do Canadá e Estados Unidos (Nomenclatura botânica: *Actaea racemosa*. Basinônimo: *Cimicifuga racemosa*. Nome popular: Cimicifuga, Black cohosh) (BORRELLI e ERNST, 2008) (Figura 7). É muito utilizada na medicina popular para aliviar dor e inflamação, para o tratamento de cólicas menstruais e, principalmente, nos sintomas e sinais da menopausa (BOLLE et al., 2007), mas também há registros sobre sua utilização para alívio de dores reumáticas, tosse e resfriados (FOSTER, 1999). A parte da planta de maior interesse farmacológico são as raízes e rizomas (Figura 7, C).

Figura 7: Imagens representativas da *Actaea racemosa* (L.). A: visão geral da planta mostrando folhagem e inflorescências. B: inflorescência. C: raízes e rizomas, parte de maior interesse farmacológico.



Fonte: stevenfoster.com.

Em relação às suas propriedades, estudos demonstram que a *A. racemosa* pode aliviar os sintomas da menopausa, de doenças cardiovasculares, osteoporose, processos alérgicos e até mesmo depressão (MCKENNA et al., 2001; MORELLI; NAQUIN, 2002; KIM et al., 2004). Além disso, através de um estudo randomizado com mulheres saudáveis que estavam na pós-menopausa, constatou-se que o uso diário de *A. racemosa* por 28 dias influenciou benéficamente a função endotelial, promovendo elasticidade vascular (FERNANDES et al., 2020). As pacientes receberam extrato seco correspondente a 160 mg de *A. racemosa* (extrato com 4 mg de glicosídeos triterpênicos) ou placebo.

O extrato de *A. racemosa* em diferentes doses (4, 40 e 400 mg/kg) foi avaliado em ratas ovariectomizadas por 2 semanas quanto aos potenciais mecanismos de ação no alívio das ondas de calor da menopausa, com ou sem E2, para determinar se o apresentaria o efeito estrogênico. Apesar de não ter interferido no volume uterino e na cornificação celular vaginal, os dados demonstraram que o extrato atua como um ligante competitivo e agonista parcial do receptor de serotonina, indicando sua atividade serotoninérgica para o alívio das ondas de calor e ainda atividade estrogênica (BURDETTE et al., 2003). No entanto, estudos com mulheres na peri e pós menopausa não encontraram atividade estrogênica do extrato (40 e/ou 127.3 mg/dia) após tratamento por 24 semanas por meio da análise de marcadores séricos de E2 (RUHLEN; SUN; SAUTER, 2008) apesar de concluírem que existe a relação da *A. racemosa* à melhora dos

efeitos da menopausa pelo Índice de Menopausa de Kupperman, testes hematológicos e bioquímicos (LISKE et al., 2002).

A menopausa pode ser um período angustiante para muitas mulheres, com muitas delas tendo ondas de calor, suores noturnos, atrofia vaginal e secura oral. Estudos mostraram que a *A. racemosa* (60 mg/kg) foi capaz de proteger as glândulas sublinguais de ratas ovariectomizadas, aliviando a secura oral, de forma semelhante ao E2, mas ambas as substâncias agindo por mecanismos diferentes (LIU et al., 2018). Tanto o E2 quanto o extrato inibiram o dano estrutural subcelular e a expressão da CASP3 causada pela ovariectomia. Estudos envolvendo camundongos mostraram que quando tratados com o extrato de *A. racemosa* foi possível observar uma redução significativa da ingestão de água e uma normalização da resposta de glicose e insulina, assim conseguiu melhorar o controle metabólico via sensibilidade do receptor de insulina (MOSER et al., 2014). Além disso, a *A. racemosa* melhorou doenças metabólicas em ratas ovariectomizadas após tratamento de longo prazo também envolvendo resistência à insulina e intolerância à glicose (SUN et al., 2016). Assim, as evidências comprovam que o extrato da planta é capaz de diminuir a secura oral durante a menopausa e melhorar desordens metabólicas. Um estudo recente, randomizado, duplo-cego e controlado por placebo com 220 mulheres com queixas da menopausa, avaliou a combinação do extrato de *A. racemosa* e *Rhodiola rósea* (raiz de ouro) comparada com uma dose eficaz de extrato de *A. racemosa* (6,5 mg) durante 12 semanas (PKHALADZE et al., 2020). O alívio nos efeitos da menopausa foi superior quando ambos os extratos foram combinados, particularmente em parâmetros psicológicos e emocionais. Dessa forma, destaca-se a efetividade da utilização de fitomedicamentos, sozinhos ou combinados.

Os mecanismos de ação de *A. racemosa* são controversos e inconclusivos, uma vez que seu extrato bruto possui uma grande quantidade de compostos com atividades diferentes (GUO et al., 2017). Dessa maneira, a base molecular do seu mecanismo de ação deve ser vista de uma perspectiva mais ampla, pois são muitas as diferentes substâncias que a compõem. Assim, supõe-se que as ações terapêuticas atribuídas a esta planta advêm da interação sinérgica entre compostos, mas ainda há necessidade de produção científica que aborde dados que comprovem os mecanismos de ação dos constituintes do extrato de *A. racemosa*.

A Tabela 1 mostra alguns dos compostos que podem ser isolados a partir de *A. racemosa*, bem como seus potenciais terapêuticos baseados em outros estudos.

Tabela 1.

Alguns compostos farmacologicamente ativos encontrados no gênero *Actaea* e/ou *Cimicifuga* e seus efeitos terapêuticos.

| Composto | Planta | Efeito terapêutico | Ação | Estudo |
|------------------------|--|---|---|--|
| 23-epi-26-deoxiacteína | <i>C. racemosa</i> | Atividade antidiabética Proliferação celular. Efeito antiestresse. | ↓Peso corporal. ↓Glicose plasmática. ↑Metabolismo da glicose. ↑Sensibilidade a insulina. Promoveu biogênese mitocondrial. ↑Ativação de PI3K/Akt e CREB. ↓Corticosterona e aspartato aminotransferase | Moser et al., 2014; Suh et al., 2017; Yuan et al., 2020; Choi, 2013; Nadaoka et al., 2012. |
| 26-deoxiacteína | <i>C. racemosa</i> | Efeito antiproliferativo em células de câncer de mama | Suprime a fase G1 do ciclo celular, induzindo alterações nas proteínas reguladoras (ciclina D1, cdk4 e p21). | Hostanska et al., 2004; |
| Ácido cafeico | <i>C. racemosa</i> | Ação antioxidante | Regulação da expressão gênica, quelação e/ou redução de metais de transição, formação de adutos covalentes. ↓ERO. | Damasceno et al., 2017; Burdette et al., 2002. |
| Ácido fucínico | <i>Cimicifuga</i> sp. | Atividade vasodilatadora | Inibição do influxo de Ca ²⁺ mediado pela abertura dos canais de potássio. | Noguchi et al., 1998. |
| Ácido isoferúlico | <i>C. dahurica</i> <i>C. racemosa</i> | Efeito antiproliferativo em células de câncer de mama. Ação antiinflamatória. Ação antioxidante. | Possivelmente envolvido na expressão de Ciclina D1 e c-Myc e/ou parada da transição do ciclo celular na fase G0/G1. ↓IL-6, TNF- α e IFN-gama. Regulação da expressão gênica, quelação e/ou redução de metais de transição, formação de adutos covalentes. | Huyen et al., 2018; Schmid et al., 2009; Damasceno et al., 2017. |
| Acteína | <i>Cimicifuga</i> sp. | Pode inibir o crescimento e migração de células cancerígenas. Ação na osteoporose. Efeito antiestresse. | Vias JNK/ERK reduziram as proteínas angiogênicas (CD34 e Fator VIII); Crescimento e diferenciação de osteoblastos. Produção de osteocalcina, conteúdo de colágeno e mineralização em células osteoblásticas MC3T3-E1. ↑Sistema tiorredoxina (Trx) (PI3K/Akt/CREB) ↓Corticosterona e aspartato aminotransferase | Yue et al., 2016; Hostanska et al., 2004; Lee; Choi, 2014; Nadaoka et al., 2012. |

| | | | | |
|-------------------------|-----------------------|--|---|---|
| Cimiracemato A | <i>Cimicifuga</i> sp. | Ação antioxidante | ↓TNF- α . ↓Modulação das atividades de uma proteína quinase ativada por mitógeno de sinalização e do fator de transcrição NF- κ B. | Yang et al., 2009. |
| Cimiracemossídio | <i>C. racemosa</i> | Efeito antiproliferativo em células de câncer de mama. | Suprime a fase G1 do ciclo celular, induzindo alterações nas proteínas reguladoras (ciclina D1, cdk4 e p21). | Hostanska et al., 2004; Nadaoka et al., 2012. |
| | | Efeito antiestresse | ↓Corticosterona e aspartato aminotransferase | |
| Formononetina | <i>Cimicifuga</i> sp. | Ação antiinflamatória, antiapoptótica, antioxidante e antiproliferativa em células cancerígenas. | ↓Cálcio intracelular. Supressão da ativação do NF- κ B e inibição da atividade da caspase-1. ↓Relação Bax/Bcl-2. ↓Caspase-3. | Xu; An, 2017; Wang et al., 2012b; Ong et al., 2019. |
| N-metilcitisina | <i>Cimicifuga</i> sp. | Ação antiinflamatória | ↓Atividade da mieloperoxidase. ↓Citocinas pró-inflamatórias. Bloqueou a ativação do fator nuclear (NF- κ B) pela inibição e fosforilação da I κ B quinase (IKK). | Jiao et al., 2018. |
| N(ômega)metilserotonina | <i>C. racemosa</i> | Ação serotoninérgica. | Possível ligante competitivo do receptor de serotonina, mostrando indução da síntese de cAMP e inibição seletiva da recaptação de serotonina. | Powell et al., 2008; Gödecke et al., 2009. |
| | <i>Cimicifuga</i> sp. | Termorregulação | . | |

Fonte: Elaborada pelo autor.

Estudos fitoquímicos revelaram que certos compostos de *A. racemosa* se destacam, incluindo glicosídeos triterpenos, constituintes fenólicos e isoflavonas (CAMPOS et al., 2012). A farmacocinética de 23-epi-26-desoxiacteína, um dos glicosídeos triterpênicos mais abundantes no extrato de *A. racemosa*, foi determinado em mulheres em uma janela de tempo de 24h, atingindo um pico de concentração máxima 2h após a administração do extrato em diferentes doses (1.4, 2.8 e 5.6mg do composto) (VAN BEEMEN et al., 2010). Neste estudo, nenhuma toxicidade aguda foi observada. Estudos *in vitro* mostraram que o 23-epi-26-desoxiacteína promoveu a biogênese mitocondrial em células β -pancreáticas, prevenindo danos celulares oxidativos induzidos por metilglioxal (espécie reativa de dicarbonil, relacionada a complicações diabéticas) (SUH et al., 2017) e protegeu os osteoblastos contra danos celulares induzidos por antimicina A (um inibidor do transporte de elétrons mitocondrial), além de

aumentar a ativação de PI3K/Akt e CREB (proteína de ligação de resposta ao AMPc) inibidas pela antimicina A (CHOI, 2013). Outro estudo mais recente em camundongos machos determinou que o 23-epi-26-desoxiacteína (5 mg/kg/d por 12 semanas) melhora a obesidade induzida por dieta, sugerindo ser um composto natural para o tratamento da obesidade e doenças metabólicas relacionadas (YUAN et al., 2020). Em modelos experimentais de estresse e úlcera gástrica em camundongos e ratos, autores descobriram os efeitos positivos de *A. racemosa* (NADAOKA et al., 2012). Uma única administração oral em camundongos, atenuou significativamente os níveis plasmáticos de corticosterona e aspartato aminotransferase (o estresse causa aumento nos níveis plasmáticos desse hormônio e enzima, respectivamente); além de prevenir o desenvolvimento de úlceras da mucosa gástrica de ratos, independente da dose de extrato utilizada (200, 500 e 1000 mg/kg). Nesse estudo, isolaram-se 10 triterpenos, entre os quais acteína, 23-epi-26-desoxiacteína e cimiracemosídeo demonstraram contribuir para os efeitos antiestresse. Também foi demonstrado que o extrato da *A. racemosa* (3 e 6 µg/mL), em particular o ácido isoferúlico que pode ser encontrado dentre os componentes do extrato, inibiram a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α) no sangue de voluntários após estimulação inflamatória (SCHMID et al., 2009). Além disso, estudos *in vitro* com células neurais e hepáticas cultivadas na presença do extrato de *A. racemosa*, houve preservação da integridade mitocondrial e dos níveis de ATP e impediu a formação de ERO e morte celular (RABENAU et al., 2019; OLIVEIRA et al. 2013).

Considerando que *A. racemosa* é um fitomedicamento que já está no mercado com indicação para alívio dos sinais da menopausa, a possibilidade de uma nova abordagem terapêutica poderá determinar uma considerável redução no tempo necessário para o desenvolvimento de novos medicamentos. Nesse sentido, a *A. racemosa* demonstrou possuir efeito protetor na periodontite através da inibição de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α), além de representar uma opção terapêutica segura no ensaio pré-clínico de periodontite em ratas (OLIVEIRA, 2013). Além disso, estudos clínicos têm sido conduzidos com administração de fitoterápicos, incluindo a *A. racemosa*, em mulheres em tratamento de câncer e os coloca como uma opção terapêutica não hormonal segura para sobreviventes dessa doença (RUAN et al., 2019). Um estudo clínico testando os efeitos da *A. racemosa* na síndrome da menopausa causada por análogo do hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH-a) no câncer de mama, indicou que o grupo que recebeu LHRH-a associado a *A. racemosa* teve um índice menor de menopausa em relação ao grupo que recebeu apenas o LHRH-a, no entanto não houve diferença entre os grupos em relação aos níveis hormonais e outras complicações ginecológicas

(WANG et al., 2019b). Ademais, um estudo *in vitro* e *in vivo* identificou atividade antitumoral sinérgica entre *Cimicifuga dahurica*, outra espécie do mesmo gênero, em combinação com a cisplatina. Houve aumento da expressão de marcadores apoptóticos e redução do volume tumoral em ratos (ZHANG et al., 2016) e inibiu o crescimento *in vitro* de células de câncer de mama (EINBOND et al., 2004). No mesmo sentido, o 23-epi-26-desoxiacteína e cimigenol isolados de *Cimicifuga yunnanensis* reduziram o crescimento tumoral em modelo de tumor subcutâneo em camundongos fêmeas ou modelo de metástase hepática de câncer de mama *in vitro* (LI et al., 2018). Isto indica que espécies do gênero *Cimicifuga* ou *Actaea* podem não só possuir mecanismos protetivos, mas também ação antitumoral em alguns casos. Porém, os mecanismos controladores dos seus potenciais protetores e antitumorais ainda não estão elucidados.

É importante enfatizar o potencial tóxico de muitos desses produtos na fisiologia reprodutiva. As pesquisas farmacológicas demonstram que os extratos brutos e compostos puros obtidos de *A. racemosa* apresentam efeitos benéficos no tratamento da síndrome da menopausa, anti-osteoporose, antivirais, antitumorais, antioxidantes e antiangiogênicos (GUO et al., 2017). Por outro lado, toxicidade induzida sobre o fígado, coração e sistema nervoso central e periférico foram relatados. Em geral, há uma baixa frequência de reações adversas, mas tontura, náusea, cefaleia, vômito e reações alérgicas foram relatadas e estão descritas na bula do medicamento. Apesar dos resultados promissores, evidências sugerem que haja um mecanismo de ação aneugênico, induzindo segregação cromossômica anormal, promovido pelo extrato de *A. racemosa* em diferentes concentrações *in vitro* (BERNACKI et al., 2019). Além disso, causou alterações hematológicas e bioquímicas em camundongos fêmeas em tratamento crônico de 92 dias com o extrato em alta dosagem (1000 mg/kg) (CORA et al., 2017) e hepatotoxicidade (ENBOM et al., 2014). Dessa forma, é importante a investigação acerca da segurança do uso deste medicamento sobre a fertilidade feminina quando administrado no período reprodutivo, pois isso coloca em questão discussões acerca da segurança e toxicidade da utilização de extratos vegetais na saúde. Portanto, é importante a investigação que visem entender o perfil farmacológico de plantas medicinais, o que só vem a endossar a necessidade de estudos que fundamentem cientificamente essa prática, a fim de minimizar ao máximo possíveis danos ao ovário.

