



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

MOISÉS BRUNO MARINHO ROCHA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA PIPERINA EM REDUZIR OS EFEITOS
ADVERSOS CAUSADOS PELA DOXORRUBICINA EM TECIDO OVARIANO
DE CAMUNDONGOS FÊMEAS**

SOBRAL
2023

MOISÉS BRUNO MARINHO ROCHA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA PIPERINA EM REDUZIR OS EFEITOS
ADVERSOS CAUSADOS PELA DOXORRUBICINA EM TECIDO OVARIANO DE
CAMUNDONGOS FÊMEAS

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. José Roberto Viana Silva.

Co-orientador: Prof. Dr. Anderson Weiny Barbalho Silva.

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)

R574a Rocha, Moisés
Bruno Marinho.

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA PIPERINA EM REDUZIR OS EFEITOS
ADVERSOS CAUSADOS PELA DOXORRUBICINA EM TECIDO OVARIANO DE
CAMUNDONGOS FÊMEAS /

Moisés Bruno Marinho Rocha. – 2023.

68 f. : il. color.

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

Orientação: Prof. Dr. José Roberto Viana

Silva. Coorientação: Prof. Dr. Anderson

Weiny Barbalho Silva.

1. Piperina. 2. Doxorubicina. 3. Gonadotoxicidade. 4. Fertilidade. 5. Modelo in vivo. I.
Título.

CDD 660.6

MOISÉS BRUNO MARINHO ROCHA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA PIPERINA EM REDUZIR OS EFEITOS
ADVERSOS CAUSADOS PELA DOXORRUBICINA EM TECIDO OVARIANO DE
CAMUNDONGOS FÊMEAS

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. José Roberto Viana Silva (Orientador)

Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Anderson Weiny Barbalho Silva (Co-orientador)

Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Geovany Amorim Gomes (Examinador)

Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA

Prof. Dra. Alana Nogueira Godinho (Examinadora)

Universidade Federal do Ceará – UFC

*Dedico este trabalho,
primeiramente, a Deus, aos meus pais
que são essenciais em minha vida e aos
meus professores que foram primordiais
para meu desenvolvimento.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, por ser essencial em minha vida, quem me deu força para seguir em frente.

A minha família por todo apoio e investimento em mim. Mãe, por ter sido pessoa fundamental nessa trajetória pelo excessivo cuidado comigo. Pai, pelo cuidado e por me dá esperança de um futuro profissional.

A minha esposa Débora Couto Marques que ao longo de todo o mestrado esteve sempre me apoiando a superar todas minhas inseguranças, sempre presente nos momentos de dificuldade.

Agradeço também ao meu orientador, Prof. Dr. José Roberto Viana Silva e ao coorientador, Prof. Dr. Anderson Weiny Barbalho Silva pelo convívio, compreensão e apoio nesse momento final.

A minha banca examinadora pela presença e sugestões de melhoria do meu trabalho de conclusão de curso de mestrado. É um prazer tê-los na minha banca examinadora.

A todos os professores do curso sejam internos e/ou externos ao programa que foram pessoas importantes para minha formação acadêmica.

Ao Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia Reprodutiva – LABIREP e ao Núcleo de Pesquisa em Experimentação Animal – NUPEX, que me acolheram e auxiliaram nos demais experimentos e na trajetória de produção escrita durante o curso.

Aos meus colegas de curso, que ao longo desses anos estiveram comigo em todos os momentos felizes e em todos os momentos difíceis.

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.

Enfim, muito obrigado a todos que contribuíram para elaboração deste estudo e para minha formação profissional.

RESUMO

O uso de quimioterápicos tem ocasionado problemas de fertilidade nos últimos anos, assim, os produtos naturais surgem como um potencial fator farmacológico capaz de reduzir os danos ovarianos *in vivo*. Dessa forma, esta proposta objetivou avaliar a ação da piperina (PIP) sob a toxicidade ovariana induzida por doxorubicina (DOX) em camundongos fêmeas, utilizando o modelo *in vivo*. Para tanto, esse projeto foi submetido à apreciação ética pela CEUA da Universidade Federal do Ceará *campus* de Sobral e aprovado sob o protocolo N° 08/21. Foi realizado o seguinte protocolo experimental: os animais receberam uma dose única de DOX e foram tratados durante 10 dias por via oral (gavagem) com PIP. A experimentação seguiu a partir da avaliação dos seguintes grupos (n=6/grupo): (Grupo 1) Controle Negativo (DMSO); (Grupo 2) Controle Positivo (NAC (150 mg/kg) + DOX (10 mg/kg); (Grupo 3) DOX (10 mg/kg); (Grupo 4) PIP 0,1 + DOX (10 mg/kg); (Grupo 5) PIP 1,0 + DOX (10 mg/kg); (Grupo 6) PIP 10,0 + DOX (10 mg/kg); (Grupo 7) PIP 0,1; (Grupo 8) PIP 1,0; (Grupo 9) PIP 10,0. Os ovários foram destinados para as análises histológicas, de colágeno, além de análise bioquímica e expressão relativa por PCR em tempo real para enzimas antioxidantes. As porcentagens de folículos foram avaliadas pelo teste qui-quadrado. Os dados de fibras colágenas e densidade celular do estroma foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação de Dunn e $p \leq 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os dados obtidos sugerem que a PIP (0,1, 1 e 10 mg/kg) não possui efeitos tóxicos sobre os folículos ou tecido ovariano em camundongos e contribui aumentando as taxas de crescimento e sobrevivência folicular *in vivo*. Quando administrado associado a DOX (10 mg/kg), a PIP (0,1 mg/kg) foi capaz de diminuir os efeitos deletérios nas células do estroma ovariano e capaz de manter o desenvolvimento folicular. Na avaliação bioquímica de enzimas antioxidantes, a presença de DOX não afetou negativamente, enquanto a presença de PIP protegeu contra os danos causados por estes fármacos. Além disso, a expressão gênica mostrou que a capacidade antioxidante foi determinante mostrando que a PIP (0,1 mg/kg) possuía melhor capacidade antioxidante frente aos danos causados pela DOX. Diante do exposto, podemos concluir que a PIP 0,1 mg/kg sugerem um efeito protetivo ao ovário de camundongos fêmeas tratadas com DOX.

Palavras-chave: Doxorubicina; Piperina; Gonadotoxicidade; Fertilidade; Modelo *in vivo*.

ABSTRACT

The use of chemotherapy drugs has caused fertility problems in recent years, therefore, natural products emerge as a potential pharmacological factor capable of reducing ovarian damage *in vivo*. Therefore, this proposal aimed to evaluate the action of piperine (PIP) on ovarian toxicity induced by doxorubicin (DOX) in female mice, using the *in vivo* model. To this end, this project was submitted to ethical assessment by the CEUA of the Federal University of Ceará, Sobral campus and approved under protocol No 08/21. The following experimental protocol was carried out: the animals received a single dose of DOX and were treated for 10 days orally (gavage) with PIP. The experiment continued based on the evaluation of the following groups (n=6/group): (Group 1) Negative Control (DMSO); (Group 2) Positive Control (NAC (150 mg/kg) + DOX (10 mg/kg); (Group 3) DOX (10 mg/kg); (Group 4) PIP 0.1 + DOX (10 mg/kg); (Group 5) PIP 1.0 + DOX (10 mg/kg); (Group 6) PIP 10.0 + DOX (10 mg/kg); (Group 7) PIP 0.1; (Group 8) PIP 1.0; (Group 9) PIP 10.0. The ovaries were used for histological and collagen analyses, in addition to biochemical analysis and relative expression by real-time PCR for antioxidant enzymes. The percentages of follicles were evaluated by the chi test -square. Data on collagen fibers and stromal cell density were analyzed using the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's comparison test and $p \leq 0.05$ was considered statistically significant. The data obtained suggest that PIP (0.1, 1 and 10 mg/kg) does not have toxic effects on follicles or ovarian tissue in mice and contributes to increasing follicular growth and survival rates *in vivo*. When administered in combination with DOX (10 mg/kg), PIP (0.1 mg/kg) was able to reduce the deleterious effects on ovarian stromal cells and was able to maintain follicular development. In the biochemical evaluation of antioxidant enzymes, the presence of DOX did not affect negatively, while the presence of PIP protected against damage caused by these drugs. Furthermore, gene expression showed that antioxidant capacity was decisive, showing that PIP (0.1 mg/kg) had better antioxidant capacity against the damage caused by DOX. Given the above, we can conclude that PIP 0.1 mg/kg suggests a protective effect on the ovaries of female mice treated with DOX.

Keywords: Doxorubicin; Piperine; Gonadotoxicity; Fertility; *In vivo* model.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processo de foliculogênese em murinos	19
Figura 2 - Fontes exógenas e endógenas de espécies reativas de oxigênio (EROS)	24
Figura 3 - Os mecanismos de dano ao ovário induzido pela quimioterapia. (A) Agentes quimioterápicos gonadotóxicos, como a doxorrubicina, causam danos em oócitos de folículos primordiais (B) A quimioterapia pode levar à diminuição da reserva de folículos primordiais através de mecanismos diretos agudos e indiretos retardados	25
Figura 4 - Imagem da <i>Piper nigrum</i>	27
Figura 5 - Fórmula estrutural da piperina	28
Figura 6 - Fórmula estrutural de DPPH e ABTS	29

LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 1

<p>Figure 1 - Experimental design. DMSO: Dimethylsulfoxide; NaCl: Sodium chloride; NAC: N-acetylcysteine; DOX: Doxorubicin; PIP: Piperine</p>	40
<p>Figure 2 - Percentage of normal and degenerated follicles evaluated by classical histology, hematoxylin and eosin staining. Ovaries were divided into PIP + DOX (0.1, 1, 10 mg/kg) and PIP (0.1, 1, 10 mg/kg) groups. a and b indicate statistically significant differences between treatments (P <0.05)</p>	46
<p>Figure 3 - Percentage (mean ± SE) of primordial follicles (A) and developing follicles (B). a and b indicate statistically significant differences between treatments (P <0.05)</p>	47
<p>Figure 4 - The levels of collagen fibers (mean ± SD) in mice ovaries induced to chemotherapy with DOX (10 mg/kg) or induced and treated with PIP (0.1, 1 and 10 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). a and b indicate statistically significant differences between treatments</p>	48
<p>Figure 5 - The levels of collagen fibers (mean ± SD) in mice ovaries induced to chemotherapy in: (A) control; (B) NAC + DOX (10 mg/kg); (C) DOX (10 mg/kg); (D) PIP (0.1 mg/kg) + DOX (10 mg/kg); (E) PIP (1 mg/kg) + DOX (10 mg/kg); (F) PIP (10 mg/kg) + DOX (10 mg/kg); (G) PIP (0.1 mg/kg); (H) PIP (1 mg/kg) and (I) PIP (10 mg/kg). Scale bar: 100 μm (400×)</p>	49
<p>Figure 6 - Stromal cell density in mice ovaries induced to chemotherapy with DOX (10 mg/kg) or induced and treated with PIP (0.1, 1 and 10 mg/kg). 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)</p>	50

Figure 7 - Representative images of ovarian stromal density in: (A) control; (B) NAC + DOX (10 mg/kg); (C) DOX (10 mg/kg); (D) PIP (0.1 mg/kg) + DOX (10 mg/kg); (E) PIP (1 mg/kg) + DOX (10 mg/kg); (F) PIP (10 mg/kg) + DOX (10 mg/kg); (G) PIP (0.1 mg/kg); (H) PIP (1 mg/kg) and (I) PIP (10 mg/kg). Scale bar: 100 μm (400 \times) 51

Figure 8 - Biochemical evaluation of SOD, CAT and THIOL in plasma of mice induced to chemotherapy with DOX (10 mg/kg) or induced and treated with PIP (0.1 mg/kg). Biochemistry was analyzed using the Kruskal-Wallis test, followed by the Dunn comparison. a and b, different lowercase letters indicate statistically significant differences between treatments ($p < 0.05$) 52

Figure 9 - The levels of mRNA for (A) CAT, (B) SOD and (C) NRF2 in mice ovaries (n=4 ovaries per treatment) treated with Control (DMSO), DOX (10 mg/kg), DOX + PIP 0,1 mg/kg and PIP 0,1 mg/kg. Levels of mRNA for CAT, SOD and NRF2 were analyzed by the Kruskal-Wallis test, followed by the Dunn comparison. a, b different lowercase letters indicate significant difference between treatments ($p < 0,05$) 53

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Drogas quimioterápicas e seus mecanismos de ação	21
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ABTS	Capacidade de remoção de radical orgânico
BAX	Proteína X associada a bcl-2
Bcl-2	Célula-B de Linfoma 2
CAT	Catalase
CG	Células da granulosa
CGPs	Células germinativas primordiais
CT	Células da teca
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picrylhydrazil
DOXO	Doxorrubicina
EROS	Espécies reativas de oxigênio
ERON	Espécies reativas de óxido de nitrogênio
IgE	Imunoglobulina E
IL-1 β	Interleucina 1 Beta
IOP	Insuficiência Ovariana Prematura
MEC	Matriz extracelular
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
NAC	N-acetilcisteína
NaCl	Cloreto de Sódio
O ₂	Oxigênio
OMS	Organização Mundial da Saúde
pH	Potencial Hidrogeniônico
PIP	Piperina
RNA	Ácido ribonucleico
SOD	Superóxido dismutase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
ZP	Zona pelúcida

LISTA DE SÍMBOLOS

<	Menor que
%	Porcentagem
μg	Micrograma
μm	Micrometros
g	Gramas
mg	Miligramma
mL	Mililitro
Mm	Milímetros
mM	Milimolar
ng	Nanograma
°C	Grau Celsius
α	Alfa
β	Beta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Oogênese e foliculogênese em mamíferos	17
2.2 Câncer e fertilidade feminina	20
2.3 Doxorrubicina e as espécies reativas ao oxigênio	22
2.4 Preservação da fertilidade em mulheres submetidas à quimioterapia	24
2.5 Piperina	26
2.6 Mecanismo de ação antioxidante da piperina	28
2.7 Efeitos antioxidantes <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> da piperina	30
3 JUSTIFICATIVA	32
4 HIPÓTESES	33
5 OBJETIVOS	34
5.1 Objetivo geral	34
5.2 Objetivos específicos	34
6 Capítulo 1: Protective effect of piperine on mice ovarian toxicity induced by doxorubicin	35
7 CONCLUSÕES GERAIS	59
8 PERSPECTIVAS	60
REFERÊNCIAS	61
ANEXO A - DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DO PROJETO "AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA PIPERINA EM REDUZIR OS EFEITOS ADVERSOS CAUSADOS PELA DOXORRUBICINA EM FOLÍCULOS OVARIANOS DE CAMUNDONGAS"	67

1 INTRODUÇÃO

As terapias utilizadas para o tratamento das doenças oncológicas envolvem medicamentos citotóxicos com alto poder de lesão às células germinativas, especialmente oócitos, gerando como processo final o bloqueio da foliculogênese e atresia folicular (VILAR *et al.*, 2018). O risco de infertilidade e os efeitos gonadotóxicos dessas drogas dependem dos medicamentos usados, das doses administradas e da idade da paciente no momento do tratamento. Nesse sentido, a proteção da reserva folicular ovariana se tornou uma das principais questões para preservar a fertilidade e aumentar a qualidade de vida das pacientes (SONIGO; BEAU; BINART; GRYNBERG, 2019).

Estudos revelam como as drogas quimioterápicas podem afetar os diferentes componentes celulares do ovário, causando rápida depleção da reserva folicular ovariana, causando insuficiência ovariana prematura ao induzir a morte e/ou ativação acelerada dos folículos primordiais e aumento da atresia de folículos em crescimento (SPEARS *et al.*, 2019). Dentre os quimioterápicos mais utilizados na prática clínica podemos destacar a doxorubicina (DOX). A DOX é um medicamento utilizado por muitos anos para tratar uma ampla variedade de cânceres, no entanto, seu uso é limitado devido à toxicidade significativa que pode ocorrer não apenas durante, mas também anos após o tratamento. Possui múltiplos mecanismos de ação, incluindo intercalação de DNA, inibição da topoisomerase II e produção de radicais livres (MOISEEVA *et al.*, 2023). Os efeitos adversos dessa substância incluem toxicidade ovariana em camundongos, reduzindo a taxa de ovulação e o tamanho dos ovários (WANG *et al.*, 2019), bem como a menopausa precoce e aumento da taxa de infertilidade em mulheres que mantêm a atividade ovariana após quimioterapia (WATSON; GADIKOTAB; BARLEVA; BECKERMANB, 2022). Assim, a compreensão detalhada das macromoléculas envolvidas nas interações entre as células somáticas e germinativas no curso da foliculogênese poderá permitir o estudo de folículos ovarianos como ponto de partida para a regulação da fertilidade dos mamíferos.