Há poucas pesquisas testando a ação do extrato de *A. racemosa* sobre a saúde reprodutiva de fêmeas, porém estudos recentes têm investigado seu papel nas terapias hormonais alternativas. Medicamentos complementares e/ou alternativos estão sendo

procurados para superar as deficiências das terapias hormonais e cirúrgicas convencionais desenvolvidas para o tratamento da síndrome do ovário policístico (SOP) e/ou endometriose. Foram investigados os efeitos, segurança e alvos do extrato de *A. racemosa* (7,14 mg/kg) associado ou não a vitamina C em ratas induzidas a SOP por hiperandrogenismo e tratadas por 28 dias (AZOUZ et al., 2021). Efeitos benéficos foram exercidos pela *A. racemosa* no status antioxidante, perfil hormonal, perfil lipídico, nível de glicose, funções hepáticas e a expressão de Ki-67 (um marcador de proliferação celular) nas células da granulosa, células da teca e células estromais. Notavelmente, a combinação de *A. racemosa* com vitamina C foi mais eficaz na reversão dos níveis desregulados de testosterona, LH e expressão positiva do gene da aromatase (Cyp19 α 1), enzima chave na biossíntese de esteroides. A combinação regulou os níveis ovarianos e hepáticos de malondialdeído (MDA) e GSH com melhora histológica observada no fígado e nos ovários. Além disso, o efeito do extrato da *A. racemosa* (60 mg/kg) foi avaliado por 28 dias em ratas induzidas a perimenopausa com GnRH-a (agonista do hormônio liberador de gonadotropina), um inibidor de estrogênio (CHEN et al., 2021). A deficiência de estrogênio também é capaz de acarretar outros distúrbios reprodutivos, como a endometriose que é uma doença dependente desse hormônio; porém o uso prolongado de hormônios para o tratamento pode causar a recorrência da doença bem como danos à função hepática, embolia venosa e câncer de mama. Assim, nesse estudo, a intervenção com a *A. racemosa* aliviou os sintomas da perimenopausa induzida, diminuindo a necessidade do tratamento hormonal convencional.

Apesar das evidências promissoras, há pouca investigação acerca da ação do extrato de *A. racemosa* levando em consideração suas potenciais características protetivas sobre o sistema reprodutivo frente aos tratamentos quimioterápicos para o câncer. Um estudo *in vitro* recente utilizando ovários de camundongos mostrou que o extrato de *A. racemosa* (5 ng/mL) adicionada ao meio de cultivo foi capaz de proteger o tecido ovariano dos efeitos negativos da DOX, diminuindo a atresia folicular e auxiliando na manutenção da densidade celular do estroma ovariano (DE ASSIS et al., 2022). Nesse estudo, houve elevação da expressão de enzimas antioxidantes, como SOD e CAT, além da diminuição da expressão de CASP3 na presença do extrato, indicando diminuição da apoptose. Porém, até o momento, não há estudos testando os efeitos desse extrato *A. racemosa* em experimentações *in vivo* utilizando modelo de quimioterapia induzida em camundongos.

Nesse sentido, e considerando a consolidação do extrato de *A. racemosa* como fármaco alternativo e natural no tratamento de sintomas da menopausa bem como a importância do

estudo de redirecionamento de fármacos, é de grande importância avaliar o efeito do extrato na prevenção dos efeitos adversos do uso de antineoplásicos, como a DOX, em modelo murino *in vivo*, bem como os efeitos do seu uso durante o período reprodutivo.

2.6 Murinos como modelo na experimentação animal

A experimentação animal possui uma grande importância e contribuição nos diferentes campos científicos, e vem promovendo ao longo dos anos a descoberta de medidas profiláticas e tratamentos de inúmeras enfermidades que acometem os seres vivos (CHORILLI et al., 2007). Além disso, a experimentação animal nos fornece novos conhecimentos em áreas biológicas, médicas e veterinárias. Para que estes conhecimentos sejam válidos, é necessário que a espécie animal utilizada seja capaz de fornecer a resposta adequada ao que nela será testado (GOMES; BRAGA, 2017).

Animais de diferentes espécies têm sido utilizados no desenvolvimento científico em diferentes protocolos para a compreensão de aspectos relacionados a fisiologia reprodutiva (SUN; LI, 2013; FAUSTINO et al. 2013; BERTOLDO et al. 2014). Contudo, os murinos se destacam e são os mais utilizados na experimentação científica de fase pré-clínica (BAUMANS, 2005). Sua introdução como animais de laboratório se dá principalmente por serem pequenos, muito prolíferos, ter um período de gestação curto, ser de fácil domesticação, fácil manutenção e manipulação. Diante disso, os murinos tornaram-se os mamíferos mais usados na experimentação animal (CHORILLI et al., 2007). Alguns estudos investigam os efeitos de determinadas substâncias na fertilidade, desenvolvimento embrionário e fetal, e desenvolvimento pré/pós-natal utilizando ratos, camundongos e coelhos (ROCCA; WEHNER, 2009). A escolha da espécie animal obedece a alguns parâmetros, destacando-se a idade, o peso, a fertilidade, a prevalência de anormalidades e a consistência que os resultados oferecem quando extrapolados para o ser humano. Mediante estes parâmetros, pode ser eleito o modelo mais relevante atendendo às especificações (STUMP et al., 2013). Camundongos tem sido usado extensivamente como modelos em pesquisas pré-clínicas para o desenvolvimento humano, incluindo estudos em reprodução. As semelhanças nos processos de desenvolvimento, genética e fisiologia fornecem ampla justificativa para a relevância dos modelos de camundongo (CUNHA et al., 2019).

Através de estudos, é possível verificar os efeitos tóxicos decorrentes da administração de substâncias, sendo de suma importância o conhecimento acerca dos efeitos do uso de medicamentos, sejam deletérios ou protetivos. Em mulheres, avalia-se os efeitos no ciclo menstrual e na morfologia folicular, registrando alterações morfológicas, corporais, comportamentais e ciclicidade (OSHIO, 2009). Assim, a investigação utilizando modelos animais para compreensão de processos biológicos como a apoptose e o estresse oxidativo, além dos mecanismos de ação que envolvem o desenvolvimento folicular, representam um importante caminho para que possamos intervir em situações de patogenicidades e possíveis tratamentos.

Doenças que envolvem a fisiologia reprodutiva como a SOP e FOP são investigadas através de modelos murinos (FABREGUES et al., 2021). Além disso, estudos recentes têm mostrado o uso do modelo com camundongos na compreensão de processos relacionados a fisiologia reprodutiva em relação a ativação de folículos ovarianos e desenvolvimento folicular em abordagens experimentais com toxicidade ovariana induzida por quimioterápicos (DE ASSIS et al., 2022; GOUVEIA et al., 2021; LINS et al., 2020).

3 JUSTIFICATIVA

Os avanços no diagnóstico e tratamentos do câncer aumentaram a sobrevida de pacientes. Contudo, os tratamentos causam danos ao sistema reprodutor, podendo levar à falência ovariana e infertilidade (SPEARS et al., 2019). Os conhecimentos acerca dos efeitos gonadotóxicos são importantes na fisiologia reprodutiva, pois a reserva ovariana é limitada e diminui ao logo da vida (GRIFFITHS; WINSHIP; HUTT et al., 2020). Nesse sentido, a doxorubicina (DOX), um antineoplásico utilizado na prática clínica para o tratamento de diferentes tipos de câncer, apresenta efeitos negativos sobre a fertilidade feminina, levando à morte celular por apoptose e afetando aspectos relacionados a saúde reprodutiva (KHALLAF; ROSHDY; IBRAHIM, 2020). Assim, considerando os efeitos da DOX sobre o ovário, é importante a investigação acerca de substâncias que tenham potencial efeito protetor contra os danos causados por esse antineoplásico.

Considerando o extrato de *A. racemosa* como fármaco natural no tratamento dos sinais e sintomas da menopausa (BOLLE et al., 2007), bem como a importância do estudo de redirecionamento de fármacos, é necessário investigar a sua possibilidade em amenizar os efeitos da DOX sobre a função ovariana. Além disso, há poucas pesquisas testando a ação desse extrato sobre a saúde reprodutiva de fêmeas e sobre a fisiologia reprodutiva de fêmeas em idade reprodutiva; além de registros relacionados aos seus potenciais características protetivas sobre o ovário frente aos tratamentos quimioterápicos para o câncer. Resultados promissores no cultivo *in vitro* de ovários de camundongos expostos a DOX com o uso da *A. racemosa* foram relatados. Nesse estudo, o extrato de *A. racemosa* (5 ng/mL) adicionada ao meio de cultivo foi capaz de proteger o tecido ovariano dos efeitos da DOX, diminuindo a atresia folicular e auxiliando na manutenção da densidade celular do estroma por meio do aumento da expressão de enzimas antioxidantes e marcadores apoptóticos (DE ASSIS et al., 2022). Porém, até o momento, não há estudos testando os efeitos do extrato de *A. racemosa* em experimentações *in vivo* utilizando modelo de quimioterapia induzida em camundongos.

O estudo da possível capacidade da *A. racemosa* em reduzir os efeitos adversos causados pela DOX em ovários de camundongos poderá contribuir para a identificação de uma nova abordagem terapêutica para a fertilidade feminina, desempenhando um papel biotecnológico de um novo produto/processo de aplicação na oncofertilidade. Além disso, o uso da *A. racemosa* pode contribuir para incrementar as taxas de ativação, crescimento e sobrevivência folicular, diminuindo assim as chances de falência ovariana prematura.

4 HIPÓTESES

Diante do exposto, foram formuladas as seguintes hipóteses científicas:

- O tratamento com extrato de *Actaea racemosa* (L.) promove o crescimento e sobrevivência de folículos ovarianos, mantém a morfologia adequada das células foliculares e do estroma e não possui toxicidade sobre o crescimento folicular em camundongos fêmeas *in vivo*.
- O extrato de *Actaea racemosa* (L.) apresenta efeito antiapoptótico e protetivo sobre o modelo de toxicidade reprodutiva induzida pela doxorrubicina no tecido ovariano de camundongos fêmeas *in vivo*.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Investigar a influência de diferentes doses de *A. racemosa* (0.5, 5 e 50 mg/kg) sobre o crescimento e sobrevivência de folículos ovarianos de camundongos fêmeas e seu possível efeito protetor frente a toxicidade ovariana induzida pela doxorrubicina (10 mg/kg) sobre o ovário utilizando um modelo *in vivo*.

5.2 Objetivos específicos

- Avaliar um possível efeito dose-dependente da *Actaea racemosa* (L.) (0.5, 5 e 50 mg/kg) no crescimento e sobrevivência *in vivo* de folículos ovarianos de camundongos fêmeas e seus efeitos sobre o tecido ovariano.
- Avaliar a influência da *Actaea racemosa* (L.) sobre a toxicidade induzida por doxorrubicina (10 mg/kg) nos ovários de camundongos fêmeas após 10 dias de tratamento, analisando os seguintes parâmetros:
 - *Morfologia folicular (sobrevivência) por histologia clássica.*
 - *Crescimento folicular por histologia clássica.*
 - *Configuração da matriz extracelular (MEC) através dos níveis de colágeno.*
 - *Densidade das células do estroma ovariano por histologia clássica.*
 - *Expressão de TNF- α por imuno-histoquímica no tecido ovariano.*
 - *Integridade ultraestrutural de folículos ovarianos por microscopia eletrônica de transmissão.*

6 CAPÍTULO 1

**Protective effect of *Actaea racemosa* (L.) on mice ovarian induced toxicity by
doxorubicin chemotherapy**

Protective effect of *Actaea racemosa* (L.) on mice ovarian induced toxicity by doxorubicin chemotherapy

Lima Neto, M.F.^{a,b}; Assis, E.I.T.^{a,b}; Azevedo, V.A.N.^{a,b}; Paulino, L.R.F.M.^{a,b}; Donato, M.A.M.^c; Peixoto, C.A.^c; Monte, A.P.O.^d; Matos, M.H.T.^d; Godinho, A.N.^b; Freire, J.M.O.^b; Batista, A.L.P.S.^{a,b}; Barberino, R.S.^d; Silva, J.R.V.^{a,b}; Silva, A.W.B.^{a,b*}

^a *Laboratory of Biotechnology and Physiology of Reproduction -LABIREP - Nucleus of Biotechnology of Sobral – NUBIS, Federal University of Ceara, Sobral, CE, Brazil.*

^b *Nucleus of Research in Animal Experimentation – NUPEX, Federal University of Ceara, Sobral, CE, Brazil.*

^c *Laboratory of Ultrastructure, CNPqAM/FIOCRUZ, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil*

^d *Nucleus of Biotechnology Applied to Ovarian Follicle Development, Federal University of São Francisco Valley, Petrolina-PE, Brazil*

**Corresponding address (A.W.B., Silva): Nucleus of Biotechnology of Sobral - NUBIS, Federal University of Ceara, Av. Comandante Maurocélvio Rocha Ponte 100, CEP 62041-040, Sobral, CE, Brazil. Phone / Fax: +55 88 36954744 [andersonweiny@sobral.ufc.br]*

*This manuscript will be submit to **Toxicology Reports** – this journal is interested in all aspects of toxicological research about influence of diseases in humans and animals on chemically induced toxicity, and toxicity of natural products and traditional medicines.*

A3 stratum for CAPES / Impact factor: 4.81

Abstract

This study aimed to investigate the potential of *A. racemosa* (AR) to reducing ovarian damage caused by doxorubicin *in vivo*. In experiment 1, the effects of AR extract (0.5, 5 and 50 mg/kg body weight, p.o.) on the growth and survival of ovarian follicles of female mice treated for 10 days was evaluated. In experiment 2, the protective action of AR (0.5 and 5 mg/kg body weight) was evaluated in ovaries of mice that underwent doxorubicin chemotherapy (10 mg/kg of body weight). For this end, mice were pre-treated with saline solution (control, 0.15 M, p.o.) or with AR (0.5 or 5 mg/kg body weight, p.o.) and received saline solution (control, 0.15 M, i.p.) or doxorubicin (10 mg/kg body weight, i.p.) and were treated with saline (control, 0.15 M, i.p.) or AR (0.5 or 5 mg/kg body weight, p.o.) once daily for 10 days. Next, the ovaries were collected and destined to histological analysis (follicular morphology and development, stromal cell density and collagen fibers), immunohistochemical and ultrastructural analysis. The data obtained suggest that the AR (0.5, 5 e 50 mg/kg), under these experimental conditions, does not have toxic effects on ovarian follicles or on ovarian tissue in mice and contributes to increasing follicular growth and survival rates *in vivo*. Moreover, when administered associated with DOX, it was able to decrease follicular atresia and apoptosis in ovarian stromal cells. AR (0.5 mg/kg) was also able to maintain the ultrastructure of granulosa cells and oocytes from preantral ovarian follicles and decrease immunostaining for the pro-inflammatory cytokine TNF- α . In conclusion, treatment with AR has the potential to increase follicular growth and survival rates and protect the ovarian follicles and stromal cells against doxorubicin-induced toxicity.

1 Introduction

Advances in early detection of cancer and therapeutic schemes have offered patients greater chances of cure and survival. However, the side effects of treatments have consequences in several fields, inducing gonadal toxicity and loss of ovarian function (YEO et al. 2020; BELLVER; DONNEZ, 2019). One of the main antineoplastic agents used in clinical practice is doxorubicin (DOX), an antitumor antibiotic of the anthracycline class and is prescribed, alone or combined, for the treatment of different cancers. Its role in cells is mainly by interfering with the synthesis and functioning of nucleic acids. In DNA, DOX intercalates and causes double strand breaks, interfering with the replication and transcription processes and/or interrupting the repair action mediated by topoisomerase-II (TOP-II) (MOBARAKI et al., 2017), which triggers generative processes for cell apoptosis. Damage to ovarian tissue involves decreased

of ovarian reserve due to increased follicular atresia, oxidative damage, damage to ovarian stroma cells and increased apoptosis (WANG et al., 2019; NIRINGIYUMUKIZA et al., 2019; SOLEIMANI et al., 2011). In this sense, oncofertility is in constant progress and evolves to develop new fertility preservation options (LOPATEGUI; YECHIELI; RAMASAMY, 2017).

The importance of developing alternative treatments through substances capable of protecting the ovary from the effects of chemotherapy arises, and phytochemicals have been targets with the purpose of identifying a possible chemoprotective action. *Actaea racemosa* (L.) (botanical nomenclature: *Actaea racemosa*. Basionym: *Cimicifuga racemosa*. Common name: Cimicifuga, Black cohosh) (AR) is a herbaceous plant of Ranunculaceae family. The roots and rhizomes are the parts of greatest pharmacological interest, in which hundreds of chemical constituents have already been identified, including isoflavones, phenolic constituents, alkaloids, tannins and triterpene glycosides (CAMPOS et al., 2012). It has traditionally been used to relieve pain and inflammation, cardiovascular disease, osteoporosis, for the treatment of menstrual cramps, and especially for the symptoms and signs of menopause (MORELLI; NAQUIN, 2002; KIM et al., 2004). In addition, AR has already been shown to have antioxidant, anti-inflammatory, antidiabetic, vasodilator and immunosuppressive effects (GUO et al., 2017). Studies with postmenopausal women found that the daily use of AR has beneficial effects on the menopause symptoms (RUHLEN et al., 2008; LISKE et al., 2002) and to beneficially influencing endothelial function (FERNANDES et al., 2020). *In vitro* study with neural and liver cells, AR extract preserved mitochondrial integrity and ATP levels and prevented reactive oxygen species (ROS) formation and cell death by apoptosis (RABENAU et al., 2019) and, more recently, was able to protect the ovarian tissue from DOX *in vitro*, decreasing follicular atresia and helping to maintain the cell density of the ovarian stroma by decreasing the expression of Caspase 3 (CASP3), indicating a decrease in apoptosis (DE ASSIS et al., 2022). *In vivo* studies showed that AR was able to improving the antioxidant status, hormone and lipid profile, glucose levels and liver functions in rats with polycystic ovary syndrome (PCOS), inducing the Ki-67 expression in granulosa, theca and stromal cells. Ki67 expression is an indicator of cell proliferation and its increase is indicative of high androgen production in the ovaries (AZOUZ et al., 2021). In this sense, the AR extract may be able to reduce ovarian damage caused by DOX through its therapeutic action, mainly preventing cell apoptosis. However, there are no reports on the potential of AR to protect the ovaries against damage caused by DOX in ovaries of mice treated *in vivo*.

The aim of this study was to investigate the effects of different doses of AR extract in ovarian tissue of female mice treated *in vivo* and to evaluate whether the AR extract prevents and protects the ovary against damage caused by DOX. Furthermore, the effects of this extract on follicular morphology and development, maintenance of ovarian stromal cell density and extracellular matrix configuration were evaluated.

2 Material and methods

2.1 Animals

This study was conducted in accordance with the guidelines and normative resolutions of the National Council for Control in Animal Experimentation (CONCEA) and the ethical guidelines from Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of Federal University of Ceara (approved under protocol N°. 01/21). Adult Swiss female mice (*Mus musculus*) (n = 66) were used in this research, which were kept in polyethylene boxes lined with wood shavings, with free access to filtered water and feed (Nuvilab®). The animals were kept at an average temperature of 22 ± 2 °C, following 12h light-dark cycles.

2.2 Evaluation of estrous cycle

All female mice from 18g and/or 2 months of age, had their estrous cycle evaluated once a day, for 10 days, between 8:00h and 9:00h a.m., by a single evaluator, as established by Marcondes; Bianchi; Tanno (2002). Briefly, the vaginal smear is collected with pipettes filled with saline solution (10 µL, NaCl 0.5 M) and placed on histological slides and read under a light microscope (Nikon, Eclipse, TS 100, Japão). According to the observed cells, it was determined whether the female was in proestrus, estrus, metestrus or diestrus. Only females with a regular cycle, that is lasting 4 to 5 days, were used to carry out the experiments in which they had their cycle continuously evaluated.

2.3 Chemicals

The drugs are available in the pharmaceutical form of Doxorubicin (Libbs, Fauldoxo®, doxorubicin hydrochloride, injectable solution, 2 mg/mL) and *Actaea racemosa* (L.) (Marjan Farma, Aplause®, *Actaea racemosa*, 20 mg of dry extract in a standardized 5% to 7% tablet,

equivalent to 1mg to 1.4 mg of triterpene glycosides expressed as 23-epi-26-deoxyactein). The working doses of *A. racemosa* were prepared by macerating the tablets and diluting them in commercial saline solution in the proportion of 1 tablet to 5 mL (concentration 4mg/mL). The DOX dosage were obtained directly from the medication ampoule.

2.4 Experimental design

In order to find a dose-response curve, in Experiment 1 the effects of different doses of *A. racemosa* (0.5, 5 and 50 mg/kg) on the activation, growth and survival of ovarian follicles in female mice were evaluated. The animals (n = 24) were randomly divided into 4 different experimental groups: control group, receiving saline solution (NaCl 0.15 M) and the others 3 groups received *A. racemosa* in 3 different doses (0.5, 5 and 50 mg/kg). AR was administered orally once a day for 10 days. In the 11-day period, the animals were euthanized and the ovaries collected for histological analysis.

For Experiment 2, the effects of the best doses of *A. racemosa* obtained with Experiment 1 on ovarian toxicity induced by doxorubicin in female mice was evaluated. Animals (n = 42) were randomly subdivided into 6 treatment groups: the control group was pre-treated orally with saline solution (NaCl, 0.15 M) and after 1h received saline solution (NaCl 0.15M, i.p); animals from group 2 were orally pretreated with saline solution (0.15 M NaCl) and 1h later received a single dose of DOX (10 mg/kg, i.p); animals from group 3 was orally pre-treated with RA (0.5 mg/kg) and, after 1 h, received saline solution (0.15 M NaCl, i.p); for group 4, the animals were orally pre-treated with AR (0.5 mg/kg) and, 1h later, they received a single dose of DOX (10 mg/kg, i.p); animals from group 5 was orally pre-treated with AR (5 mg/kg) and, after 1 h, received saline solution (0.15 M NaCl, i.p); animals from group 6 was orally pre-treated with AR (5 mg/kg) and, 1 h later, a single dose of DOX (10 mg/kg, i.p). Thus, AR was administered orally once a day for 10 days.

quantifying the follicles in the different developmental follicular classes (primordial, primary, secondary and antral).

2.6 Analysis of the extracellular matrix and density evaluation of ovarian stroma

To assess collagen fibers of the extracellular matrix of ovarian cortex, staining with Picrosirius Red (Abcam Kit) was performed following the methodology described by Vanié (2017) with modifications. Ovarian sections of 7 μm were dewaxed in xylol and incubated in Sirius Red solution (0.1%) for 1h at room temperature. Then, the excess dye will be removed with acetic acid solution (0.5%) and the sections were dehydrated and subjected to slide assembly with subsequent observation under an optical microscope (Nikon, Eclipse, TS 100, Japan) under magnification 400x. For each treatment, the percentage of the area occupied by collagen fibers in ten different fields was measured with the aid of a DS Cooled DS DS-Ri1 camera attached to a microscope (Nikon, Eclipse, TS 100, Japan), the microscope and the images were analyzed by Image J Software (Version 1.51p, 2017) with 400x magnification. Only the collagen fibers were marked in red with the picrosirius color, while the follicles remained colorless (white). The analyzer software automatically excludes the circumference of unstained follicles from the total area marked in red. The Image J Software was used to quantify the percentage of collagen fiber in uncultured and cultured tissues. The staining intensity of collagen fibers was determined by measuring the average pixel intensity of the total area imaged after background subtraction. For evaluation of cell density of ovarian stroma, the number of stromal cells was calculated in an area of 100 μm^2 in all treatments. For each treatment, five fields from different sections were evaluated. The average number of stromal cells per field was calculated as previously described (DE ASSIS et al., 2022). All evaluations and measurements were performed by a single operator.

2.7 Immunohistochemistry assay

Immunohistochemical analyses of proinflammatory cytokine (TNF- α) were carried out to measure the amount of inflammation. Section (5 μm thick) from each paraffin block were cut using a microtome, mounted in Starfrost glass slides (Knittel, Braunschweig, Germany), and taken for immunohistochemistry using procedures previously described (BARBERINO et al., 2017). The slides were incubated in citrate buffer at 95°C in a decloaking chamber (Biocare,

Concord, USA) for 40 min to retrieve antigenicity, and endogenous peroxidase activity was prevented by incubation with peroxidase blocker for 10 min. Nonspecific binding sites were blocked using 10% normal goat serum for 10 min. Subsequently, the sections were incubated in a humidified chamber for 50 min at room temperature with the antibodies anti-TNF- α . Thereafter, the sections were incubated for 20 min with EasyLink One polymer, followed by DAB staining for protein localization, and counterstaining with hematoxylin for 1 min. For reaction control (no primary antibody control), the tissues were incubated with blocking buffer, without the primary antibody included. Images were taken using a Nikon microscope with a camera. Image analysis was performed using software Motic Images® Plus 3.0 (Motic China Group Co., Ltd.), with the assessor blind to treatment. For inflammatory activity, the immunostaining of TNF- α in the ovarian tissue was subjectively classified as absent, weak, moderate, or strong (KAYEDPOOR et al., 2017).

2.8 Ultrastructural analysis by transmission electron microscopy

Ovarian were fixed overnight in a solution containing 2.5% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer. After fixation, the samples were washed twice in the same buffer and post-fixed in a solution containing 1% osmium tetroxide, 2 mM calcium chloride and 0.8% potassium ferricyanide in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2, dehydrated in acetone and embedded in Embed 812. Polymerization was performed at 60 °C for 3 days. Ultrathin sections were collected on 300-mesh nickel grids, counterstained with 5% uranyl acetate and lead citrate and examined using a FEI Morgani 268D transmission electron microscope.

2.9 Statistical analysis

The statistical analysis was performed using the software GraphPad Prism. The percentages of normal follicles, as well those of primordial and developing follicles were evaluated by chi square test. Data of collagen fibers distribution and stromal cell density were analyzed by the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's comparison. The results were expressed as mean and standard error (mean \pm S.E.M). Differences were considered significant when $p < 0.05$.

3 Results

3.1 Experiment 1: Effect of *Actaea racemosa* (L.) extract on follicular morphology, activation and development of female mice

The administration of AR at 0.5, 5 or 50 mg/kg did not influence the percentages of morphologically normal follicles, primordial and developing follicles (Figure 2 A, B and C) when compared to the untreated control group ($p < 0.05$) (Figure 2).

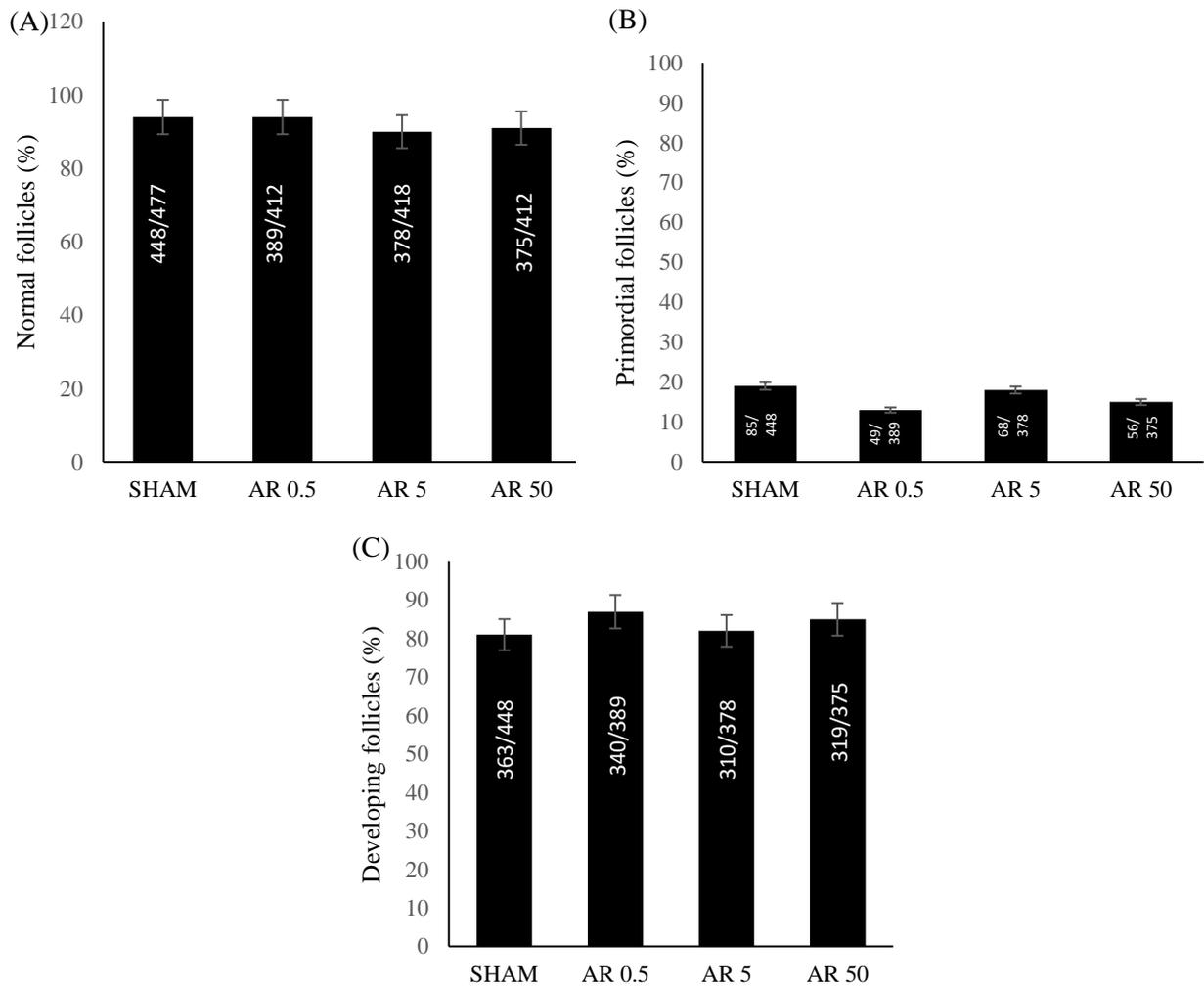


Figure 2. The percentage (mean \pm SE) of normal follicles (A), primordial follicles (B) and developing follicles (C) in mice ovaries mice treated for 10 days with AR extract at different doses (0.5, 5 or 50 mg/kg) or SHAM (untreated control group). The percentage of primordial and developing follicles was compared by chi-square test and no significant differences were observed between treatments ($p > 0.05$). Numbers of follicles evaluated are shown within each column.

3.1.2 Evaluation of Ovarian Extracellular Matrix after 10 days of treatment with AR extract (0.5, 5 or 50 mg/kg)

Ovaries from animals treated with AR extract at all dosages (0.5, 5 and 50 mg/kg) showed a statistically higher percentage of collagen fibers when compared to the untreated group (SHAM) (Figure 3).

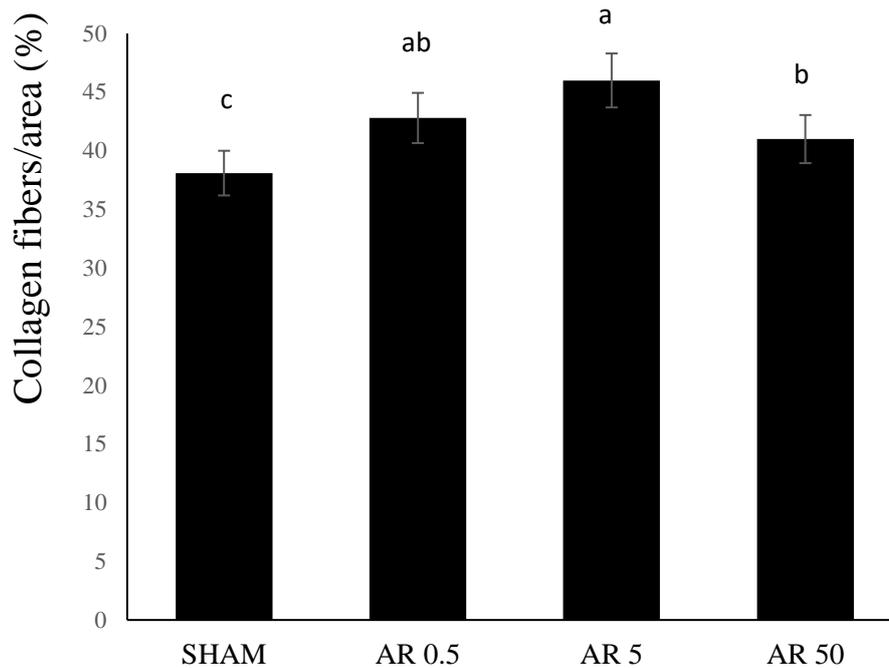


Figure 3. The levels of collagen fibers (mean \pm SD) in the mouse ovaries (n = 4 ovaries per treatment) treated for 10 days with AR extract at different doses (0.5, 5 or 50 mg/kg) or SHAM (untreated control group). Collagen fiber distribution was analyzed by the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's comparison. a, b and c different lowercase letters indicate statistically significant differences between treatments ($p < 0.05$).

3.1.3 Evaluation of Stromal Cells Density after 10 days of treatment with AR extract (0.5, 5 or 50 mg/kg)

The ovarian stroma of treated animals in all experimental groups (0.5, 5 or 50 mg/kg) showed a well-preserved ovarian structure within normal limits. However, only the 50 mg/kg dose was similar to the control group, while AR 0.5 and 5 mg/kg were similar to each other (Figure 4).