A quimioterapia induz falência ovariana, causando gonadotoxicidade por meio da estimulação do estresse oxidativo (NIRINGIYUMUKIZA *et al.*, 2019). Para contornar estes efeitos secundários e na tentativa de se encontrar alternativas eficazes para preservar a fertilidade de mulheres em idade reprodutiva que estiveram frente ao tratamento quimioterápico, os antioxidantes naturais têm sido apontados como alternativa promissora para

proteger as células ovarianas. A respeito da reprodução das fêmeas, as ações dos antioxidantes são de fundamental importância, visto que os níveis elevados das Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) quando presentes em excesso, podem comprometer vários aspectos, incluindo a foliculogênese, maturação, ovulação e luteólise (SILVA *et al.*, 2020). Assim, a investigação acerca de substâncias que possam bloquear ou reduzir os efeitos adversos causados por quimioterápicos, como a DOX, possui um grande potencial, podendo amenizar o impacto que esses fármacos têm na fertilidade feminina. Nesse sentido, o uso de compostos extraídos de especiarias, poderiam ser eficazes na prevenção da toxicidade causada pela DOX.

A piperina (PIP) é um componente bioativo presente na pimenta preta (*Piper nigrum*) e utilizado na medicina tradicional chinesa, possuindo atividades anti-inflamatórias, antioxidantes, analgésica e preventiva do câncer (KIM; SHIN; YOO; SHIN, 2018). Esta planta é comumente utilizada na medicina popular para aliviar dor, inflamação e para o tratamento de distúrbios menstruais (BAHRAMI *et al.*, 2022). No entanto, ainda há pouca investigação sobre a utilização dos seus compostos sobre a fertilidade feminina. Dada a importância do estudo, é necessária a investigação acerca da segurança do uso deste 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.

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi de investigar a ação da PIP em ovários de camundongos fêmeas induzidas à quimioterapia com DOX 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, desenvolvimento folicular, ativação e atresia folicular. Ainda sobre os aspectos que envolvem o câncer, impactos desses agentes quimioterápicos na saúde reprodutiva feminina, produtos naturais, como o composto PIP, além do modelo animal utilizado na experimentação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Oogênese e foliculogênese em mamíferos

O ovário dos mamíferos é um órgão heterogêneo que contém folículos ovarianos, corpo lúteo e vários tipos de células somáticas, e dividido em duas regiões distintas, uma porção cortical e uma medular. A região medular é composta de tecido conjuntivo frouxo vascularizado, repleto de vasos sanguíneos e linfáticos que promovem a nutrição e sustentação do órgão, já a cortical é onde encontra-se a população de folículos em diferentes estágios de desenvolvimento (MCKEY *et al.*, 2022). As funções do ovário estão relacionadas com a produção de hormônios e de oócitos maduros que permitem a perpetuação da espécie (ZHANG *et al.*, 2021).

No ovário ocorrem dois processos importantes, sendo eles, a oogênese e foliculogênese. A oogênese é o processo de formação dos oócitos, sendo um processo complexo que envolve várias etapas. Primeiramente, a formação de oócitos primários começa durante o desenvolvimento. Nesse estágio, as células germinativas primordiais se dividem por mitose para formar oócitos primários. Posteriormente ocorre a parada na prófase I, onde os oócitos primários ficam em estado de dormência na prófase I da meiose, isso significa que eles permaneceram parados no processo de divisão celular até serem ativados (ARHIN; LU; XI; JIN, 2018). Durante o ciclo, sob a influência de hormônios gonadotróficos, um ou mais folículos ovarianos começam a se desenvolver e a amadurecer em resposta aos sinais hormonais. Ocorre ainda a continuação da meiose I, quando o oócito que é ativado continua a meiose, chegando à metafase I, mas não completa a divisão. No ciclo, o folículo maduro se rompe, liberando o oócito secundário do ovário em um processo chamado ovulação. A conclusão da meiose II ocorre quando o oócito secundário completa a segunda divisão da meiose, tornando-se um oócito maduro (MERICCO *et al.*, 2021). Concomitante ao processo de oogênese tem-se a foliculogênese.

A foliculogênese é um processo preciso e ordenado que se inicia com a formação dos folículos primordiais e termina com o folículo pré-ovulatório (Figura 1) (POURJAFARI *et al.*, 2020). Os folículos ovarianos podem ser divididos em pré-antrais ou antrais. Os folículos pré-antrais, ou seja, aqueles que não possuem cavidade antral, são classificados em: primordiais, primários e secundários. Os folículos primordiais são considerados os estágios mais imaturos dos folículos ovarianos, nos quais os óvulos estão em desenvolvimento inicial.

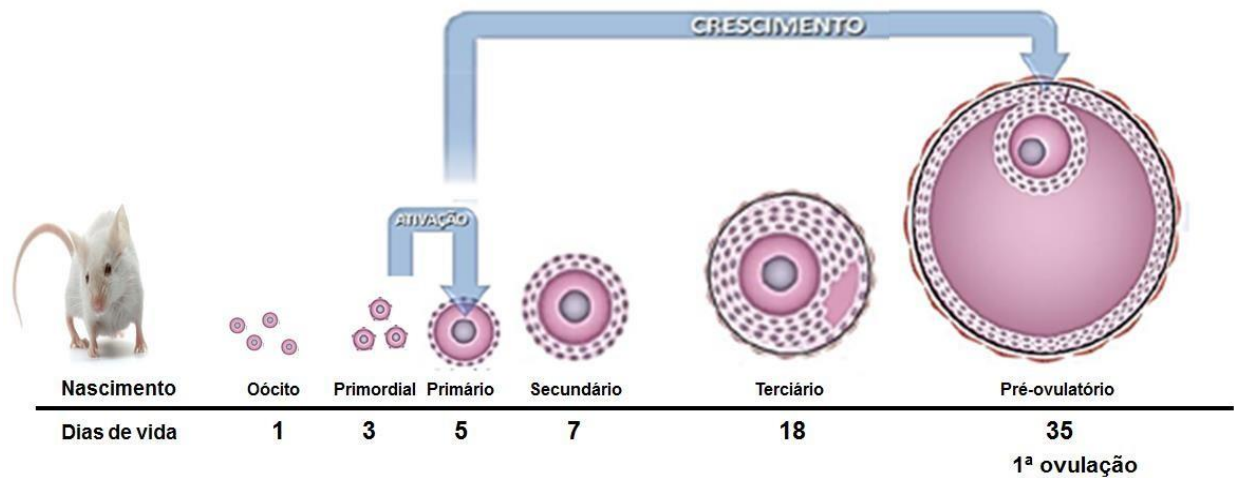
Cada folículo primordial é composto por um óvulo imaturo, também chamado de ovócito primário, que está envolto por uma camada de células achatadas chamadas de células foliculares planas. Os folículos primários são os estágios seguintes aos folículos primordiais durante o processo de desenvolvimento dos folículos ovarianos em mamíferos, incluindo camundongos. Eles representam uma etapa intermediária no amadurecimento dos folículos ovarianos (ZHANG *et al.*, 2022).

No estágio de folículo primário, as células foliculares ao redor do óvulo imaturo passam por alterações morfológicas e se tornam cuboidais ou colunares. Essas células formam uma camada mais espessa em torno do ovócito primário e são responsáveis por fornecer suporte nutricional e hormonal ao óvulo em desenvolvimento. Os folículos primários também exibem uma reorganização da zona pelúcida, uma matriz extracelular composta por glicoproteínas, que envolve o ovócito (ISOLA *et al.*, 2020).

Os folículos secundários são estágios posteriores de desenvolvimento dos folículos ovarianos em mamíferos, incluindo camundongos. Eles são uma etapa intermediária entre os folículos primários e os folículos terciários ou antrais. Durante a transição de folículos primários para secundários, ocorrem mudanças estruturais adicionais nos folículos ovarianos (COSTA *et al.*, 2022). Os folículos secundários são caracterizados pela presença de uma cavidade preenchida por líquido chamada de antro, que se forma entre as células foliculares. As células foliculares no folículo secundário se dividem e se organizam em camadas concêntricas ao redor do antro. A camada mais interna de células foliculares é chamada de granulosa, e a camada mais externa é a teca (OKUNOMIYA *et al.*, 2021).

Após o estágio dos folículos secundários, os folículos ovarianos passam para a fase de folículos antrais ou vesiculares. Os folículos antrais são caracterizados pela presença de um antro bem desenvolvido e preenchido por líquido folicular. É nessa fase que ocorre o maior crescimento e maturação dos folículos ovarianos. Os folículos antrais continuam a crescer em tamanho, impulsionados pelo acúmulo de líquido folicular no antro. As células da granulosa que circundam o ovócito se multiplicam e formam uma camada espessa. Essas células também se organizam em uma massa compacta chamada cumulus oophorus, que fica na parte superior do ovócito (FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

Figura 1: Processo de foliculogênese em murinos.



Fonte: Adaptado de SOUSA, 2013.

A população folicular é bastante variável entre as espécies, sendo população estimada em 1.500 em camundongos e 2.000.000 em mulheres (SHAW *et al.*, 2000; BETTERIDGE *et al.*, 1989; AMORIM *et al.*, 2000; LUCCI *et al.*, 1999; ERICKSON *et al.*, 1986). A reserva ovariana é influenciada pela idade, genética e variáveis ambientais. Embora seja um desafio prever a taxa de declínio da reserva ovariana de um indivíduo, dela está diretamente relacionada com a fertilidade (KALTSAS *et al.*, 2023). Além disso, no que se refere a idade, o envelhecimento reprodutivo em fêmeas de mamíferos é um processo irreversível associado ao declínio da qualidade do oócito, que é um fator limitante da taxa de fertilidade (BERTOLDO *et al.*, 2020).

Nos folículos ovarianos, podem ocorrer diferentes tipos de morte celular, incluindo apoptose e atresia folicular. Esses processos são essenciais para a regulação e controle do desenvolvimento dos folículos, garantindo a manutenção de um número adequado de folículos funcionais. A apoptose é um tipo de morte celular programada que ocorre naturalmente no desenvolvimento dos folículos ovarianos. Durante a apoptose, ocorrem alterações morfológicas nas células, como a condensação do núcleo e a fragmentação do DNA (ZHANG *et al.*, 2018). Esse processo é controlado por vias de sinalização intracelulares e envolve a ativação de proteases conhecidas como caspases, que desempenham um papel central na degradação das células. A apoptose dos folículos ovarianos pode ocorrer em diferentes estágios de desenvolvimento, desde os folículos primordiais até os folículos antrais. A apoptose é um mecanismo importante para eliminar folículos que não atingiram a maturação adequada ou que

apresentam danos no DNA, garantindo assim a seleção e sobrevivência dos folículos saudáveis (PAJOKH *et al.*, 2018).

A atresia folicular é um processo de degeneração dos folículos ovarianos que ocorre ao longo do tempo. Durante a atresia, os folículos ovarianos regridem e são reabsorvidos pelo organismo. Esse processo pode envolver a apoptose das células foliculares e do ovócito, além de alterações na vascularização e invasão de células imunes (SALES *et al.*, 2019). A regulação da apoptose e da atresia folicular nos folículos ovarianos é complexa e envolve a interação de diversos fatores, como hormônios, fatores de crescimento e sinalização local. Esses processos são cruciais para o equilíbrio entre a reserva de folículos ovarianos e a disponibilidade de folículos saudáveis para a ovulação e fertilidade (PEREIRA *et al.*, 2020).

2.2 Câncer e fertilidade feminina

Câncer é uma doença caracterizada pelo crescimento descontrolado e desordenado de células anormais no organismo. Essas células, conhecidas como células cancerígenas ou malignas, têm a capacidade de invadir tecidos e órgãos adjacentes, podendo também se espalhar para outras partes do corpo através da corrente sanguínea ou do sistema linfático. O câncer pode afetar qualquer parte do corpo e existem diferentes tipos de câncer, dependendo do local de origem das células malignas. Alguns exemplos comuns incluem câncer de mama, câncer de pulmão, câncer de próstata, câncer colorretal e câncer de pele, entre muitos outros, e, ainda, o câncer ainda disponibiliza possibilidades de tratamento, como exemplo, o processo quimioterápico (LEWANDOWSKA *et al.*, 2019).

A quimioterapia envolve o uso de substâncias citotóxicas, administradas principalmente por vias sistêmicas e seu uso ocasiona efeitos colaterais na medula óssea, ocasiona imunossupressão, toxicidade renal, cardiotoxicidade, toxicidade pulmonar, neurotoxicidade, lesão gonadal e esterilidade (LAI, 2018). A quimioterapia pode causar efeitos colaterais significativos, incluindo danos aos ovários e potencialmente levar à infertilidade feminina. As sequelas relacionadas à quimioterapia podem variar dependendo de vários fatores, como o tipo de quimioterapia utilizada, a dose administrada, a idade da paciente e a reserva ovariana inicial. A quimioterapia pode afetar a função ovariana e levar à diminuição da reserva de óvulos, resultando em uma diminuição da capacidade de conceber naturalmente ou de responder a técnicas de reprodução assistida (WALD *et al.*, 2019).

Os estudos que investigam os mecanismos de ação das diversas drogas quimioterápicas estão fornecendo mais detalhes sobre os seus efeitos específicos nos diferentes tipos de células do ovário e o mecanismo geral por trás do dano ovariano induzido pela quimioterapia (Quadro 1). O aumento do conhecimento das especificidades das vias envolvidas revela novos alvos para agentes de proteção com o objetivo de reduzir ou prevenir danos ovarianos (ROSÁRIO; CUI; ANDERSON, 2022). As terapias utilizadas para o tratamento das doenças oncológicas envolvem medicamentos citotóxicos com alto poder de lesão às células germinativas, especialmente oócitos, inibindo a oogênese e foliculogênese, levando à atresia (VILAR *et. al*, 2018).

Quadro 1: Drogas quimioterápicas e seus mecanismos de ação.

Classe da droga	Exemplos	Mecanismo de ação
Agentes alquilantes	Ciclofosfamida Busulfan Clorambucil Bussulfano	Os metabólitos ativos formam ligações cruzadas com o DNA, impedindo a desespiralização deste, resultando em inibição da síntese e função do DNA. Quebras na fita dupla de DNA e morte apoptótica mediada por p63 em folículos primordiais.
Compostos à base de platina	Cisplatina Carboplatina	Ligação de forma covalente ao DNA para formar ligações cruzadas, levando à quebra do DNA durante a replicação e inibição da sua transcrição, síntese e função.
Antimetabólicos	Metotrexato Citarabina 5-Fluorouracil	Inibição da síntese de DNA, RNA, timidilato e purina.
Alcaloides/ Taxanos	Vincristina Vinblastina Paclitaxel Docetaxel	Inibição da polimerização da tubulina e ruptura da montagem dos microtúbulos durante a mitose, impedindo a ocorrência desta durante a metáfase, o que leva à morte celular.

Antibióticos antraciclinas	Doxorrubicina Daunorrubicina Bleomicina	Inibição da topoisomerase II, ocasionando quebras no DNA. Também forma radicais livres de oxigênio que induzem quebras no DNA. Portanto, inibe a síntese e função do DNA.
---------------------------------------	---	---

Fonte: Adaptado de Bedoschi, Navarro e Oktay (2016) e Guerreiro *et al.* (2016).

2.3 Doxorrubicina e as espécies reativas de oxigênio

A DOX é um dos medicamentos anticâncer mais comumente usados, mas que possui efeitos adversos para a fertilidade pois causa danos aos folículos ovarianos (HAN *et al.*, 2020). É utilizada em sarcomas (MARUZZO *et al.*, 2013), ovários, tumores de mama (MORGAN *et al.*, 2013), entre outros. Os efeitos dessa substância incluem toxicidade ovariana em camundongos, afetam a taxa de ovulação e o desenvolvimento dos ovários (ANDERSEN *et al.*, 2021), bem como a menopausa precoce e aumento de infertilidade em mulheres após quimioterapia (ARECCO *et al.*, 2021). Nas células cancerígenas, a DOX se intercala no DNA e interrompe a ação do reparo do DNA mediado pela topoisomerase-II e promove a geração de radicais livres e danos às membranas celulares, ao DNA e às proteínas (GEWIRTZ *et al.*, 1999).

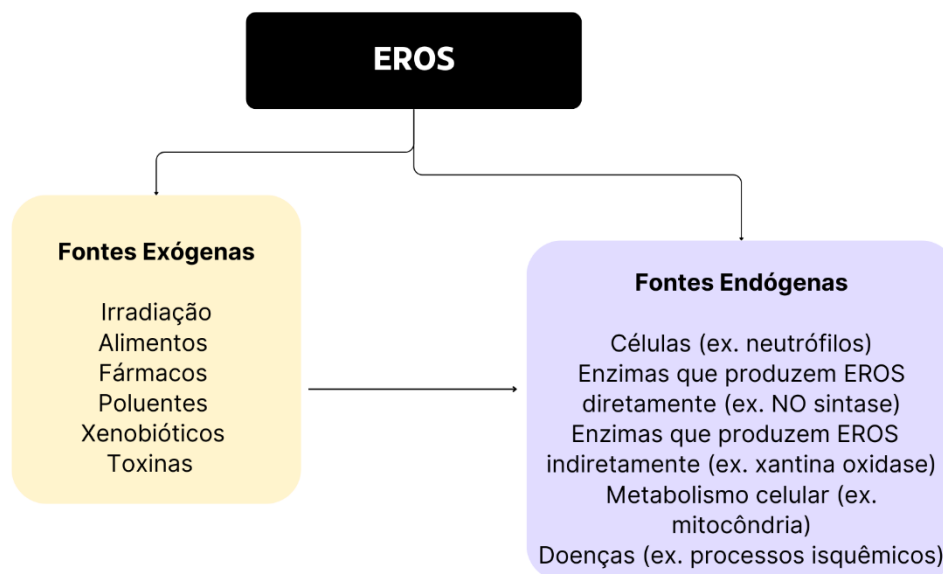
A qualidade de vida e a preservação da fertilidade são questões que devem ser cuidadosamente discutidas entre mulheres submetidas ao tratamento de câncer em idade reprodutiva (KNEZ; MAHDAWI; TAKAC; SOBOCAN, 2021). Embora o tratamento oncológico, mediante a administração de agentes quimioterápicos, venha aumentando a sobrevivência dessas pacientes, ele pode aumentar o risco de falência ovariana e infertilidade (RUSHING *et al.*, 2021). Segundo Soleimani *et al.* (2011), ainda não existem estudos com humanos que examinem a qualidade dos óocitos e dos embriões após o tratamento quimioterápico. Porém, sabe-se que os agentes quimioterápicos podem causar efeitos gonadotóxicos, interrompendo processos celulares básicos, e interferindo na proliferação celular.

Os agentes quimioterápicos rotineiramente utilizados no tratamento do câncer de mama são extremamente tóxicos para os ovários, particularmente para os folículos primordiais (GADDUCCI *et al.*, 2008). Porém, esses quimioterápicos não exercem efeito citotóxico apenas sobre os folículos primordiais, podendo atuar também sobre os folículos em crescimento. A

presença dos folículos em crescimento inibe o recrutamento dos folículos primordiais, e a perda crescente dessa população folicular leva ao aumento na ativação de folículos primordiais, e assim, a perda da reserva folicular. 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 pelas células da granulosa (SHAO *et al.*, 2022).

O estresse oxidativo é resultado de um desequilíbrio na quantidade de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) e nos níveis de agentes antioxidantes, culminando em processos deletérios e, conseqüente, morte celular. As EROS são átomos, moléculas ou quaisquer compostos que contenham um ou mais elétrons desemparelhados em seus orbitais atômicos (OFOEDU *et al.*, 2021). Elas são geradas, principalmente, na mitocôndria, pelo metabolismo energético normal da célula e, em condições homeostáticas. As EROS intracelulares mantidas em concentrações adequadas atuam como “moléculas sinalizadoras” ou “mensageiros secundários” envolvidas em funções fisiológicas fundamentais às células e ao próprio organismo (Figura 2) (DOWLING; SIMMONS, 2009). As EROS passam a ter um efeito prejudicial ao organismo quando ocorre um aumento excessivo na sua produção, causando injúrias às células, como a peroxidação dos lipídios das membranas, danos ao DNA e morte celular por apoptose ou necrose (KAJARABILLE; LATUNDE-DADA, 2019).

Figura 2: Fontes exógenas e endógenas de espécies reativas de oxigênio (EROS).



Fonte: Adaptado de Kohen, R. e Nyska, A., 2002.

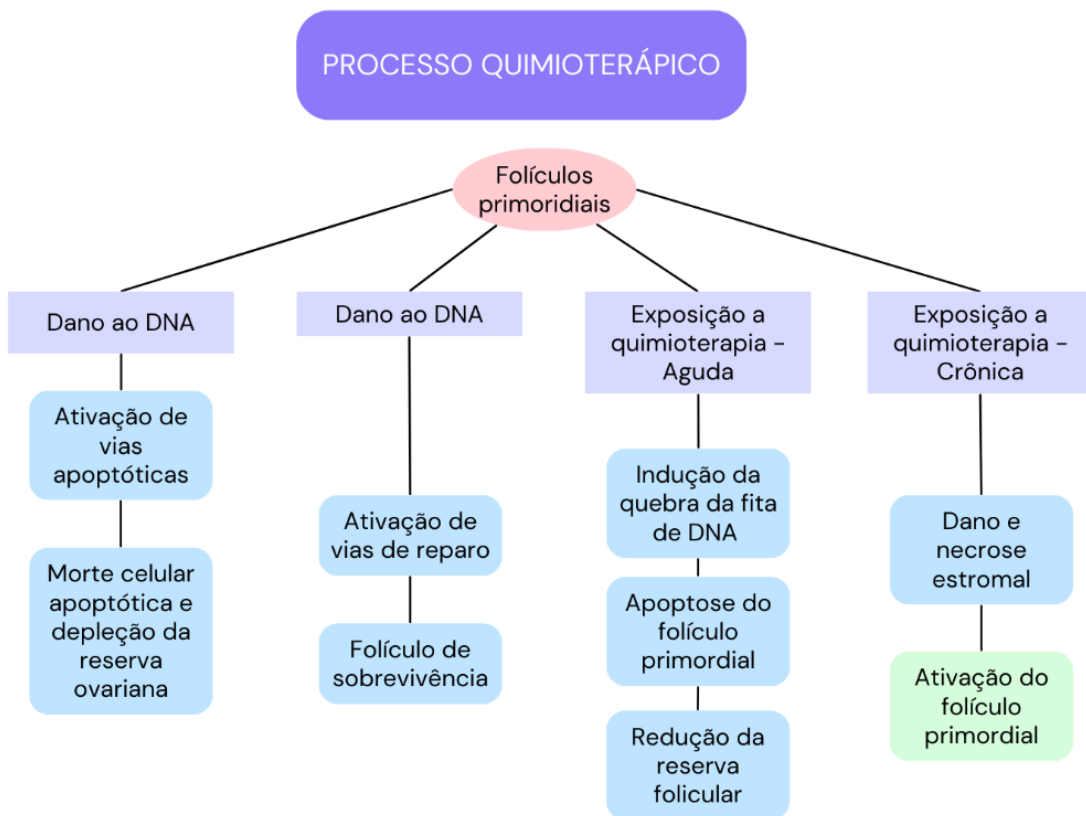
Dentre as fontes exógenas causadoras do aumento das EROS temos a DOX, para isso, na presença de NADPH, a DOX se torna substrato da enzima citocromo P450 redutase, formando intermediários de radicais semiquinonas. Estes, por sua vez, reagem prontamente com oxigênio molecular (O_2) e produzem os principais precursores de outras EROS mais reativas - os radicais superóxido (O_2^-). A enzima superóxido dismutase (SOD) catalisa a decomposição dos radicais O_2^- em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que, por sua vez, é decomposto pela enzima catalase (CAT) em moléculas de água (CARDOSO; BONDAN, 2018).

2.3 Preservação da fertilidade em mulheres submetidas à quimioterapia

A perda do potencial reprodutivo na mulher com câncer raramente se deve a própria patologia, mas ao efeito gonadotóxico do tratamento (Figura 3). As pacientes que se submeteram à terapia oncológica têm alto risco de Insuficiência Ovariana Prematura (IOP), como resultado de depleção folicular, fibrose estromal e injúria vascular causadas pela quimioterapia e radioterapia (CASTILLO *et al.*, 2021). Tal condição afeta gravemente a qualidade de vida da paciente, já que uma menopausa precoce reflete em uma maior prevalência

de doença cardiovascular, osteoporose e desordens do humor, como depressão (GILMER *et al.*, 2023).

Figura 3: Os mecanismos de dano ao ovário induzido pela quimioterapia. Agentes quimioterápicos gonadotóxicos, como a doxorrubicina, causam danos em oócitos de folículos primordiais. A quimioterapia pode levar à diminuição da reserva de folículos primordiais através de mecanismos diretos agudos e indiretos retardados.



Fonte: Adaptado de Katarzyna J. Szymanska, Xiujuan Tan e Kutluk Oktay, 2020.

Os efeitos adversos do tratamento dependem do tipo de câncer, da droga administrada e da sua respectiva dose, do local/campo de irradiação e da idade da paciente. A escolha do tratamento para preservação da fertilidade feminina deve levar em consideração a idade da paciente; o tipo de câncer e seu respectivo tratamento; a existência de um parceiro ou a possibilidade de utilizar gameta de doadores; o tempo disponível para a terapia de preservação, e a probabilidade de metástase ovariana (LIN *et al.*, 2022). Os métodos de oncofertilidade bem estabelecidos consistem na criopreservação de oócitos e embriões, ambos métodos utilizados de rotina no tratamento de mulheres inférteis, além da transposição ovariana,

quando a radioterapia faz parte do esquema terapêutico. Métodos experimentais, como congelamento de tecido ovariano e criopreservação de oócitos imaturos *in vitro*, já são utilizados em alguns centros; porém, necessitam de mais estudos para confirmar seus resultados e aperfeiçoar suas técnicas (BOZZETTI; ZANDONÁ; HENTSCHE; PETRACCO, 2018).

Os antioxidantes podem ser uma estratégia promissora na preservação da fertilidade feminina devido ao seu papel na redução do estresse oxidativo. O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e a capacidade do organismo de neutralizá-las com antioxidantes endógenos (WANG *et al.*, 2022). O estresse oxidativo tem sido associado a danos nas células dos ovários, incluindo os folículos ovarianos, que são as estruturas responsáveis pelo desenvolvimento e maturação dos óvulos. Altos níveis de EROS podem causar danos no DNA, nas proteínas e nos lipídios celulares, levando à disfunção e à morte celular. Ao introduzir antioxidantes, que são substâncias capazes de neutralizar os EROS, é possível reduzir o estresse oxidativo e proteger as células dos ovários contra danos. Isso pode ter um impacto positivo na preservação da fertilidade feminina, ajudando a manter a função ovariana e a qualidade dos óvulos (HE *et al.*, 2021).

Além disso, alguns estudos sugerem que os antioxidantes podem ter efeitos benéficos no desenvolvimento e na maturação dos folículos, aumentando a taxa de sobrevivência dos óvulos e melhorando a qualidade embrionária. Isso pode ser particularmente importante em casos em que a fertilidade pode estar comprometida devido a fatores como a idade avançada, tratamentos médicos agressivos ou condições médicas que afetam a reserva ovariana. Os antioxidantes podem ser administrados por via oral, como suplementos nutricionais, ou por meio de injeções diretamente nos ovários. Alguns exemplos de antioxidantes comumente estudados na preservação da fertilidade incluem a vitamina C, vitamina E, coenzima Q10, melatonina, ácido fólico e N-acetilcisteína (FLOROU *et al.*, 2020). Um dos antioxidantes que tem despertado o interesse de pesquisadores e que merece destaque é a piperina.

2.4 Piperina

O uso de plantas com a finalidade de tratamento e cura de enfermidades é quase tão antigo quanto a espécie humana e, por vezes, o conhecimento sobre a aplicabilidade de plantas medicinais pode representar no único recurso terapêutico de diversas comunidades e grupos

étnicos. Indiretamente, a cultura medicinal pode despertar o interesse de pesquisadores em estudos multidisciplinares (MACIEL *et al.*, 2002). Ademais, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a prática do uso de plantas medicinais nos programas de atenção primária à saúde como forma de diminuir os custos destes programas e ampliar o número de beneficiados, principalmente nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento onde persistem os grandes bolsões de pobreza (NIAZIAN, 2019).

As plantas medicinais são utilizadas há anos como fonte de alimento, especiarias e, na medicina tradicional, como remédio para inúmeras doenças. A *Piper nigrum* (Figura 4), conhecida popularmente como pimenta-preta ou pimenta-do-reino, pertencente à família *Piperaceae*, é uma das especiarias mais utilizadas em todo o mundo, possuindo um sabor acentuado distinto atribuído à presença do fitoquímico piperina. Além de seu uso como tempero, a *Piper nigrum* é frequentemente usada para fins medicinais (HAQ; IMRAN; NADEEM; TUFAIL; GONDAL; MUBARAK, 2020).

Figura 4: Imagem da *Piper nigrum*.



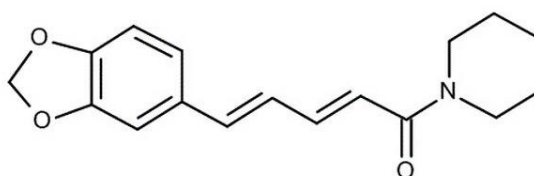
Fonte: Getty images.

A piperina (PIP) é o alcalóide principal da pimenta-do-reino ou pimenta-preta, a qual é comumente usada como condimento e também em vários preparos tradicionais da medicina popular, relatada em diversos estudos como perspectivas para diversos usos na saúde (TRIPATHI; RAY; MISHRA, 2022).

A piperina é um alcaloide nitrogenado, sua fórmula química é $C_{17}H_{19}NO_3$ (Figura 1), e com o nome IUPAC 1-(5-[1,3-benzodioxol-5-il]-1-oxo-2,4-pentadienyl) piperidina. Sua fórmula estrutural é composta por três subunidades: (1) uma função amida que consiste em um anel piperidina com uma porção carbonila a-b-insaturada, (2) um grupo 1,3-benzodioxol,

também chamado de núcleo piperonal e (3) uma cadeia de butadieno. A piperina tem peso molecular de 285,34 g/mol, ponto de fusão de 130 °C (QUIJIA CR, ARAUJO VH, CHORILLI M, 2021).

Figura 5. Fórmula estrutural da piperina.



O composto mais conhecido na semente de *P. nigrum* é a amida, sendo o metabólito secundário presente em maior concentração na semente da planta. A análise do germoplasma de *P. nigrum* de diferentes distribuidores na América do Norte mostrou que os níveis de piperina nas sementes secas flutuaram junto com o teor total de piperamidas. Semente moída de *P. nigrum*, pimenta em grão ou baga seca contém 10,8% em peso de oleorresina, 5,7% em peso de piperina, 1,5% (v/m) de óleo essencial e 9% em peso de água (LUCA *et al.*, 2021).

A piperina apresenta dificuldade em se solubilizar, sendo uma limitação significativa de sua atividade biológica, necessitando, assim, de uma correlação com outros compostos para melhorar sua atividade e garantir a permeabilidade frente aos sistemas biológicos (STASIŁOWICZ *et al.*, 2021). A piperina também foi usada como bioestimulador para melhorar a absorção de drogas *in vivo*. Os resultados mostraram que a cocristalização de drogas pode ser positiva e benéfica para estudos futuros que exijam uma relação medicamentosa (LIU *et al.*, 2018).