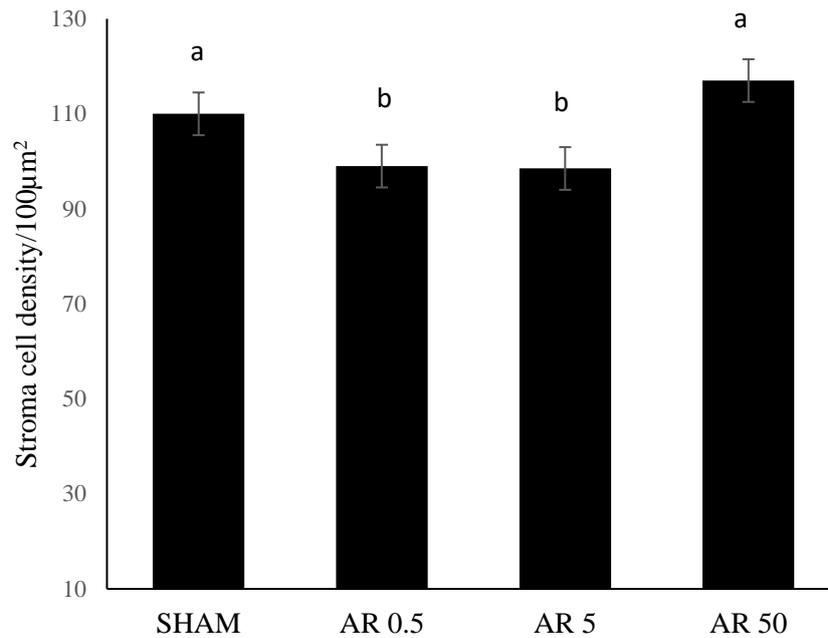


Figure 4. Stromal cell density on mice ovarian tissues after treated for 10 days with AR extract at different doses (0.5, 5 or 50 mg/kg) or SHAM (untreated control group). Stromal density was analyzed using the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's comparison. a and b different lowercase letters indicate statistically significant differences between treatments ($p < 0.05$).

3.2 Experiment 2: Analysis of *Actaea racemosa* (L.) extract as a protective agent of female mice ovarian induced to chemotherapy with doxorubicin

3.2.1 Effect of *Actaea racemosa* (L.) extract on follicular morphology and development of female mice induced to chemotherapy with doxorubicin

Administration of AR at 0.5 and 5 mg/kg maintained the percentage of morphologically normal follicles similar to the control (SHAM), while DOX (10 mg/kg) drastically decreased the percentages of morphologically normal follicles in the ovaries of female mice. On the other hand, the groups induced to chemotherapy that received AR in both dosages (0.5+DOX and 5+DOX) presented percentages of normal follicles similar to the groups not induced to chemotherapy and treated only with AR (0.5 and 5 mg/kg) (Figure 5). The presence of AR (0.5 and 5 mg/kg) attenuated the ovarian follicles against damage caused by DOX (10 mg/kg). Figure 6 A-H shows morphologically normal or degenerated follicles.

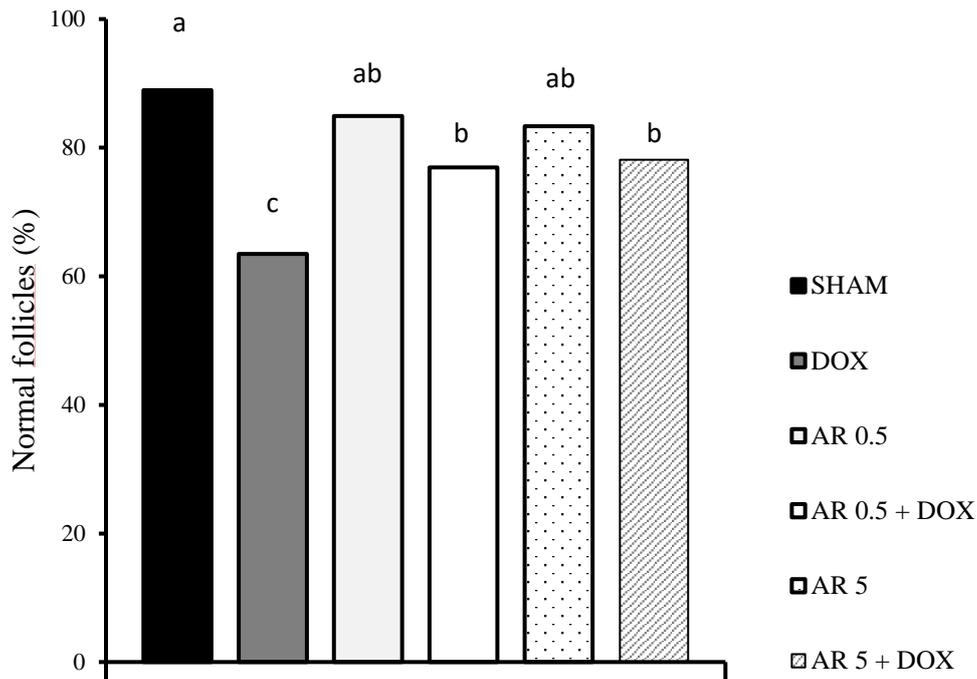


Figure 5. The percentage (mean \pm SE) of normal follicles in ovaries of mice induced to chemotherapy with DOX (10 mg/kg) or induced and treated with AR (0.5 and 5 mg/kg). The percentages of normal follicles was calculated as the fraction of normal follicles number/total follicles number in each treatment ($\times 100$). Data were compared using chi-square test and expressed as percentages. a, b and c different lowercase letters indicate statistically significant differences between treatments ($p < 0.05$).

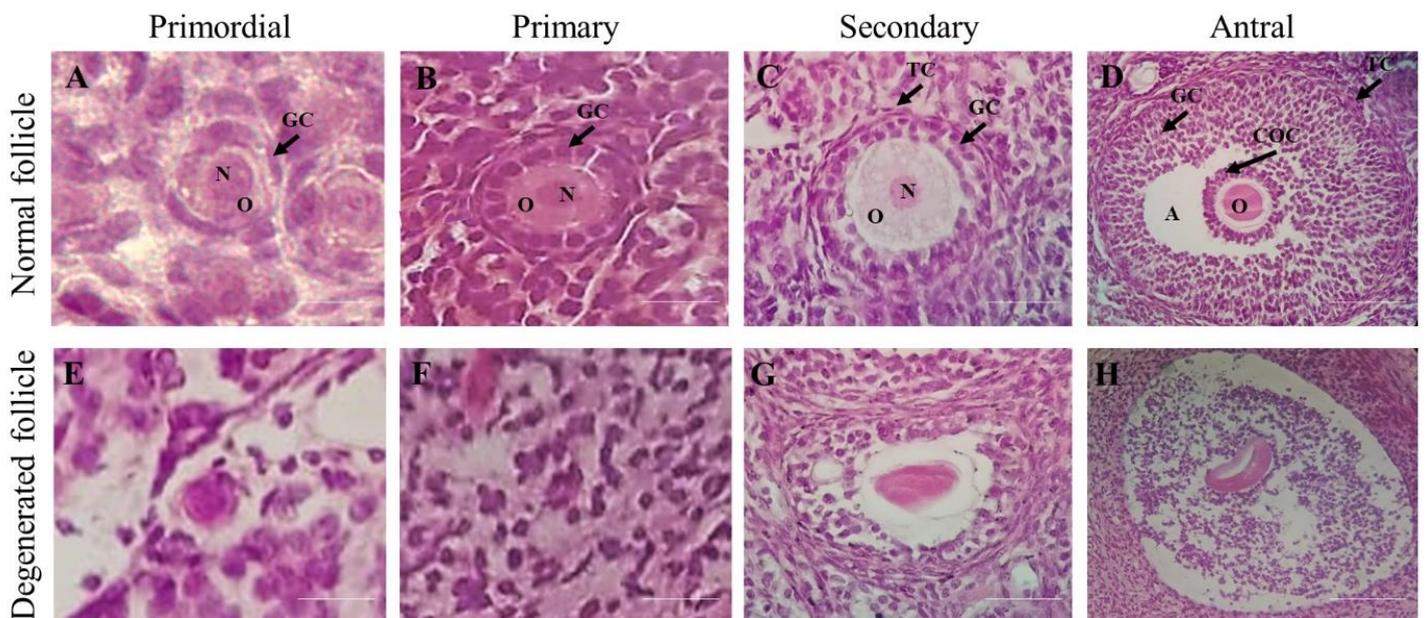


Figure 6. Representative images of ovarian sections of mouse treated for 10 days showing a morphologically normal (A–D) and degenerated (E–H) follicles from different stages of development stained with haematoxylin and eosin. (A) Normal and (E) degenerated primordial follicles; (B) Normal and (F) degenerated primary follicles; (C) Normal and (G) degenerated secondary follicle; (D) Normal and (H) degenerated antral follicle. Granulosa cells (GC); Oocyte (O); Oocyte nucleus (N); Antrum (A); Cumulus oocyte complex (COC); Theca cells (TC) (400 \times , Scale bar: 100 μ m).

DOX (10 mg/kg) reduced the percentage of primordial and primary follicles, but only secondary follicles showed the greatest difference, where DOX significantly decreased the number of follicles while the isolated presence of AR (0.5 and 5 mg/kg) or associated with DOX maintained the percentage of normal follicles.

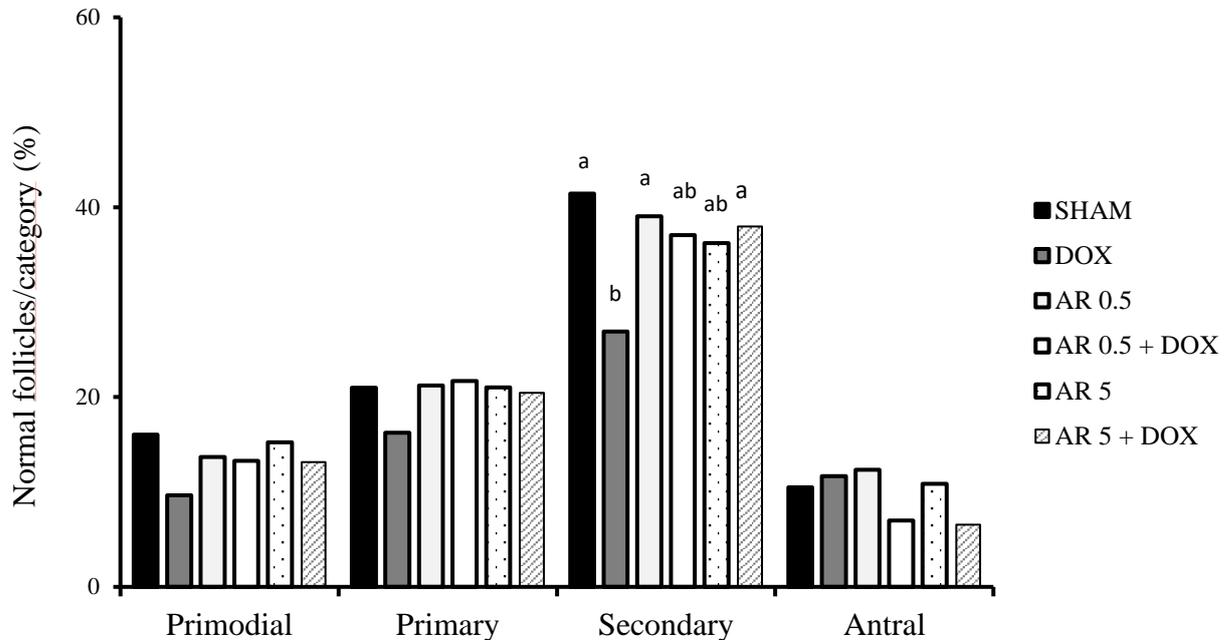


Figure 7. The percentage (mean \pm SE) of normal follicles per category (primordial, primary, secondary or antral) in ovaries of mice induced to chemotherapy with DOX (10 mg/kg) or induced and treated with AR (0.5 and 5 mg/kg). The proportion of follicles at different developmental stages was defined as a percentage of normal follicles in each stage over the total follicle count. Data were compared using chi-square test and expressed as percentages. a and b different lowercase letters indicate statistically significant differences between treatments ($p < 0.05$).

3.2.2 Evaluation of the Ovarian Extracellular Matrix after 10 days of treatment with AR extract (0.5 or 5 mg/kg) with or without DOX (10 mg/kg)

After treatment in all experimental conditions, there was no difference in the organization of collagen fibers in the extracellular matrix in the ovaries (Figure 8A). Figure 8B shows regions containing collagen fibers in mouse ovaries after *in vivo* treatment.

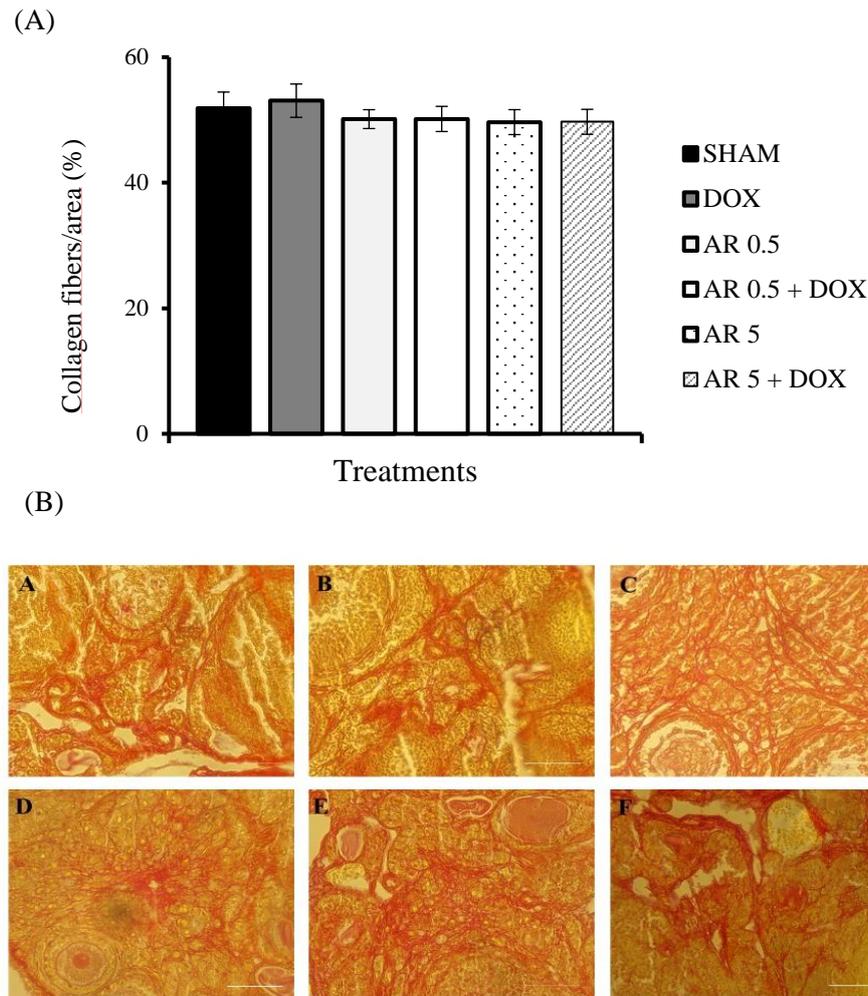


Figure 8. (A) The levels of collagen fibers (mean \pm SD) in mice ovaries induced to chemotherapy with DOX (10 mg/kg) or induced and treated with AR (0.5 and 5 mg/kg). Collagen fiber distribution was analyzed by the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's comparison and no significant differences were observed between treatments ($p > 0.05$). (B, A-F) Representative images of collagen fibers labeled by Picrosirius red: (A) control group; (B) DOX (10 mg/kg); (C) AR (0.5 mg/kg); (D) AR (0.5 mg/kg) + DOX (10 mg/kg); (E) AR (5 mg/kg) and (F) AR (5 mg/kg) + DOX (10 mg/kg). Scale bar: 100 μ m (400 \times).

3.2.3 Evaluation of Stromal Cells Density in mice ovary after 10 days of treatment with AR extract (0.5 or 5 mg/kg) after chemotherapy with DOX (10 mg/kg)

The ovarian stromal cell density of animals treated with AR (0.5 and 5 mg/kg) were statistically different from each other, but similar to the control group (SHAM). Furthermore, when AR (0.5 and 5 mg/kg) was combined with DOX (10 mg/kg), they were similar to the control group (SHAM). On the other hand, the group induced chemotherapy with DOX (10 mg/kg) but which did not receive any AR treatment, showed a significant decrease in ovarian stromal cell density (Figure 8). The data indicate that AR was able to decrease the apoptosis of

ovarian stromal cells from animals induced to chemotherapy with DOX. Figure 10 shows histological sections of ovaries from mice that were treated with RA extract after induction or not of DOX chemotherapy.