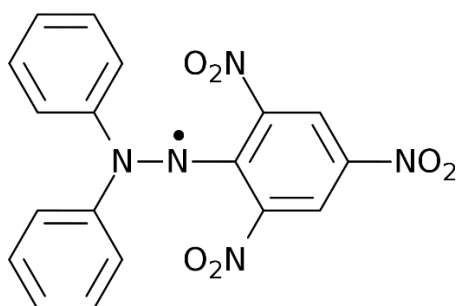
2.5 Mecanismo de ação antioxidante da piperina

O aumento das EROS intracelulares demonstra um papel fundamental nas respostas inflamatórias (MORRIS; GEVEZOVA; SARAFIAN; MAES, 2022). A piperina então exibe

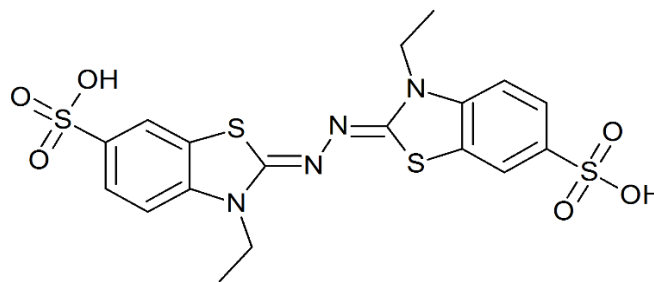
efeitos protetores e exerce fortes efeitos de eliminação direta nos radicais DPPH, para avaliação de sua capacidade antioxidante, e exibe capacidades de eliminação de radicais livres (JAISIN *et al.*, 2020). A eletroquímica foi estudada de forma inovadora para relatar as potenciais propriedades antioxidantes desse composto com diferentes ensaios de peroxidação e redução *in vitro*. A piperina reagiu prontamente com radicais oxidantes, além de se ligar a íons metálicos redox-ativos semelhantes a outros antioxidantes também estudados (CARP; MORARU; PINTEALA; ARVINTE, 2021). Uma atividade anti-radical das amostras testadas foi demonstrada em alto nível, influenciando a capacidade de eliminar os radicais livres DPPH e os resultados obtidos mostraram que o teor de óleos essenciais na piperina influenciou significativamente a atividade antioxidante medida com seu uso. Uma fraca correlação significativa entre esses parâmetros mostra que, à medida que o teor de óleo essencial aumenta, a capacidade da especiaria de sequestrar os radicais DPPH também aumenta (LUCA *et al.*, 2021).

Em adição, a capacidade de DPPH e ABTS, foram considerados como um método para medir a atividade antioxidante por meio de radicais. Em sua composição fitoquímica, pode-se notar que as amostras mais ativas em DPPH, ABTS, entre outras, foram aquelas em que foi possível notar as propriedades antioxidantes nos metabólitos (Figura 2) (ADEFEGHA; OBOH; OKEKE, 2021) (NUTMAKUL; CHEWCHINDA, 2023).

Figura 6. Fórmula estrutural de DPPH e ABTS.



DPPH



ABTS

Zahin *et al.* (2021) visualizaram o poder antioxidante da folha de *P. nigrum* avaliado por meio de uma série de ensaios. Três extratos de solvente (acetato de etila, acetona e aquoso) determinaram todo o desenho do estudo. O extrato de acetato de etila teve o maior efeito de eliminação no DPPH, ABTS e ânion superóxido, enquanto o extrato de acetona exibiu a maior inibição contra o peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e foi mais eficaz no ensaio de fosfomolibdênio. Por outro lado, o extrato aquoso foi o redutor férrico mais forte. Da mesma forma, a piperina elimina espécies reativas, incluindo peróxido de hidrogênio, radicais livres de ânions, radicais hidroxila e radicais DPPH. Isso indica que a piperina protege as mitocôndrias contra danos tóxicos induzidos por sua atividade antioxidante (DUTTA *et al.*, 2014).

2.7 Efeitos antioxidantes *in vivo* e *in vitro* da piperina

Existe uma infinidade de evidências científicas sobre os vários efeitos da piperina *in vivo* e *in vitro*. Em alguns estudos, a piperina mostrou que poderia atuar no controle do estresse oxidativo (ZHANG *et al.*, 2023). O mecanismo molecular de ação da piperina foi testado nas seguintes doses (0,25, 1,25 e 6,25 μM , *in vitro*; 1 e 10 mg/kg, *in vivo*). Assim, houve uma melhora na defesa celular, mostrando que o tratamento foi eficiente contra os danos do estresse oxidativo, promovendo assim o fator nuclear relacionado ao eritróide 2 (Nrf2) (SAHA *et al.*, 2022).

O Nrf2 atua como regulador de várias enzimas antioxidantes; alterando o equilíbrio redox no estresse oxidativo celular. Regula a atividade de componentes de defesa antioxidante, como superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GSH-Px), heme oxigenase-1 (HO-1), glutatona redutase, tioredoxina redutase, ferritina e NAD(P)H:quinona oxidoredutase 1 (NQO1) (SAJADIMAJD S, KHAZAEI M, 2018; YUAN *et al.*, 2021). A influência protetora

da piperina sugere que o efeito entre as células ajusta o sistema redox celular e aumenta as enzimas antioxidantes intracelulares, mostrando um aumento nas atividades de SOD, CAT e GSH e reduz os níveis de EROS (DUAN *et al.*, 2022). Portanto, o tratamento profilático com piperina ativa a via de sinalização Nrf2, que aciona mediadores da resposta antioxidante como GSH, GPx, CAT, SOD e elimina EROS (REHMAN *et al.*, 2020).

No tecido epitelial *in vivo*, a piperina nas doses de 10, 25, 50 e 100 mg/kg tem papel único na atividade metabólica e no equilíbrio homeostático, regulando o transporte de substâncias nutricionais, íons e antioxidantes. O GSH, ou glutatona, é um composto tripeptídico que desempenha um papel importante na proteção das células contra danos oxidativos e é frequentemente referido como um antioxidante celular, ele demonstrou dano oxidativo no tecido epitelial consistindo em mecanismos pós-transcricionais e transcricionais. A primeira consiste em EROS como o ânion superóxido (O_2^-) formado devido à luz ultravioleta, a qual os seres humanos são expostos durante suas vidas. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e outros oxidantes induzem dano oxidativo a macromoléculas e proteínas de membrana, causando EROS (VURMAZ *et al.*, 2019).

No sistema biológico de camundongos com neurotoxicidade, o estresse oxidativo compreende uma sequência de eventos envolvendo produção excessiva de ERO ($O_2 \bullet^-$ (ânions superóxido), $OH \bullet$ (radicais hidroxila), H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) e NO (óxido nítrico) que sobrecarrega mecanismos celulares de defesa antioxidante. No estudo em questão, foram utilizados modelos animais e foi adicionada piperina na concentração de 25mg/kg, em combinação com timoquinona. Assim, foi demonstrado que o potencial antioxidante foi melhorado com a combinação dos dois compostos do que eles sozinhos, sendo evidenciada melhor absorção e biodisponibilidade em sua associação (ABDEL-DAIM *et al.*, 2019).

A piperina na concentração de 5 mg/kg apresentou ação antioxidante, reduzindo o estresse oxidativo e melhorando os níveis de Nrf2. A suplementação com o composto aumentou a capacidade antioxidante total (FRAP) e reduziu o nível do marcador de estresse oxidativo (MDA), ambos na avaliação do potencial antioxidante (NASRNEZHAD *et al.*, 2021).

Nesse sentido, considerando o uso da piperina como composto alternativo e natural na preservação da fertilidade, é de grande importância avaliar o efeito do composto frente aos 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.

3 JUSTIFICATIVA

O tratamento quimioterápico representa um momento delicado na vida da paciente e requer cuidados especiais, pois os efeitos colaterais podem influenciar negativamente a vida reprodutiva. A maioria dos medicamentos quimioterápicos podem danificar as células germinativas femininas, culminando, para alguns pacientes, em uma redução no potencial reprodutivo e por consequência, gerando infertilidade. Dentre os agentes antineoplásicos amplamente utilizados, destaca-se a doxorrubicina (DOX), que apesar de sua eficácia no tratamento anticâncer, pode apresentar uma alta toxicidade para os gametas. Assim, o efeito desta substância na reserva ovariana exige uma investigação mais aprofundada. Os efeitos deletérios da DOX estão associados principalmente à formação de espécie reativas de oxigênio (EROS), que consequentemente promove o estresse oxidativo, culminado na morte celular (LI *et al.*, 2021). O estresse oxidativo também pode provocar efeitos deletérios ao sistema reprodutor, ocasionando problemas desde o processo de maturação do oócito até à gestação (HUSSAIN *et al.*, 2021). Nesse sentido, o uso concomitante de um agente antioxidante, como a Piperina, poderá auxiliar na prevenção aos danos ovarianos ocasionados pela DOX.

A piperina é o principal alcalóide da pimenta-do-reino ou pimenta preta (*Piper nigrum*), a qual é comumente usada como condimento e em vários preparos tradicionais da medicina popular. Este composto apresenta-se como um componente nutracêutico e exerce efeito terapêutico sobre o sistema imunológico, a exemplo de doenças que levam a imunossupressão, como a quimioterapia e radioterapia no tratamento de câncer. Foi relatado ainda que o tratamento de piperina em ratos modula o índice de adiposidade relacionados ao estado antioxidante do corpo (BRAHMANAIDU *et al.*, 2014). Em um modelo animal com identificação de camundongos imunocomprometidos induzidos por cádmio, o tratamento com piperina mostrou melhora considerável nas enzimas antioxidantes e alterações no apoptose (VERMA *et al.*, 2020).

Com seus benéficos supracitados em diversos sistemas do organismo, a piperina traz uma nova perspectiva de estudos e explanação. Como já se conhece seus efeitos protetores em processo antioxidante, é ainda necessário avaliar seus efeitos protetores frente aos danos sofridos no sistema reprodutor feminino, o que só vem a endossar a necessidade de estudos que minimizem ao máximo os possíveis danos à reserva folicular presente no ovário. Portanto, projetos que buscam a inserção de compostos extraídos de frutos de plantas comumente usadas pela comunidade devem ser considerados estratégias prioritárias para minimizar os efeitos causados pelos quimioterápicos.

4 HIPÓTESES

Diante do exposto, foram formuladas as seguintes hipóteses científicas:

- A piperina possui atividade protetora em ovários de camundongos fêmeas.
- Após tratamento *in vivo* a piperina reduz os níveis de EROS e influencia positivamente o crescimento e a manutenção da morfologia, integridade e viabilidade de folículos ovarianos em camundongos fêmeas tratadas com doxorubicina.
- A piperina é capaz de diminuir o processo apoptótico de folículos ovarianos de camundongos fêmeas frente aos efeitos adversos causados por doxorubicina quando administrada *in vivo*.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Avaliar a capacidade da piperina em reduzir os efeitos adversos causados por doxorrubicina em ovários de camundongos fêmeas tratadas *in vivo*.

5.2 Objetivos Específicos

i. Identificar os efeitos do tratamento com diferentes doses de piperina (0,1, 1,0 ou 10,0 mg/kg) no tratamento após indução à quimioterapia com doxorrubicina (10 mg/kg) sobre a morfologia folicular, ativação e desenvolvimento folicular em camundongos fêmeas *in vivo*.

ii. Analisar o efeito da doxorrubicina e piperina na configuração da matriz extracelular (MEC) e na densidade das células do estroma ovariano de camundongos fêmeas.

iii. Verificar na análise bioquímica a expressão de enzimas antioxidantes (SOD e CAT) e tiol em ovários de camundongos fêmeas após o tratamento *in vivo* com doxorrubicina e piperina sozinhas ou em associação.

iv. Analisar a expressão de RNAm para os genes envolvidos na ação antioxidante (SOD, CAT e NRF2) em ovários de camundongos fêmeas após o tratamento *in vivo* com doxorrubicina e piperina sozinhas ou em associação.

6 CAPÍTULO 1

Protective effect of piperine on mice ovarian toxicity induced by doxorubicin

Protective effect of piperine on mice ovarian toxicity induced by doxorubicin

Running title: Protective effect of piperine on mice ovaries.

Rocha, M.B.M.^{1,2}; Assis, E.I.T.^{1,2}; Azevedo V. A. N.^{1,2}; Lima Neto, M.F.^{1,2}; Silva, A.W.B.^{1,2}; Godinho, A.N.²; Freire, J.M.O.²; Araujo, V.R.⁴; Gomes, G.A.³; Silva, J.R.V.^{1,2*}

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

² *Nucleus for Research in Animal Experimentation (NUPEX), Federal University of Ceará, Sobral, CE, Brazil.*

³ *State University of Vale do Acaraú, Sobral, CE, Brazil.*

⁴ *Graduate Program in Physiological Sciences, Higher Institute of Biomedical Sciences, State University of Ceará, Fortaleza, CE, 60714-903, Brazil.*

**Corresponding author (SILVA, J.R.V.): Federal University of Ceará, Av. Comandante Maurocéllo Rocha Ponte 100, CEP 62041-040, Sobral, CE, Brazil. Phone / Fax: +55 8836118000. [jrvsilva@ufc.br]*

Abstract

This study evaluated the potential of piperine (PIP) to reduce the deleterious effects of doxorubicin (DOX) on mouse ovaries *in vivo*. The animals from control group received intraperitoneally saline solution, while those from treated groups received both N-acetylcysteine (NAC) and DOX, DOX (10 mg/kg); both DOX PIP (0.1,1.0, 10.0 mg/kg or only PIP (0.1,1.0, 10.0 mg/kg). After chemotherapy induction, piperine treatments were administered orally by gavage for the next 10 days. At the end of the experimental period, the animals were euthanized and the tissues and biological material were destined for the following analyses: histology (ovarian follicle morphology, growth and activation, extracellular matrix configurations and stromal density), biochemical analysis (superoxide dismutase [SOD], catalase [CAT] and thiol) and real time PCR (mRNA levels of *SOD*, *CAT*, and *factor-related erythroid nuclear factor 2* [*NRF2*]). The results showed that the percentage of normal follicles was reduced, while an increase in collagen fibers was seen in animals treated with DOX. Additionally, DOX also reduced stromal density when compared to the other groups. Neither DOX nor PIP influence the activity of SOD and CAT, as well as the levels of thiol. *DOX reduced the levels of mRNA for NRF2*, while both DOX and 0.1 mg/kg PIP increased the levels of mRNA for CAT. In conclusion, piperine treatment has the potential to increase follicular growth and survival rates and protect ovarian follicles and stromal cells against doxorubicin-induced toxicity.

Keywords: Chemotherapy; Ovary; Gonadal Toxicity; Fertility; *In vivo* model.

Introduction

The therapies used to treat cancer involve cytotoxic drugs with high power to damage germ cells, especially the oocytes [1]. The risk of infertility and the gonadotoxic effects depend on the type of medication used, the doses administered and the age of patient at the time of treatment. In this sense, the protection of the ovarian follicular reserve has become one of the main issues to preserve fertility and to increase the quality of patient life [2]. Recent studies reveal that doxorubicin (DOX) causes premature ovarian failure by accelerating activation of primordial follicles and inducing death of growing follicles [3]. The DOX is used to treat a wide variety of cancers, however, it can cause toxicity from the beginning to the end of treatment. It has multiple mechanisms of action, including DNA intercalation, topoisomerase II inhibition, and free radical production [4]. This substance induces ovarian toxicity in mice, reduces ovulation rate and ovary size [5], as well as causes early menopause and increases infertility rate after chemotherapy [6]. Thus, it is very important to develop new alternatives to preserve fertility of patients by protecting ovarian follicles against the oxidative stress [7].

Among the phytomedicines that are candidate to protect the ovaries against deleterious effects of DOX, piperine is a bioactive component present in black pepper (*Piper nigrum*) and it is used in traditional Chinese medicine, having anti-inflammatory, antioxidant, analgesic and cancer preventive activities [8]. In the gonads, piperine protect the cells against oxidative damage, and inhibits free radicals and reactive oxygen species (Adicionar uma REF). In addition, black pepper or piperine has been shown to reduce lipid peroxidation *in vivo* and beneficially influence cellular thiol status, antioxidants and antioxidant enzymes [9].

The aims of this study were to investigate the potential of different doses of piperine to protect mice ovaries against the damages caused by DOX. Furthermore, the effects of piperine on follicular morphology and development, maintenance of ovarian stromal cell density,

extracellular matrix configuration, levels of thiol, activity of antioxidant enzymes (SOD and CAT) and on the levels of mRNA for *NFR2*, *SOD* and *CAT* were evaluated.

Material and methods

Chemicals

The tested drugs were doxorubicin (Libbs, Fauldoxo®, doxorubicin hydrochloride, injectable solution, 2 mg/mL) and piperine (TCI - CAS number: 94-62-2, 97%). Dimethylsulfoxide (DMSO: 0,2%) was used to dilute piperine.

Animals and evaluation of estrous cycle

Female *Swiss* mice (*Mus musculus*) (n= 54) were kept with free access to filtered water and food (Nuvilab) at an average temperature of $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, following a 12-hour light-dark cycle. The experiment was performed in accordance with the guidelines and normative resolutions of the Conselho Nacional de Controle em Experimentação Animal (CONCEA). The entire process was only started after approval by the Ethics in the Use of Animals Committee (CEUA) (protocol number 08/21).

Mice weighting 18g and/or 2 months old had their estrous cycle evaluated once a day, for 20 days, between 8 and 9 am, by a single evaluator [10]. According to the observed cells, estrus cycle was classified as proestrus, estrus, metestrus or diestrus. Only females with a regular cycle, with a duration of 4 to 5 days, were used in the experiments.

Experimental design

Female mice (n=54) (weight/age: 18g/2 months) had water and food released throughout the experimental period. From day 1 to day 10, female mice were monitored daily to determine

the stage of the estrus cycle (diestrus, proestrus, estrus, metestrus), as previously described (Fig. 1) [10]. Mice were divided into nine groups, i.e., animals from control group saline solution and DMSO (0.2%), while those from positive control –were treated with both NAC (150mg/kg) and DOX (10mg/kg). For the treatments, the animals received DOX (10mg/kg), both DOX and PIP (0.1, 1.0 or 10.0 mg/kg or only PIP (0.1, 1.0 or 10.0 mg/kg From the 11⁰ to the 20⁰ day, female mice were treated as mentioned above, where, after that period, all animals were euthanized and tissues were collected and the ovaries collected for histology analysis, biochemical analysis and gene expression by real-time PCR, described below.

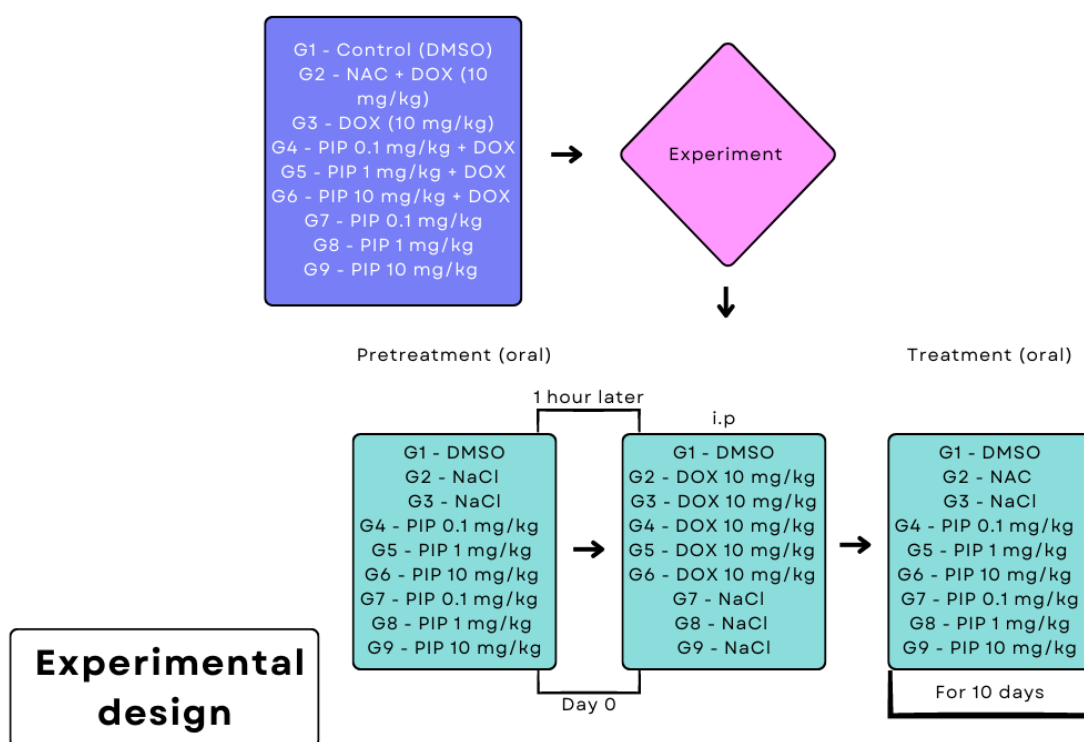


Figure 1. Experimental design. DMSO: Dimethylsulfoxide; NaCl: Sodium chloride; NAC: N-acetylcysteine; DOX: Doxorubicin; PIP: Piperine.

Analysis of follicle morphology and stromal cell density in the ovaries

At the end of the experimental period, the ovaries were fixed in 4% paraformaldehyde for 24 h and destined for classical histology. The ovaries were dehydrated in increasing

concentrations of ethanol (Dinâmica), clarified in xylene (Dinâmica) and embedded in paraffin (Dinâmica). Serial 5 μm thick sections were stained with hematoxylin and eosin (Vetec) and evaluated by using an optical microscope (Nikon). The follicles were classified according to their stage of development as primordial, primary, secondary and antral follicles. Furthermore, these follicles were individually classified as morphologically normal when an intact oocyte is present and surrounded by granulosa cells well organized in one or more layers and without pyknotic nuclei. Degenerated follicles were defined as those with a retracted or vacuolated oocyte, containing a pyknotic nucleus, surrounded by disorganized granulosa cells. To avoid double counting of the same follicles, one follicle was counted in the first section in which the oocyte nucleus was visible [11]. For evaluation of follicular growth, only morphologically normal follicles with visible oocyte nucleus were recorded and the percentage of primordial and developing (primary, secondary and antral) follicles was calculated in the different experimental groups. In total, 150 follicles were evaluated for each group of animal. To evaluate ovarian stromal cell density, the number of stromal cells in an area of 100 μm^2 was counted. For each treatment, ten fields from different sections of histological preparations from five different animals were evaluated. The average number of stromal cells per field was calculated as previously described [12]. All assessments and measurements were performed by a single operator.

Analysis of ovarian extracellular matrix

To evaluate the collagen fibers in extracellular matrix, the sections were staining with Picrosirius Red (Abcam Kit) according to the methodology described previously [13] and analyzed in an optical microscope (Nikon, Eclipse, TS 100, Japan) under magnification of 400x. For each treatment, the percentage of the area occupied by collagen fibers in ten different fields was measured using a DS Cooled DS DS-Ri1 camera attached to a microscope (Nikon, Eclipse,

TS 100, Japan). Only collagen fibers were stained in red with picrosirius staining, while follicles remained uncolored (white). The images were analyzed by Image J Software (Version 1.51p, 2017) and the circumference of unstained follicles from the total area was automatically excluded.

Analysis of total proteins in blood plasm of mice

The animals were anesthetized with a dose of 100mg/kg of ketamine and 10 mg/kg of xylazine and after verifying the deep stage of anesthesia, and then 1 mL of blood was collected through the abdominal vein. Blood plasm was obtained by centrifugation (3000rpm) for 15 minutes and then stored at -80°C until analysis of antioxidant enzymes SOD, CAT and (thiol).

The blood plasm was submitted to the analysis of total proteins where their concentrations were determined by the Bradford method [14]. This method uses Coomassie blue (Quick start/Bradford; Catalog No. 500–0205; Bio-Rad) to determine the total protein concentration in each sample. When in contact with proteins, the Coomassie blue dye forms a complex and emits a blue luminescence. Absorbance is directly related to the protein concentration of the sample and was evaluated spectrophotometrically at a wavelength of 595 nm. The total protein concentration in the samples was determined using a standard curve constructed using bovine albumin as a standard (0, 2.5, 5, 10, 15, 25, 35 and 50 mg/mL⁻¹), and was used to standardize levels of pro-oxidants (thiol) and antioxidants (SOD and CAT), as described below.

Determination of pro-oxidant based on the thiol content

Total thiol content in the samples were determined using 5,50-dithiobis 2-nitrobenzoic acid (DTNB; Dinâmica D8130) as an index of reduced thiol. Thiol residues react with DTNB (10 mM), cleaving the disulfide bond to form 2-nitro-5-thiobenzoate anion (NTB2⁻) at a neutral

pH. NTB₂⁻ is quantified in a spectrophotometer by measuring absorbance at 412 nm, with results expressed as nMol of reduced DTNB per milligram of protein [15].

Determination of SOD and CAT activity

The SOD activity was measured as the inhibition of adrenaline auto-oxidation [16]. The oxidation of adrenaline, in the presence of CAT in basic medium, leads to the formation of the O₂⁻ radical, with which SOD reacts, delaying ('inhibiting') the oxidation of adrenaline. The CAT solution (0.048 mg/mL⁻¹; c9322; Sigma-Aldrich) was performed by adding (7:3) to the glycine buffer, pH 10.2 (Dynamic), and then adrenaline (0.218 mg/mL₁; E4260; Sigma-Aldrich) was added to initiate oxidation. Oxidation was measured at 480 nm every 10 s for 180 s.

The CAT activity was measured as consumption of H₂O₂ as substrate at 240 nm [17]. A solution of H₂O₂ (152µL/mL₁; PH09717RA; Scientific Exodus) and phosphate buffered saline (PBS; pH7.4) was mixed in a quartz cuvette at room temperature, and then 50 µl of blood plasma were added. Every 30 s, the H₂O₂ consumption was measured twice.

Expression of mRNA for SOD, CAT and NRF2 in ovarian mice

Total RNA was extracted by the TRIzol® method (LifeTechnologies/Invitrogen) (0.1 g of tissue/1.0 mL of TRIzol®) following the manufacturer's instructions. For this, the ovaries were initially homogenized by the physical method using scalpel blade n°. 20 under sterile conditions, then 800 µl of Trizol® solution was added to each frozen sample and the lysate was aspirated through a 20 Gauge needle before centrifugation at 10,000 g for 3 min at room temperature. Subsequently, all lysates were diluted 1:1 with 70% ethanol and applied to a mini column provided in the kit. After binding the RNA to the column, DNA digestion was performed using RNase-free DNase (340K units/ml) for 15 minutes at room temperature.

After washing the column three times, the RNA was eluted with 30 ml of RNase-free water. The RNA concentration was estimated by reading the absorbance at 260 nm and the purity was verified at 280 nm in a spectrophotometer (Amersham, Biosciences Cambridge, England). Before the reverse transcription reaction, the RNA samples were incubated for 5 min at 70°C and then cooled on ice. Reverse transcription was performed in a total volume of 20 µl consisting of 10 µl of sample containing 50 ng of RNA, 4 µl of reverse transcriptase buffer (Invitrogen), eight units of RNAsin, 150 units of Superscript III reverse transcriptase, 0.036 U random primers, 10 mM of dithiothreitol and 0.5 mM of each dNTP (Invitrogen). The mixture was incubated at 42.1°C for 1 hour, then at 80°C for 5 minutes and finally stored at -20°C. The negative control was prepared under the same conditions, but without the addition of reverse transcriptase.

The mRNA quantification was performed using SYBR Green. Each real-time reaction (20 µl) contained 10 µl of SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK), 7.3 µl of ultrapure water, 1 µl of complementary DNA (cDNA) and 5 mM of each primer. The primers were designed to carry out amplification of SOD, CAT, NRF2 and glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Table 1). The GAPDH was used as a housekeeping gene for normalizing mRNA expression, as per previous studies [18]. The specificity of each pair of primers was confirmed by analyzing the melting curve of the PCR products. Amplification efficiency for all genes was verified according to protocol [19]. The thermal cycling profile for the first round of PCR was initial denaturation and polymerase activation for 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C, 30 s at 58 °C, and 30 s at 72 °C. The final extension was at 72 °C in a period of 10 minutes. All reactions were performed on a Step One Plus instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The negative control was prepared under the same conditions, but without the addition of cDNA. The $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method was used to transform C_t values into mRNA expression levels [20].

Table 1. Primers pairs used for real-time PCR.

Target gene	Primer sequence (5' → 3')	Forward (F) Reverse (R)	GenBank accession no.
GAPDH	GAACGGATTTGGCCGTATTG GTGAGTGGAGTCATACTGGAAC	F R	GU214026.1
SOD	CTCGTCTTGCTCTCTCTGGTC CTTGCCTTCTGCTCGAAGTG	F R	NM_011434.2
CAT	CCAATGGCAATTACCCGTCC CCTTGTGAGGCCAAACCTTG	F R	NM_009804.2
NRF2	TTGCCCTAGCCTTTTCTCCG CTAGGAGATAGCCTGCTCGC	F R	NM_010902.4

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software. The percentages of normal follicles, as well as primordial and developing follicles, were evaluated using the chi-square test. Data on collagen fiber distribution, stromal cell density and mRNA expression were evaluated for normality of distribution (Anderson-Darling, D'Agostino & Pearson, Shapiro-Wilk and Kolmogorov-Smirnov tests) and then analyzed individually by the test Kruskal-Wallis test followed by the Dunn test. multiple comparison test. For the biochemistry results, they were initially analyzed using the Kruskal-Wallis test, followed by the Dunn comparison. Results were expressed as mean and standard error (mean \pm SEM).

Results

Analysis of activation, survival and growth of ovarian follicles

Mice treated with only piperine (0.1, 1, or 10 mg/kg) had similar percentage of morphologically normal follicles when compared to those from control group (saline solution) (Fig. 2). On the other hand, mice treated with DOX had significantly reduced percentage of normal follicles with compared to control group, but the presence of NAC or 0.1 or 10 mg/kg piperine blocked the adverse effects of DOX (Fig. 2).

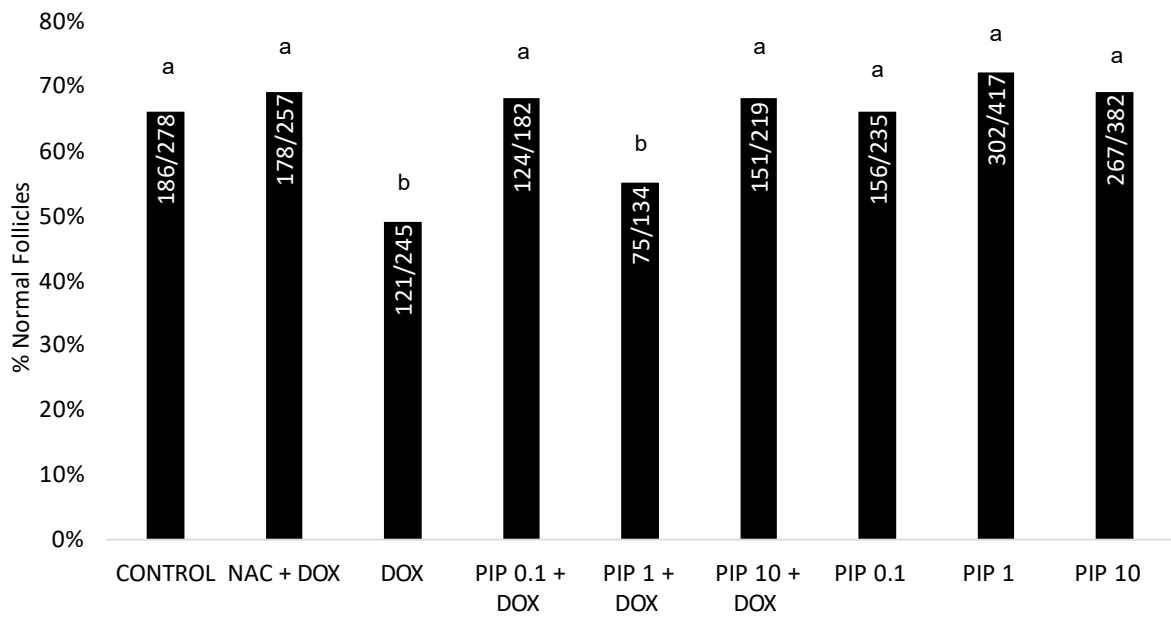
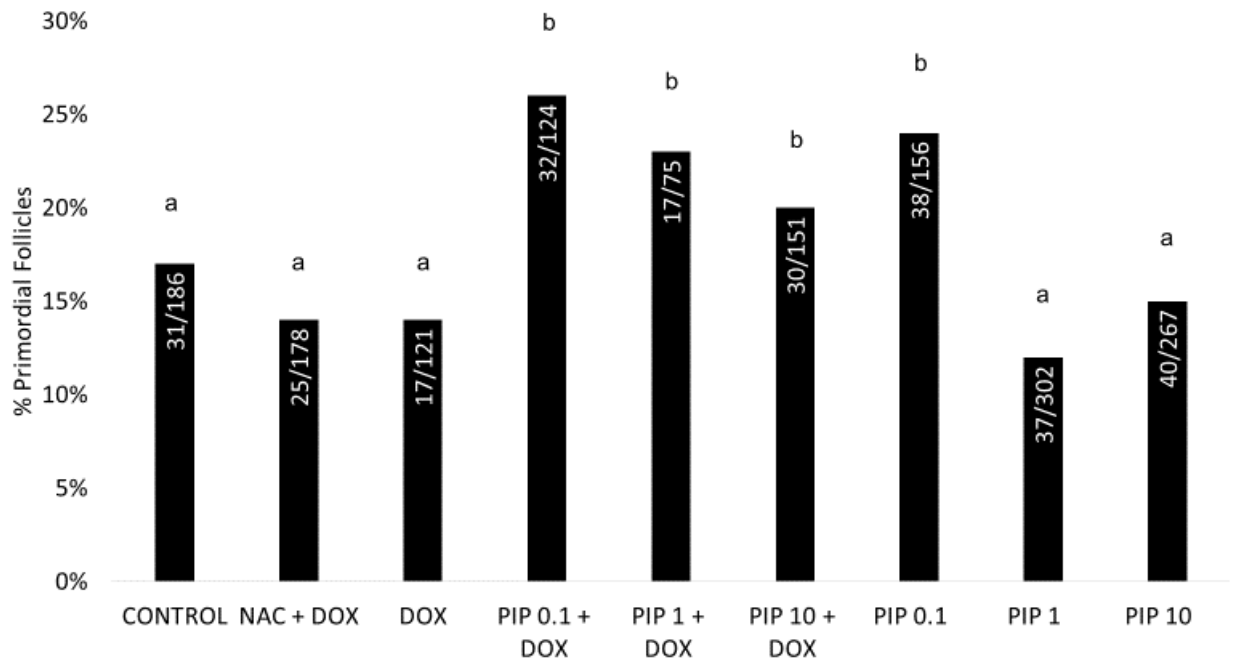


Figure 2. Percentage of normal and degenerated follicles evaluated by classical histology, hematoxylin and eosin staining. Ovaries were divided into PIP + DOX (0.1, 1, 10 mg/kg) and PIP (0.1, 1, 10 mg/kg) groups. a and b indicate statistically significant differences between treatments ($P < 0.05$).