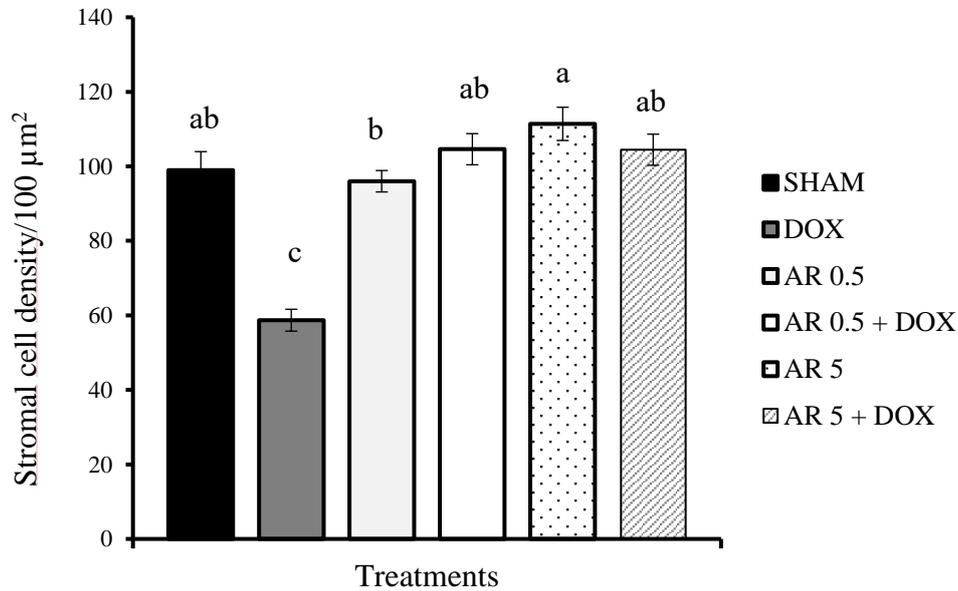


Figure 9. Stromal cell density in mice ovaries induced to chemotherapy with DOX (10 mg/kg) or induced and treated with AR (0.5 and 5 mg/kg). Stromal density was analyzed using the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's comparison. a, b and c different lowercase letters indicate statistically significant differences between treatments ($p < 0.05$).

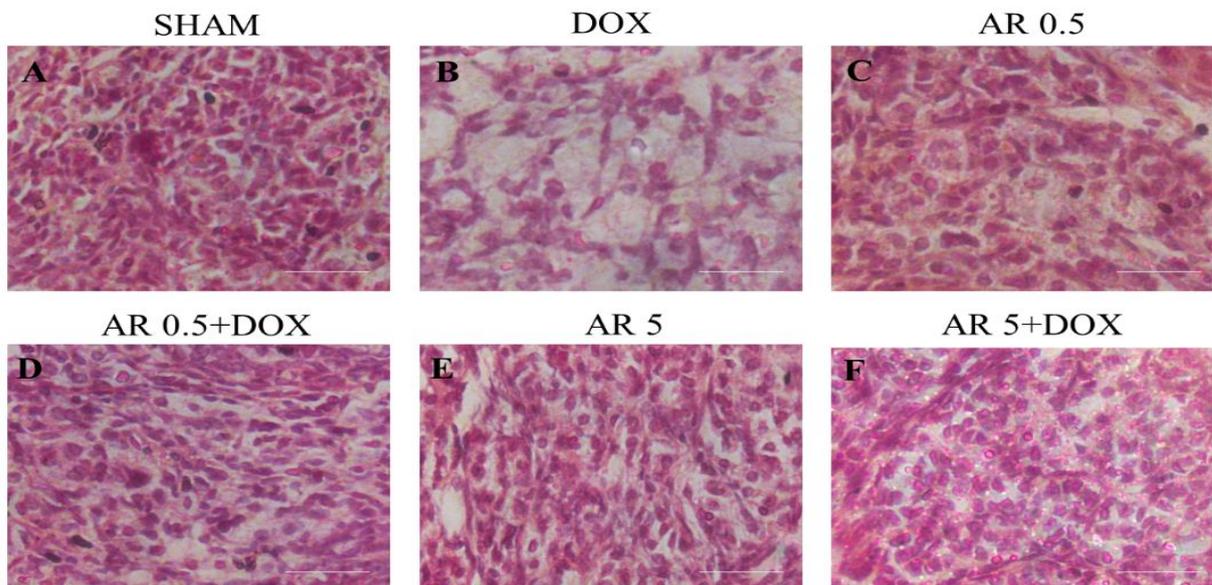


Figure 10. Representative images of ovarian stromal density in: (A) control group; (B) DOX (10 mg/kg); (C) AR (0.5 mg/kg); (D) AR (0.5 mg/kg) + DOX (10 mg/kg); (E) AR (5 mg/kg) and (F) AR (5 mg/kg) + DOX (10 mg/kg). Scale bar: 100 μm (400 \times).

3.2.4 Immunohistochemical localization of TNF- α in mice ovary treated for 10 days with AR extract (0.5 mg/kg) after chemotherapy with DOX (10 mg/kg)

Immunohistochemical analysis showed weak staining for TNF- α in follicles from control mice (Figure 11C,D), while moderate staining for TNF- α was observed in follicles from AR 0.5 mg/kg (Figure 11G,H) and AR 0.5 mg/kg + DOX (10 mg/kg) (Figure 10I,J). DOX group (Figure 11E,F) showed strong staining for TNF- α .

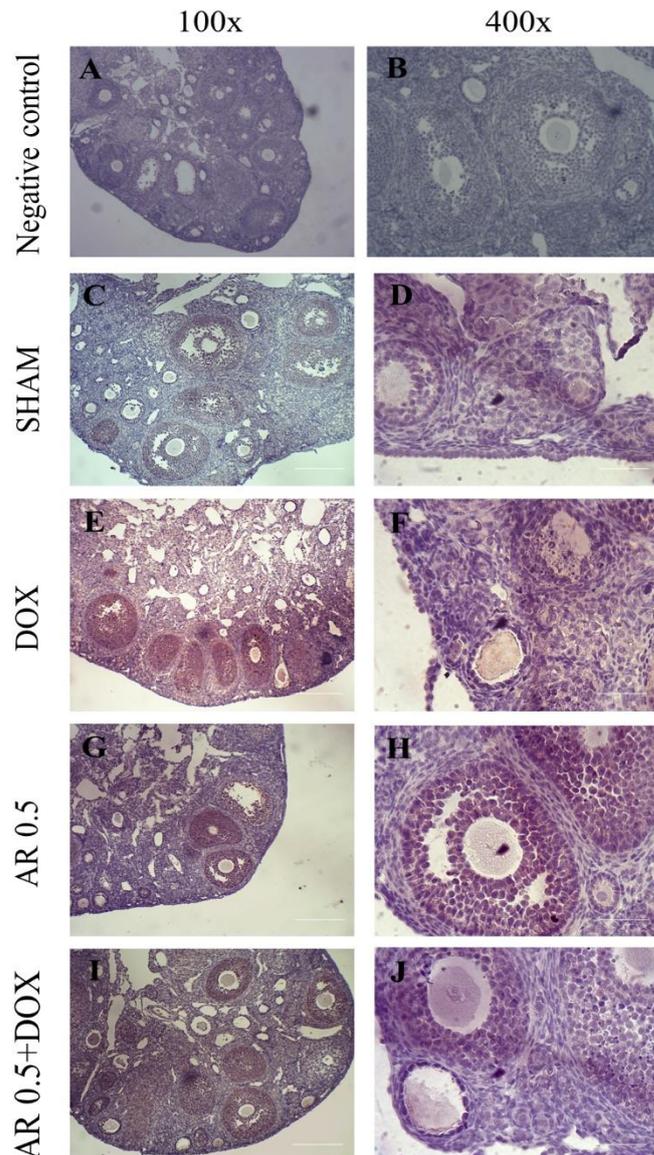


Figure 11. Immunohistochemical staining for TNF- α in mice ovaries (**A and B**) reaction negative control group; (**C and D**) control group; (**E and F**) DOX (10 mg/kg); (**G and H**) AR (0.5 mg/kg); (**I and J**) AR (0.5 mg/kg) + DOX (10 mg/kg). Scale bar: 100 μ m (100 \times and 400 \times).

3.2.5 Ultrastructural analysis in mice ovary treated for 10 days with AR extract (0.5 mg/kg) after chemotherapy with DOX (10 mg/kg)

Control group ovary follicles (SHAM) showed well-preserved granulosa and zona pellucida cells, homogeneous oocytes with well-defined mitochondria and nuclear membranes (Figure 12 A,B). The same was observed in groups treated with AR alone (0.5 mg/kg) (Figure 12 E,F) or after DOX-induction (10 mg/kg) (Figure 12 G,H). The presence of lipid inclusions in granulosa cells in ovaries of the control group and groups treated with AR (0.5 mg/kg) was also observed (Figure 12, E). In the DOX group (10 mg/kg), there was a very reduced amount of preantral follicles. Furthermore, the presence of smaller amounts of lipid inclusions was observed in the few remaining follicles (Figure 12 C,D). However, no serious ultrastructural alterations were observed that would suggest any oocyte or follicular degeneration.

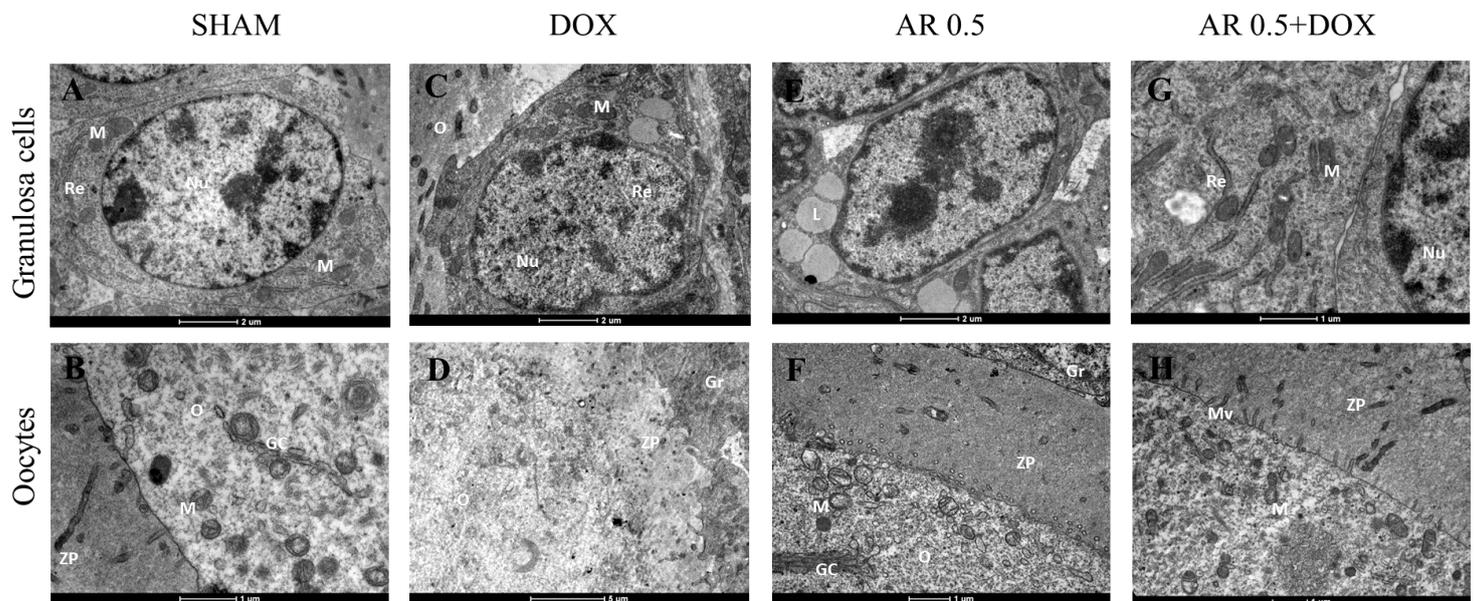


Figure 12. Representative ultrastructural micrographs in mice ovaries: (A,B) control group; (C,D) DOX (10 mg/kg); (E,F) AR (0.5 mg/kg) and (G,H) AR (0.5 mg/kg) + DOX (10 mg/kg). M: mitochondria; Nu: nucleus; ZP: zona pellucida, L: lipid; O: oocyte; Gr: granulosa cells; Re: endoplasmic reticulum; GC: golgi complex; Mv: microvillus.

4 Discussion

This study demonstrates for the first time that AR extract support folliculogenesis and attenuates DOX-induced damage to ovarian follicle morphology in female mice treated *in vivo*. Our data show that AR extract at any dosage (0.5, 5 and 50 mg/kg) did not influence the percentage of normal, primordial or developing follicles in mouse ovaries when compared to

animals that did not receive the extract. This indicates that the extract did not play a toxic or negative role on folliculogenesis in this model. Furthermore, DOX (10 mg/kg) decreased the morphologically normal follicles promoting follicular atresia, while the AR extract (0.5 and 5 mg/kg) managed to keep the numbers within the normal range. AR extract has several chemical constituents with therapeutic properties, such as antioxidants, anti-inflammatories and anti-apoptotics. The 23-epi-26-deoxyactein, one of the most abundant triterpene glycosides in AR extract, stimulates mitochondrial biogenesis and activates factors related to cell proliferation (SUH et al., 2017; CHOI, 2013) and isoferulic acid, an antioxidant presente in AR, inhibited the production of pro-inflammatory cytokines (SCHMID et al., 2009). DOX stimulates apoptosis mainly by direct DNA damage or through oxidative stress pathways. *In vitro* studies with neural and liver cells cultured in the presence of AR extract preserved mitochondrial integrity and ATP levels and prevented ROS formation and cell death (RABENAU et al., 2019; OLIVEIRA et al. 2013). In addition, beneficial effects exerted by AR on antioxidant, hormonal and proliferative status in granulosa cells, theca cells and stromal cells in female rats have already been demonstrated (AZOUZ et al., 2021).

DOX exposure results in the loss of primordial and growing follicles. However, previous studies show that the acute damage caused by DOX in the ovary of mice is cell and follicle type dependent (ROTI ROTI, et al., 2012). Apparently, DOX accumulates more in developing follicles, i.e., secondary and antral follicles. In the present study, although there was no significant difference, DOX reduced the percentage of primordial and primary follicles. We noticed that in the secondary follicles there was the greatest difference, where DOX decreased the number of follicles while the isolated presence of AR maintained the percentage. It has recently been shown that DOX causes overactivation of primordial follicles and consequently increases the number of developing follicles. Although the presence of growing follicles inhibits the recruitment of primordial follicles, chemotherapy drugs have a cytotoxic effect on growing follicles and the increasing loss of this population leads to increased activation of primordial follicles and, thus, loss of follicular reserve (WANG et al., 2019).

DOX chemotherapy reduced stromal cell density in female mouse ovaries. Follicular development is influenced by ovarian stromal cells, which support the tissue and provide a suitable microenvironment. In general, ovarian stromal tissue fibroblasts secrete extracellular matrix configuration proteins, such as collagen, for cellular support, structure, and repair. In addition, it promotes the formation of capillaries, which provide nutrients for follicular growth and development (CUI et al., 2020). In experiment 1 the doses of AR 0.5 and 5 mg/kg showed

a reduction in the density of stromal cells when compared to the control. This doesn't necessarily imply that AR was able to cause cell death, but the reduction may be related to the very pattern of the animals in the groups and/or to a stromal reorganization caused by follicular growth that influences the reduction of stromal area. Previous studies have reported evidence of indirect follicular death from vascular and stromal damage, as well as decreased blood flow and shrinkage of human ovaries (BEN-AHARON et al., 2012; SOLEIMANI et al., 2011). This stromal cell death, as well as microvasculares damage, induces tissue hypoxia, which may contribute to the indirect loss of ovarian follicles. In our study, AR (0.5 and 5 mg/kg) contributed to maintain stromal cell density and protected them from DOX damage.

In our study, the AR extract did not influence the extracellular matrix configuration in the ovaries. Previous studies determined there was no significant accumulation of collagen in the ovaries of mice regardless of age and the estrous cycle synchronization may influence fiber homogeneity of collagen in the ovary (LLIBEROS et al., 2021; BRILEY et al., 2016). Studies have shown that the presence of collagen fibers in the cortical stroma after chemotherapy is a characteristic sign of cell death and scarring of the ovarian tissue (OKTEM et al., 2007). However, increased follicular degeneration was not associated with changes in extracellular matrix configuration. Our findings are in line with a recent *in vitro* study that showed that there were no significant changes in the organization and amount of collagen fibers in the ovaries of mice cultured in the presence of AR or DOX (DE ASSIS et al., 2022).