Lower percentage of morphologically normal follicles were seen in animals that received both DOX and 1 mg/kg piperine. Regarding to follicular growth, the DOX, both DOX and NAC or only 1 or 10 mg/kg piperine did not influence the percentage of primordial or developing follicles. However, mice that were treated with both DOX and 0.1, 1 or 10 mg/kg piperine or only 0.1 mg/kg piperine had greater percentage of primordial follicles and lower percentage of developing follicles than those from control group ($P < 0.05$) (Fig. 4 A and B).

A)



B)

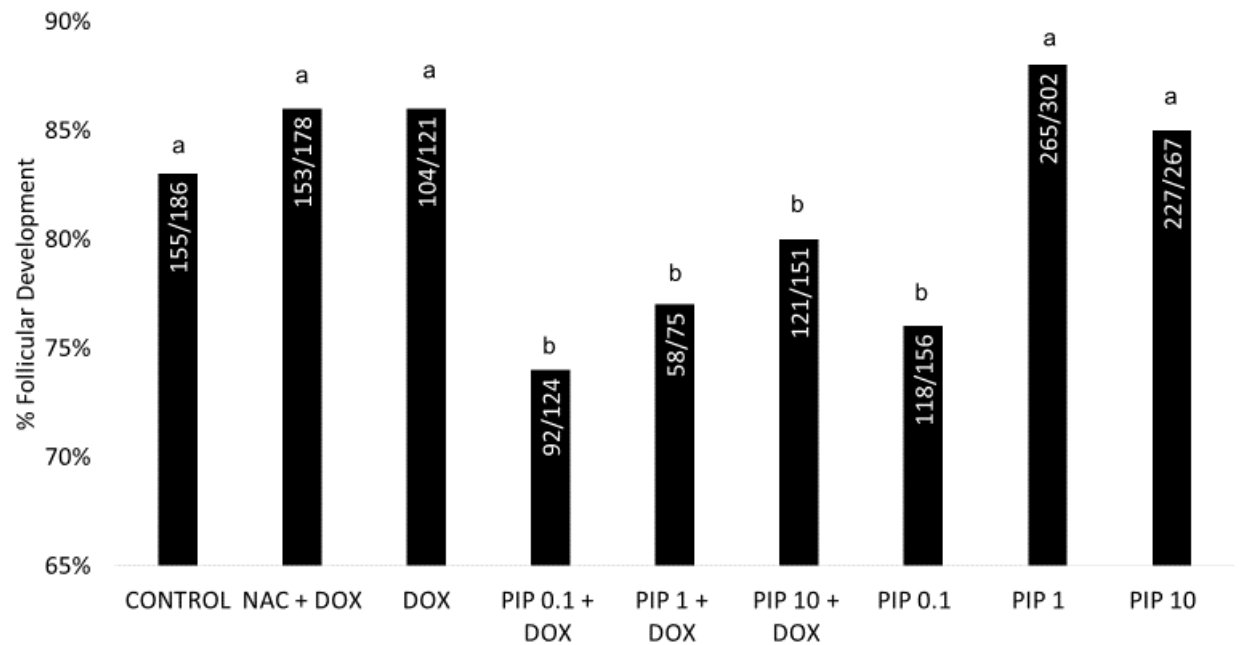


Figure 3. Percentage (mean \pm SE) of primordial follicles (A) and developing follicles (B). a and b indicate statistically significant differences between treatments ($P < 0.05$).

Evaluation of collagen fiber in ovarian extracellular matrix

The results show that mice treated with DOX had greater area of collagen than those from control group or from other treatments (Fig. 4). Figure 5 shows histological section of ovaries from different treatments stained with Picro Sirius red.

Stromal cell density

The results show that mice treated with DOX had reduced number of ovarian stromal cells when compared to those from control group or from other treatments (Fig. 6). Figure 7 shows histological sections of ovaries from mice from different treatments illustrating stromal cell density.

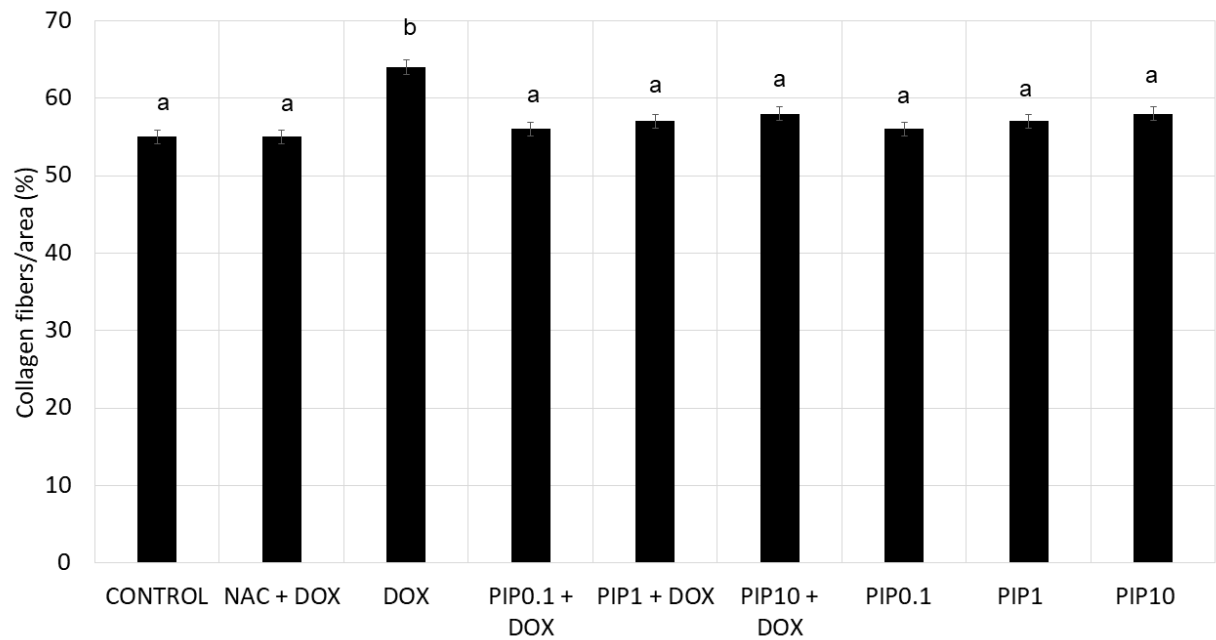


Figure 4. The levels of collagen fibers (mean \pm SD) in mice ovaries induced to chemotherapy with DOX (10 mg/kg) or induced and treated with PIP (0.1, 1 and 10 mg/kg). Collagen fiber distribution was analyzed by the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's comparison and no significant differences were observed between treatments ($p > 0.05$). a and b indicate statistically significant differences between treatments.

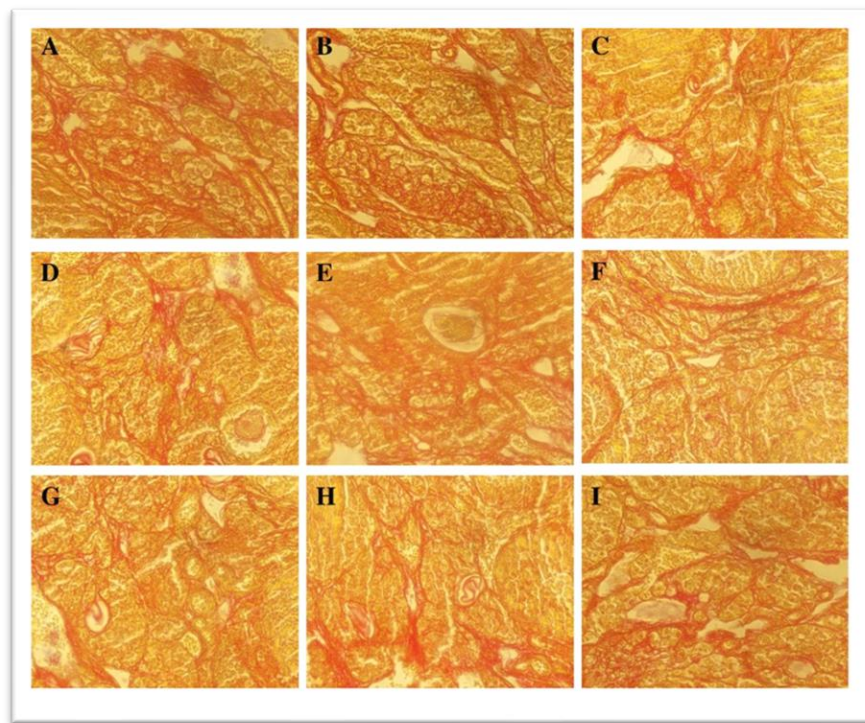


Figure 5. The levels of collagen fibers (mean \pm SD) in mice ovaries induced to chemotherapy in: (A) control; (B) NAC + DOX (10 mg/kg); (C) DOX (10 mg/kg); (D) PIP (0.1 mg/kg) + DOX (10 mg/kg); (E) PIP (1 mg/kg) + DOX (10 mg/kg); (F) PIP (10 mg/kg) + DOX (10 mg/kg); (G) PIP (0.1 mg/kg); (H) PIP (1 mg/kg) and (I) PIP (10 mg/kg). Scale bar: 100 μ m (40)

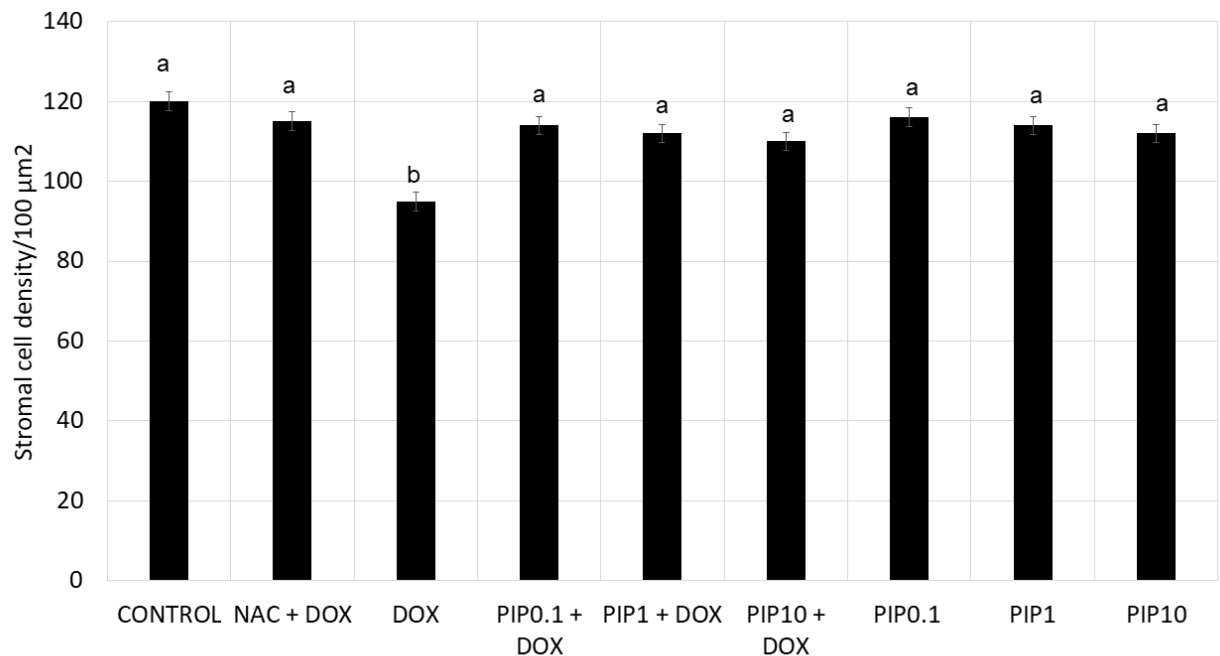


Figure 6. Stromal cell density in mice ovaries induced to chemotherapy with DOX (10 mg/kg) or induced and treated with PIP (0.1, 1 and 10 mg/kg). Stromal density was analyzed using the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's comparison. a and b, different lowercase letters indicate statistically significant differences between treatments ($p < 0.05$).

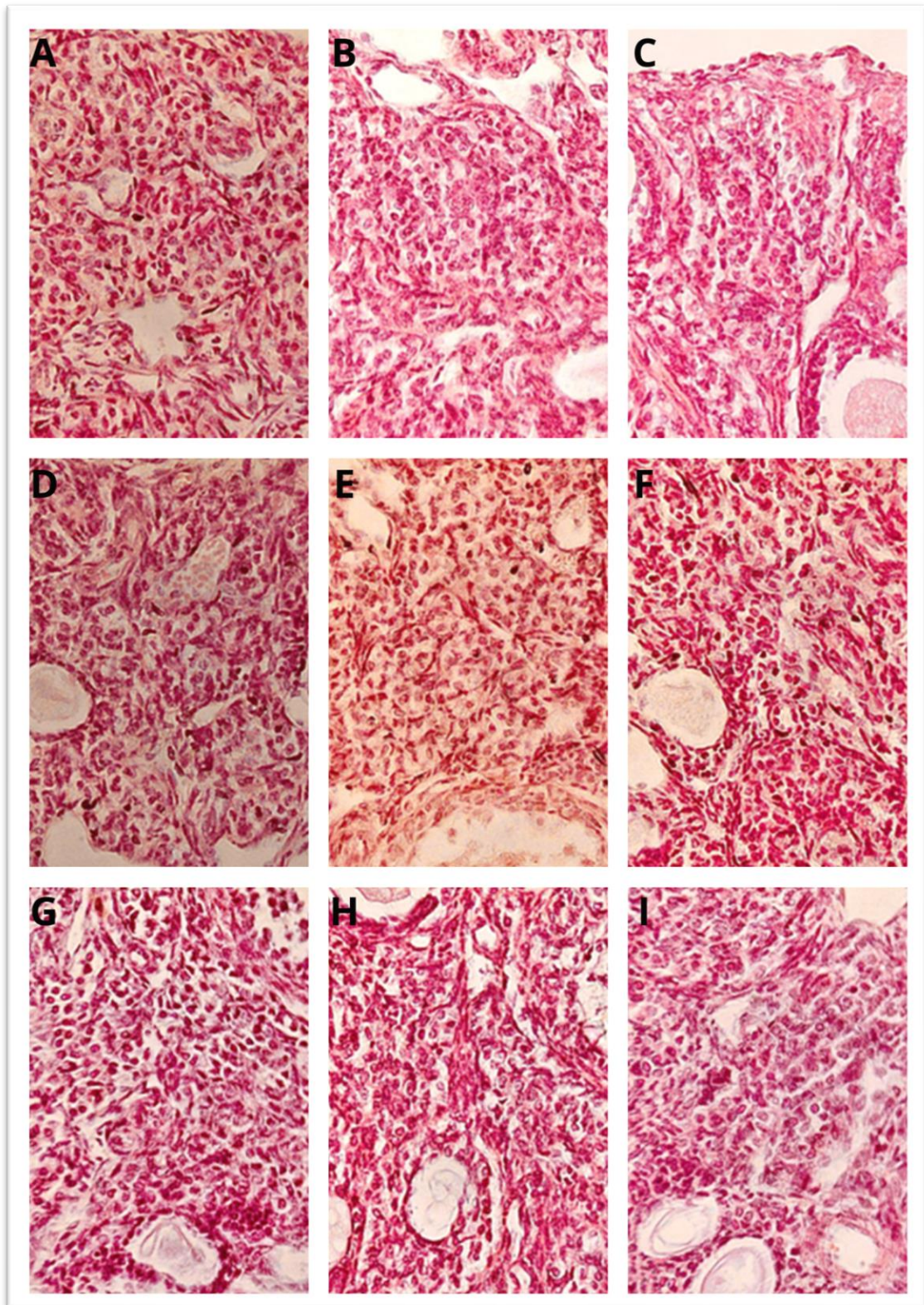


Figure 7. Representative images of ovarian stromal density in: (A) control; (B) NAC + DOX (10 mg/kg); (C) DOX (10 mg/kg); (D) PIP (0.1 mg/kg) + DOX (10 mg/kg); (E) PIP (1 mg/kg) + DOX (10 mg/kg); (F) PIP (10 mg/kg) + DOX (10 mg/kg); (G) PIP (0.1 mg/kg); (H) PIP (1 mg/kg) and (I) PIP (10 mg/kg). Scale bar: 100 μ m (400 \times).

Evaluation of antioxidant enzyme activity in the blood plasm

Based on histological results, samples of blood were collected of mice from control group and from those that were treated with DOX, 0.1 mg/kg piperine, or both DOX and 0.1 mg/kg piperine. The results shows that these treatments neither influenced the levels of thiol nor the activity of SOD and CAT (Fig. 8).

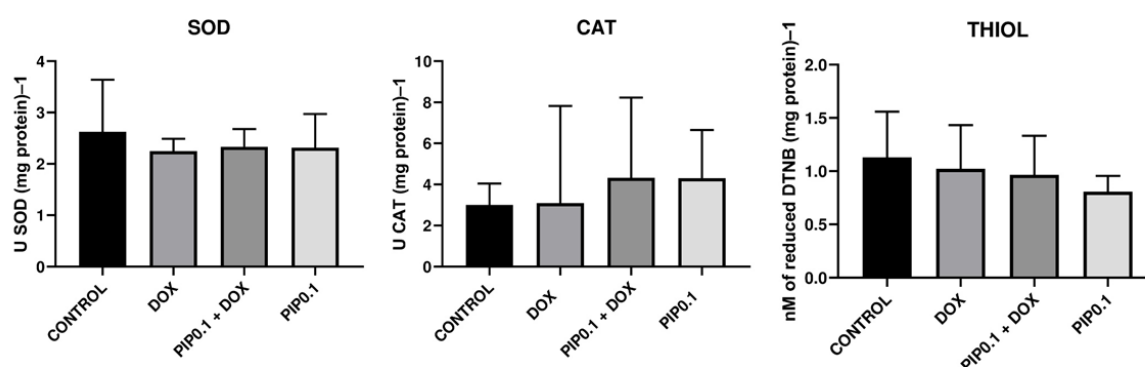


Figure 8. Biochemical evaluation of SOD, CAT and THIOL in plasma of mice induced to chemotherapy with DOX (10 mg/kg) or induced and treated with PIP (0.1 mg/kg). Biochemistry was analyzed using the Kruskal-Wallis test, followed by the Dunn comparison. a and b, different lowercase letters indicate statistically significant differences between treatments ($p < 0.05$).

Levels of mRNA for *CAT*, *SOD* and *NRF2*

The results showed that DOX, 0.1 mg/kg PIP or both DOX and 0.1 mg/kg piperine did not influence the levels of SOD in mice ovaries (Fig. 9A). However, the levels of mRNA for CAT was significantly higher in mice treated with both DOX and 0.1 mg/kg piperine than those from control group, but did not differ from mice that received only DOX or piperine (Fig. 9B). The DOX reduced the expression of NRF2 when compared to control group. However, there was no difference in levels of mRNA for NRF2 in mice treated with DOX, 0.1 mg/kg piperine, or both DOX and 0.1 mg/kg piperine (Fig. 9C).

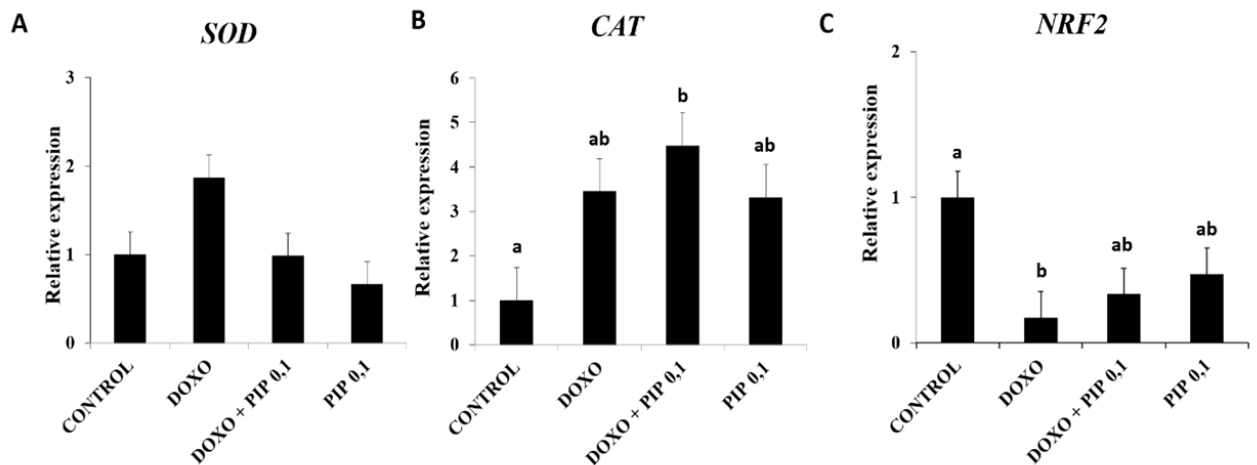


Figure 9. The levels of mRNA for (A) CAT, (B) SOD and (C) NRF2 in mice ovaries (n=4 ovaries per treatment) treated with Control (DMSO), DOX (10 mg/kg), DOX + PIP 0,1 mg/kg and PIP 0,1 mg/kg. Levels of mRNA for CAT, SOD and NRF2 were analyzed by the Kruskal-Wallis test, followed by the Dunn comparison. a, b different lowercase letters indicate significant difference between treatments ($p < 0,05$).

Discussion

The present study demonstrates for the first time that 0.1 or 10.0 mg/kg of piperine blocks the adverse effects of DOX on ovarian follicles and maintains the percentage of normal follicles similar to that of mice in the control group, bringing results where certain chemotherapy drugs, like DOX, are toxic to ovarian follicles. These chemotherapy drugs, like others, are toxic to ovarian follicles because these products are designed to attack and kill rapidly dividing cells, a common trait of cancer cells. However, this feature also affects normal, rapidly dividing cells, such as ovarian follicles, which contain immature oocytes. Chemotherapy drugs work in several ways to interfere with the cell division cycle, damaging the cells' DNA, preventing DNA replication or inhibiting cell division itself [20].

The DOX, both DOX and NAC or only 1 or 10 mg/kg piperine did not influence follicular growth. However, both DOX and 0.1, 1 or 10 mg/kg piperine or only 0.1 mg/kg piperine reduced follicular development in mice ovaries. Previous studies show that DOX has dose-dependent toxicity on the development of ovarian follicles, hormone secretion and oocyte maturation [21]. It has further been shown that granulosa cells from more advanced stages of

follicles, such as secondary and antral follicles, are more susceptible to DOX-induced cytotoxicity than primary and secondary bilayer follicles [12]. These results are consistent with previous studies that follicular apoptosis in the mouse ovary is dependent on cell type and follicle [22].

This study shows that DOX increase the area of collagen in mice ovaries. Excessive deposition of extracellular matrix components and ovarian fibrosis have been associated with decreased follicular density and ovarian dysfunction in women with ovarian endometriosis cysts, suggesting that there may be a link between follicular depletion and fibrosis [23]. Previous studies have shown that the presence of collagen fibers in the cortical stroma after chemotherapy is a characteristic sign of cell death and healing of ovarian tissue [24]. The administration of piperine improved the morphological structure, increased the levels of glycosaminoglycans and hydroxyproline, which indicate a beneficial role of piperine against collagenase-induced injury [25].

The DOX reduced the density of stromal cells in the ovaries of mice. Follicular development is strongly influenced by ovarian stromal cells, which support the tissue and play several important roles. Thus, the ovarian stromal tissue secretes extracellular matrix proteins, such as collagen [18]. Molecular pathways of DOX-induced ovarian damage such as apoptosis is the main process of cell death triggered by DOX in the ovary. Exploring DOX-triggered apoptosis shows that granulosa and stromal/thecal cells from DOX-treated mice exhibit DNA double strand breaks after chemotherapy injection [19].

This study shows that DOX did not influence the activity of SOD and CAT, and the levels of thiol in blood plasma. Previous studies showed lack of statistical significance in the thiol content and in the activity of antioxidant enzymes (SOD and CAT) in rats with polycystic ovary syndrome. DOX uses oxidative stress pathway and apoptotic signaling to induce ovarian damage [23]. In the present study, ovaries treated with PIP alone or in combination with DOX

showed no difference between antioxidant enzymes [25]. SOD provides high protection against oxidative tissue damage and aging by dismutation of superoxide radicals [24]. SOD and non-enzymatic antioxidants act on ROS by dismutating O_2 and H_2O_2 , and then CAT reduces H_2O_2 , water and oxygen, promoting ovarian protection [26].

In the present study, relative expression data by PCR of antioxidant activity play important roles in protecting cells against oxidative stress, a process that can cause cell damage. In addition, SOD showed no difference in treatments, CAT and NRF2 brought statistically inversely proportional data and brought effective protection. Ovarian function against cisplatin-induced ovarian damage by reducing apoptosis, ROS production and mitochondrial damage showed the same situation [27]. Piperine, however, did not block these effects. Oxidative stress is positively correlated with lipid peroxidation and negatively correlated with increased activity of antioxidant enzymes [18].

Conclusions

The piperine (0.1 or 10 mg/kg) blocks the adverse effects of DOX and helps to preserve the integrity of mice ovarian follicles. However, the effects of DOX on ovarian stromal cells, collagen fibers and gene expression were not inhibited by piperine.

Acknowledgments

This work was supported by the Federal University of Ceará, Sobral campus. This work also received financial support from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPQ) and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES). The team from the Laboratory of Biotechnology and Physiology of Reproduction (LABIREP) and the Nucleus for Research and Animal Experimentation (NUPEX).

Conflict of interest

All other authors declare that they have no conflicts of interest.

References

- [1] Vilar LM, Duarte DK, Lopes DC, Silva JG, Silva RE. Preservação da fertilidade em mulheres com câncer de ovário. **Revista brasileira de inovação tecnológica em saúde**. 2018. v. 8, n. 1, p. 40-50.
- [2] Carvalho BR, Caetano JP, Cavagna M, Marinho RM, Silva AA, Nakagawaa HM. Indução de ovulação em pacientes com tumor estrogênio-dependente: diretrizes clínicas da Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. **Reprodução e climatério**. 2017. 32(1):31–38.
- [3] Spears N, Lopes F, Stefansdottir A. et al. Ovarian damage from chemotherapy and current approaches to its protection. **Hum Reprod Update**. 2019.
- [4] Meredith AM, Dass CR. Increasing role of the cancer chemotherapeutic doxorubicin in cellular metabolism. **J Pharm Pharmacol**. 2016.
- [5] Ben-Aharon I, Bar-Joseph H, Tzarfaty G. et al. Doxorubicin-induced ovarian toxicity. **Reprod Biol Endocrinol**. 2010 Mar 4;8:20.
- [6] Ito A, Katagiri Y, Fukuda Y, Morita M. Dynamic changes in serum steroid hormone during the first trimester of pregnancy between infertile women conceiving with and without hormone replacement therapy. **Heliyon**. 2021 Sep 29;7(10):e08100.
- [7] 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.

- [8] Kim TH, Shin S, Yoo SD, Shin BS. Effects of Phytochemical P-Glycoprotein Modulators on the Pharmacokinetics and Tissue Distribution of Doxorubicin in Mice. **Molecules**. 2018 Feb 7;23(2):349.
- [9] Zheng J, Zhou Y, Li Y, Xu DP, Li S, Li HB. Spices for Prevention and Treatment of Cancers. **Nutrients**. 2016 Aug 12;8(8):495.
- [10] 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.
- [11] Pedersen T, Peters H. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. **J Reprod Fertil**. 1968 Dec;17(3):555-7.
- [12] Cavalcante BN, Matos-Brito BG, Paulino LRFM. et al. 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.
- [13] McKenzie AJ, Hicks SR, Svec KV, Naughton H, Edmunds ZL, Howe AK. The mechanical microenvironment regulates ovarian cancer cell morphology, migration, and spheroid disaggregation. **Sci Rep**. 2018 May 8;8(1):7228.
- [14] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**. 1976 May 7;72:248-54.
- [15] Wang S, He G, Chen M, Zuo T, Xu W, Liu X. The Role of Antioxidant Enzymes in the Ovaries. **Oxid Med Cell Longev**. 2017;2017:4371714.
- [16] Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. **Methods Biochem Anal**. 1987;32:279-312.
- [17] Aebi H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**. 1984;105:121-6.

- [18] de Assis EIT, Azevedo VAN, De Lima Neto MF. 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)**. 2022 Dec 20;13(1):18.
- [19] Xiao S, Zhang J, Liu M, Iwahata H, Rogers HB, Woodruff TK. A doxorubicina tem toxicidade dependente da dose no desenvolvimento do folículo ovariano de camundongos, na secreção hormonal e na maturação de oócitos. **Toxicol Sci**. 1º de junho de 2017;157(2):320-329.
- [20] Andersen CL, Byun H, Li Y, Xiao S. et al. Varied effects of doxorubicin (DOX) on the corpus luteum of C57BL/6 mice during early pregnancy†. **Biol Reprod**. 2021 Dec 20;105(6):1521-1532.
- [21] Wang Y, Liu M, Johnson SB. et al. Doxorubicin obliterates mouse ovarian reserve through both primordial follicle atresia and overactivation. **Toxicol Appl Pharmacol**. 2019 Oct 15;381:114714.
- [22] Daware MB, Mujumdar AM, Ghaskadbi S. Reproductive toxicity of piperine in Swiss albino mice. **Planta Med**. 2000 Apr;66(3):231-6.
- [23] Moradi Negahdari F, Hadjzadeh MA, Gholamnezhad Z, Sohrabi F, Samadi Noshahr Z. The Protective Effects of Trans-Anethole against Polycystic Ovary Syndrome Induced Histopathological and Metabolic Changes in Rat. **Int J Fertil Steril**. 2022 Aug 21;16(3):192-199.
- [24] Yang L, Chen Y, Liu Y. et al. The Role of Oxidative Stress and Natural Antioxidants in Ovarian Aging. **Front Pharmacol**. 2021 Jan 14;11:617843.
- [25] Zou H, Qu H, Bian Y. et al. Polystyrene Microplastics Induce Oxidative Stress in Mouse Hepatocytes in Relation to Their Size. **Int J Mol Sci**. 2023 Apr 17;24(8):7382.

[26] Sun TC, Liu XC, Yang SH. et al. Melatonin Inhibits Oxidative Stress and Apoptosis in Cryopreserved Ovarian Tissues via Nrf2/HO-1 Signaling Pathway. **Front Mol Biosci.** 2020 Jul 29;7:163.

[27] Fattah A, Morovati A, Niknam Z, Mashouri L, Asadi A, Rizi ST, Abbasi M, Shakeri F, Abazari O. The Synergistic Combination of Cisplatin and Piperine Induces Apoptosis in MCF-7 Cell Line. **Iran J Public Health.** 2021 May;50(5):1037-1047.

7 CONCLUSÕES GERAIS

- A piperina (0,1 ou 10 mg/kg) bloqueia os efeitos adversos da doxorubicina e ajuda a preservar a integridade morfológica dos folículos ovarianos de camundongos após tratamento quimioterápico.
- Os efeitos da doxorubicina nas células do estroma ovariano, nas fibras de colágeno e na expressão gênica em ovários de camundongos não são inibidos pela piperina.

8 PERSPECTIVAS

Os dados obtidos nessa dissertação poderão auxiliar no conhecimento dos efeitos do tratamento com piperina na função ovariana *in vivo*, preparando bases científicas para futuros testes da associação desse composto com DOX, ou outros antineoplásicos, na prática clínica. Evidencia-se que os estudos desenvolvidos neste trabalho foram realizados com animais saudáveis e em condições coordenadas. Desta forma, mais estudos devem ser realizados para avaliar como a piperina atuaria em animais induzidos a doenças e posteriormente tratados, de modo a avaliar se o tratamento iria replicar de forma positiva amenizando os efeitos causados pela doxorubicina na quimioterapia.

REFERÊNCIAS

- Abdel-Daim MM. et al. Piperine enhances the antioxidant and anti-inflammatory activities of thymoquinone against microcystin-LR-induced hepatotoxicity and neurotoxicity in mice. **Oxid Med Cell Longev**, v.19, p. 1-10, 2019.
- Adefegha SA, Oboh G, Okeke BM. Comparative effects of berberine and piperine on the neuroprotective potential of neostigmine. **J Complement Integr Med**, v.18, p. 491-497, 2021.
- Amorim, CA. et al. Effect of sectioning on the number of isolated ovine preantral follicles. **Small Ruminant Research**, v. 37, n. 3, p. 269-277, 2000.
- Andersen CL. et al. Varied effects of doxorubicin (DOX) on the corpus luteum of C57BL/6 mice during early pregnancy†. **Biol Reprod**, v.105, p.1521-1532, 2021.
- Arecco L. et al. How to Protect Ovarian Function before and during Chemotherapy? **J Clin Med**, v.10, p.4192, 2021.
- Arhin SK, Lu J, Xi H, Jin X. Energy requirements in mammalian oogenesis. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)**, v.64, p.12-19, 2018.
- Bahrami A. et al. Effects of curcumin-piperine supplementation on systemic immunity in young women with premenstrual syndrome and dysmenorrhea: A randomized clinical trial. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v.278, p.131-136, 2022.
- Bertoldo MJ. et. al. NAD⁺ Repletion Rescues Female Fertility during Reproductive Aging. **Cell Reports**, v.30, p.1670-1681, 2020.
- Betteridge, KJ. et al. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 38, p. 87-98, 1989.
- Bozzetti J, Zandoná L, Hentschke MR, Petracco R. Preservação da fertilidade em mulheres com câncer. **Acta méd**, v.39, p.315-326, 2018.
- Brahmanaidu P. et al. Mitigating efficacy of piperine in the physiological derangements of high fat diet induced obesity in Sprague Dawley rats. **Chem Biol Interact**, v.25, p.42-51, 2014.
- Cardoso CV, Bondan EF. Doxorubicina e chemobrain - estudos experimentais para a avaliação dos déficits cognitivos pósquimioterapia. **Atas de Saúde Ambiental** (São Paulo, online), v.6, p.209-225, 2018.
- Carp OE. et.al. Electrochemical behaviour of piperine. Comparison with control antioxidants. **Food Chemistry**, v.33, p.110-128, 2021.
- Castillo LM. et al. The cyto-protective effects of LH on ovarian reserve and female fertility during exposure to gonadotoxic alkylating agents in an adult mouse model. **Hum Reprod**. Aug 18;36(9):2514-2528. 2021.
- Costa R. et al. Associations of reproductive factors with postmenopausal follicle stimulating hormone. **Womens Midlife Health**, v.8, p.1-7, 2022.

- Dowling DK; Simmons LW. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v. 276, p. 1737-1745, 2009.
- Duan Z. et al. Protective Effects of Piperine on Ethanol-Induced Gastric Mucosa Injury by Oxidative Stress Inhibition. **Nutrients**, v.14, p.44-47, 2022.
- Dutta M. et al. Protective effects of piperine against copper-ascorbate induced toxic injury to goat cardiac mitochondria in vitro. **Food Funct**, v.9, p.52-67, 2014.
- Erickson GF. An analysis of follicle development and ovum maturation. **Seminars in Reproductive Endocrinology**, v. 4, [s.n.], p. 233-254, 1986.
- Figueiredo JR. 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.
- Florou P. et al. Does coenzyme Q10 supplementation improve fertility outcomes in women undergoing assisted reproductive technology procedures? A systematic review and meta-analysis of randomized-controlled trials. **J Assist Reprod Genet**. Oct;37(10):2377-2387. 2020.
- Gadducci. et al. The Management of Patients With Uterine Sarcoma: A Debated Clinical Challenge. **Rev. Oncol Hematol**, v. 65, n. 2, p. 129-42, 2008.
- Gewirtz DA. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. **Biochem Pharmacol**, v.57, p.727-41, 1999.
- Gilmer G. et al. Uncovering the "riddle of femininity" in osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis of menopausal animal models and mathematical modeling of estrogen treatment. **Osteoarthritis Cartilage**, v.4, p.447-457, 2023.
- Han J. et al. Resveratrol attenuates doxorubicin-induced meiotic failure through inhibiting oxidative stress and apoptosis in mouse oocytes. **Aging (Albany NY)**. Apr 30;12(9):7717-7728. 2020.
- Haq I. et al. Piperine: A review of its biological effects. **Phytotherapy Research**, v.35, p.680-670, 2021.
- He J. et al. Theaflavin 3, 3'-Digallate Delays Ovarian Aging by Improving Oocyte Quality and Regulating Granulosa Cell Function. **Oxid Med Cell Longev**. Dec 8;2021:7064179. 2021.
- Hussain T. et al. The Role of Oxidative Stress and Antioxidant Balance in Pregnancy. **Mediators Inflamm**, v.27, p.1-11, 2021.
- Isola JVV. et al. 17 α -Estradiol promotes ovarian aging in growth hormone receptor knockout mice, but not wild-type littermates. **Exp Gerontol**, v.129, p.1-15, 2020.
- Jaisin Y. et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of piperine on UV-B-irradiated human HaCaT keratinocyte cells. **Life Sci**, v.15, p.263, 2020.
- Kajarabille N, Latunde-Dada GO. Programmed Cell-Death by Ferroptosis: Antioxidants as Mitigators. **Int J Mol Sci**. Oct 8;20(19):4968. 2019.
- Kaltsas A. et al. The Silent Threat to Women's Fertility: Uncovering the Devastating Effects of Oxidative Stress. **Antioxidants (Basel)**. Jul 26;12(8):1490. 2023.

- Kim TH; Shin S.; Yoo SD; Shin BS. Effects of Phytochemical P-Glycoprotein Modulators on the Pharmacokinetics and Tissue Distribution of Doxorubicin in Mice. **Molecules**, v.23, p.349, 2018.
- Knez J, Al Mahdawi L, Takač I, Sobočan M. The Perspectives of Fertility Preservation in Women with Endometrial Cancer. **Cancers** (Basel). Feb 3;13(4):602. 2021.
- Lai, S. Carcinogenesis is consequence of failure of tissue development. **Med Hyp**, v. 119, s. n., p.84-87, 2018.
- Lewandowska AM, Rudzki M, Rudzki S, Lewandowski T, Laskowska B. Environmental risk factors for cancer - review paper. **Ann Agric Environ Med**, v.26, p.1-7, 2019.
- Li D. et al. Role of acetylation in doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Redox Biol**, v.46, p.1-14, 2021.
- Lin F. et al. Stanniocalcin 1 promotes metastasis, lipid metabolism and cisplatin chemoresistance via the FOXC2/ITGB6 signaling axis in ovarian cancer. **J Exp Clin Cancer Res**. Apr 7;41(1):129. 2022.
- 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.
- Luca SV, et al. Insights into the Phytochemical and Multifunctional Biological Profile of Spices from the Genus Piper. **Antioxidants** (Basel). Oct 19;10(10):1642. 2021.
- Lucci, CM. et al. Effect of the interval of serial sections of ovarian tissue in the tissue chopper on the number of isolated caprine preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 56, n. 1, p. 39-49, 1999.
- Maciel MAM. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.
- Maruzzo M. et al. Adjuvant and neoadjuvant chemotherapy for soft tissue sarcomas. **Curr Med Chem**.;20(5):613-20, 2013.
- McKey J. et al. Integration of mouse ovary morphogenesis with developmental dynamics of the oviduct, ovarian ligaments, and rete ovarii. **Elife**, v.11, p.1-26, 2022.
- Merico V, Zanoni M, Parada-Bustamante A, Garagna S, Zuccotti M. In Vitro Maturation of Fully Grown Mouse Antral Follicles in the Presence of 1 nM 2-Hydroxyestradiol Improves Oocytes' Developmental Competence. **Reprod Sci**. Jan;28(1):121-133. 2021.
- Moiseeva N. et al. The Molecular Mechanisms of Oleanane Aldehyde- β -enone Cytotoxicity against Doxorubicin-Resistant Cancer Cells. **Biology** (Basel). Mar 8;12(3):415. 2023.
- Morgan S. et al. Cisplatin and doxorubicin induce distinct mechanisms of ovarian follicle loss; imatinib provides selective protection only against cisplatin. **PLoS One**, v.8, p.1-10, 2013.
- Morris G, Gevezova M, Sarafian V, Maes M. Redox regulation of the immune response. **Cell Mol Immunol**. Oct;19(10):1079-1101. 2022.
- Nasrnezhad R, Halalkhor S, Sadeghi F, Pourabdolhossein F. Piperine Improves Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) in Lewis Rats Through its Neuroprotective, Anti-inflammatory, and Antioxidant Effects. **Mol Neurobiol**, v.58, p.5473-5493, 2021.

- Niazian M. Application of genetics and biotechnology for improving medicinal plants. **Planta**, v.249, p.953-973, 2019.
- Niringiyumukiza JD. et. al. Protective properties of glycogen synthase kinase-3 inhibition against doxorubicin-induced oxidative damage to mouse ovarian reserve. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.116, 2019.
- Nutmakul T, Chewchinda S. Synergistic effect of Trikatuk, a traditional Thai formulation, on antioxidant and alpha-glucosidase inhibitory activities. **Heliyon**, v.18, p.1-9, 2023.
- Ofoedu CE. et al. Hydrogen Peroxide Effects on Natural-Sourced Polysacchrides: Free Radical Formation/Production, Degradation Process, and Reaction Mechanism-A Critical Synopsis. **Foods**. Mar 25;10(4):699. 2021.
- Okunomiya A. et al. Figla promotes secondary follicle growth in mature mice. **Sci Rep**. May 10;11(1):9842. 2021.
- Pajokh M, Mesbah F, Bordbar H, Talaei-Khozani T. Different cell death types determination in juvenile mice ovarian follicles. **Iran J Vet Res**, v.19, p.298-203, 2018.
- Pereira J. et. al., Silencing of RpATG8 impairs the biogenesis of maternal autophagosomes in vitellogenic oocytes, but does not interrupt follicular atresia in the insect vector *Rhodnius prolixus*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.14, p.1-20, 2020.
- Pourjafari F. et al. Hydroalcoholic extract and seed of *Foeniculum vulgare* improve folliculogenesis and total antioxidant capacity level in F1 female mice offspring. **BMC Complement Med Ther**. Sep 29;20(1):294. 2020.
- Quijia CR, Araujo VH, Chorilli M. Piperine: Chemical, biological and nanotechnological applications. **Acta Pharm**, v.71, p.185-213, 2021.
- Rehman MU. et al. Piperine Regulates Nrf-2/Keap-1 Signalling and Exhibits Anticancer Effect in Experimental Colon Carcinogenesis in Wistar Rats. **Biology (Basel)**, v.9, p.302, 2020.
- Rosario R, Cui W, Anderson RA. Potential ovarian toxicity and infertility risk following targeted anti-cancer therapies. **Reprod Fertil**. Jul 11;3(3):R147-R162. 2022.
- Rushing JS. et al. Ovarian stimulation for fertility preservation in an oncology patient with etonogestrel implant in place. **J Assist Reprod Genet**. Feb;38(2):513-516. 2021.
- Saha P. et al. Piperine Attenuates Cigarette Smoke-Induced Oxidative Stress, Lung Inflammation, and Epithelial-Mesenchymal Transition by Modulating the SIRT1/Nrf2 Axis. **Int J Mol Sci**, v.23, p.1-21, 2022.
- Sajadimajd S, Khazaei M. Oxidative Stress and Cancer: The Role of Nrf2. **Curr Cancer Drug Targets**, v.18, p.538-557, 2018.
- Sales CF. et al. Autophagy and Cathepsin D mediated apoptosis contributing to ovarian follicular atresia in the Nile tilapia. **Mol Reprod Dev**, v.86, p.1592-1602, 2019.
- Shao T. et al. Autophagy regulates differentiation of ovarian granulosa cells through degradation of WT1. **Autophagy**. Aug;18(8):1864-1878. 2022.
- Shaw JM. et al. Evaluation of the long-term function of cryopreserved ovarian grafts in the mouse, implications for human applications. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 161, n. 1-2, p. 103-110, 2000.

- 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**, [s.n.], p. 1-8, 2020.
- 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.
- Sonigo C, Beau I, Binart N, Grynberg M. The Impact of Chemotherapy on the Ovaries: Molecular Aspects and the Prevention of Ovarian Damage. **Int J Mol Sci**. Oct 27;20(21):5342. 2019.
- Spears N. et al. Ovarian damage from chemotherapy and current approaches to its protection. **Hum Reprod Update**, v.25, p.673-693, 2019.
- Stasiłowicz A. et al. Combinations of Piperine with Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin as a Multifunctional System. **Int J Mol Sci**, v.22, p.1-16, 2021.
- Tripathi AK, Ray AK, Mishra SK. Molecular and pharmacological aspects of piperine as a potential molecule for disease prevention and management: evidence from clinical trials. **Beni Suef Univ J Basic Appl Sci**. 11(1):16. 2022.
- Verma N. et al. Antioxidative Effects of Piperine against Cadmium-Induced Oxidative Stress in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocytes. **J Diet Suppl**, v.17, p.41-52, 2020.
- Vilar LMGS. et al. Preservação da fertilidade em mulheres com câncer de ovário. **Revista brasileira de inovação tecnológica em saúde**, v. 8, n. 1, p. 40-50, 2018.
- Vurmaz A. et al. Antioxidant effects of piperine in in-vivo chick embryo cataract model induced by steroids. **Cutan Ocul Toxicol**, v.32, p.182-189, 2019.
- Wald K. et al. Back-to-back random-start ovarian stimulation prior to chemotherapy to maximize oocyte yield. **J Assist Reprod Genet**. Jun;36(6):1161-1168. 2019.
- Wang Y. et al. Citrus flavonoids and their antioxidant evaluation. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v.62, p.3833-3854, 2022.
- Wang. et. al. Doxorubicin obliterates mouse ovarian reserve through both primordial follicle atresia and overactivation. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.381, p.1-26, 2019.
- Watson C, Gadikota H, Barlev A, Beckerman R. A review of the risks of long-term consequences associated with components of the CHOP chemotherapy regimen. **J Drug Assess**. Jun 3;11(1):1-11. 2022.
- Yuan H. et al. Role of Nrf2 in the regulation of cellular senescence. **Cell biochemistry Mol**, v.476, p.247-259, 2021.
- Zahin M. et al. Antioxidant, antibacterial, and antimutagenic activity of Piper nigrum seeds extracts. **Saudi J Biol Sci**, v.9, p.5094-5105, 2021.
- Zhang H. et al. Piperine attenuates the inflammation, oxidative stress, and pyroptosis to facilitate recovery from spinal cord injury via autophagy enhancement. **Phytother Res**, v.37, p.438-451, 2023.
- Zhang J. et al. Deubiquitinase USP35 restrains STING-mediated interferon signaling in ovarian cancer. **Cell Death Differ**, v.28, p.139-155, 2021.

Zhang J. et al. Initiation of follicular atresia: gene networks during early atresia in pig ovaries. **Reproduction**, v.156, p.23-33, 2018.

Zhang X. et al. Enhanced glycolysis in granulosa cells promotes the activation of primordial follicles through mTOR signaling. **Cell Death Dis.** Jan 27;13(1):87. 2022.

ANEXO A - DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DO PROJETO "AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA PIPERINA EM REDUZIR OS EFEITOS ADVERSOS CAUSADOS PELA DOXORRUBICINA EM FOLÍCULOS OVARIANOS DE CAMUNDONGAS



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 do potencial da piperina em reduzir os efeitos adversos causados pela doxorubicina em folículos ovarianos de camundongas**", registrada como **Projeto nº 08/21**, sob a responsabilidade da **Prof. Dr. José Roberto Viana 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 14/09/2021.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/03/2022 até 01/04/2024
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> / Camundongos heterogênicos Swiss
Nº de animais	125 (cento e vinte e cinco)
Peso/Idade	18 g / 2 meses
Sexo	♀ Fêmeas
Origem	Biotério Central de Fortaleza

Sobral, 28 de setembro de 2021.

Prof. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar
Vice-coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