We identified immunostaining for TNF- α in granulosa cells and oocytes from secondary and antral follicles, and in oocytes from primary and primordial follicles in all experimental groups analyzed. In addition, corpus luteum and theca cells were also stained. TNF- α is related to inflammation, apoptosis, cell growth and differentiation. Furthermore, its effects on ovarian cell death are dependent on the stage of follicular development, which may be associated with different levels of expression of its receptors (SILVA et al., 2020). The type 1 receptor (TNFR-I) is related to the intracellular death domain necessary for signaling pathways associated with apoptosis, while the type 2 receptor (TNFR-II) is more related to the induction and transcription of genes for the cell growth, survival and differentiation. In rat ovaries, sites of TNF- α localization include oocytes, granulosa cells, corpora lutea, and macrophages (MARCINKIEWICZ et al., 1994; ROBY; TERRANOVA, 1989; SANCHO-TELLO et al., 1993). In this study, we identified strong immunostaining for TNF- α in ovaries from animals induced with DOX chemotherapy (10 mg/kg). On the other hand, there was a decrease in

intensity to moderate in ovaries from AR (0.5 mg/kg) or AR (0.5 mg/kg) + DOX (10 mg/kg) animals.

Ultrastructural analysis showed that ovarian follicles from animals treated with AR (0.5 mg/kg) had well-preserved granulosa cells, zona pellucida, oocytes and nuclear membranes. DOX (0.5 mg/kg) showed reduced amount of preantral follicles and lower lipid inclusions. The lipids in granulosa cells are important because they serve as a substrate for the synthesis of hormones. The reduced number of preantral follicles is related to the ability of DOX to induce follicular apoptosis and increase follicular recruitment rates. No antral follicles were analyzed, and the few remaining preantral follicles did not show severe signs of degeneration. Our findings are similar to those found in an *in vitro* study that associated the AR extract (5 ng/mL) with DOX (0.3 µg/mL) (DE ASSIS et al., 2022).

5 Conclusions

The data suggest that the AR, under these experimental conditions, does not have toxic effects on ovarian follicles or on ovarian tissue in mice and contributes to increasing follicular growth and survival rates *in vivo*. Furthermore, when associated with DOX, it was able to maintain normal follicle rates and decrease apoptosis in ovarian stromal cells and decreased immunostaining for TNF- α . However, there were no serious ultrastructural alterations in the experimental groups analyzed. New studies are needed to investigate the AR pathways and their molecular effects and mechanisms.

Financial support

This research was supported by grants from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil, Grant N° 435524/2018-6). LIMA NETO, M.F. is recipient of scholarship from CAPES, Brazil.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that would prejudice the impartiality of this scientific work.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

References

- Azouz AA, Ali SE, Abd-Elsalam RM, Emam SR, Galal MK, Elmosalamy SH, Alsherbiny MA, Hassan BB, Li CG, El Badawy SA. Modulation of steroidogenesis by *Actaea racemosa* and vitamin C combination, in letrozole induced polycystic ovarian syndrome rat model: promising activity without the risk of hepatic adverse effect. *Chin Med*. 2021 Apr 29;16(1):36. doi: 10.1186/s13020-021-00444-z.
- Barberino, R.S.; Menezes, V.G.; Ribeiro, A.E.A.S.; Palheta, R.C.Jr.; Jiang, X.; Smitz, J.E.J.; Matos, M.H.T. Melatonin protects against cisplatin-induced ovarian damage in mice via the MT1 receptor and antioxidant activity. *Biol. Reprod*. 2017, 96, 1244– 1255. doi: 10.1093/biolre/iox053.
- Bellver J, Donnez J. Introduction: Infertility etiology and offspring health. *Fertil Steril*. 2019 Jun;111(6):1033-1035. doi: 10.1016/j.fertnstert.2019.04.043.
- Bolle P, Mastrangelo S, Perrone F, Evandri MG. Estrogen-like effect of a *Cimicifuga racemosa* extract sub-fraction as assessed by in vivo, ex vivo and in vitro assays. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2007 Nov-Dec;107(3-5):262-9. doi: 10.1016/j.jsbmb.2007.03.044.
- Briley SM, Jasti S, McCracken JM, Hornick JE, Fegley B, Pritchard MT, Duncan FE. Reproductive age-associated fibrosis in the stroma of the mammalian ovary. *Reproduction*. 2016 Sep;152(3):245-260. doi: 10.1530/REP-16-0129.
- Campos, L. B. et al. *Cimicifuga racemosa* impairs fatty acid β -oxidation and induces oxidative stress in livers of ovariectomized rats with renovascular hypertension. *Free Radical Biology and Medicine*. 2012. v. 53, n. 4, p. 680-689. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.043.
- Cavalcante BN, Matos-Brito BG, Paulino LRFM, Silva BR, Aguiar AWM, de Almeida EFM, Souza ALP, Vasconcelos GL, De Assis EIT, Silva AWB, Silva JRV. Effects of melatonin on morphology and development of primordial follicles during in vitro culture of bovine ovarian tissue. *Reprod Domest Anim*. 2019 Dec;54(12):1567-1573. doi: 10.1111/rda.13565.
- Cui, L.; Bao, H.; Liu, Z.; Man, X.; Liu, H.; Hou, Y.; Luo, Q.; Wang, S.; Fu, Q. hUMSCs regulate the differentiation of ovarian stromal cells via TGF- β 1/Smad3 signaling pathway to inhibit ovarian fibrosis to repair ovarian function in POI rats. *Stem Cell Res. Ther*. 2020, 11, 386. doi: 10.1186/s13287-020-01904-3.
- de Assis EIT, Azevedo VAN, De Lima Neto MF, Costa FC, Paulino LRFM, Barroso PAA, Donato MAM, Peixoto CA, Do Monte APO, Matos MHT, Godinho AN, Freire JMO, Batista ALPS, Silva JRV, Silva AWB. Protective Effect of *Cimicifuga racemosa* (L.) Nutt Extract on

Oocyte and Follicle Toxicity Induced by Doxorubicin during In Vitro Culture of Mice Ovaries. *Animals (Basel)*. 2022 Dec 20;13(1):18. doi: 10.3390/ani13010018.

Fernandes ES, Celani MFS, Fistarol M, Geber S. Effectiveness of the short-term use of *Cimicifuga racemosa* in the endothelial function of postmenopausal women: a double-blind, randomized, controlled trial. *Climacteric*. 2020 Jun;23(3):245-251. doi: 10.1080/13697137.2019.1682542.

Gouveia BB, Barberino RS, Dos Santos Silva RL, Lins TLBG, da Silva Guimarães V, do Monte APO, Palheta RC Jr, de Matos MHT. Involvement of PTEN and FOXO3a Proteins in the Protective Activity of Protocatechuic Acid Against Cisplatin-Induced Ovarian Toxicity in Mice. *Reprod Sci*. 2021 Mar;28(3):865-876. doi: 10.1007/s43032-020-00305-4.

Guo, Y.; Yin, T.; Wang, X.; Zhang, F.; Pan, G.; Lv, H.; Wang, X.; Owoicho Orgah, J.; Zhu, Y.; Wu, H. Traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicology of the genus *Cimicifuga*: A review. *J. Ethnopharmacol* 2017, 209, 264–282. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.07.040>.

Guo, Y.; Yin, T.; Wang, X.; Zhang, F.; Pan, G.; Lv, H.; Wang, X.; Owoicho Orgah, J.; Zhu, Y.; Wu, H. Traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicology of the genus *Cimicifuga*: A review. *J. Ethnopharmacol* 2017, 209, 264–282. doi: 10.1016/j.jep.2017.07.040.

Kayedpoor, P. S.; Mohamadi, L. Karimzadeh-Bardei, M. Nabiuni, Anti-inflammatory effect of silymarin on ovarian immunohistochemical localization of TNF- α associated with systemic inflammation in polycystic ovarian syndrome, *Int. J. Morphol.* 35, 2017, 723–732, <https://doi.org/10.4067/s0717-95022017000200054>.

Khallaf SM, Roshdy J, Ibrahim A. Pegylated liposomal doxorubicin in patients with metastatic triple-negative breast cancer: 8-year experience of a single center. *J Egypt Natl Canc Inst*. 2020 Apr 27;32(1):20. doi: 10.1186/s43046-020-00034-4.

Kim CD, Lee WK, Lee MH, Cho HS, Lee YK, Roh SS. Inhibition of mast cell-dependent allergy reaction by extract of black cohosh (*Cimicifuga racemosa*). *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2004 May;26(2):299-308. doi: 10.1081/iph-120037728.

Kusano, A.; Seyama, Y.; Nagai, M.; Shibano, M.; Kusano, G. Effects of fukinolic acid and cimicifugic acids from *Cimicifuga* species on collagenolytic activity. *Biol. Pharm. Bull.* 2001, 24, 1198–1201. <https://doi.org/10.1248/bpb.24.1198>.

Lliberos C, Liew SH, Zareie P, La Gruta NL, Mansell A, Hutt K. Evaluation of inflammation and follicle depletion during ovarian ageing in mice. *Sci Rep*. 2021 Jan 11;11(1):278. doi: 10.1038/s41598-020-79488-4.

Liske E, Hänggi W, Henneicke-von Zepelin HH, Boblitz N, Wüstenberg P, Rahlfs VW. Physiological investigation of a unique extract of black cohosh (*Cimicifugae racemosae rhizoma*): a 6-month clinical study demonstrates no systemic estrogenic effect. *J Womens Health Gend Based Med*. 2002 Mar;11(2):163-74. doi: 10.1089/152460902753645308.

Lopategui, D.M.; Yechieli, R.; Ramasamy, R. Oncofertility in sarcoma patients. *Transl. Androl. Urol.* 2017, 6, 951–958. <https://doi.org/10.21037/tau.2017.07.03>.

Marcinkiewicz JL, Krishna A, Cheung CM and Terranova PF. Oocytic tumor necrosis factor alpha: localization in the neonatal rat ovary and throughout follicular development in the adult rat. *Biol Reprod* 1994, 1251–60. doi: 10.1095/biolreprod50.6.1251.

Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol.* 2002 Nov;62(4A):609-14. doi: 10.1590/s1519-69842002000400008.

Mobaraki, M; Faraji, A; Dolati, P; Ataei, M; Manshadi, HRD. Molecular Mechanisms of Cardiotoxicity: A Review on the Major Side-effect of Doxorubicin. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2017, v. 79, n. 3, p. 335-344. doi: 10.4172/pharmaceutical-sciences.1000235

Morgan S, Lopes F, Gourley C, Anderson RA, Spears N. Cisplatin and doxorubicin induce distinct mechanisms of ovarian follicle loss; imatinib provides selective protection only against cisplatin. *PLoS One.* 2013 Jul 29;8(7):e70117. doi: 10.1371/journal.pone.0070117.

Morelli V, Naquin C. Alternative therapies for traditional disease states: menopause. *Am Fam Physician.* 2002 Jul 1;66(1):129-34. PMID: 12126027.

Niringiyumukiza JD, Cai H, Chen L, Li Y, Wang L, Zhang M, Xu X, Xiang W. Protective properties of glycogen synthase kinase-3 inhibition against doxorubicin-induced oxidative damage to mouse ovarian reserve. *Biomed Pharmacother.* 2019 Aug;116:108963. doi: 10.1016/j.biopha.2019.108963.

Nisslein, T.; Freudenstein, J. Effects of an isopropanolic extract of *Cimicifuga racemosa* on urinary crosslinks and other parameters of bone quality in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *J. Bone Miner. Metab.* 2003, 21, 370–376. doi: 10.1007/s00774-003-0431-9.

Qiu, S.X.; Dan, C.; Ding, L.S.; Peng, S.; Chen, S.N.; Farnsworth, N.R.; Nolte, J.; Gross, M.L.; Zhou, P. A triterpene glycoside from black cohosh that inhibits osteoclastogenesis by modulating RANKL and TNF α signaling pathways. *Chem. Biol.* 2007, 14, 860–869. doi: 10.1016/j.chembiol.2007.06.010.

Rabenau M, Unger M, Drewe J, Culmsee C. Metabolic switch induced by *Cimicifuga racemosa* extract prevents mitochondrial damage and oxidative cell death. *Phytomedicine.* 2019 Jan;52:107-116. doi: 10.1016/j.phymed.2018.09.177.

Roby KF and Terranova PF. Localization of tumor necrosis factor (TNF) in the rat and bovine ovary using immunocytochemistry and cell blot: evidence for granulosa production. In *Growth Factors and the Ovary* (ed. AN Hirshfield), 1989, pp. 273–8. Boston, MA: Springer. doi: 10.1007/978-1-4684-5688-2_31.

Roti Roti, E.C.; Leisman, S.K.; Abbott, D.H.; Salih, S.M. Acute doxorubicin insult in the mouse ovary is cell- and follicle-type dependent. *PLoS ONE* 2012, 7, e42293. doi: 10.1371/journal.pone.0042293.

Ruhlen RL, Sun GY, Sauter ER. Black Cohosh: Insights into its Mechanism(s) of Action. *Integrative Medicine Insights*. January 2008. doi:10.4137/117863370800300002.

Sancho-Tello M, Tash J, Roby K and Terranova PF Effects of lipopolysaccharide on ovarian function in the pregnant mare serum gonadotropin-treated immature rat. *Endocr J* 1, 1993, 503–11. doi: 10.2527/jas1987.6561768x.

Shuya Liu, Kaiyu Niu, Yunmeng Da, Yao Liu, Jing Zhang, Wenjuan Wang, Yi Zhang, Hai Jiang, Ke Wang, Wenpei Bai, Lihua Qin, Jing Jia, Effects of standardized isopropanolic black cohosh and estrogen on salivary function in ovariectomized rats, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Volume 97, 2018, Pages 1438-1444. doi: 10.1016/j.biopha.2017.11.038.

Silva JRV, Lima FEO, Souza ALP, Silva AWB. Interleukin-1 β and TNF- α systems in ovarian follicles and their roles during follicular development, oocyte maturation and ovulation. *Zygote*. 2020 Aug;28(4):270-277. doi: 10.1017/S0967199420000222.

Soleimani R, Heytens E, Darzynkiewicz Z, Oktay K. Mechanisms of chemotherapy-induced human ovarian aging: double strand DNA breaks and microvascular compromise. *Aging (Albany NY)*. 2011 Aug;3(8):782-93. doi: 10.18632/aging.100363.

Wang Y, Liu M, Johnson SB, Yuan G, Arriba AK, Zubizarreta ME, Chatterjee S, Nagarkatti M, Nagarkatti P, Xiao S. Doxorubicin obliterates mouse ovarian reserve through both primordial follicle atresia and overactivation. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2019 Oct 15;381:114714. doi: 10.1016/j.taap.2019.114714.

Yeo W, Pang E, Liem GS, Suen JJS, Ng RYW, Yip CCH, Li L, Yip CHW, Mo FKF. Menopausal symptoms in relationship to breast cancer-specific quality of life after adjuvant cytotoxic treatment in young breast cancer survivors. *Health Qual Life Outcomes*. 2020 Feb 10;18(1):24. doi: 10.1186/s12955-020-1283-x.

7 CONCLUSÕES GERAIS

O fitomedicamento a base de *Actaea racemosa* (L.) mantém as características morfológicas normais em folículos ovarianos de camundongos fêmeas. Além disso, é capaz de prevenir os efeitos negativos causados pela doxorubicina na manutenção da sobrevivência folicular e das células do estroma do tecido ovariano em animais tratados por 10 dias. Esses achados mostram que a *Actaea racemosa* possui propriedades funcionais na foliculogênese e este composto representa uma ferramenta biotecnológica promissora em estudos pré-clínicos para compreensão de mecanismos responsáveis pela manutenção da fertilidade.

8 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos nessa Dissertação poderão auxiliar na compreensão dos efeitos do tratamento com *Actaea racemosa* (L.) na função folicular e ovariana *in vivo*, fornecendo bases científicas para futuros testes da associação desse fitomedicamento com DOX, ou outros antineoplásicos, na prática clínica. Além disso, medicamentos que tenham como base a *Actaea racemosa* e/ou seus componentes isolados, poderão ser desenvolvidos para preservar a função ovariana durante a quimioterapia. Ressalta-se que os estudos desenvolvidos neste trabalho foram realizados com animais saudáveis e em condições experimentais controladas. Desta forma, mais estudos devem ser realizados para avaliar como os compostos da *Actaea racemosa* (L.) atuam em animais induzidos a doenças e posteriormente tratados com o fármaco testado nesse trabalho, de modo a avaliar se o tratamento iria responder de forma positiva reduzindo os efeitos causados pela doxorubicina na quimioterapia.

REFERÊNCIAS

- Abdallah H.M.I. et al. Protective effect of some natural products against chemotherapy-induced toxicity in rats. **Heliyon**. May 7;5(5), 2019.
- Amarowicz, R.; Pegg, R. B. Natural antioxidants of plant origin. 1. ed. [s.l.] **Elsevier Inc.**, 2019.
- Andersen CL, et al. Chemotherapeutic agent doxorubicin alters uterine gene expression in response to estrogen in ovariectomized CD-1 adult mice†. **Biol Reprod**. Apr 1;100(4):869-871, 2019.
- Armstrong DK, et al. Ovarian Cancer, Version 2.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. **J Natl Compr Canc Netw**. Feb 2;19(2):191-226, 2021.
- Azam, H, et al. Ovarian protection in cyclophosphamide-treated mice by fennel, **Toxicology Reports**, Volume 4, Pages 160-164, 2017.
- Azouz AA, et al. Modulation of steroidogenesis by *Actaea racemosa* and vitamin C combination, in letrozole induced polycystic ovarian syndrome rat model: promising activity without the risk of hepatic adverse effect. **Chin Med**. Apr 29;16(1):36, 2021.
- Bassiri-Jahromi S. *Punica granatum* (Pomegranate) activity in health promotion and cancer prevention. **Oncology reviews**, 12(1), 345, 2018.
- Baumans V. Science-based assessment of animal welfare: laboratory animals. **Rev Sci Tech**. 2005 Aug;24(2):503-13, 2005.
- Bellver J, Donnez J. Introduction: Infertility etiology and offspring health. **Fertil Steril**. Jun;111(6):1033-1035, 2019.
- Ben-Aharon, et al. Chemotherapy-induced ovarian failure as a prototype for acute vascular toxicity. **The oncologist**, 17(11), 1386–1393, 2012.
- Beneventi F, et al. Adolescent and adult uterine volume and uterine artery Doppler blood flow among subjects treated with bone marrow transplantation or chemotherapy in pediatric age: a case-control study. **Fertil Steril**. Feb;103(2):455-61, 2015.
- Bent, S; Ko, R, Commonly used herbal medicines in the United States: a review, **Am. J. Med**. 116 (7) (2004) 478–485, 2004.
- Bernacki DT, et al. Evidence for an Aneugenic Mechanism of Action for Micronucleus Induction by Black Cohosh Extract. **Environ Mol Mutagen**. Dec;60(9):845-856, 2019.
- Bertoldo MJ, et al. Effects of bone morphogenetic protein 4 (BMP4) supplementation during culture of the sheep ovarian cortex. **Anim Reprod Sci** 149 124-34, 2014.
- Bolle P, et al. Estrogen-like effect of a *Cimicifuga racemosa* extract sub-fraction as assessed by in vivo, ex vivo and in vitro assays. **J Steroid Biochem Mol Biol**. Nov-Dec;107(3-5):262-9, 2007.

- Bonnet, A. et al. An overview of gene expression dynamics during early ovarian folliculogenesis: specificity of follicular compartments and bi-directional dialog. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 904, 2013.
- Borrelli, F.; Ernst, E. Black cohosh (*Cimicifuga racemosa*): a systematic review of adverse events. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 199, n. 5, p. 455-466, 2008.
- Burdette JE, et al. Black cohosh acts as a mixed competitive ligand and partial agonist of the serotonin receptor. **J Agric Food Chem**. Sep 10;51(19):5661-70, 2003.
- Burdette, J.E., et al. Black cohosh (*Cimicifuga racemosa* L.) protects Against menadione-induced DNA damage through scavenging of reactive oxygen species: bioassay-directed isolation and characterization of active principles. **J. Agric. Food Chem**. 50 (24), 7022–7028, 2002.
- Campos, L. B. et al. *Cimicifuga racemosa* impairs fatty acid β -oxidation and induces oxidative stress in livers of ovariectomized rats with renovascular hypertension. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 53, n. 4, p. 680-689, 2012.
- Carneiro, N. S. et al. Essential oil of flowers from *Eugenia klotzschiana* (Myrtaceae): chemical composition and in vitro trypanocidal and cytotoxic activities. **Revista virtual de química**, v. 9, n. 3, p.1381-1392, 2017.
- Castelo-branco, C. et al. Review & meta-analysis: isopropanolic black cohosh extract iCR for menopausal symptoms - an update on the evidence. **Climacteric**. Apr;24(2):109-119, 2021.
- Cecconi S, et al. The role of Akt signalling in the mammalian ovary. **Int J Dev Biol**.;56(10-12):809-17, 2012.
- Chang EM, et al. Cisplatin Induces Overactivation of the Dormant Primordial Follicle through PTEN/AKT/FOXO3a Pathway which Leads to Loss of Ovarian Reserve in Mice. **PLOS ONE** 10(12): e0144245, 2015.
- Cora MC, et al. Black Cohosh Extract Causes Hematologic and Biochemical Changes Consistent with a Functional Cobalamin Deficiency in Female B6C3F1/N Mice. **Toxicol Pathol**. Jul;45(5):614-623, 2017.
- Chaudhary, G. R. et al. Necroptosis in stressed ovary. **Journal of Biomedical Science**, v. 26, n. 1, p. 1–6, 2019.
- Chen J, et al. GnRH-a-Induced Perimenopausal Rat Modeling and Black Cohosh Preparations' Effect on Rat's Reproductive Endocrine. **Front Endocrinol (Lausanne)**, Dec 24;12:683552, 2021.
- Cho HW, et al. Advances in the Treatment and Prevention of Chemotherapy-Induced Ovarian Toxicity. **Int J Mol Sci**. Oct 21;21(20):7792, 2020.
- Choi EM. Deoxyactein Isolated from *Cimicifuga racemosa* protects osteoblastic MC3T3-E1 cells against antimycin A-induced cytotoxicity. **J Appl Toxicol**. Jun;33(6):488-94, 2013.

Chorilli, M.; Michelin, D.C.; Salgado, H.R.N. Animais de laboratório: o camundongo. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 28, n.1, p.11-23, 2007.

Christowitz, C., et al. Mechanisms of doxorubicin-induced drug resistance and drug resistant tumour growth in a murine breast tumour model. **BMC Cancer** 19, 757, 2019.

Compton, J. A., Culham, A., Jury, S. L. Reclassification of *Actaea* to Include *Cimicifuga* and *Souliea* (Ranunculaceae): Phylogeny Inferred from Morphology, nrDNA ITS, and cpDNA trnL-F Sequence Variation. *Taxon*, 47(3), 593, 1998.

Cora MC, et al. Black Cohosh Extract Causes Hematologic and Biochemical Changes Consistent with a Functional Cobalamin Deficiency in Female B6C3F1/N Mice. **Toxicol Pathol.** Jul;45(5):614-623, 2017.

Corn, P. G., El-Deiry, W. S. Derangement of growth and differentiation control in oncogenesis. **BioEssays**, 24(1), 83–90, 2002.

Cortvrindt, R.; Smits, J. In vitro follicle growth: achievements in mammalian species. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, n. 1, p. 3-9, 2001.

Cunha GR, et al. Reproductive tract biology: Of mice and men. *Differentiation*. Nov-Dec;110:49-63, 2019.

Czabotar PE, et al. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15:49–63, 2014.

Damasceno, et al. Chemical Properties of Caffeic and Ferulic Acids in Biological System: Implications in Cancer Therapy. A Review. **Current pharmaceutical design**, 23(20), 3015–3023, 2017.

de Assis EIT, et al. Protective Effect of *Cimicifuga racemosa* (L.) Nutt Extract on Oocyte and Follicle Toxicity Induced by Doxorubicin during In Vitro Culture of Mice Ovaries. **Animals (Basel)**. Dec 20;13(1):18, 2022.

Devine PJ, et al. Ultrastructural evaluation of oocytes during atresia in rat ovarian follicles. **Biol Reprod.** Nov;63(5):1245-52, 2000.

Durlinger AL, et al. Anti-Mullerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. **Endocrinology**;142(11):4891–9, 2001.

Einbond LS, et al. Growth inhibitory activity of extracts and purified components of black cohosh on human breast cancer cells. **Breast Cancer Res Treat.** Feb;83(3):221-31, 2004.

Enbom ET, et al. Mechanism of hepatotoxicity due to black cohosh (*Cimicifuga racemosa*): histological, immunohistochemical and electron microscopy analysis of two liver biopsies with clinical correlation. *Exp Mol Pathol.* Jun;96(3):279-83, 2014.

Fàbregues F, et al. *In Vitro* Follicular Activation and Stem Cell Therapy as a Novel Treatment Strategies in Diminished Ovarian Reserve and Primary Ovarian Insufficiency. **Front Endocrinol (Lausanne)**. Feb 24;11:617704, 2021.

Faddy MJ; Gosden RG. A model conforming the decline in follicle numbers to the age of menopause in women. **Hum Reprod**; 11(7):1484–6, 1996.

Faustino LR, et al. Interaction between keratinocyte growth factor-1 and kit ligand on the goat preantral follicles cultured in vitro. *Small Rumin Res* 114 112-119, 2013.

Feng, Y. et al. Imaging the ovary. **Reprod Biomed Online**, n. 36, v. 5, p. 584-593, 2018.

Fernandes ES, et al. Effectiveness of the short-term use of *Cimicifuga racemosa* in the endothelial function of postmenopausal women: a double-blind, randomized, controlled trial. *Climacteric*. Jun;23(3):245-251, 2020.

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

Figueiredo, J. R. et al. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais – MOIFOPA. In: Gonçalves, P. B. D.; Figueiredo, J. R.; Freitas, V. J. F. (Ed.). **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, p. 303-327, 2008.

Findlay, J. K. et al. Follicle Selection in Mammalian Ovaries. 3. ed. [s.l.] **Elsevier Inc.**, 2019.

Ford, EA, et al. Advances in human primordial follicle activation and premature ovarian insufficiency. **Reproduction**, 159:12–29, 2020.

Foster, S. Black cohosh: *Cimicifuga racemosa*. A literature review. **Herbal Gram**, e. 45, p. 35 – 50, 1999.

Fu X, et al. Overexpression of miR-21 in stem cells improves ovarian structure and function in rats with chemotherapy-induced ovarian damage by targeting PDCD4 and PTEN to inhibit granulosa cell apoptosis. **Stem Cell Res Ther**;8(1):187, 2017.

Gödecke, T. et al. Phytochemistry of cimicifugic acids and associated bases in *Cimicifuga racemosa* root extracts. **Phytochemical analysis: PCA**, 20(2), 120–133, 2009.

Gomes, L. M.; Braga, M. Controle reprodutivo em biotérios de criação de animais de laboratório com ênfase em roedores. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.41, n.1, p.105-109, 2017.

Gorini S, et al. Chemotherapeutic Drugs and Mitochondrial Dysfunction: Focus on Doxorubicin, Trastuzumab, and Sunitinib. **Oxid Med Cell Longev**. 2018 Mar 18;2018:7582730. Erratum in: **Oxid Med Cell Longev**. Jun 26;2019:9601435, 2019.

Goto M, et al. IGF1-induced AKT phosphorylation and cell proliferation are suppressed with the increase in PTEN during luteinization in human granulosa cells. **Reproduction**;137(5):835–42, 2009.

Gougeon A. Human ovarian follicular development: from activation of resting follicles to preovulatory maturation. **Ann Endocrinol (Paris)**, May;71(3):132-43, 2010.

Gouveia BB, et al. Involvement of PTEN and FOXO3a Proteins in the Protective Activity of Protocatechuic Acid Against Cisplatin-Induced Ovarian Toxicity in Mice. **Reprod Sci**. Mar;28(3):865-876, 2021.

Griffiths MJ; Winship AL; Hutt KJ. Do cancer therapies damage the uterus and compromise fertility? **Hum Reprod Update**. Feb 28;26(2):161-173, 2020.

Guo Y, et al. Traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicology of the genus *Cimicifuga*: A review. **J Ethnopharmacol**. Sep 14;209:264-282, 2017.

Han HS, et al. Analysis of chemotherapy-induced amenorrhea rates by three different anthracycline and taxane containing regimens for early breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**. May;115(2):335-42, 2009.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer: The next Generation. **Cell** 144(5): 646-67, 2011.

Hansen KR, et al. A new model of reproductive aging: the decline in ovarian non-growing follicle number from birth to menopause. **Hum Reprod**;23(3):699–708, 2008.

Hirshfield, A. N. Granulosa cell proliferation in very small follicles of cycling rats studied by long-term continuous tritiated-thymidine infusion. **Biology of reproduction**, v. 41, n. 2, p. 309-316, 1989.

Hostanska, K., et al. Evaluation of cell death caused by triterpene glycosides and phenolic substances from *Cimicifuga racemosa* extract in human MCF-7 breast cancer cells. **Biological & pharmaceutical bulletin**, 27(12), 1970–1975, 2004.

Hsueh AJ, et al. Intraovarian control of Early folliculogenesis. **Endocr Rev** 36(1):1–24, 2015.

Hussein MR. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. **Hum Reprod Update**. v.11, n. 2, p.162-77, 2005.

Hutt, K. J.; Albertini, D. F. An oocentric view of folliculogenesis and embryogenesis. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 14, n. 6, p. 758–764, 2007.

Huyen, C., et al. Chemical Constituents from *Cimicifuga dahurica* and Their Anti-Proliferative Effects on MCF-7 Breast Cancer Cells. **Molecules** (Basel, Switzerland), 23(5), 1083, 2018.

Ireland JJ, et al. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. **Hum Reprod**, Jun;22(6):1687-95, 2007.

Ireland JL, et al. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. **Biol Reprod**;79(6):1219–25, 2008.

Findlay, J.K., et al. Chapter 1 - Follicle Selection in Mammalian Ovaries, Editor(s): Peter C.K. Leung, Eli Y. Adashi, *The Ovary* (Third Edition), Academic Press, Pages 3-21, 2019.

Jagarlamudi K, et al. Genetically modified mouse models for premature ovarian failure (POF). **Mol Cell Endocrinol**;315(1–2):1–10, 2010.

Jagarlamudi, K.; Rajkovic, A. Oogenesis: Transcriptional regulators and mouse models. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 356, n. 1–2, p. 31–39, 2012.

Jiao, Y. F., et al. Methylcytosine Ameliorates Dextran-Sulfate-Sodium-Induced Colitis in Mice by Inhibiting the Inflammatory Response. **Molecules** (Basel, Switzerland), 23(3), 510, 2018.

Katz-Jaffe MG, et al. Antioxidant Intervention Attenuates Aging-Related Changes in the Murine Ovary and Oocyte. **Life (Basel)**. Oct 22;10(11):250, 2020.

Kaygusuzoglu E, et al. Zingerone ameliorates cisplatin-induced ovarian and uterine toxicity via suppression of sex hormone imbalances, oxidative stress, inflammation and apoptosis in female wistar rats. **Biomed Pharmacother**. Jun;102:517-530, 2018.

Khallaf SM, Roshdy J, Ibrahim A. Pegylated liposomal doxorubicin in patients with metastatic triple-negative breast cancer: 8-year experience of a single center. **J Egypt Natl Canc Inst**. Apr 27;32(1):20, 2020.

Kim CD, et al. Inhibition of mast cell-dependent allergy reaction by extract of black cohosh (*Cimicifuga racemosa*). *Immunopharmacol Immunotoxicol*. May;26(2):299-308, 2004.

Kim SY, et al. Cell autonomous phosphoinositide 3-kinase activation in oocytes disrupts normal ovarian function through promoting survival and overgrowth of ovarian follicles. *Endocrinology*; 156(4):1464–76, 2015.

Kroemer, G.; Mariño, G.; Levine, B. Autophagy and the Integrated Stress Response. **Molecular Cell**, v. 40, n. 2, p. 280–293, 2010.

Kubeček, et al. Extracorporeal Elimination of Circulating Pegylated Liposomal Doxorubicin (PLD) to Enhance the Benefit of Cytostatic Therapy in Platinum-Resistant Ovarian Cancer Patients. **Acta Medica** (Hradec Kralove, Czech Republic), 2015.

Kumar R, Joy KP. Melanins as biomarkers of ovarian follicular atresia in the catfish *Heteropneustes fossilis*: biochemical and histochemical characterization, seasonal variation and hormone effects. **Fish Physiol Biochem**. Jun;41(3):761-72, 2015.

Kumar TR, Wang Y, Lu N, Matzuk MM. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility, **Nat Genet**;15(2):201–4, 1997.

Lee, Y. S., Choi, E. M. Actein isolated from black cohosh promotes the function of osteoblastic MC3T3-E1 cells. **Journal of medicinal food**, 17(4), 414–423, 2014.

- Letourneau JM, et al. Acute ovarian failure underestimates age-specific reproductive impairment for young women undergoing chemotherapy for cancer. **Cancer**. Apr 1;118(7):1933-9, 2012.
- Li X, et al. Anticancer efficiency of cycloartane triterpenoid derivatives isolated from *Cimicifuga yunnanensis* Hsiao on triple-negative breast cancer cells. **Cancer Manag Res**. Dec 6;10:6715-6729, 2018.
- Liew SH, et al. Loss of the proapoptotic BH3-only protein BCL-2 modifying factor prolongs the fertile life span in female mice. *Biol Reprod*;90(4):77, 2014.
- Lins TLBG, et al. Rutin prevents cisplatin-induced ovarian damage via antioxidant activity and regulation of PTEN and FOXO3a phosphorylation in mouse model. **Reprod Toxicol**. Dec;98:209-217, 2020.
- Liske E, et al. Physiological investigation of a unique extract of black cohosh (*Cimicifugae racemosae rhizoma*): a 6-month clinical study demonstrates no systemic estrogenic effect. *J Womens Health Gen Based Med*. Mar;11(2):163-74, 2002.
- Liu, S. et al. Effects of standardized isopropanolic black cohosh and estrogen on salivary function in ovariectomized rats, **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Volume 97, Pages 1438-1444, 2018.
- Maidarti M, Anderson RA, Telfer EE. Crosstalk between PTEN/PI3K/Akt Signalling and DNA Damage in the Oocyte: Implications for Primordial Follicle Activation, Oocyte Quality and Ageing. **Cells**, Jan 14;9(1):200, 2020.
- Maruzzo M, et al. Adjuvant and neoadjuvant chemotherapy for soft tissue sarcomas. **Curr Med Chem**.;20(5):613-20, 2013.
- Matsuda F, et al. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. **J Reprod Dev**. v. 58, [s.n.], p.44-50, 2012.
- Mccully, J. D. et al. Differential contribution of necrosis and apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion injury. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 286, n. 5 55-5, 2004.
- McKenna DJ, et al. Black cohosh: efficacy, safety, and use in clinical and preclinical applications. *Altern Ther Health Med*. 001 May-Jun;7(3):93-100, 2001.
- Minotti G, et al. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Pharmacol Rev**; 56: 185–229, 2004.
- Mobaraki, et al Molecular Mechanisms of Cardiotoxicity: A Review on the Major Side-effect of Doxorubicin. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 79, n. 3, p. 335-344, 2017.
- Morelli, V.; Naquin, C. Alternative therapies for traditional disease states: menopause. **American family physician**, v. 66, n. 1, p. 129-134, 2002.

- Morgan S, et al. How do chemotherapeutic agents damage the ovary? **Hum Reprod Update**, Sep-Oct;18(5):525-35, 2012.
- Moser C, et al. Antidiabetic effects of the *Cimicifuga racemosa* extract Ze 450 in vitro and in vivo in ob/ob mice. **Phytomedicine**. Sep 25;21(11):1382-9, 2014.
- Nadaoka I, et al. Oral administration of *Cimicifuga racemosa* extract attenuates immobilization stress-induced reactions. *Nat Prod Commun*. Jan;7(1):15-8, 2012.
- Nagata S. DNA degradation in development and programmed cell death. **Annu. Rev. Immunol.** 23:853–75, 2005.
- Nagata S. Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. **Annu Rev Immunol**. Apr 26;36:489-517, 2018.
- Niringiyumukiza JD, et al. Protective properties of glycogen synthase kinase-3 inhibition against doxorubicin-induced oxidative damage to mouse ovarian reserve. **Biomed Pharmacother**. Aug;116:108963, 2019.
- Niu, W.; Spradling, A.C. Two distinct pathways of pregranulosa cell differentiation support follicle formation in the mouse ovary, **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 117, n. 33. 2020, p. 20015-20026. <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.2005570117>.
- Noguchi, M., et al. Vasoactive effects of cimicifugic acids C and D, and fukinolic acid in *Cimicifuga* rhizome. **Biol. Pharm. Bull.** 21 (11), 1163–1168, 1998.
- Ojeda S.R., Urbanski H.F., Ahmed C.E. The onset of female puberty: studies in the rat. In *Proceedings of the 1985 Laurentian hormone conference*. **Academic Press**. p. 385-442. 1986. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-571142-5.50013-6>.
- Oktem, O.; Oktay, K. A novel ovarian xenografting model to characterize the impact of chemotherapy agents on human primordial follicle reserve. **Cancer Res.** 67, 10159–10162, 2007.
- Oliveira, J. M. Eficácia e segurança do fitomedicamento aplace® (*cimicifuga racemosa*) em ensaio pré-clínico de periodontite: análise do envolvimento do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α). Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de PósGraduação em Biotecnologia – **Universidade Federal do Ceará**, Sobral, p. 71, 2013.
- Ong, S., et al. Focus on Formononetin: Anticancer Potential and Molecular Targets. **Cancers** (Basel), 2019.
- Oshio, L. T. Métodos em Toxicologia do Sistema Reprodutor Masculino e Fertilidade em Roedores. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 1, n. 3, 2009.
- Pampanini, V. et al. Impact of first-line cancer treatment on the follicle quality in cryopreserved ovarian samples from girls and young women. *Human Reproduction*, v. 34, n. 9, p. 1674–1685, 2019.

Pkhaladze L, et al. *Actaea racemosa* L. Is More Effective in Combination with *Rhodiola rosea* L. for Relief of Menopausal Symptoms: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Pharmaceuticals (Basel)*. May 21;13(5):102, 2020.

Powell, S. L., et al. In vitro serotonergic activity of black cohosh and identification of N(omega)-methylserotonin as a potential active constituent. **Journal of agricultural and food chemistry**, 56(24), 11718–11726, 2008.

Pugazhendhi A, et al. Toxicity of Doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems. **Life Sci**. May 1;200:26-30, 2018.

Pulido, R. PTEN inhibition in human disease therapy. **Molecules**, v. 23, n. 2, 2018.

Rabenau M, et al. Metabolic switch induced by *Cimicifuga racemosa* extract prevents mitochondrial damage and oxidative cell death. *Phytomedicine*. 2019 Jan;52:107-116, 2019.

Rad P, et al. Preserved Ovarian Function After Toxicity With Doxorubicin in Rats: Protective Effect of *Nasturtium officinale* Extract. *IJT.*; 15 (1): 57-64, 2021.

Reddy, P., et al. Oocyte-specific deletion of pten causes premature activation of the primordial follicle pool, **Phytomedicine**. Volume 52, 2019, Pages 107-116, 2008.

Reddy, P. et al. PDK1 signaling in oocytes controls reproductive aging and lifespan by manipulating the survival of primordial follicles. *Human Molecular Genetics*, v. 18, n. 15, p. 2813–2824, 2009.

Rimon-Dahari, N. et al. Ovarian folliculogenesis. In: *Results and Problems in Cell Differentiation*. [s.l: s.n.]. v. 58p. 167–190, 2016.

Rocca, M. S.; Wehner N G. The Guinea Pig as an Animal Model for Developmental and Reproductive Toxicology Studies. **Birth Defects Research**, v. 86, p. 92–97, 2009.

Ruan X, et al. Benefit-risk profile of black cohosh (isopropanolic *Cimicifuga racemosa* extract) with and without St John's wort in breast cancer patients. *Climacteric*. 2019 Aug;22(4):339-347.

Ruhlen RL, Sun GY, Sauter ER. Black Cohosh: Insights into its Mechanism(s) of Action. *Integrative Medicine Insights*, 2008.

Rüsse, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliotheca Anatomica**, v. 24, [s.n.], p. 77-92, 1983.

Samare-Najaf M, Zal F, Safari S. Primary and Secondary Markers of Doxorubicin-Induced Female Infertility and the Alleviative Properties of Quercetin and Vitamin E in a Rat Model. **Reprod Toxicol**. Sep;96:316-326, 2020.

Sánchez, F.; Smitz, J. Molecular control of oogenesis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1822, p. 1896–1912, 2012.

Schmid D, Woehs F, Svoboda M, Thalhammer T, Chiba P, Moeslinger T. Aqueous extracts of *Cimicifuga racemosa* and phenolcarboxylic constituents inhibit production of

proinflammatory cytokines in LPS-stimulated human whole blood. **Can J Physiol Pharmacol.** Nov;87(11):963-72, 2009.

Shin JJ, et al. Amenorrhea and Menopause in Patients with Breast Cancer after Chemotherapy. **J Breast Cancer.** Nov 13;22(4):624-634, 2019.

Shukla A, et al. Blocking of ERK1 and ERK2 sensitizes human mesothelioma cells to doxorubicin. *Mol Cancer [Internet] BioMed Central Ltd.* 2010.

Silva EF, et al. DNA-doxorubicin interaction: New insights and peculiarities. **Biopolymers,** Mar;107(3), 2017.

Silva JRV, et al. Interleukin-1 β and TNF- α systems in ovarian follicles and their roles during follicular development, oocyte maturation and ovulation. **Zygote.** Aug;28(4):270-277, 2020.

Silva, J.R.V.; Van Den Hurk, R.; Figueiredo, J.R. Ovarian follicle development in vitro and oocyte competence: advances and challenges for farm animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 55, p. 123-135, 2016.

Soleimani R, et al. Mechanisms of chemotherapy-induced human ovarian aging: double strand DNA breaks and microvascular compromise. **Aging (Albany NY)**, Aug;3(8):782-93, 2011.

Soloman R, Gabizon AA. Clinical pharmacology of liposomal anthracyclines: focus on pegylated liposomal Doxorubicin. **Clin Lymphoma Myeloma.** Feb;8(1):21-32, 2008.

Son WY, et al. Mechanisms of follicle selection and development. **Minerva Ginecol;**63(2): 89–102, 2011.

Spears N, et al. Ovarian damage from chemotherapy and current approaches to its protection. **Hum Reprod Update,** Nov 5;25(6):673-693, 2019.

Stump. P. et al. Developmental and Reproductive Toxicology. In Faqi, A. S. A Comprehensive E Guide To Toxicology In Preclinical Drug Development. 1ª Edição, **Editora Elsevir**, pp. 336-360, 2013.

Suh KS, et al. Deoxyactein protects pancreatic β -cells against methylglyoxal-induced oxidative cell damage by the upregulation of mitochondrial biogenesis. *Int J Mol Med.* Aug;40(2):539-548, 2017.

Sun J, Li X, Growth and antrum formation of bovine primary follicles in long-term culture in vitro. **Reprod Biol.** 13 221-228, 2013.

Sun Y, et al. Black Cohosh Ameliorates Metabolic Disorders in Female Ovariectomized Rats. **Rejuvenation Res.** Jun;19(3):204-14, 2016.

Sung H, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin,* Feb 4, 2021.

- Titus S, et al. Individual-oocyte transcriptomic analysis shows that genotoxic chemotherapy depletes human primordial follicle reserve in vivo by triggering proapoptotic pathways without growth activation. **Sci Rep**. Jan 11;11(1):407, 2021.
- Tokunaga H, et al. The 2020 Japan Society of Gynecologic Oncology guidelines for the treatment of ovarian cancer, fallopian tube cancer, and primary peritoneal cancer. **J Gynecol Oncol**. Mar;32(2):e49, 2021.
- Tossetta G, et al. Role of NRF2 in Ovarian Cancer. *Antioxidants (Basel)*. Mar 30;11(4):663, 2022.
- Uruno A, et al., Nrf2 Suppresses Oxidative Stress and Inflammation in *App* Knock-In Alzheimer's Disease Model Mice. **Mol Cell Biol**. Feb 27;40(6):e00467-19, 2020.
- van Breemen RB, et al. Pharmacokinetics of 23-epi-26-deoxyactein in women after oral administration of a standardized extract of black cohosh. **Clin Pharmacol Ther**. 2010 Feb;87(2):219-25, 2010.
- van de Loo LEXM, et al. Uterine function, pregnancy complications, and pregnancy outcomes among female childhood cancer survivors. **Fertil Steril**. Feb;111(2):372-380, 2019.
- Van den Hurk, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1717-1751, 2005.
- Varela-López A, et al. An update on the mechanisms related to cell death and toxicity of doxorubicin and the protective role of nutrients. **Food Chem Toxicol**. Dec;134:110834, 2019.
- Wallace WH, Kelsey TW. Human ovarian reserve from conception to the menopause. **PloS One**, 5:e8772, 2010.
- Wang C, et al. Effect of cimicifuga racemosa on menopausal syndrome caused by LHRH-a in breast cancer. *J Ethnopharmacol*. 2019 Jun 28;238:111840, 2019.
- Wang, Y., et al. Formononetin attenuates IL-1beta-induced apoptosis and NF-kappaB activation in INS-1 cells. **Molecules** 17, 10052–10064, 2012.
- Wang, Y. et al. Doxorubicin obliterates mouse ovarian reserve through both primordial follicle atresia and overactivation. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 381, p. 114714, 2019.
- West KA, Castillo SS, Dennis PA. Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance. **Drug Resist Updat**. ;5(6):234–48, 2002.
- Wigner, P., et al. Doxorubicin–transferrin conjugate alters mitochondrial homeostasis and energy metabolism in human breast cancer cells. **Sci Rep** 11, 4544, 2021.
- Xiao S, et al. Doxorubicin Has Dose-Dependent Toxicity on Mouse Ovarian Follicle Development, Hormone Secretion, and Oocyte Maturation. **Toxicol Sci**. Jun 1;157(2):320-329, 2017.

Xu, N., An, J. Formononetin ameliorates mast cell-mediated allergic inflammation via inhibition of histamine release and production of pro-inflammatory cytokines. **Experimental and therapeutic medicine**, 14(6), 6201–6206, 2017.

Yajid, A., et al. Potential Benefits of *Annona muricata* in Combating Cancer: A Review. **The Malaysian journal of medical sciences : MJMS**, 25(1), 5–15, 2018.

Yang, C.L.H., et al. Identification of the bioactive constituent and its mechanisms of action in mediating the antiinflammatory effects of black cohosh and related *Cimicifuga* species on human primary blood macrophages. **J. Med. Chem.** 52 (21), 6707–6715, 2009.

Ye W, et al. What Changed on the Folliculogenesis in the Process of Mouse Ovarian Aging? **Biomed Res Int.** Apr 1;2019:3842312, 2019.

Yeo W, et al. Menopausal symptoms in relationship to breast cancer-specific quality of life after adjuvant cytotoxic treatment in young breast cancer survivors. **Health Qual Life Outcomes.** Feb 10;18(1):24, 2020

Yuan J, et al. Effects of 23-epi-26-deoxyactein on adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes and diet-induced obesity in C57BL/6 mice. *Phytomedicine.* Jun 5;76:153264, 2020.

Yue, GL. et al. New potential beneficial effects of actein, a triterpene glycoside isolated from *Cimicifuga* species, in breast cancer treatment. **Sci Rep** 6, 35263, 2016.

Zhang FP, et al. Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice. *Mol Endocrinol*; 15(1):172–83, 2001.

Zhang H, et al. Somatic cells initiate primordial follicle activation and govern the development of dormant oocytes in mice. **Curr Biol**; 24(21):2501–8, 2014.

Zhang LL, et al. Synergistic anti-tumor activity and mechanisms of total glycosides from *Cimicifuga dahurica* in combination with cisplatin. **Chin J Integr Med.** Jan 29, 2016.

Zhang, Y., et al. The combinatory effects of natural products and chemotherapy drugs and their mechanisms in breast cancer treatment. *Phytochemistry Reviews*, 2019.

Zheng, W. et al. Two classes of ovarian primordial follicles exhibit distinct developmental dynamics and physiological functions, **Human Mol.Genet.**, v. 23, n. 4, p. 920–928. 2014. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt486>.

Zhou Y, et al. HEATR1 deficiency promotes pancreatic cancer proliferation and gemcitabine resistance by up-regulating Nrf2 signaling. **Redox Biol.** Jan;29:101390, 2020.

Zhou, J.; PENG, X.; MEI, S. Autophagy in ovarian follicular development and Atresia. **International Journal of Biological Sciences**, v. 15, n. 4, p. 726–737, 2019.

ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
Campus de Sobral – Faculdade de Medicina
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada: "Avaliação da ação da *Cimicifuga racemosa* L. sobre a toxicidade ovariana induzida por doxorubicina e dexametasona em camundongas", registrada com o nº de Projeto 01/21, sob a responsabilidade da **Prof. Dr. Anderson Weiny Barbalho Silva** envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) *Campus Sobral*, em reunião de 02/03/2021.

| | |
|-------------------------|---|
| Finalidade | () Ensino (x) Pesquisa Científica |
| Vigência da autorização | 09/03/2021 até 01/03/2023 |
| Espécie/linhagem/raça | <i>Mus musculus</i> / Camundongos heterogênicos Swiss |
| Nº de animais | 203 (duzentos e três) |
| Peso/Idade | 20-25 g / 2 meses |
| Sexo | ♀ Fêmeas |
| Origem | Biotério Central de Fortaleza |

Sobral, 09 de março de 2021.


 Prof. Igor Iuço Castro da Silva
 Professor de Regulação Superior
 Curso de Farmácia - UNIFOR
 2º - Campus Sobral

Prof. Dr. Igor Iuço Castro da Silva
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA