



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA**  
**MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS**

**ANNA CRISTINA ALBUQUERQUE BARROS**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA CROMOMICINA A<sub>5</sub> SOBRE O  
DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS EM TECIDO  
OVARIANO OVINO**

**FORTALEZA-CE**

**2024**

ANNA CRISTINA ALBUQUERQUE BARROS

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA CROMOMICINA A<sub>5</sub> SOBRE O  
DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS EM TECIDO  
OVARIANO OVINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Morfofuncionais. Área de Concentração: Biologia da Reprodução.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Beatriz Graça Duarte

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Ribeiro Rodrigues

**FORTALEZA-CE**

**2024**

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)

---

B273a Barros, Anna Cristina Albuquerque.

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA CROMOMICINA A5 SOBRE O DESENVOLVIMENTO  
*IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS EM TECIDO OVARIANO OVINO / Anna Cristina  
Albuquerque Barros. – 2024.

71 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina,  
Mestrado Profissional em Farmacologia Clínica, Fortaleza, 2024.

Orientação: Profa. Dra. Ana Beatriz Graça Duarte.

Coorientação: Profa. Dra. Ana Paula Ribeiro Rodrigues.

1. Folículos pré-antrais. 2. Insuficiência ovariana. 3. Quimioterapia. 4. Cromomicina A5.  
I. Título.

---

CDD 615.1

ANNA CRISTINA ALBUQUERQUE BARROS

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA CROMOMICINA A<sub>5</sub> SOBRE O  
DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS EM TECIDO  
OVARIANO DE OVINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Morfofuncionais. Área de Concentração: Biologia da Reprodução.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Ana Beatriz Graça Duarte - UFC (Orientadora)

---

Profa. Dra. Juliana Jales de Hollanda Celestino – UNILAB (Examinadora)

---

Profa. Dra. Laritza Ferreira de Lima – UECE (Examinadora)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por sua infinita graça e misericórdia ao longo deste processo. A Ele devo toda a força, sabedoria e discernimento que me foram concedidos para superar desafios, vencer obstáculos e alcançar esta etapa tão significativa em minha vida acadêmica.

À minha amada família, expresso minha profunda gratidão. Vocês foram meu alicerce, meu porto seguro e minha fonte constante de incentivo. Aos meus pais, Fabiano Pereira Barros e Eliane Albuquerque Barros, sua dedicação incansável e amor incondicional me impulsionaram a perseguir meus sonhos com persistência e determinação. Vocês são a minha maior fonte de inspiração e orgulho. Aos meus irmãos, Fabiana Albuquerque Barros, Vitória Albuquerque Barros e Emanuel Abrahão Albuquerque Barros, agradeço pelo apoio constante e por sempre me incentivarem a buscar o meu melhor e por celebrarem cada conquista comigo. Ao meu cunhado, Diego Vinícius, agradeço pelo apoio e amizade. A presença de vocês em minha vida foi fundamental para me proporcionar momentos de descontração e me ajudar a manter o equilíbrio durante a jornada acadêmica. Ao meu querido e amado esposo Davisson Emanuel Duarte, dedico um agradecimento especial e cheio de amor. Sua compreensão, paciência e apoio incondicional foram essenciais para que eu pudesse conciliar meus estudos com a vida pessoal. Você é meu companheiro de jornada, meu porto seguro.

À minha amiga querida Kayse Najara Matos Damasceno, agradeço por compartilhar suas experiências e conhecimentos sobre o mestrado, por me orientar nos primeiros passos e por me apresentar as oportunidades que essa nova etapa poderia oferecer. Você foi essencial nessa trajetória.

Agradeço a minha querida orientadora, professora Dra. Ana Beatriz Duarte, por ser um exemplo de profissionalismo e humanidade, por seus ensinamentos valiosos, por acreditar em meu potencial e por me incentivar a sempre buscar o meu melhor. Sou imensamente grata por todo o aprendizado adquirido, tanto na área acadêmica quanto na pessoal.

À minha co-orientadora, professora Dra. Ana Paula Ribeiro Rodrigues, por me receber no LAMOFOPA e por todo suporte.

À toda minha equipe executora do trabalho: Gaby Palomino, amiga que muito me ajudou durante a execução do experimento, obrigada pelos momentos de alegria,

pelas palavras de incentivo nos dias difíceis, por toda dedicação e ensinamentos. À Dra Naiza Sá, por compartilhar seus conhecimentos, e por sua inestimável contribuição não apenas na execução do experimento, mas também para o meu crescimento pessoal e profissional. Aos Pós-docs Anna Clara Acciolly e Gildas Mbemya, por todas as contribuições na execução do experimento e artigo. Ao professor Dr. Marco Schiavo pela execução das análises estatísticas. Aos Ics Alesandro Silva e João Elmo, por todo auxílio ao longo do experimento.

Às minhas amigas Carmen Huayhua, Isabor Queiroz, Gabriela Carvalho, Ana Júlia Fernandes, Carla Letícia e Thamyres Rodrigues, por tornarem os meus dias durante essa jornada mais leve, por todo amparo e conselhos.

À Universidade Federal do Ceará, à Faculdade de Medicina (FAMED) e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais pela oportunidade e experiências proporcionadas.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa auxílio.

Ao Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-Antrais (LAMOFOPA) da UECE pela oportunidade e toda contribuição científica.

## RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da cromomicina A<sub>5</sub> (CA<sub>5</sub>), um metabólito isolado de bactérias marinhas do gênero *Streptomyces* com potente atividade antibacteriana e antitumoral, na sobrevivência, ativação e desenvolvimento *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais de ovelhas. Fragmentos do córtex ovariano coletados de abatedouro foram aleatoriamente distribuídos nas seguintes condições experimentais: controle não cultivado (NC), cultivado *in vitro* (CIV) em meio  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> sozinho (MEM<sup>+</sup>); ou adicionado de 0,3  $\mu$ g/mL de doxorrubicina (DOX) como controle positivo; ou de 100, 200 ou 300nM de CA<sub>5</sub> (CA<sub>5</sub>100, CA<sub>5</sub>200 e CA<sub>5</sub>300). Após 1 ou 6 dias de CIV, os fragmentos foram processados e corados com Ácido Periódico Schiff (PAS) para avaliação morfológica ou Sudan Black B (SBB) para avaliação do acúmulo de lipofuscina, imunohistoquímica para PCNA e TUNEL e expressão gênica para os genes FOXL2, BAX, BCL2 e caspase-3. O tratamento CA<sub>5</sub>300 apresentou a menor taxa de sobrevivência folicular no D1, quando comparado aos demais tratamentos (P<0,05). Após 6 dias de CIV, DOX, CA<sub>5</sub>200 e CA<sub>5</sub>300 reduziram significativamente a sobrevivência em todas as categorias foliculares, quando comparados ao MEM<sup>+</sup>. Com relação aos folículos primordiais normais, apenas MEM<sup>+</sup> e CA<sub>5</sub>100 se mantiveram semelhantes ao NC após 1 dia de CIV. Em relação ao desenvolvimento folicular, o CA<sub>5</sub>300 foi o único que apresentou a menor taxa de folículos em desenvolvimento com relação ao MEM<sup>+</sup> no D1. No D6, CA<sub>5</sub>200 e CA<sub>5</sub>300 apresentaram as menores taxas de folículos em desenvolvimento com relação aos demais tratamentos (P<0,05). Quanto à densidade estromal, no D6, a CA<sub>5</sub>200 e CA<sub>5</sub>300 reduziram a densidade celular quando comparadas ao MEM<sup>+</sup> (P<0,05), enquanto a CA<sub>5</sub>100 se manteve semelhante. No D6 de CIV, todos os tratamentos apresentaram percentual significativamente maior de células senescentes (SB) em relação ao MEM<sup>+</sup>, mas a CA<sub>5</sub>300 apresentou a maior marcação para fragmentação do DNA, comparado ao MEM<sup>+</sup> (P<0,05). Com relação à proliferação celular, todos os tratamentos apresentaram uma redução significativa, comparados ao MEM<sup>+</sup> (P<0,05). Além disso, os resultados mostraram que os níveis de mRNA para o gene FOXL2 reduziram significativamente nos tratamentos com DOX e CA<sub>5</sub>100. Já o nível de mRNA relativo de BAX/BCL2 foi superior no tratamento com DOX (P<0,05). Entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos em relação à expressão da caspase-3. Os dados do presente estudo indicam que a CA<sub>5</sub> possui efeitos de

citotoxicidade dose-dependente nos folículos pré-antrais, afetando tanto as células estromais quanto a sobrevivência e o desenvolvimento dos folículos pré-antrais, sugerindo um efeito na indução da senescência celular.

**Palavras-chave:** Folículos pré-antrais. Insuficiência ovariana. Quimioterapia. Cromomicina A<sub>5</sub>.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of chromomycin A<sub>5</sub> (CA<sub>5</sub>), a metabolite isolated from marine bacteria of the genus *Streptomyces* with potent antibacterial and antitumor activity, on the survival, activation and in vitro development of sheep preantral ovarian follicles. Ovarian cortex fragments collected from a slaughterhouse were randomly assigned to the following experimental conditions: uncultured control (NC), cultured in vitro (CIV) in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> medium alone (MEM<sup>+</sup>); or with the addition of 0.3  $\mu$ g/mL doxorubicin (DOX) as a positive control; or 100, 200 or 300nM of CA<sub>5</sub> (CA<sub>5</sub>100, CA<sub>5</sub>200 and CA<sub>5</sub>300). After 1 or 6 days of IVC, the fragments were processed and stained with Periodic Acid Schiff (PAS) for morphological evaluation or Sudan Black B (SBB) to assess lipofuscin accumulation, immunohistochemistry for PCNA and TUNEL and gene expression for the FOXL2, BAX, BCL2 and caspase-3 genes. The CA<sub>5</sub>300 treatment showed the lowest follicle survival rate on D1 when compared to the other treatments ( $P < 0.05$ ). After 6 days of IVC, DOX, CA<sub>5</sub>200 and CA<sub>5</sub>300 significantly reduced survival in all follicular categories when compared to MEM<sup>+</sup>. With regard to normal primordial follicles, only MEM<sup>+</sup> and CA<sub>5</sub>100 remained similar to NC after 1 day of IVC. With regard to follicular development, CA<sub>5</sub>300 was the only one with the lowest rate of developing follicles compared to MEM<sup>+</sup> on D1. On D6, CA<sub>5</sub>200 and CA<sub>5</sub>300 had the lowest rates of developing follicles compared to the other treatments ( $P < 0.05$ ). As for stromal density, at D6, CA<sub>5</sub>200 and CA<sub>5</sub>300 had reduced cell density compared to MEM<sup>+</sup> ( $P < 0.05$ ), while CA<sub>5</sub>100 remained similar. On D6 of IVC, all treatments showed a significantly higher percentage of senescent cells (SB) compared to MEM<sup>+</sup>, but CA<sub>5</sub>300 showed the highest mark for DNA fragmentation compared to MEM<sup>+</sup> ( $P < 0.05$ ). With regard to cell proliferation, all treatments showed a significant reduction compared to MEM<sup>+</sup> ( $P < 0.05$ ). In addition, the results showed that the mRNA levels for the FOXL2 gene were significantly reduced in the treatments with DOX and CA<sub>5</sub>100. The relative mRNA level of BAX/BCL2 was higher in the DOX treatment ( $P < 0.05$ ). However, no significant differences were observed between treatments in relation to caspase-3 expression. The data from the present study indicate that CA<sub>5</sub> has dose-dependent cytotoxic effects on preantral follicles, affecting both stromal cells and the survival and development of preantral follicles, suggesting an effect on the induction of cellular senescence.

**Keywords:** Pre-antral follicles. Ovarian insufficiency. Chemotherapy. Chromomycin A5.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Representação esquemática da foliculogênese em mamíferos durante a vida reprodutiva.....22
- Figura 2** - Imagens representativas da morfologia folicular em diferentes tratamentos. (A) Controle NC; (B) MEM<sup>+</sup>; (C) DOX. (D) CA<sub>5</sub>100; (D) CA<sub>5</sub>200; (D) CA<sub>5</sub>300. As setas amarelas e vermelhas indicam folículos normais e degenerados, respectivamente. Ampliação da imagem = 400×; Barra de escala = 50µm. Nu=núcleo, Ct=citoplasma, Gc=células da granulosa.....42
- Figura 3** - Percentual de folículos pré-antrais ovinos morfologicamente normais no tecido ovariano fresco (controle NC), ou após CIV em MEM<sup>+</sup> (sozinho), na presença de DOX (0,3µg/mL) ou de CA<sub>5</sub> nas concentrações de 100, 200 ou 300nM/mL por 1 ou 6 dias (média±SEM). A) Percentual de folículos pré-antrais normais (sobrevivência folicular). B) Percentual de folículos primordiais morfologicamente normais. C) Percentual de folículos em desenvolvimento morfologicamente normais. (\*) Compara tratamentos com controle NC no dia 1 de cultivo. (A,B,C) Comparam o mesmo tratamento entre os dias 1 e 6 (P<0,05). (a,b,c) Comparam diferença entre tratamentos no mesmo dia de cultivo (D1 ou D6; P <0,05.....43
- Figura 4** - Marcação de lipofuscina representada pelo % de senescência em tecido ovariano após 6 dias de CIV em MEM<sup>+</sup>, na presença de DOX (0.3 µg/mL) ou de CA<sub>5</sub> (100 e 300nM). (a,b,c) Comparam os tratamentos.....46
- Figura 5** - Marcação do antígeno de proliferação nuclear (PCNA) em tecido ovariano após 6 dias em MEM<sup>+</sup>, na presença de DOX (0.3 µg/mL) ou de CA<sub>5</sub> (100 e 300nM (a,b,c) Comparam os tratamentos.....46
- Figura 6** - Marcação de fragmentação do DNA pela técnica de TUNEL no tecido ovariano após 6 dias de CIV em MEM<sup>+</sup>, na presença de DOX (0.3 µg/mL) ou de CA<sub>5</sub> (100 e 300nM). (a,b,c) Comparam os tratamentos .....47
- Figura 7** - Imagens representativas da imunomarcação pela técnica de TUNEL em fragmentos ovarianos CIV, durante 6 dias. As células TUNEL positivas são representadas pela coloração

marrom. (A) MEM<sup>+</sup>; (B) DOX 0.3 µg/mL ; (C) CA<sub>5</sub>100; (D) CA<sub>5</sub>300; (E) Controle Positivo; (F) Controle Negativo.....48

**Figura 8** - Média±SEM da expressão do mRNA dos genes FOXL2, BAX/BCL2 e Caspase-3 avaliados por qPCR (A-C). (a,b) Comparam os tratamentos (P<0,05).....49

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Sequência de iniciadores de RT-qPCR e número de acesso usados para análises quantitativas de expressão gênica no tecido ovariano cultivado por 6 dias.....39

**Tabela 2.** Densidade das células do estroma (média±SEM) em tecido ovariano não cultivado (controle NC) ou após CIV em MEM<sup>+</sup> (sozinho), na presença de DOX (0,3µg/mL) ou de CA<sub>5</sub> nas concentrações de 100, 200 ou 300nM/mL por 1 ou 6 dias. (\*) Compara todos os tratamentos com controle NC no dia 1 de cultivo. (<sup>A,B</sup>) Comparam o mesmo tratamento entre os dias 1 e 6 (mesma linha, entre colunas; (P<0,05). (<sup>a,b,c</sup>) Comparam os tratamentos no mesmo dia de cultivo (mesma coluna, entre linhas; P<0,05).....45

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAX	BCL2 associated X
BCL2	B-cell leukemia/lymphoma protein 2
BH3	Miméticos do domínio de homologia 3
BSA	Albumina Sérica Bovina
CO2	Dióxido de carbono
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOX	Doxorrubicina
FOXO3	Fator de transcrição forkhead BOX O3
FOXL2	Forkhead Box L2
H2O2	Peróxido de Hidrogênio
HEPES	Ácido 4- (2- hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfônico
LH	Hormônio Luteinizante
MEM	Meio Essencial Mínimo
MOIFOPA	Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovariano Préantrais
O <sub>2</sub>	Oxigênio
PAS	Ácido Periódico de Schiff-Hematoxilina
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PTEN	Fosfatase e homólogo de tensina
RT-qPCR	PCR quantitativa em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labelling

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
h	Hora
L	Litro
mg	Miligramas
Min	Minuto
mL	Mililitros
mm	Milímetro
mM	Milimolar
ng	Nanogramas
nM	Nanomolar
nº	Número
pH	Potencial hidrogeniônico
µg	Microgramas
µL	Microlitros

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	20
2.1 Morfofisiologia da gônada feminina.....	20
2.2 A gametogênese feminina: oogênese e foliculogênese .....	20
2.3 Senescência celular e envelhecimento ovariano.....	23
2.4 Atresia folicular.....	25
2.5 Importância da biotécnica de MOIFOPA para teste de toxicidade reprodutiva ...	26
2.7 Agentes quimioterapêuticos e os impactos sobre os folículos ovarianos .....	29
2.8 Uso de substâncias naturais com ação antitumoral .....	30
2.8.1 Cromomicinas .....	30
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	33
<b>4 HIPÓTESE CIENTÍFICA</b> .....	35
<b>5 OBJETIVOS</b> .....	35
5.1 Objetivo Geral .....	35
5.2 Objetivos específicos.....	35
<b>6 METODOLOGIA</b> .....	36
6.1 Coleta de ovários .....	36
6.2 Meio de Cultivo.....	36
6.3 Cultivo <i>in vitro</i> de folículos pré-antrais de ovinos inclusos em fragmentos do córtex ovarianos.....	36
6.4 Análise morfológica dos folículos pré-antrais cultivados <i>in vitro</i> .....	37
6.5 Avaliação da ativação folicular .....	37
6.6 Densidade do estroma .....	38
6.7 Sudan black B .....	38
6.8 Análise imunohistoquímica (IHC) .....	38
6.9 Ensaio de fragmentação de DNA para detecção de células apoptóticas (coloração TUNEL) .....	39

6.10 Extração de ácido ribonucleico (RNA) e PCR quantitativo em tempo real .....	40
6.11 Análise estatística .....	41
<b>7 RESULTADOS</b> .....	<b>42</b>
7.1 Morfologia folicular .....	42
7.2 Densidade do estroma .....	45
7.3 Senescência celular .....	46
7.4 Proliferação celular.....	47
7.5 Detecção da fragmentação do DNA pelo ensaio de TUNEL .....	48
7.6 Expressão relativa do mRNA de FOXL2, BAX, BCL2 e CASPASE-3 .....	49
<b>8 DISCUSSÃO</b> .....	<b>51</b>
<b>9 CONCLUSÃO</b> .....	<b>56</b>
<b>10 PERSPECTIVA</b> .....	<b>57</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>58</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Existem diferentes manifestações clínicas causadas ao sistema reprodutor feminino após tratamento quimioterápico, que vão desde falhas temporárias do ciclo menstrual, até uma perda permanente da reserva de folículos ovarianos que levam a paciente à infertilidade. Do sistema reprodutor feminino, o ovário é o órgão mais suscetível aos danos causados pelo tratamento de quimioterapia que podem levar as mulheres submetidas ao tratamento, à uma falha ovariana prematura (FOP) (Oktem *et al.*, 2018).

A FOP pode ocorrer principalmente pela degeneração dos folículos primordiais causada pelos danos ao DNA dos oócitos que levam os folículos pré-antrais à apoptose ou causados pela redução drástica dos folículos em crescimento que levam a uma ativação em massa dos folículos primordiais, resultando na redução do pool de reserva dos gametas (efeito *burnout*) (Masciangelo *et al.*, 2020). Os danos aos ovário incluem ainda a injúria aos vasos sanguíneos do estroma com consequente redução da vascularização e fibrose, que também estão associadas com a redução no do pool de reserva e declínio na função endócrina do ovário (Oktem & Oktay, 2007; Bedoschi; Navarro; Oktay, 2016; Codacci-Pisanelli *et al.*, 2017; Mauri *et al.*, 2020; Du *et al.*, 2022).

Em jovens mulheres, a perda da fertilidade futura é considerada um dos piores efeitos colaterais do tratamento do câncer e muitas chegam a adiar a terapia anticâncer, por medo da infertilidade causada pelo uso dos quimioterápicos (Llarena *et al.*, 2015). Além disso, as taxas de fertilidade em mulheres após a quimioterapia, são significativamente inferiores quando comparadas às taxas de fertilidade de homens que se submeteram ao mesmo tratamento quimioterápico (Steinshein *et al.*, 2011). Dessa forma, a escolha dos agentes quimioterápicos que preservem melhor a fertilidade feminina são imprescindíveis do sucesso do tratamento.

Neste sentido, novos compostos alternativos, como os de origem natural efetivos contra linhagens de células tumorais e que apresentem efeitos colaterais reduzidos, têm sido alvos de vários estudos (Pieme *et al.*, 2014; Ohnishi & Takeda, 2015). Na busca de novas substâncias, o ambiente marinho tem emergido como uma fonte imensurável de compostos bioativos (Wilke *et al.*, 2020). Bactérias marinhas do gênero *Streptomyces* (família streptomycetaceae; ordem *actinomycetales*) têm sido consideradas grande produtoras de compostos ativos e dentre os metabólitos

secundários destas bactérias, as cromomicinas tem sido isoladas e embora conhecidas pela sua potente atividade antimicrobiana, o principal interesse farmacológico dessas moléculas, tem sido sua potente atividade antiproliferativa em células tumorais (Pettit *et al.*, 2015).

A cromomicina A<sub>5</sub> (CA<sub>5</sub>) tem se apresentado como uma substância com maior potencial antiproliferativo em diversas linhagens de células tumorais do que outras cromomicinas já investigadas (Pinto *et al.*, 2020). Seu efeito antiproliferativo se mostrou dose-dependente em concentrações na ordem de nanomolar em linhagens tumorais, inclusive quando comparada aos agentes quimioterápicos padrão, como a doxorrubicina (DOX) (Pettit *et al.*, 2015; Pinto *et al.*, 2020; Sahn *et al.*, 2020). O mecanismo de ação das cromomicinas nas linhagens tumorais tem sido descrito pela sua ligação ao sulco menor da dupla fita de DNA que estimulam a expressão de genes relacionados a apoptose (Boer *et al.*, 2009; Zihlif *et al.*, 2010).

Recentemente, os efeitos citotóxicos da CA<sub>5</sub> foram avaliados no meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos e foi demonstrado que a CA<sub>5</sub> nas concentrações entre 100 a 200nM reduziram as taxas de maturação oocitária (Costa *et al.*, 2021). No entanto, ainda não são conhecidos os efeitos da CA<sub>5</sub> sobre a viabilidade e crescimento de folículos ovarianos pré-antrais, que constituem a reserva de gametas no ovário mamífero. Dessa forma, o objetivo do presente artigo foi avaliar o efeito citotóxico da CA<sub>5</sub> na sobrevivência, ativação e crescimento de folículos ovarianos pré-antrais de ovelhas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Morfofisiologia da gônada feminina

O ovário possui uma estrutura complexa composta por uma medula interna, rica em vasos sanguíneos, e um córtex externo com corpos lúteos, corpos albicans e hemorrágicos, bem como folículos em diferentes estágios de desenvolvimento (Bahr, 2018; Tetkova *et al.*, 2019).

O folículo é a unidade morfofuncional do ovário, e é composto por três tipos celulares: oócito, células da granulosa (GCs) e/ou células da teca (Li, 2022). O crescimento e a diferenciação do folículo ovariano é um processo coordenado por interações complexas entre o oócito e as células circundantes, com sinalizações autócrinas, parácrinas e endócrinas importantes para o controle da gametogênese feminina (Matzuk *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2021).

### 2.2 A gametogênese feminina: oogênese e foliculogênese

A oogênese e a foliculogênese (Figura 1) são processos simultâneos que começam na fase fetal na maioria dos mamíferos. No entanto, a oogênese tem início antes da foliculogênese e se estende além do término deste processo. Isso envolve o processo pelo qual os oócitos e folículos se formam, passando por estágios de crescimento para eventualmente liberar o ovócito maduro. O oócito cresce e amadurece dentro do folículo para se tornar fertilizável e as células somáticas proliferam e se especializam como os principais produtores de hormônios sexuais esteróides, e de outras moléculas reguladoras locais (Gershon & Dekel, 2020).

A oogênese é um processo complexo regulado pela interação de diversos fatores intra e extra-ovarianos, caracterizada pelo crescimento e a diferenciação do gameta feminino (Sánchez & Smitz, 2012; Robert & Gilbert, 2018). O processo de desenvolvimento dos oócitos começa com as células germinativas primordiais (CGPs), ainda na fase fetal, e ainda na vida embrionária, as CGPs migram para a gônada em desenvolvimento e sofrem sucessivas divisões mitóticas e se diferenciam em oogônias. Por volta do 3º mês de vida embrionária, as oogônias estão circundadas por uma camada de células somáticas da granulosa (CG) pavimentosas e formam os folículos primordiais. As oogônias se dividem mitoticamente e subsequentemente,

iniciam a primeira divisão meiótica (Bahr, 2018) se transformando em oócitos primários (oócito I). Ainda na vida embrionária, os folículos primordiais aumentam em número e tamanho e por volta do 5<sup>o</sup> mês chegam a 7 milhões no ovário. Até o nascimento, muitos folículos primordiais entram em apoptose e chegam a cerca de 2 milhões de folículos (Li *et al.*, 2021).

Ainda na vida embrionária, os oócitos primários ficam em prófase I no estágio de diplóteno, e por volta do 7<sup>o</sup> mês de gestação, milhares de folículos primordiais já degeneraram no ovário por um processo denominado atresia. Em mulheres, o número de folículos primordiais diminui de 2 milhões para 400.000 ao atingir a menarca, constituindo assim, o pool de reserva folicular no ovário (Tal & Seifer, 2017).

O folículo primordial é constituído por um oócito I envolto por uma camada de CG pavimentosas e a maioria dos folículos primordiais permanece quiescente, enquanto um número limitado entra em um processo de ativação para integrar o conjunto de folículos em crescimento. Os folículos primordiais são ativados por uma via de sinalização complexa e são estimulados por hormônios hipofisários, as gonadotrofinas (Elkouby & Mullins, 2017).

A manutenção da quiescência do pool de reserva ovariana previne a ativação prematura, assegurando o desenvolvimento adequado de folículos para a reprodução (Reddy, 2008). A via de sinalização PTEN/PI3K/AKT/FOXO3 foi identificada como uma das vias de sinalização essenciais para o desenvolvimento folicular, regulando a dormência e a ativação folicular. A inibição da PTEN e a ativação da PI3K podem induzir a ativação dos folículos primordiais quiescentes. A fosfatase homóloga à tensina (PTEN) atua como um regulador negativo da via de sinalização da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K/AKT), onde a PI3K regula a fosforilação de AKT. Esta, por sua vez, controla a fosforilação do fator de transcrição forkhead (FOXO3), desencadeando, assim, o processo de ativação folicular (Lee & Chang, 2019).

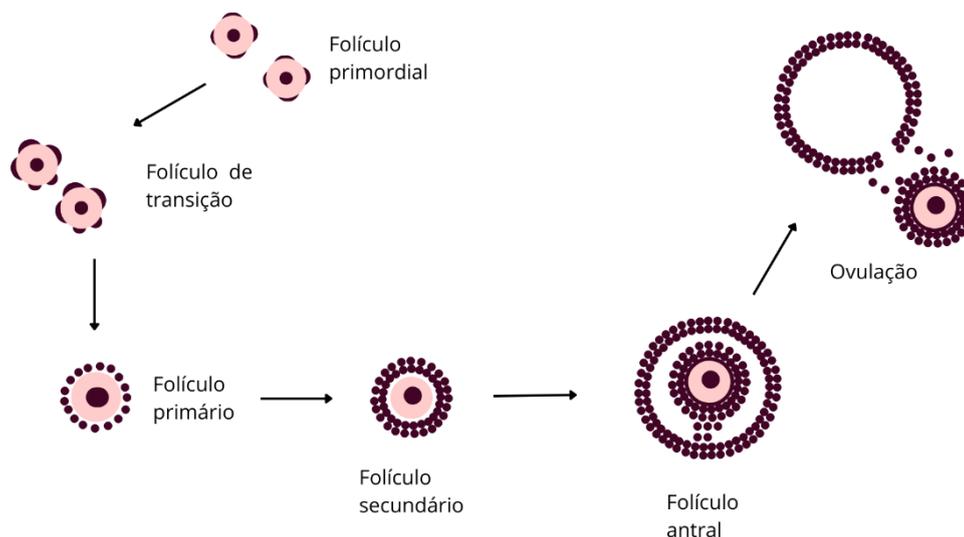
Já o "forkhead box" L2 (Foxl2), um fator de transcrição expresso durante todo o processo de foliculogênese, desempenha um papel fundamental na diferenciação das células da granulosa. Estudos indicam que a ausência de Foxl2 causa interrupção dessa diferenciação durante a transição do estado pavimentoso para cubóide. Esse desequilíbrio leva à atresia prematura e à depleção do pool de folículos primordiais, resultando em infertilidade (Schmidt *et al.*, 2004; Uda *et al.*, 2004).

Após a ativação folicular marcada por uma alteração morfológica nas CGs que passam de células pavimentosas para cúbicas, o folículo agora é classificado como primário, com uma camada completa de CGs cúbicas (Martelli *et al.*, 2017). Os folículos que apresentam características tanto de primordiais (células pavimentosas) quanto de primários (células cúbicas), são denominados de folículos intermediários ou de transição (Silva *et al.*, 2004).

O folículo em crescimento evolui para folículo secundário, com múltiplas camadas de CGs e um oócito I em crescimento. No folículo secundário observa-se a formação da zona pelúcida ao redor do oócito. Além disso, nesse estágio, os precursores das células da teca são recrutados provavelmente do estroma ovariano que irão constituir as camadas interna e externa de células da teca (Vlieghe *et al.*, 2023). Com o crescimento dos folículos secundários ocorre, entre as camadas de CGs, a formação de uma cavidade repleta de líquido denominada antro (Wigglesworth *et al.*, 2015). A partir desse estágio, os folículos passam a ser denominados antrais e são caracterizados pelo aumento acentuado do diâmetro folicular ocasionado pelo crescimento do oócito, multiplicação das células da granulosa e da teca e acúmulo do fluido antral que aumenta pela secreção de fatores osmóticos pelas CGs e compõe cerca de 90% do volume folicular (Wigglesworth *et al.*, 2015). Tal fluido pode servir como uma importante fonte de substâncias reguladoras derivadas do sangue ou de secreções de células foliculares, como gonadotrofinas, esteroides, fatores de crescimento, enzimas, proteoglicanos e lipoproteínas (Bristol-Gould & Woodruff, 2006; Rodgers & Irving-Rodgers, 2010). Sob a influência do hormônio luteinizante (LH), os oócitos completam a primeira divisão celular meiótica. Neste estágio, ocorre uma pausa na segunda metáfase meiótica, e são esses oócitos que ovulam normalmente junto com o primeiro corpo polar (Clarke, 2018).

Durante a vida reprodutiva, a população de folículos primordiais declina e o número de folículos primordiais é drasticamente reduzido até a menopausa, quando sua população chega a menos de 1.000 folículos no ovário, e este se torna incapaz de produzir hormônios e liberar o oócito maduro (Faddy *et al.* 1992; Hansen *et al.* 2008).

**Figura 1- Representação esquemática da foliculogênese em mamíferos durante a vida reprodutiva.**



**Fonte: Elaborada pelo autor.**

### 2.3 Senescência celular e envelhecimento ovariano

A senescência celular é marcada pela parada permanente do ciclo celular e perda da capacidade proliferativa, podendo ser desencadeada por diversos estímulos estressores, tais como o processo natural de envelhecimento, dano no DNA e presença elevada de espécies reativas de oxigênio (Herranz & Gil, 2018; Di Micco *et al.*, 2021). A finalidade da senescência celular é interromper a proliferação de células danificadas, evitar a propagação do dano genético para a próxima geração celular, eliminar fatores prejudiciais acumulados e desativar a capacidade de transformação maligna dessas células (Vicenzio *et al.*, 2008). No entanto, embora a indução da senescência celular a curto prazo possa trazer benefícios em diversos cenários, a permanência prolongada parece ter efeitos prejudiciais para o organismo (Yosef *et al.*, 2016).

A senescência pode ser ocasionada por fatores como estresse oxidativo, radiação, luz ultravioleta e quimioterápicos, que danificam o DNA (Campisi & D'adda, 2007; Campisi, 2011; Van Deursen, 2014). Estudos recentes comprovaram que a senescência celular induzida por agentes quimioterápicos, pode levar à deterioração da estrutura e função dos tecidos normais (Di Micco *et al.*, 2021; Gao *et al.*, 2023). Portanto, a senescência celular pode ser um mecanismo para suprimir a ocorrência de tumores mas o acúmulo excessivo de células senescentes nos tecidos e órgãos pode afetar negativamente a capacidade regenerativa e criar um ambiente pró-inflamatório favorável ao aparecimento e progressão de várias doenças, incluindo câncer (Li *et al.*, 2019). Células senescentes secretam fatores que afetam o crescimento de suas células vizinhas e a matriz extracelular alterando a organização tecidual no entorno. Fatores parácrinos e autócrinos produzidos pelas células senescentes tem grandes efeitos no crescimento e sobrevivência de células *in vivo* e *in vitro*.

As células senescentes podem adquirir um fenótipo secretório associado a senescência, (FSAS) que envolve a liberação de citocinas, proteases de matriz extracelular que causam danos e contribuem com a disfunção da arquitetura do tecido, causando fibrose. Evidências que marcam o FSAS incluem o aumento no tamanho celular, expressão de ciclinas inibidoras do ciclo celular, aumento de enzimas lisossomais como a  $\beta$ -galactosidase associada à senescência (SA- $\beta$ -Gal), acúmulo de lipofuscina no compartimento lisossomal, danos no DNA (Velarde & Menon, 2016).

A lipofuscina consiste em um agregado de proteínas oxidadas que se acumulam em agregados citoplasmáticos e é considerado um importante marcador de células senescentes (Geogarkopoulo *et al.*, 2013). Estudos tem relatado o acúmulo de grânulos de lipofuscina com o decorrer da idade no ovário de cabras e camundongas e sugerem que o aumento de células senescentes pode estar relacionado com o declínio da reserva ovariana (Ansere *et al.*, 2021; Lima *et al.* 2023).

O Sudan Black B é uma coloração histoquímica lipofílica que identifica a lipofuscina e é facilmente aplicável para estudos *in vitro*, em tecidos fixado em formalina e embebido em parafina (Gatenb & Moussa, 1949; Rasmussen, 1961; Jung; Hohn; Grune, 2010). O corante, devido à sua natureza lipofílica, quando em contato com lipídeos, cora o componente lipídico da lipofuscina (Romijn *et al.*, 1999).

## 2.4 Atresia folicular

Os folículos pré-antrais (FOPA) que compreendem os folículos primordiais, primários e secundários, representam cerca de 90 a 95% da população folicular, armazenam a grande maioria dos oócitos e constituem, portanto, o pool de reserva folicular no ovário mamífero (Figueiredo *et al.*, 2007). No entanto, é importante notar que a maioria desses folículos (99,9%) não alcança a ovulação; eles são eliminados por meio de um processo conhecido como atresia folicular (Pelosi *et al.*, 2015; Bahr, 2018).

A atresia é um processo complexo de morte folicular que ocorre naturalmente no ovário e regula o pool de reserva folicular. Este processo inclui a perda do oócitos e das células somáticas foliculares (Li *et al.*, 2023), é regulado por fatores de crescimento e hormônios e envolve múltiplos mecanismos reguladores como a apoptose e a autofagia (Stringer *et al.*, 2023). A atresia é essencial para manutenção da homeostase do ovário e sua desregulação contribui com o estabelecimento de desordens reprodutivas, como a síndrome do ovário policístico e a falha ovariana prematura (FOP) (Duncan, 2014).

A autofagia e a apoptose são processos que parecem coexistir durante o desenvolvimento folicular e a atresia nos oócitos, nas células da granulosa (GCs), assim como nas células estromais dependendo das situações. A autofagia é um processo celular que engloba a fusão do autofagossomo, uma vesícula que contém materiais a serem reciclados, com o lisossomo, formando assim o autolisossomo, responsável pela degradação e reciclagem de componentes intracelulares (Stringer *et al.*, 2023). A atividade autofágica no pool folicular parece ser um processo contínuo, afetando aproximadamente 20% dos folículos ovarianos de mulheres em todas as faixas etárias (Cacciottola *et al.*, 2023). Em situações em que há falta de fatores de crescimento, a autofagia pode ser causada por meio de uma cascata de sinalização, o que ajuda a sustentar a sobrevivência das células. No entanto, sob condições de estresse extremo como no caso da quimioterapia, a autofagia excessiva pode induzir à morte celular por meio de um efeito combinado de autofagia e apoptose e, conseqüentemente, diminuição das reservas ovarianas (Zhou; Peng; Mei, 2019).

A apoptose é um processo complexo que envolve muitas moléculas, incluindo proteínas antiapoptóticas, pró-apoptóticas e caspases (Grivicich; Regner; Rocha,

2007). Esse processo pode ser desencadeado por duas vias principais: a via intrínseca e a via extrínseca. A via intrínseca é ativada dentro da célula e é predominantemente regulada pelas mitocôndrias, enquanto a via extrínseca é iniciada de fora da célula, normalmente em resposta a condições e fatores do ambiente extracelular, como os tratamentos quimioterápicos (Czabotar *et al.*, 2014). Na via intrínseca, as proteínas BH3 detectam sinais apoptóticos e os transmitem aos membros da família BCL-2. Elas inibem as proteínas antiapoptóticas BCL-2, resultando na ativação de BAX e BAK, que permeabilizam a membrana mitocondrial externa, liberando citocromo C. O apoptossomo é então formado, levando à ativação da caspase-9 e subsequente ativação da caspase-3 e -7. Na via extrínseca, os receptores de morte são ativados por sinais externos, levando à ativação da caspase-8 e -10. A apoptose pode então ser iniciada diretamente, através da clivagem direta das caspases-3 e -7, ou indiretamente, através da clivagem de BID em tBID e subsequente ativação de BAX e BAK (Stringer *et al.*, 2023).

## **2.5 Importância da biotécnica de MOIFOPA para teste de toxicidade reprodutiva**

Os quimioterápicos são substâncias citotóxicas que podem afetar de forma variável a função do ovário dependendo da idade e da reserva ovariana no momento do diagnóstico e do tipo de quimioterapia (Torino *et al.*, 2014). Nesse contexto, a preservação da reserva folicular ovariana se torna crucial, pois engloba intervenções e procedimentos que têm como objetivo proteger a oportunidade de conceber um bebê, especialmente quando a condição clínica do paciente ou o tratamento proposto, podem ameaçar a fertilidade (Eshre *et al.*, 2020).

A possibilidade da existência de efeitos secundários pós quimioterapia a longo prazo, tanto pré-clínicos como clínicos, levou à investigações de forma crescente nessa área. Além disso, levou ao desenvolvimento contínuo de um sistema de cuidados de suporte destinado a avaliar e tratar os efeitos colaterais dos tratamentos anticancerígenos, incluindo o impacto na fertilidade e na qualidade de vida de mulheres pós quimioterapia (Ben-Aharon & Shalgi, 2012).

Assim, a biotécnica de Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais (MOIFOPA), representa uma importante ferramenta atualmente empregada para a compreensão dos processos iniciais da foliculogênese, obtenção de oócitos competentes destinados a outras biotécnicas da reprodução, como a produção *in vitro* de embriões, a clonagem e as transgenias. Além disso, essa técnica também é empregada para investigar como medicamentos afetam o desenvolvimento dos folículos pré-antrais (Guerreiro *et al.*, 2019).

Dentre as etapas da MOIFOPA, o cultivo *in vitro*, seja utilizando tecido ovariano ou mesmo folículos isolados do ovário, possui a capacidade de avaliar de maneira eficiente e segura os efeitos de compostos químicos na função ovariana e na fertilidade (Guerreiro *et al.*, 2019). Essa abordagem possibilita um acompanhamento detalhado dos efeitos de compostos como os quimioterápicos, expondo os folículos ovarianos a essas substâncias, em um ambiente controlado de laboratório. Além disso, novas abordagens terapêuticas estão sendo investigadas, na busca em minimizar os efeitos colaterais de quimioterápicos em células reprodutivas e preservar a fertilidade das mulheres em tratamento. Exemplos dessas abordagens incluem o emprego da melatonina (Palomino *et al.*, 2021; Xing *et al.*, 2022), resveratrol (Herrero *et al.*, 2023) e o extrato de *Cimicifuga racemosa* (L.) (De Assis *et al.*, 2022).

## 2.6 Técnicas de avaliação folicular

Existem várias técnicas para avaliar a estrutura e morfologia dos folículos ovarianos pré-antrais, permitindo a análise do seu desenvolvimento e previsão durante o cultivo *in vitro* (Figueiredo *et al.*, 2007). As técnicas utilizadas para avaliação do tecido ovariano incluem métodos histológicos, imunohistoquímica e qRT-PCR (Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa quantitativa) e Sudan Black B (Figueiredo *et al.*, 2007; Kilic *et al.*, 2012; Arbel *et al.*, 2021; Xia *et al.*, 2023).

A análise histológica tem sido empregada na identificação das características dos folículos pré-antrais, como sua classificação, avanços de desenvolvimento, morfologia e densidade folicular (Palma *et al.*, 2012). Uma das colorações frequentemente utilizadas é a coloração que combina o PAS com hematoxilina (Silva *et al.*, 2004). A coloração PAS-hematoxilina destaca a zona pelúcida e a membrana basal, além de outros componentes foliculares como células da granulosa, citoplasma e núcleo do oócito, proporcionando uma visualização abrangente das estruturas

envolvidas nos folículos ovarianos (Figueiredo *et al.*, 2007). O método de coloração histológica Sudan Black B é uma técnica amplamente reconhecida por sua capacidade de detectar lipofuscina que se acumulam nos lisossomos. A lipofuscina é um conglomerado de proteínas, lipídios e metais oxidados, e sua presença tem sido associada a diversos processos relacionados ao envelhecimento (Evangelou & Gorgoulis, 2017; Salmonowicz & Passos, 2017).

A imunohistoquímica, por sua vez, desempenha um papel crucial no diagnóstico baseado em tecidos e na detecção de biomarcadores, sendo amplamente utilizada no mundo todo (Sukswai & Khoury, 2019). Na imunohistoquímica, a detecção do PCNA (antígeno nuclear de células em proliferação) é uma abordagem importante para avaliação da atividade de proliferação celular (Melo *et al.*, 2015). O PCNA é uma proteína que forma um anel trimérico em torno do DNA, desempenhando um papel crucial na replicação e reparo do DNA (Arbel *et al.*, 2021). No ovário, esse antígeno é utilizado como marcador do desenvolvimento folicular avaliação da proliferação das células da granulosa, oócitos e células estromais (Melo *et al.*, 2015; Vatanparast *et al.*, 2021).

A técnica TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay), um mecanismo imunohistoquímico, fundamenta-se na capacidade da TdT (desoxinucleotidil transferase terminal), uma DNA polimerase, em adicionar nucleotídeos aos fragmentos das fitas de DNA quebradas na extremidades 3'-OH das células apoptóticas (Mirzayans & Murray, 2020). O ensaio TUNEL é amplamente utilizada para detectar danos no DNA, identificar células apoptóticas em tecidos ou culturas e avaliar a toxicidade de medicamentos (Lebon *et al.*, 2015; Rossello & Adell, 2023). A técnica TUNEL tem sido empregada de forma eficaz em diversos estudos para avaliar a presença de apoptose em folículos pré-antrais (Guerreiro *et al.*, 2019; Ai *et al.*, 2023; Shen *et al.*, 2023).

A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) é um método robusto e confiável para analisar a expressão gênica, onde os níveis de expressão são quantificados através da normalização em relação aos genes de referência (Cai *et al.*, 2014). A avaliação da expressão gênica tem sido objeto de investigação, visto que o desenvolvimento folicular inicial demanda a expressão adequada de diversos genes em diferentes estágios de desenvolvimento (Bonnet *et al.*, 2013)

## 2.7 Agentes quimioterapêuticos e os impactos sobre os folículos ovarianos

A terapia anticâncer frequentemente resulta em insuficiência ovariana prematura e infertilidade, uma vez que a reserva de folículos ovarianos é altamente sensível aos efeitos da quimioterapia. Embora a criopreservação de oócitos, embriões e córtex ovariano possa auxiliar algumas mulheres com infertilidade causada pelo câncer a conceber, o desenvolvimento de métodos eficazes para preservar a função ovariana durante o tratamento com agentes antineoplásicos representa uma vantagem significativa (Spears *et al.*, 2019).

Esses agentes antineoplásicos podem ser classificadas em agentes alquilantes, antraciclina, antimetabólitos, compostos de platina, taxanos e agentes diversos (Chuai; Xu; Wang, 2012). Entre essas substâncias, pode-se destacar a ciclofosfamida, da classe dos alquilantes, a cisplatina, composto à base de platina, e doxorubicina, da classe das antraciclina, como causadoras de danos profundos ao ovário em estudos clínicos e biológicos (Bedoschi; Navarro; Oktay, 2016).

Agentes quimioterápicos alquilantes, como a ciclofosfamida, são conhecidos por serem altamente gonadotóxicos, e evidências sugerem que eles podem induzir danos nos ovários por meio da regulação positiva da sinalização PI3K/Akt. Isso pode resultar na ativação prematura dos folículos primordiais e, eventualmente, no esgotamento prematuro da reserva de folículos primordiais (Sonigo *et al.*, 2019).

A cisplatina é uma droga citotóxica que causa apoptose ao danificar o DNA, ativar várias transduções de sinal e subsequente inibição da replicação e da mitose. É amplamente utilizado no tratamento de câncer sólido, como câncer de próstata, câncer de ovário, câncer de cabeça e pescoço, câncer de bexiga e pulmão e alguns outros tipos de câncer (Ghosh, 2019). Em um estudo anterior, foi observado que camundongos que receberam transplantes de tecido ovariano humano e posteriormente foram submetidos a uma única injeção intraperitoneal de cisplatina em uma dose de 5 mg/kg apresentaram alterações morfológicas nos folículos, incluindo ausência de oócitos, atresia folicular e apoptose de células da granulosa e oócitos (Bildik *et al.*, 2018).

Já a doxorubicina, também conhecida pelos nomes comerciais Adriamicina e Rubex, atua através da inibição da enzima nuclear topoisomerase II $\alpha$ , impedindo assim, o superenrolamento e torção do DNA durante a replicação e, conseqüentemente, provocando a quebra do DNA, apoptose das células da

granulosa, acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO), declínio do potencial da membrana mitocondrial nas células da granulosa (Spears *et al.*, 2019). A DOX é frequentemente utilizada em vários regimes de quimioterapia multiagentes para leucemia linfoblástica aguda, linfoma de Hodgkin e câncer de mama invasivo (Rivankar, 2014). Estudos anteriores demonstraram uma toxicidade dose-dependente no desenvolvimento dos folículos ovarianos, no estímulo hormonal e na maturação dos oócitos, além de senescência ovariana aumentada (Xiao *et al.*, 2017; Gao *et al.*, 2023). Nesse contexto, a busca por novos quimioterápicos com menor incidência de efeitos colaterais, como para a gonadotoxicidade, tem se tornado relevante para a pesquisa oncológica atual.

Portanto, é essencial aprofundar a compreensão dos mecanismos que causam dano ovariano por esses agentes, visando também o desenvolvimento de adjuvantes que protejam a fertilidade.

## **2.8 Uso de substâncias naturais com ação antitumoral**

Atualmente, a busca por novas substâncias anticancerígenas de origem natural está sendo realizada tanto em plantas terrestres quanto em ambientes marinhos (Greenwell & Rahman, 2015). O ambiente marinho é caracterizado por possuir uma enorme diversidade de organismos, oferecendo grandes oportunidades para a obtenção de novos compostos bioativos com atividade anticancerígena (Lichota & Gwozdziński, 2018; Wilke *et al.*, 2020). As bactérias marinhas do gênero *Streptomyces* (família *streptomycetaceae*; ordem *actinomycetales*) têm sido consideradas grandes produtoras de compostos ativos que tem contribuído com o tratamento do câncer (Pinto *et al.*, 2015). Dentre os compostos isolados da *Streptomyces*, destacam-se a DOX, um composto utilizado como quimioterápico comercial e as cromomicinas que têm se destacado pelos seus efeitos antibacterianos e antitumorais.

### **2.8.1 Cromomicinas**

As cromomicinas são policetídeos tricíclicos glicosilados pertencentes à família dos ácidos aureólicos, produzidas e secretadas por actinobactérias do gênero *Streptomyces* (Lombó *et al.*, 2006). Os actinomicetos são bactérias Gram-positivas amplamente distribuídas no solo de ambientes terrestres e aquáticos (Bérdy, 2012)

Essas bactérias possuem atividades antimicrobianas e antitumorais, representados por outras classes de compostos como as mitramicinas, olivomicinas e duramicinas (Lombó *et al.*, 2006; Gozari, 2019).

Um estudo conduzido por Guimarães *et al.* em 2014 revelou que a cromomicina A<sub>2</sub> (CA<sub>2</sub>), obtida a partir de culturas em grande escala da bactéria *Streptomyces sp.*, apresentou a capacidade de induzir um processo conhecido como autofagia. Este estudo se concentrou no uso da CA<sub>2</sub> em células de melanoma metastático, comumente na linhagem MALME-3M. Além disso, o estudo realizou um teste em sete diferentes linhagens celulares, consistindo em seis linhagens tumorais e uma não tumoral. O CA<sub>2</sub> foi aplicado nessas seis linhagens celulares em três períodos de tempo distintos (24, 48 e 72 horas). Os resultados da pesquisa descobriram que o CA<sub>2</sub> foi capaz de induzir a morte celular. Já a cromomicina A<sub>3</sub> (CA<sub>3</sub>) é um antibiótico isolado de uma cultura de *Streptomyces griseus*, foi obtida originalmente na cidade de Toyonaka, no Japão (Slavik & Carter, 1975). A CA<sub>3</sub> interage no sulco menor da hélice do DNA em regiões com alto conteúdo de citosina e guanina (C-G), causando danos ao DNA nas células tratadas (Zihlif *et al.*, 2010; Murase; Noguchi; Sasaki, 2018).

Além das cromomicinas citadas acima, é importante destacar aqui a cromomicina A<sub>5</sub> (CA<sub>5</sub>), que tem se apresentado como uma das mais citotóxicas (Pettit *et al.*, 2015; Pinto *et al.*, 2020). Pinto *et al.* (2020), avaliaram os efeitos de algumas cromomicinas (CA<sub>5</sub>, CA<sub>6</sub>, CA<sub>7</sub> e CA<sub>8</sub>) em linhagens de celulares tumorais, incluindo melanoma, mama, cólon e carcinomas de próstata. Todas as quatro cromomicinas apresentaram alta atividade citotóxica. No entanto, a CA<sub>5</sub> foi a mais eficaz em todas as células testadas, com doses variando entre 0,2nM a 7,9nM. Em um estudo conduzido por Sahn *et al.* (2020), foi demonstrado pela primeira vez que as cromomicinas CA<sub>5</sub> e CA<sub>6</sub>, isoladas e purificadas a partir do cultivo da bactéria *Streptomyces sp.* BRA-384, apresentam afinidade pelo fator de transcrição T-box 2 (TBX2). Esta descoberta é significativa, pois o TBX2 emergiu como um novo alvo potencial na terapia anticâncer, uma vez que é superexpresso em diversos tipos de câncer, incluindo rabdomyossarcoma, câncer de mama, nasofaríngeo e próstata, apresentando papel crítico como fator de regulação em células tumorais, contornando a senescência e limitando os principais reguladores negativos do ciclo celular (Sahn *et al.*, 2020). Uma visão geral dos mecanismos de ação das cromomicinas é apresentada no estudo de Wilke *et al.* (2020), no qual a CA<sub>5</sub> foi capaz de inibir o TBX2, resultando na indução de efeitos antiproliferativos e antimetastáticos, ao permitir a

expressão da quinase 1 dependente da ciclina (p21) e da proteína E-caderina, respectivamente.

Um estudo recente avaliou a indução da morte celular imunogênica (MCI) por cromomicinas A<sub>5-8</sub> (CAs) em melanoma metastático murino (linhagem B16-F10). Os resultados mostraram que as CAs, especialmente a CA<sub>5</sub> (100nM), foram capazes de induzir a morte celular imunogênica (MCI) em células tumorais, caracterizada por estresse celular, morte por apoptose e liberação de padrões moleculares associados a danos (DAMPs, do inglês *damage associated molecular patterns*). A CA<sub>5</sub> (100nM) também foi capaz de gerar um efeito vacinal *in vivo*, reduzindo significativamente o crescimento tumoral em animais vacinados com células tumorais pré-expostas à CA<sub>5</sub> (Florêncio *et al.*, 2022).

Os resultados mais recentes sobre a toxicidade ovariana da CA<sub>5</sub>, avaliaram os efeitos tóxicos do CA<sub>5</sub> no meio de maturação *in vitro* de oócitos bovino. Foi demonstrado que o CA<sub>5</sub> trouxe uma redução significativa nas taxas de maturação oocitária apenas na concentração de 200 nM. No entanto, nas concentrações de 100 e 200 nM, observou-se um aumento na taxa de degeneração oocitária (Costa *et al.*, 2021). Os resultados apresentados levantaram questões sobre como essa substância pode afetar os processos de terapia das células ovarianas, desencadear a morte celular e/ou provocar uma ativação em massa dos folículos primordiais, resultando na redução drástica da reserva de gametas no ovário. O presente estudo tem o potencial de oferecer informações significativas sobre os efeitos do CA<sub>5</sub> no ovário, especialmente considerando seu potencial como um agente farmacêutico no combate ao câncer.

### 3 JUSTIFICATIVA

A busca por substâncias com atividade antitumoral efetiva e com efeitos colaterais reduzidos tais como, falha ovariana prematura ou infertilidade, tem sido o foco de vários grupos de pesquisa, com o objetivo de garantir a qualidade de vida dos pacientes em tratamento contra o câncer (Kazufumi *et al.*, 2014; Luo *et al.*, 2018; Guerreiro *et al.*, 2019). Portanto, é de extrema importância avaliar o potencial de danos causados pelos quimioterápicos durante o tratamento do câncer, com o objetivo de desenvolver fármacos que preservem a fertilidade dessas pacientes.

Nesse cenário, estudos envolvendo novos compostos naturais com propriedade anticancerígena vêm ganhando grande destaque, como a cromomicina A<sub>5</sub> (CA<sub>5</sub>). A CA<sub>5</sub> é reconhecida por sua elevada toxicidade em células tumorais. No entanto, seu efeito na sobrevivência, ativação e desenvolvimento dos folículos ovarianos pré-antrais ainda não foi investigado.

A investigação de efeitos tóxicos de candidatos às drogas quimioterápicas no ovário humano usando estudos *in vitro* é dificultada pela pouca disponibilidade de amostras de tecido ovariano de humanos. Portanto, estudos têm sido conduzidos utilizando modelos animais *in vivo* ou *in vitro* (Almeida *et al.*, 2022; Guerreiro *et al.*, 2016). Os sistemas *in vitro* oferecem melhores alternativas no uso de técnicas que investiguem vias bioquímicas celulares de toxicidade, integridade da membrana, sistemas de desintoxicação celular, capacidade metabólica e danos no DNA, podendo ser feito diretamente após o cultivo *in vitro*. Os modelos de sistemas *in vitro* empregados em testes de toxicidade têm muitas vantagens, incluindo a redução do número de animais de laboratório e, conseqüentemente, do tempo de análise (Delraso, 1993; Lecluyse *et al.*, 1996). Nesse sentido, destaca-se a importância de biotécnicas como a manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA), que permite a realização de testes toxicológicos sobre a função reprodutiva da fêmea. A MOIFOPA tem sido considerada como uma excelente ferramenta para avaliar o impacto de substâncias antitumorais sobre a fertilidade da fêmea, investigação dos mecanismos de ação destas substâncias e no impacto das drogas antineoplásicas no ovário (Baldassare, 2008; Guerreiro *et al.*, 2016, 2019).

Nos últimos anos, animais de produção destinados ao abate têm sido amplamente utilizados como doadores de ovários (Silva *et al.*, 2019; Ñaupás *et al.*, 2021) e oócitos (Van Woudenberg *et al.*, 2017; Sá *et al.*, 2019). Devido às

semelhanças morfofisiológicas do ovário, na duração da foliculogênese e no desenvolvimento folicular entre as espécies humana e ovina, essa última se caracteriza como um excelente modelo translacional para a primeira (Cazarin, 2004; Ñaupas *et al.*, 2021). Portanto, no presente estudo foram utilizados ovários de ovelhas oriundos de abatedouros locais para investigar a toxicidade da cromomicina A<sub>5</sub> sobre a sobrevivência, ativação e desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano.

## 4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

A cromomicina A<sub>5</sub> não apresenta efeito citotóxico nos folículos ovarianos pré-antrais dose-dependente, não induz a morte celular e não reduz a reserva de folículos primordiais no ovário mamífero.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo Geral

- Avaliar a toxicidade da cromomicina A<sub>5</sub> sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano de ovelhas.

### 5.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos tóxicos da cromomicina A<sub>5</sub> nas concentrações de (0, 100, 200 e 300nM) sobre a densidade do estroma, a sobrevivência, a ativação e o desenvolvimento de folículos pré-antrais presentes no tecido ovariano cultivados *in vitro* por 1 e 6 dias;
- Avaliar a marcação de lipofuscina, estimando a ocorrência de senescência ovariana.
- Investigar a presença de dano ao DNA pelo ensaio de TUNEL e proliferação celular através da análise da expressão de PCNA.
- Verificar a expressão gênica de fatores relacionados à foliculogênese (FOXL2) à apoptose (BAX, BCL-2 e caspase-3).

## 6 METODOLOGIA

### 6.1 Coleta de ovários

Todo o experimento foi realizado respeitando os princípios éticos de bem-estar animal, sendo o projeto aprovado pelo comitê de ética da Universidade Estadual do Ceará sob o número (N°05135399/2023). Os ovários (n = 12) foram coletados de 6 ovelhas adultas, sem raça definida, em abatedouro local. Imediatamente post-mortem, os ovários foram lavados com álcool (70%), seguido de duas lavagens em Meio Essencial Mínimo (MEM) suplementado com penicilina (100 µg/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e HEPES (25 mM – MEM-HEPES). Os ovários foram transportados para o laboratório no meio MEM-HEPES a 4 °C no período máximo de 1 hora (Chaves *et al.*, 2008).

### 6.2 Meio de Cultivo

O meio de cultivo básico (cultura controle) consistia em  $\alpha$ -MEM (pH 7,2 - 7,4) suplementado com 1,25 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), insulina 10 µg/mL, transferrina 5,5 µg/mL e selênio 5 ng /mL (ITS), glutamina 2 mM e hipoxantina 2 mM , que foi chamada de  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>.

### 6.3 Cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais de ovinos inclusos em fragmentos do córtex ovarianos

No laboratório, cada par de ovário o córtex ovariano foi dividido fragmentos (3 x 3 x 1 mm). Posteriormente, os fragmentos foram fixados imediatamente para análise histológica (controle não cultivado = NC). Os demais fragmentos foram distribuídos em cinco (5) tratamentos, a saber:  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> sozinho (MEM<sup>+</sup>);  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> com adição de 0,3 µg/mL de doxorrubicina (DOX) como controle positivo;  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> com adição de 100nM da cromomicina A<sub>5</sub> (CA<sub>5</sub>100), 200nM cromomicina A<sub>5</sub> (CA<sub>5</sub>200) ou 300nM cromomicina A<sub>5</sub> (CA<sub>5</sub>300). O cultivo *in vitro* (CIV) foi realizado por 1 e 6 dias, em placas de 24 poços contendo 1 mL de meio, a 38,5 °C e 5% de CO<sub>2</sub> em atmosfera umidificada. A troca total do meio foi realizada a cada 2 dias. Cada tratamento foi replicado 6 vezes.

#### **6.4 Análise morfológica dos folículos pré-antrais cultivados *in vitro***

Após o término do período de CIV, em cada tratamento, os fragmentos foram fixados em solução de Davidson (22,2% de formaldeído, 33,4% de etanol, 11% de ácido acético glacial e 33,4% de água destilada) à temperatura ambiente por 12 horas e destinados à histologia clássica. Os fragmentos foram desidratados, diafanizados e inclusos em parafina. Posteriormente, os blocos confeccionados foram seccionados à espessura de 5 µm. Cada seção foi montada em lâmina e corada pelo método do ácido periódico de Schiff (PAS)-hematoxilina. Somente foram analisados os folículos pré-antrais cujos oócitos apresentaram o núcleo evidente na seção observada.

Os folículos foram classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento em primordiais (oócito rodeado por uma camada de células da granulosa pavimentosa) ou em desenvolvimento, os quais foram divididos em intermediários (oócito rodeado por uma camada de células da granulosa pavimentosa e cubóides), primários (oócito rodeado por uma camada de células da granulosa cubóides) ou secundários (oócito rodeado por duas ou mais camadas de células da granulosa cubóides) (Silva *et al.*, 2000). De acordo com a morfologia, os folículos foram ainda classificados em normais ou degenerados, considerando as seguintes características: presença ou ausência de corpos picnóticos, retração citoplasmática e organização das células da granulosa (Chaves, 2008). Cada folículo foi examinado em cada seção em que apareceu e combinado com mesmo folículo em seções adjacentes para evitar contagem dupla, garantindo assim que cada folículo foi contado apenas uma vez, independentemente do seu tamanho.

#### **6.5 Avaliação da ativação folicular**

Para avaliar a ativação folicular, consideramos características morfológicas dos folículos ovarianos, como a proliferação das células da granulosa. O folículo primordial, inicialmente circundado por células da granulosa pavimentosas, transforma-se em formato cúbico, tornando-se um folículo primário. Foram registrados apenas os folículos morfolologicamente normais e com um núcleo de oócito visível (seção equatorial). Essa análise foi realizada no dia 0 (controle fresco) e após 1 ou 6 dias de cultivo com os tratamentos, calculando-se a proporção de folículos primordiais e em crescimento.

## 6.6 Densidade do estroma

Um total de 10% dos cortes histológicos para cada fragmento ovariano foram analisados. A média de quatro quadrantes aleatórios por seção (área de cada quadrante:  $50 \times 50 \mu\text{m} = 2.500 \mu\text{m}^2$ ) foram examinados sob um microscópio óptico com ampliação de 400x, e as células foram contadas usando o software NIS Elements AR da Nikon v.4.50. A seleção dos quadrantes e a contagem de células estromais foram efetuadas nos núcleos celulares presentes no estroma, conforme preconizado por Alves *et al.* (2016).

## 6.7 Sudan black B

Para a análise do acúmulo de lipofuscina, foi realizada a coloração com SBB. Para isso, fragmentos de tecido ovariano CIV por 6 dias na presença de MEM<sup>+</sup>; MEM<sup>+</sup> com adição de DOX (0.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) como controle positivo; MEM<sup>+</sup> com adição da CA<sub>5</sub> (100 e 300nM), foram fixados em solução de Davidson (22,2% de formaldeído, 33,4% de etanol, 11% de ácido acético glacial e 33,4% de água destilada) à temperatura ambiente por 12 horas, incluídos em blocos de parafina e seccionados com espessura de 5  $\mu\text{m}$ . Em seguida, as lâminas foram processadas de acordo com o protocolo descrito por Evangelou & Gorgoulis (2017) com modificações. As lâminas foram desparafinadas com xilol, lavadas em um gradiente de álcoois e coradas com SBB (Dinâmica, Santa Catarina, Brasil) por 3 minutos, seguidas de imersão em álcool etílico a 50% por 2 minutos. Posteriormente, foram lavadas em água destilada por 2 minutos e finalmente contracoradas com eosina por 2 minutos e montadas com glicerol a 40%. Para a avaliação, quatro imagens por animal foram obtidas utilizando imagens fotografadas em padrão RGB de um microscópio óptico com ampliação de 400x e as células com coloração positiva para lipofuscina foram quantificadas. O número de pixels nas imagens foi obtido por meio do software Fiji/Image J (Wayne Rasband, NIH, EUA) e então foi calculado o número médio de células marcadas.

## 6.8 Análise imunohistoquímica (IHC)

Para imunohistoquímica, os fragmentos ovarianos foram fixados em paraformaldeído por 4h à temperatura ambiente, desidratados em álcool, diafanizados com xilol, embebidos em parafina, seccionados a 5  $\mu\text{m}$ , carregadas positivamente e processados para imunohistoquímica.

A recuperação antigênica foi realizada incubando as lâminas em tampão de recuperação com pH proteico específico por 20 min a 98 °C. O bloqueio da atividade da peroxidase endógena foi realizado com 10% de peróxido de hidrogênio em metanol. As lâminas foram incubadas por 30 minutos com anticorpos primários monoclonais determinados para PCNA. Após incubação em PA, foi realizado um novo bloqueio da atividade da peroxidase. Posteriormente, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário IgG anti-coelho de cabra por 30 min. Em seguida, incubados por 30 minutos com o complexo enzimático avidina-biotina (ABC) e a localização das proteínas demonstrada com 3,3'-diaminobenzidina em solução cromogênica (DAB). Finalmente, as secções foram contracoradas com hematoxilina e solução de amônia a 0,5%. Os controles negativos foram o tecido submetido à mesma reação, no entanto, com omissão dos anticorpos primários.

### **6.9 Ensaio de fragmentação de DNA para detecção de células apoptóticas (coloração TUNEL)**

A fragmentação do DNA foi analisada pelo teste de TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotinylated deoxyuridine triphosphates nick end-labeling), utilizando o kit de detecção de morte celular in situ, POD (Roche Applied Science, Mannheim, BW, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. A recuperação antigênica foi realizada incubando os cortes dos tecidos em tampão citrato de sódio 0,01 M (pH 6,0) por 5 min, em panela de pressão. Para bloquear a peroxidase endógena, as lâminas foram incubadas com 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em metanol e depois bloqueadas por 1 h à temperatura ambiente utilizando PBS contendo 5% de BSA e 3% de Triton X. Após a lavagem, as lâminas foram incubadas com a mistura de reação TUNEL (50 µL) por 1 h a 37 °C. O conversor POD foi adicionado e a localização da expressão da proteína foi revelada por incubação com DAB. Finalmente, as secções foram contracoradas com hematoxilina. As células do tecido ovariano foram consideradas com DNA fragmentado quando foram detectados a cor marrom escuro (Yucebilgin *et al.*, 2004). Como controle positivo interno, as secções foram tratadas com DNase I a 10 U/mL (Invitrogen™, Carlsbad, CA) por 15 min à temperatura ambiente, antes da incubação com TUNEL para induzir as quebras inespecíficas do DNA. Para o controle negativo foi estabelecido a omissão da enzima terminal de desoxinucleotidil transferase (Tarumi *et al.*, 2009).

## 6.10 Extração de ácido ribonucleico (RNA) e PCR quantitativo em tempo real

Para a avaliação dos níveis de expressão gênica para caspase-3 ativada, BAX, BCL-2 e FOXL2, os fragmentos ovarianos foram submetidos à extração de RNA com Trizol. As preparações de RNA isoladas foram tratadas com DNase I e Kit Pure Link™ Mini RNA. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir do RNA isolado usando o Superscript™ II RNase H Reverse Transcriptase. As reações qPCR foram um volume final de 20 µL que tem os seguintes componentes: 1 µL de cDNA como modelo em 7,5 µL de SYBR Green Master Mix 5,5 µL de água ultrapura e 0,5 µL de cada primer. Os primers foram projetados para realizar a amplificação de Caspase-3 ativada, FOXL2, BAX e BCL-2 (Tabela 1). Como controle endógeno, foi usado a Peptidylprolyl isomerase A (PPIA). As reações foram realizadas usando um sistema de detecção de PCR em tempo real IQ5 (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). A transformação dos valores limiares do ciclo (Ct) em níveis de expressão relativos normalizados de mRNA (Livak e Schmittgen, 2001). Os dados foram analisados usando o método Delta-Delta-Ct com correção de eficiência de acordo com Silva *et al.* (2011).

**Tabela 1.** Sequência de iniciadores de RT-qPCR e número de acesso usados para análises quantitativas de expressão gênica no tecido ovariano cultivado por 6 dias.

Transcrições	Sequência de primers (5'-3')	Nº de acesso
<b>CASPASE-3</b>	F: TTTGTCCAGGAGCTACGGTT R: TGCAAAGGATGGATGAGGGT	XM_018041755.1
<b>FOXL2</b>	F: CGCTGTCCGGCATCTACCAG R: CCGGGTCCAGCGTCCAGTAG	XM_027959904.2
<b>BAX</b>	F: GTTTTCCGACGGCAACTTC R: GGATGGTCCTGATCAACTCG	JN036558.1
<b>BCL-2</b>	F: ATGTGTGTGGAGAGCGTCAA R: GCCAGGAGAAATCAAACAGG	XM_004020687.1
<b>PPIA</b>	F: TCATTTGCACTGCCAAGACTG R: TCATGCCCTCTTTCACTTTGC	XM_018047035.1

### 6.11 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistical Package for Social Science (SPSS – versão 27.0). Inicialmente, foram avaliadas a normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e a homogeneidade de variância (testes de Levene). Sequencialmente, para comparar o efeito do cultivo, cada tratamento do D1 foi comparado por teste de Dunnett com o controle NC. Em seguida, para comparar o efeito dos compostos testados, os tratamentos foram comparados entre si nos dias 1 e 6 por GLM seguido de teste SNK. Por fim, para verificação do efeito do tempo de cultivo, os mesmos tratamentos foram comparados nos dias 1 x 6 por teste t pareado. Os dados são apresentados como média ( $\pm$  SEM) e os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

## 7 RESULTADOS

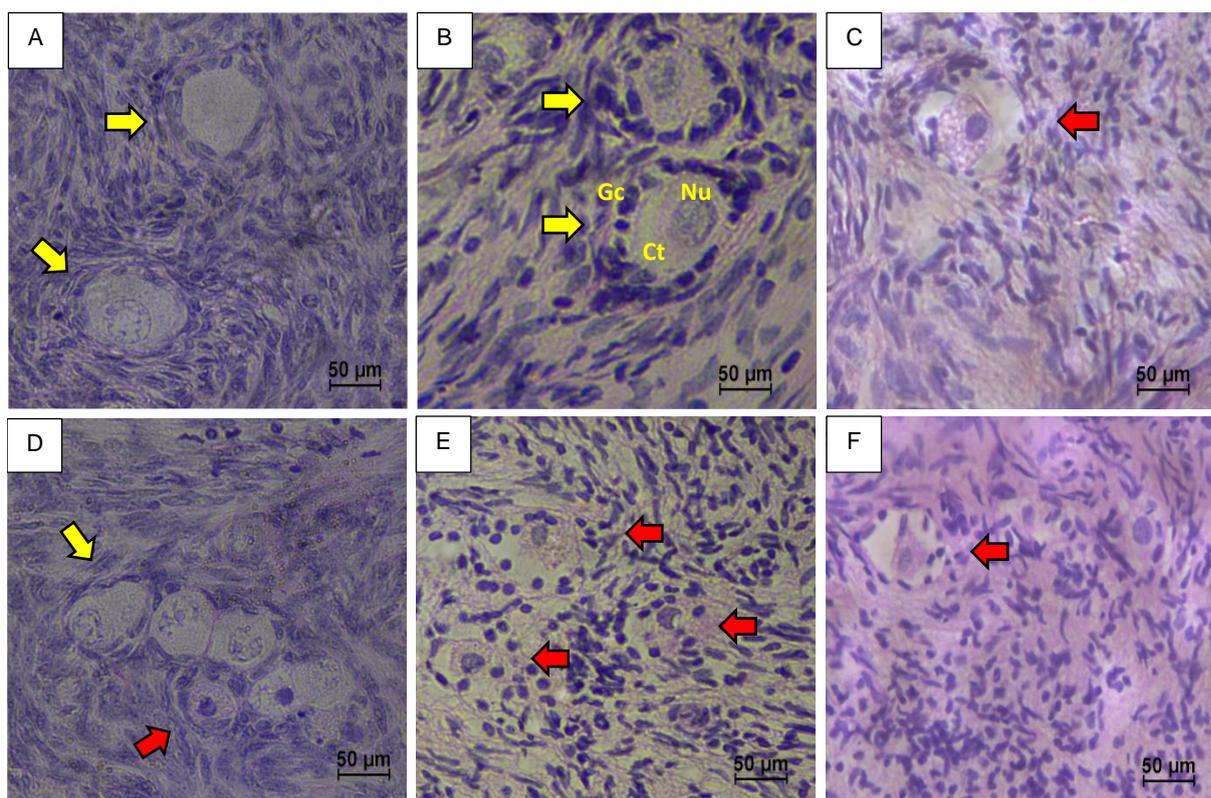
### 7.1 Morfologia folicular

Um total de 2.640 folículos pré-antrais (240 folículos/tratamento) foram analisados quanto à sua morfologia. A Figura 2 mostra alterações morfológicas observadas nos folículos pré-antrais após CIV. Dentre as alterações, folículos com retração do oócito e núcleos picnóticos (Fig. 2C e 2E) foram registrados nos tratamentos com DOX e CA<sub>5</sub>300. Folículos com morfologia normal foram mais presentes no tecido ovariano não cultivado e cultivado somente com MEM<sup>+</sup> (Fig. 2A e 2B). A Figura 3A mostra o percentual de sobrevivência representado pelo número de folículos considerados normais quanto a sua morfologia em todos os tratamentos testados. Após 24h de cultivo, foi possível observar que os fragmentos cultivados em MEM<sup>+</sup> e CA<sub>5</sub>100, mantiveram ( $P>0,05$ ) o percentual de sobrevivência folicular semelhante ao controle NC. Além disso, é importante destacar que o tratamento CA<sub>5</sub>300 apresentou a menor ( $P<0,05$ ) taxa de sobrevivência folicular logo no dia 1 de cultivo quando comparado aos demais tratamentos. Após 6 dias de cultivo, os tratamentos CA<sub>5</sub>200 e CA<sub>5</sub>300 apresentaram as menores ( $P<0,05$ ) taxa de sobrevivência folicular quando comparados aos demais tratamentos. Adicionalmente, quando comparado o tratamento nos dias 1 e 6 de cultivo, apenas o MEM<sup>+</sup> não apresentou redução ( $P>0,05$ ) da sobrevivência folicular.

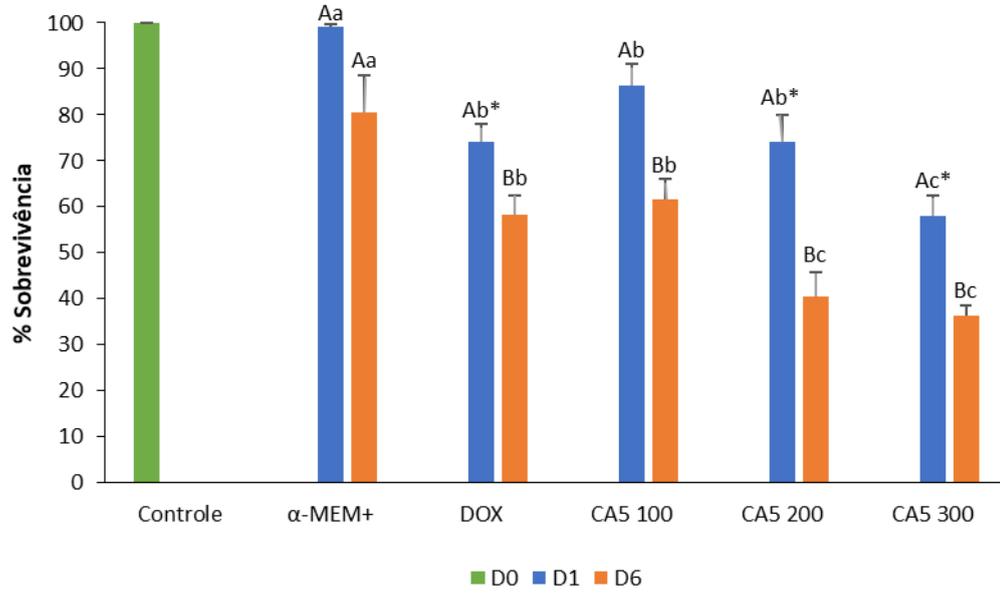
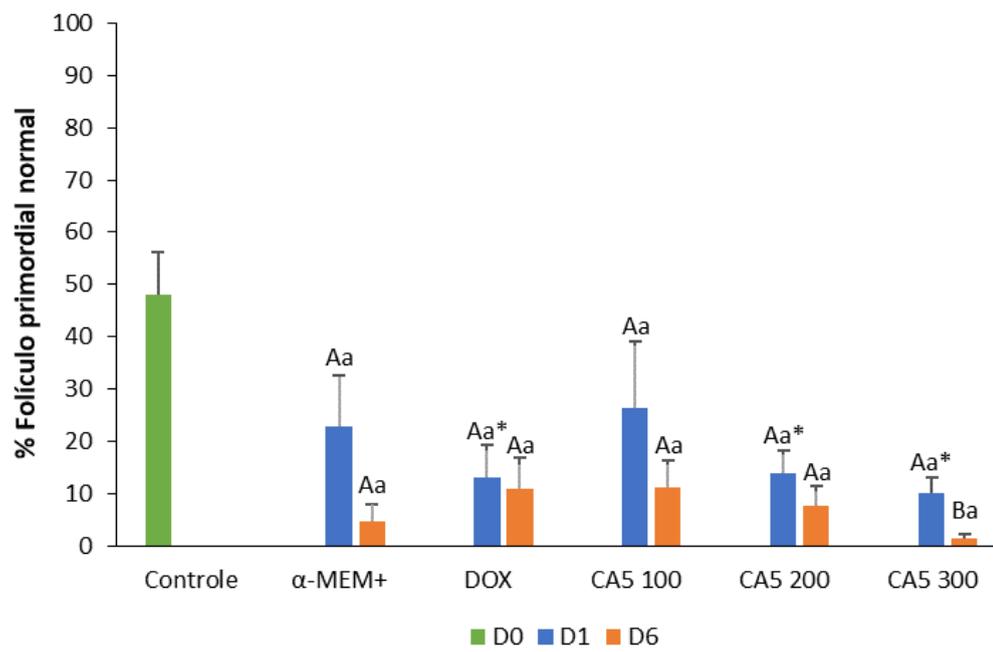
Na Figura 3B, foi observado que, logo após 24h de CIV, os tratamentos com DOX, CA<sub>5</sub>200 e CA<sub>5</sub>300 reduziram significativamente o percentual de folículos primordiais normais em relação ao controle NC. Ainda no dia 1 de cultivo, os tratamentos MEM<sup>+</sup> e CA<sub>5</sub>100 se mantiveram semelhantes ao controle NC e foram semelhantes entre si quanto ao percentual de primordiais normais. Entretanto, após 6 dias de cultivo, não houve diferença entre os tratamentos testados com relação ao número de primordiais normais. Vale ressaltar que o CA<sub>5</sub>300 foi o único que reduziu significativamente o percentual de folículos primordiais normais entre os dias 1 e 6 de cultivo.

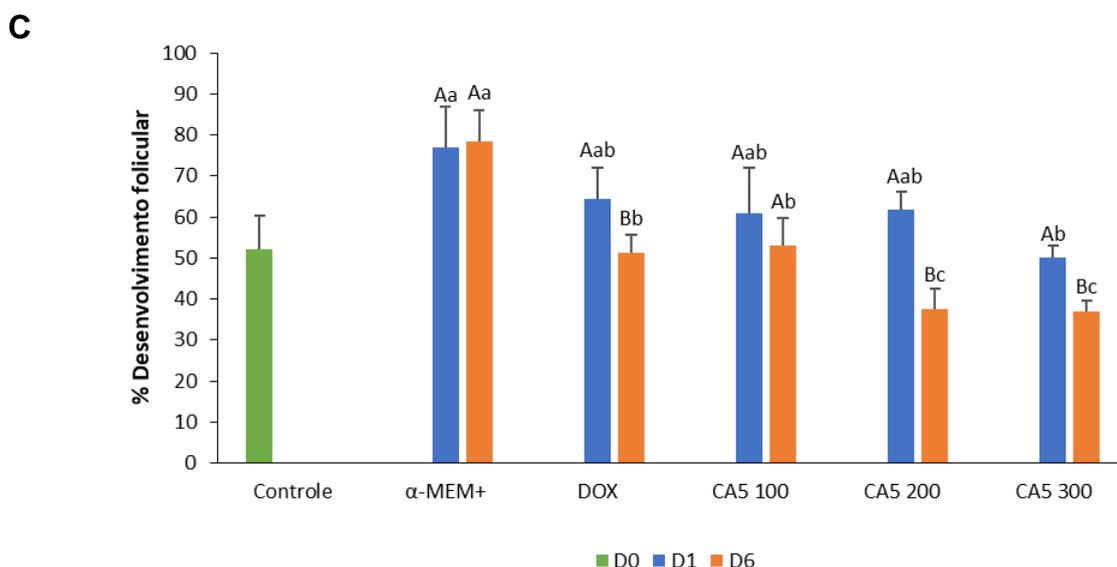
A Figura 3C demonstra, o percentual de folículos pré-antrais em desenvolvimento (taxa de ativação folicular) normais. Após 1 dia de cultivo, todos os tratamentos mantiveram o percentual de folículos em desenvolvimento semelhante ao controle NC. No entanto, ainda no dia 1 de cultivo, o MEM<sup>+</sup> apresentou o maior

percentual de folículos em desenvolvimento e a CA<sub>5</sub>300 apresentou o menor percentual quando comparados aos demais tratamentos. Já no dia 6 de cultivo, as concentrações mais altas CA<sub>5</sub>200 e CA<sub>5</sub>300, apresentaram percentual de desenvolvimento significativamente menor quando comparados aos demais. Vale ressaltar que, CA<sub>5</sub>100, assim como o MEM<sup>+</sup>, mantiveram o percentual de folículos normais em desenvolvimento folicular entre os dias 1 e 6 de cultivo.



**Figura 2.** Imagens representativas da morfologia folicular em diferentes tratamentos. (A) Controle NC; (B) MEM<sup>+</sup>; (C) DOX; (D) CA<sub>5</sub>100; (E) CA<sub>5</sub>200; (F) CA<sub>5</sub>300. As setas amarelas e vermelhas indicam folículos normais e degenerados, respectivamente. Ampliação da imagem = 400×; Barra de escala = 50μm. Nu=núcleo, Ct=citoplasma, Gc=células da granulosa.

**A****B**



**Figura 3.** Percentual de folículos pré-antrais ovinos morfologicamente normais no tecido ovariano fresco (controle NC), ou após CIV em MEM<sup>+</sup> (sozinho), na presença de DOX (0,3μg/mL) ou de CA<sub>5</sub> nas concentrações de 100, 200 ou 300nM/mL por 1 ou 6 dias (média±SEM). A) Percentual de folículos pré-antrais normais (sobrevivência folicular). B) Percentual de folículos primordiais morfologicamente normais. C) Percentual de folículos em desenvolvimento morfologicamente normais. (\*) Compara tratamentos com controle NC no dia 1 de cultivo. (A,B,C) Comparam o mesmo tratamento entre os dias 1 e 6 (P<0,05). (a,b,c) Comparam diferença entre tratamentos no mesmo dia de cultivo (D1 ou D6; P <0,05).

## 7.2 Densidade do estroma

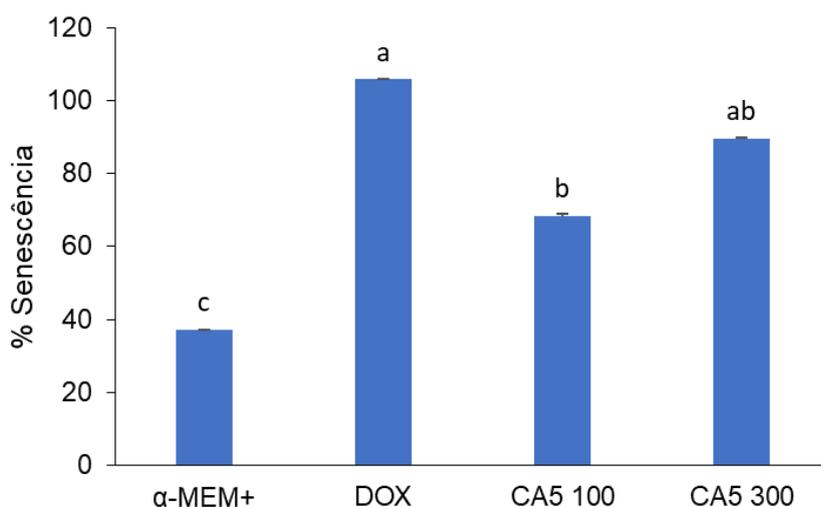
Foi observada redução (P<0,05) da densidade celular no estroma (Tabela 3), após 24 horas de CIV em todos os tratamentos comparados ao controle NC. A DOX apresentou menor (P<0,05) densidade estromal aos demais tratamentos em ambos os dias de cultivo (1 e 6). No D6, a CA<sub>5</sub> nas concentrações de 200 e 300nM reduziram (P<0,05) a densidade celular quando comparadas ao MEM<sup>+</sup>. Curiosamente, a CA<sub>5</sub>100 além de manter (P>0,05) a densidade estromal semelhante ao MEM<sup>+</sup>, apresentou aumento (P<0,05) dessa densidade entre os dias 1 e 6 de cultivo.

Tratamentos	Densidade de células do estroma (células/2500 $\mu\text{m}^2$ )	
	D1	D6
Controle NC	277.2 $\pm$ (7.24)	
MEM <sup>+</sup>	213.5 $\pm$ (15.30) <sup>Ba*</sup>	263.0 $\pm$ (13.90) <sup>Aa</sup>
DOX	126.0 $\pm$ (4.87) <sup>Ab*</sup>	116.3 $\pm$ (7.30) <sup>Ac</sup>
CA <sub>5</sub> 100	193.5 $\pm$ (7.98) <sup>Ba*</sup>	257.0 $\pm$ (7.76) <sup>Aa</sup>
CA <sub>5</sub> 200	206.2 $\pm$ (20.7) <sup>Aa*</sup>	198.7 $\pm$ (6.66) <sup>Ab</sup>
CA <sub>5</sub> 300	180.7 $\pm$ (10.6) <sup>Aa*</sup>	172.3 $\pm$ (8.98) <sup>Ab</sup>

**Tabela 2.** Densidade das células do estroma (média $\pm$ SEM) em tecido ovariano não cultivado (controle NC) ou após CIV em MEM<sup>+</sup> (sozinho), na presença de DOX (0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ou de CA<sub>5</sub> nas concentrações de 100, 200 ou 300nM/mL por 1 ou 6 dias. (\*) compara todos os tratamentos com controle NC no dia 1 de cultivo. (A,B) Comparam o mesmo tratamento entre os dias 1 e 6 (mesma linha, entre colunas; (P<0,05). (a,b,c) Comparam diferença entre tratamentos no mesmo dia de cultivo (mesma coluna, entre linhas; P<0,05).

### 7.3 Senescência celular

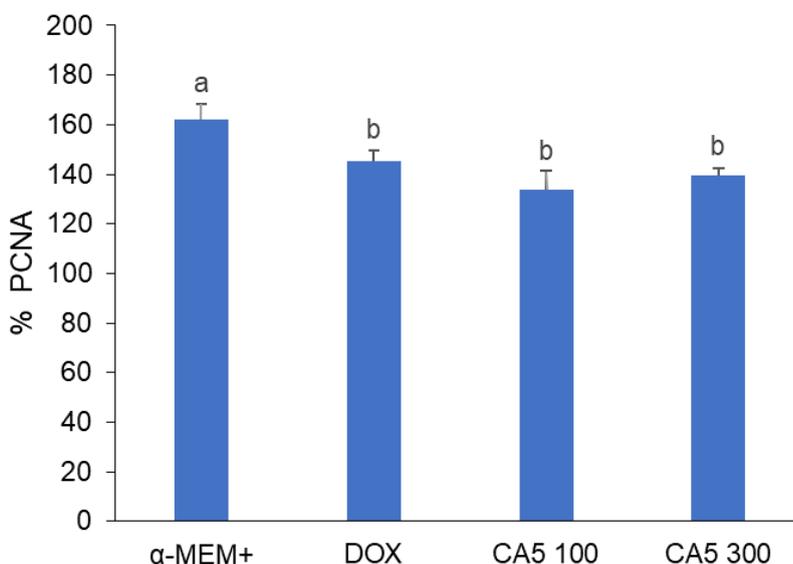
Os tratamentos MEM<sup>+</sup> e DOX apresentaram menor e maior marcação de acúmulo de grânulos de lipofuscina nos tecidos ovariano, respectivamente, comparados aos demais tratamentos (Figura 4).



**Figura 4.** Marcação de lipofuscina representada pelo % de senescência em tecido ovariano CIV após 6 dias em MEM<sup>+</sup>, na presença de DOX (0.3 µg/mL) ou de CA<sub>5</sub> (100 e 300nM). (a,b,c) Comparam os tratamentos.

#### 7.4 Proliferação celular

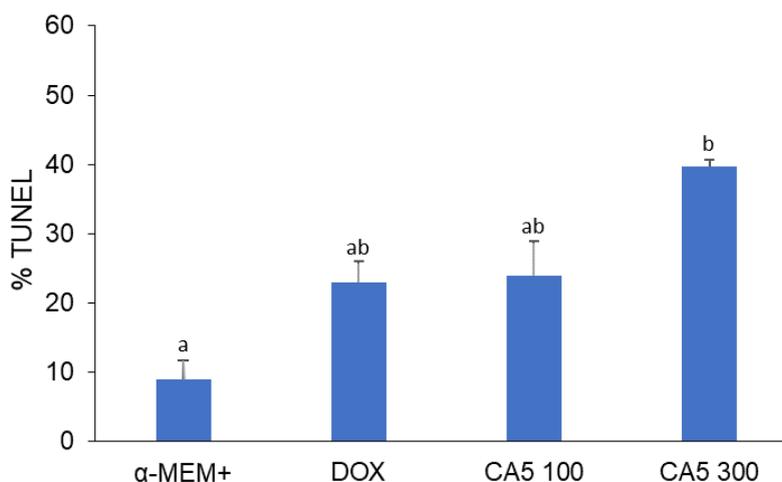
A Figura 5 mostra a análise do antígeno de proliferação PCNA no tecido ovariano CIV por 6 dias. Foi possível observar uma redução significativa na proliferação celular nos grupos tratados com DOX e CA<sub>5</sub> quando comparados ao MEM<sup>+</sup>.



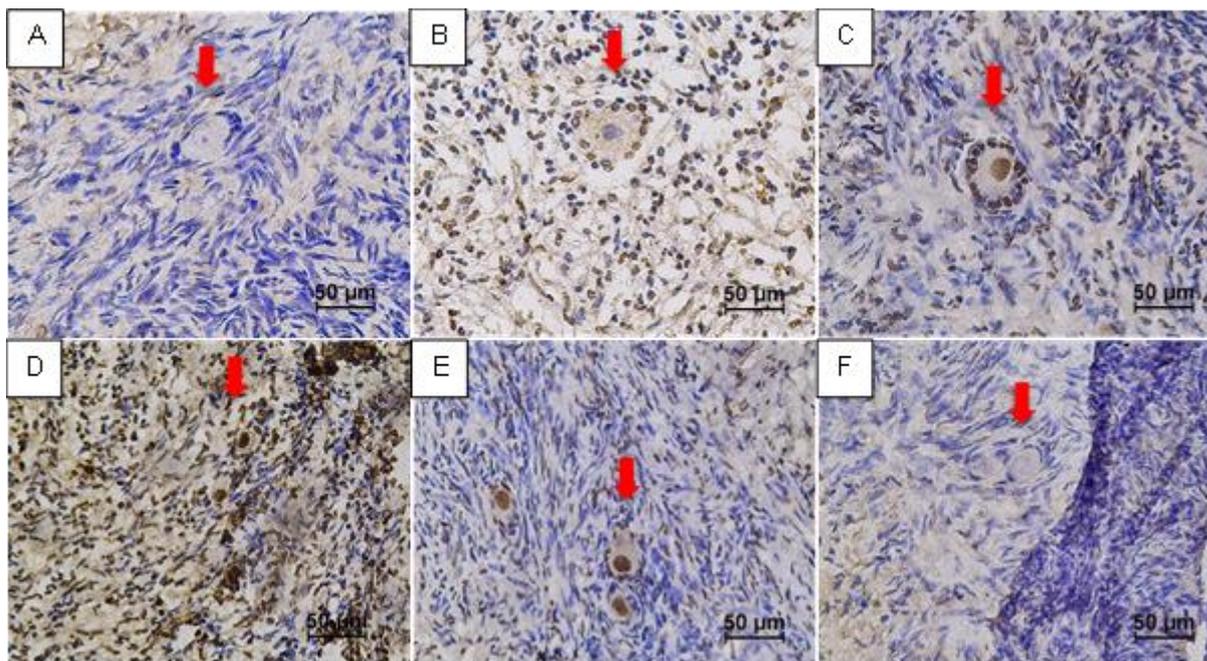
**Figura 5.** Marcação do antígeno de proliferação nuclear (PCNA) em tecido ovariano após 6 dias em MEM<sup>+</sup>, na presença de DOX (0.3 µg/mL) ou de CA<sub>5</sub> (100 e 300nM). (a,b,c) Comparam os tratamentos.

### 7.5 Detecção da fragmentação do DNA pelo ensaio de TUNEL

A Figura 6 mostra a fragmentação do DNA pelo ensaio TUNEL no tecido ovariano após 6 dias de CIV. O tratamento CA<sub>5</sub>300 foi o único que apresentou um aumento significativo no número de células apoptóticas quando comparado ao MEM<sup>+</sup>, enquanto os tratamentos cultivados com DOX e CA<sub>5</sub>100 não diferiram do controle cultivado (MEM<sup>+</sup>).



**Figura 6.** Marcação de fragmentação do DNA pela técnica de TUNEL no tecido ovariano após 6 dias de CIV com MEM<sup>+</sup>, na presença de DOX (0.3 µg/mL) ou de CA<sub>5</sub> (100 e 300nM). (a,b,c) Comparam os tratamentos.



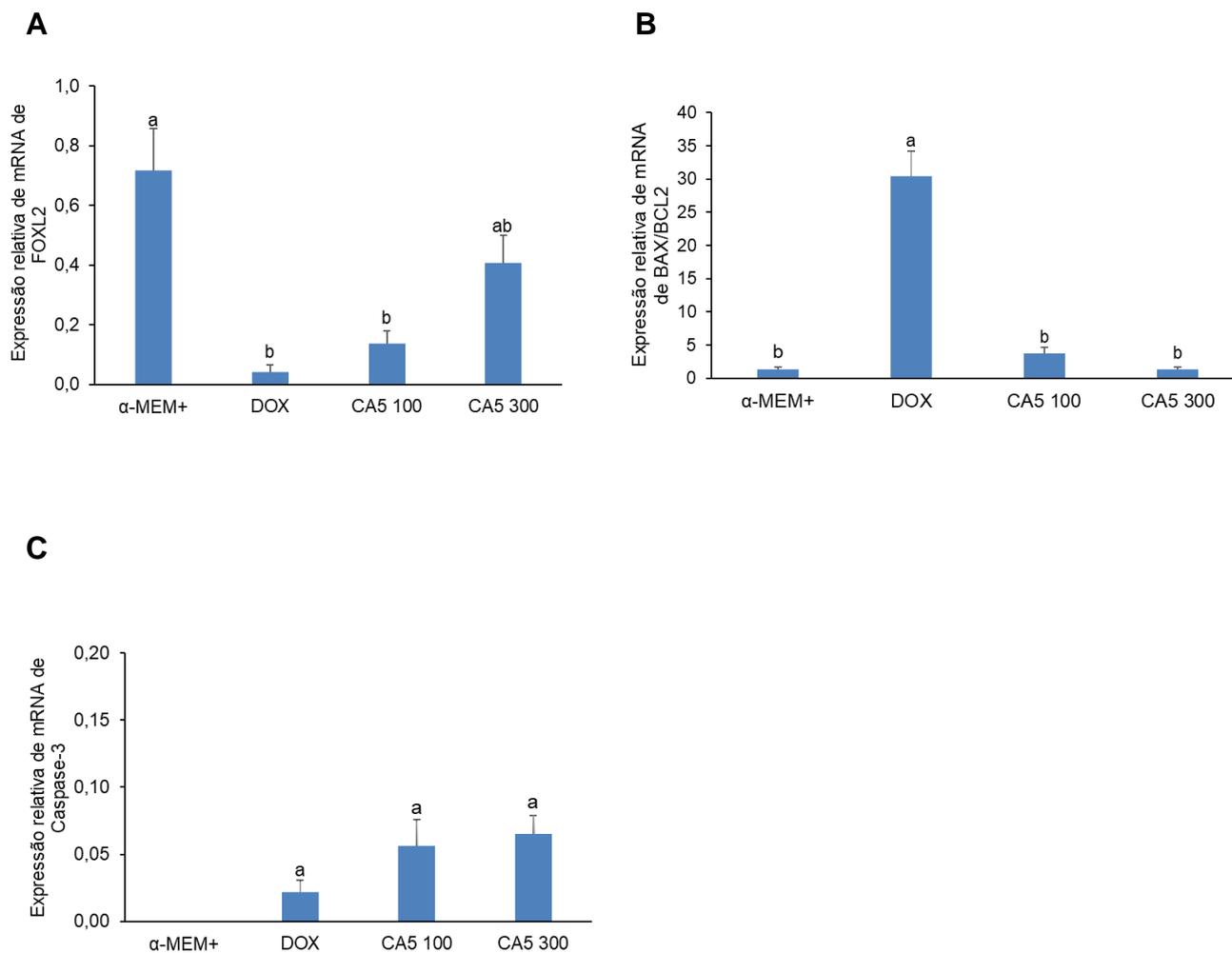
**Figura 7.** Imagens representativas da imunomarcação pela técnica de TUNEL em fragmentos ovarianos CIV, durante 6 dias. As células TUNEL positivas são representadas pela colora o marrom. (A) MEM<sup>+</sup>; (B) DOX 0.3 µg/mL; (C) CA<sub>5</sub>100; (D) CA<sub>5</sub>300; (E) Controle Positivo; (F) Controle Negativo.

### 7.6 Expressão relativa do mRNA de FOXL2, BAX, BCL2 e CASPASE-3

A Figura 8A mostra a expressão relativa de mRNA do FOXL2 que codifica a expressão do fator de transcri o forkhead box L2 envolvido nos processos de ativa o e crescimento folicular no ovário. Após 6 dias de CIV, os tratamentos CA<sub>5</sub>300 foram semelhantes ao MEM<sup>+</sup> na expressão relativa do mRNA do FOXL2, enquanto que esta mesma expressão foi reduzida nos tratamentos DOX e CA<sub>5</sub>100 quando comparado ao MEM<sup>+</sup> ( $P < 0,05$ ).

A Figura 8B mostra a rela o entre os genes pr  e antiapopt ticos BAX e BCL2 (razão BAX/BCL2) e observa-se no tratamento com DOX um aumento significativo na rela o BAX/BCL2, quando comparado aos demais tratamentos.

A Figura 8C demonstra que a expressão relativa da enzima caspase-3 foi maior em todos os tratamentos testados, enquanto que no MEM<sup>+</sup>, não foi detectada a expressão relativa deste gene nas condi es testadas.



**Figura 8.** Média±SEM da expressão do mRNA dos genes FOXL2, BAX/BCL2 e Caspase-3 avaliados por qPCR (A-C). (a,b) Comparam os tratamentos (P<0,05).

## 8 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou pela primeira vez o efeito da cromomicina A<sub>5</sub> no desenvolvimento *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais ovinos. A exposição do tecido ovariano ovino às doses de 100, 200 e 300nM de CA<sub>5</sub>, após 6 dias de CIV, resultou na perda progressiva dos folículos primordiais e em desenvolvimento. As concentrações mais altas de CA<sub>5</sub> testadas no presente estudo (200 e 300nM), demonstraram maior toxicidade logo após 1 dia de CIV, enquanto que a menor dose testada se mostrou similar ao tecido ovariano cultivado somente em MEM<sup>+</sup>. Ao final do cultivo, as maiores doses também levaram maiores taxas de degeneração, independente da categoria folicular e sendo ainda mais tóxicas do que o quimioterápico doxorrubicina. Com relação aos folículos primordiais, as doses de CA<sub>5</sub> de 200 e 300nM também se mostraram mais deletérias, o que indica o potencial citotóxico desta substância no pool de reserva de folículos ovarianos. Com relação aos folículos em desenvolvimento, enquanto a menor dose testada (100nM) manteve taxas de sobrevivência de folículos em desenvolvimento similares ao controle cultivado, as doses de 200 e 300nM foram ainda mais tóxicas aos folículos em desenvolvimento do que a doxorrubicina. Isso sugere que a CA<sub>5</sub> pode causar um efeito deletério na reserva folicular e levar à falência ovariana, uma vez que os folículos primordiais constituem o pool de reserva de gametas. Além disso, esses efeitos tóxicos podem se estender à função endócrina do ovário que é dependente da capacidade de proliferação e diferenciação das células da granulosa e do crescimento folicular. De forma semelhante, o estudo de Costa *et al.* (2021), observou efeitos citotóxicos na maturação *in vitro* de oócitos bovinos quando cultivados *in vitro* nestas mesmas doses de CA<sub>5</sub>, mostrando que o potencial citotóxico desta substância no ovário é independente da fase de desenvolvimento do gameta feminino.

Estudos anteriores relatam que um dos mecanismos que levam a falha ovariana após quimioterapia é o efeito *burnout*, estímulo acelerado da ativação folicular que leva posteriormente a completa depleção do pool de reserva folicular (Sonigo *et al.*, 2019; Guerreiro *et al.*, 2020; De Assis *et al.* 2023). Alguns estudos relatam que os efeitos da DOX no desenvolvimento folicular murino pode causar perda tanto de folículos primordiais como de folículos em desenvolvimento, afetando principalmente as células da granulosa mitoticamente ativas, levando a uma redução nas taxas de ovulação (Wang *et al.*, 2019; Herrero *et al.*, 2023). Um estudo de Titus

*et al.* (2021) mostrou que a exposição ao quimioterápico ciclofosfamida em um modelo de xenoinxerto ovariano humano, induziu a morte aguda por apoptose de folículos primordiais sem, no entanto, promover o efeito *burnout*. Os achados do presente estudo podem sugerir que a morte de folículos primordiais causada pela CA<sub>5</sub> seja provocada diretamente por danos às células foliculares que podem levar à morte folicular por apoptose, sem no entanto, causar ativação maciça dos folículos primordiais, o feito *burnout*.

Os dados aqui obtidos, demonstram que a CA<sub>5</sub> assim como a DOX, apresentaram efeitos citotóxicos generalizados ao tecido ovariano, pois além de afetar a sobrevida e o desenvolvimento folicular, acometeu de forma negativa também a densidade e a capacidade proliferativa das células do estroma ovariano, mesmo na menor dose testada de 100nM de CA<sub>5</sub>. Os efeitos da CA<sub>5</sub> encontrados neste estudo são consistentes com os efeitos da DOX que causou uma redução no potencial proliferativo das células foliculares do ovário de murino (Silva *et al.*, 2023) e também com de Herrero *et al.* (2023) e De Assis *et al.* (2023), que observaram danos ao estroma ovariano de roedores também submetidos ao tratamento com DOX. As células estromais desempenham uma variedade de funções essenciais na manutenção, formação e desenvolvimento folicular. Danos a essas células podem ter um impacto negativo na quiescência e no desenvolvimento folicular (Kierszebaum & Tres, 2016; Spears *et al.*, 2019; Cui *et al.*, 2020). Os efeitos dos quimioterápicos na células somáticas ovarianas incluem variados tipos de danos que podem resultar desde uma redução temporária da fertilidade feminina pela degeneração dos folículos e oócitos em crescimento, até a completa exaustão dos folículos primordiais que podem levar a uma falha ovariana precoce e permanente. Além disso, é relatado que a degeneração das células estromais podem levar a uma redução na produção de estradiol e causar desequilíbrio endócrino (Oktem & Oktay 2007).

Entretanto, os exatos mecanismos pelos quais essa toxicidade é exercida e o tipo de célula ovariana afetada, podem variar de acordo com o tipo de droga e o tempo

de tratamento. As células somáticas do estroma e da granulosa são usualmente muito afetadas e esses danos e podem levar à consequências mais deletérias, como a destruição dos vasos sanguíneos, danos aos microtúbulos e ao DNA das células estromais e da granulosa, com conseqüente degeneração do oócito (Codasi-Pisanelli *et al.*, 2017). A CA<sub>5</sub> testadas no presente estudo, pode estar causando um efeito tóxico nas células somáticas do tecido ovariano, podendo estimular uma conseqüente morte dos folículos em desenvolvimento.

O ensaio de TUNEL demonstrou uma fraca marcação nos folículos cultivados somente com MEM<sup>+</sup> e até mesmo no tratamento com DOX. Por outro lado, foi observada forte fragmentação do DNA nos folículos expostos à CA<sub>5</sub> (Figura 7). Estes dados corroboram com os resultados obtidos com o antígeno de proliferação PCNA neste estudo. Este antígeno desempenha um papel crucial nos processos de reparo e replicação do DNA, o que indica que as doses de CA<sub>5</sub> testadas estão causando danos irreparáveis ao DNA do tecido ovariano ao final de seis dias de cultivo *in vitro*. Esses dados são similares aos resultados de citotoxicidade da CA<sub>5</sub> em células tumorais e reforçam seu forte potencial como droga quimioterápica (Pettit *et al.*, 2015; Pinto *et al.*, 2020). Os quimioterápicos agem em uma gama de mecanismos celulares, mas apresentam particular citotoxicidade às células em alta atividade proliferativa. Esta ação tem grande relevância ao avaliar os efeitos destas substâncias na função ovariana, pois oócitos e células somáticas podem apresentar diferentes vulnerabilidades aos agentes tóxicos em diferentes fases do desenvolvimento folicular. Os oócitos não estão se dividindo constantemente no ovário, mas as células foliculares e o estroma ovariano apresentam alto grau de proliferação e podem apresentar maior sensibilidade aos efeitos destas drogas (Morgan *et al.*, 2012). O ensaio de TUNEL no presente estudo, confirmou maiores danos tanto às células foliculares como às células do estroma, o que mais uma vez pode indicar que a morte folicular pode estar ocorrendo pela degeneração inicial das células estromais e das células da granulosa em proliferação.

Sabe-se que os agentes quimioterápicos, podem induzir a senescência celular em diversos órgãos, comprometendo a estrutura e a função dos tecidos saudáveis (Birch & Gil, 2020; Gao *et al.*, 2023). Dessa forma, o presente estudo também investigou o efeito da CA<sub>5</sub> na indução da senescência celular pela marcação de lipofuscina no tecido ovariano. Observou-se um aumento no acúmulo de lipofuscina nas concentrações testadas de CA<sub>5</sub>. No entanto, a DOX apresentou uma maior

marcação de células senescentes do que a CA<sub>5</sub>. Esse resultado corrobora com um estudo recente que demonstrou pela primeira vez que a DOX aumentou as células senescentes em ovários murinos (Gao *et al.*, 2023). Estudos recentes também relataram que a senescência celular é desencadeada em células da granulosa após indução de insuficiência ovariana prematura por ciclofosfamida (Xu *et al.*, 2023). A senescência celular se caracteriza pela interrupção irreversível do ciclo celular e pela resistência à apoptose, sua indução pode ser desencadeada por uma diversidade de estímulos, tais como estresse oxidativo ou danos persistentes ao DNA (Herranz & Gil, 2018). No ovário, o acúmulo dessas células pode resultar na deterioração do microambiente tecidual, levando à diminuição da qualidade do oócito e, conseqüentemente, à infertilidade (Briley *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2023).

Em relação a análise da expressão gênica, o presente estudo avaliou a expressão do FOXL2, um gene que codifica um fator de transcrição forkhead expresso no ovário, essencial na diferenciação das células da granulosa (Schmidt *et al.*, 2004; Uda *et al.*, 2004). No presente estudo observou-se uma redução na expressão do mRNA de FOXL2 no tecido ovariano cultivado na presença da CA<sub>5</sub>100 e DOX. A ausência de FOXL2 impede a transição das células da granulosa nos folículos primordiais de uma única camada pavimentosa para uma camada de células cúbicas após ativação folicular, e os folículos ativados sem o adequado suporte das células da granulosa sofrem atresia, levando à depleção precoce do conjunto de folículos primordiais e, eventualmente, leva à infertilidade (Schmidt *et al.*, 2004). Isso sugere que a redução na expressão do FOXL2, causada pela presença da CA<sub>5</sub>, pode influenciar diretamente os mecanismos de ativação, crescimento folicular e oocitário durante o desenvolvimento do ciclo ovariano.

Com base nos resultados de qPCR, pode-se observar um aumento na razão da expressão entre BAX e BCL-2 no tecido ovariano cultivado com DOX. O desequilíbrio na relação entre as proteínas BAX (pró-apoptótica) e BCL-2 (antiapoptótica), em resposta a um estímulo letal intrínseco como dano ao DNA, favorece a liberação do citocromo c e ativação das caspases, incluindo a caspase-3, resultando na indução da apoptose (Stringer *et al.*, 2023). No entanto no presente estudo, a expressão de mRNA da caspase-3 não foi alterada quando o tecido ovariano

ovino foi cultivado com a CA<sub>5</sub> nas diferentes concentrações testadas. Pesquisas anteriores estabeleceram que o pico de execução da apoptose no ovário pode ocorrer em torno de 24 horas após tratamento com DOX, resultando na diminuição da expressão da caspase-3 após 72h (Wang *et al.*, 2019; Gao *et al.*, 2023). Essa descoberta sugere que os resultados observados com a DOX e a CA<sub>5</sub> podem estar ligados a um pico de atividade apoptótica que ocorre dentro desse intervalo de tempo e após esse período, há uma redução da caspase-3 não sendo possível detectá-la.

## 9 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a CA<sub>5</sub> exerce um efeito tóxico na sobrevivência e no desenvolvimento de folículos pré-antrais de ovelhas de maneira dose dependente. A CA<sub>5</sub> na menor concentração testada se mostrou menos tóxica até mesmo que a doxorubicina para o desenvolvimento folicular, o que sugere verificar seus efeitos no ovário em menores concentrações. No entanto, as doses de CA<sub>5</sub> utilizadas aqui, foram superiores às concentrações testadas em estudos anteriores em diferentes linhagens celulares tumorais.

## 10 PERSPECTIVA

Diante disso, investigações futuras serão necessárias para confirmar se os folículos primordiais poderão demonstrar maior resistência ao efeito antiproliferativo da CA<sub>5</sub> em menores concentrações. Estes folículos, em estágio de dormência no ovário, apresentam menor atividade mitótica e assim, podem apresentar menor sensibilidade ao efeito antiproliferativo CA<sub>5</sub> em menores concentrações, tornando esta substância um potencial medicamento anticâncer com baixa toxicidade à função ovariana.

## REFERÊNCIAS

Al, G *et al.* Adipose-derived stem cells promote the repair of chemotherapy-induced premature ovarian failure by inhibiting granulosa cells apoptosis and senescence. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 14, n. 1, p. 75, 2023.

ALMEIDA, J.Z *et al.* *In vitro* cytotoxic effects of 5-Fluorouracil on isolated murine ovarian preantral follicles. **Theriogenology**, v. 178, p. 60-66, 2022.

ALVES, K.A *et al.* The mare model to study the effects of ovarian dynamics on preantral follicle features. **PLoS One**, v. 11, n. 2, p. e0149693, 2016.

ALVES, K.A *et al.* Anethole improves blastocysts rates together with antioxidante capacity when added during bovine embryo culture rather than in the *in vitro* maturation medium. **Zygote (Cambridge, England)**, v. 27, n. 6, p. 382–385, 2019.

ARBEL, M.; CHOUDHARY, K, TFILOIN O, KUPIEC M. PCNA loaders and unloaders—One ring that rules them all. *Genes*, v. 12, n. 11, p. 1812, 2021.

BAHR, J. M. Ovary, Overview. In: Skinner, M. K. (Ed.). *Encyclopedia of Reproduction* 2nd Edition. **Elsevier, Amsterdam**, v. 2, p. 3-7, 2018.

BALDASSARE, H. Coleta, conservação e transferência de embrião. In: Aisen, E.G. *Reprodução ovina e caprina*. **São Paulo: MedVet**. Cap 11, p.143-152, 2008.

BAKER, D.J *et al.* Naturally occurring p16Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. **Nature**, v. 530, n. 7589, p. 184-189, 2016.

BEDOSCHI, G.; NAVARRO, P.A.; OKTAY, K. Chemotherapy-induced damage to ovary: mechanisms and clinical impact. **Future Oncol**, v. 12, n. 19, p. 2333-2344, 2016.

BEN-AHARON, I *et al.* Doxorubicin-induced ovarian toxicity. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 8, n. 1, p. 1-7, 2010.

BEN-AHARON, I; SHALGI, R. What lies behind chemotherapy-induced ovarian toxicity? **Reproduction**, v. 144, n. 2, p. 153-163, 2012.

BÉRDY, J. Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. **The Journal of antibiotics**, v. 65, n. 8, p. 385-395, 2012.

BERTOLAZZI, L.G *et al.* Incidência e caracterização de reações adversas imediatas à infusão de quimioterápicos em hospital sentinela. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v. 22, n. 3, p. 84-90, 2015.

BILDIK, G.; ACILAN, C.; SAHIN, G.N.; KARAHUSEYINOGLU, S.; OKTEM, O. C-Abl is not activated in DNA damage-induced and Tap63-mediated oocyte apoptosis in human ovary. **Cell Death & Disease**, v. 9, n. 10, p. 943, 2018.

BIRCH, J.; GIL, J. Senescence and the SASP: many therapeutic avenues. **Genes & development**, v. 34, n. 23-24, p. 1565-1576, 2020.

BOER, D. R.; CANALS, A.; COLL, M. DNA-binding drugs caught in action: the latest 3D pictures of drug-DNA complexes. **Dalton Transactions**, v. 3, p. 399–414, 2009.

BONNET, A *et al.* An overview of gene expression dynamics during early ovarian folliculogenesis: specificity of follicular compartments and bi-directional dialog. **BMC genomics**, v. 14, p. 1-19, 2013.

BRILEY, S.M *et al.* Reproductive age-associated fibrosis in the stroma of the mammalian ovary. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 152, n. 3, p. 245, 2016.

CACCIOTTOLA, L.; CAMBONI, A.; CERNOGORAZ, A.; DONNEZ, J.; DOLMANS, M.M. Role of apoptosis and autophagy in ovarian follicle pool decline in children and women diagnosed with benign or malignant extra-ovarian conditions. **Human Reproduction**, v. 38, n. 1, p. 75-88, 2023.

CARVALHO, G.; CAMILO, M.E.; RAVASCO, P. What is the relevance of nutrition in oncology? **Acta Médica Portuguesa**, v. 24, p. 1041-50, 2011.

CAZARIN, K.C.C.; CORREA, C.L.; ZAMBRONE, F.A.D. Reducao, refinamento e substituicao do uso de animais em estudos toxicologicos: uma abordagem atual. **Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 3, p. 289-299, 2004.

CHAVES, R.N *et al.* Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured *in vitro*. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, n. 5, p. 640-647, 2008.

CLARKE, H.J. Regulation of germ cell development by intercellular signaling in the mammalian ovarian follicle. Wiley Interdisciplinary Reviews: **Developmental Biology**, v. 7, n. 1, p. e294, 2018.

CODACCI-PISANELLI, G.; DEL PUP, L.; DEL GRANDE, M.; PECCATORI, F.A. Mechanisms of chemotherapy-induced ovarian damage in breast cancer patients. **Critical Reviews In Oncology/Hematology**, v. 113, p. 90-96, 2017.

COSTA, B.N *et al.* Avaliacao da toxicidade da cromomicina a5, um potencial agente anticancer, sobre oocitos bovinos maturados *in vitro*. 72 f. **[Dissertacao]**. Ceará: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Ceara, 2021. Disponível em: <http://www.uece.br/ppgcv/pesquisa/dissertacoes/dissertacoes-de-2021>. Acesso: 10.Jan.2022.

COX, E; TAKOV, V. Embryology, ovarian follicle development. **Study Guide from StatPearls Publishing**, Treasure Island (FL), 2018.

CUI, L *et al.* hUMSCs regulate the differentiation of ovarian stromal cells via TGF- $\beta$ 1/Smad3 signaling pathway to inhibit ovarian fibrosis to repair ovarian function in POI rats. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2020.

CZABOTAR, P.E *et al.* Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: Implications for physiology and therapy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 1, p. 49– 63, 2014.

DE ASSIS, E.I.T *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**, v. 13, n. 1, p. 18, 2022.

DELRASO, N.J. *In vitro* methodologies for enhanced toxicity testing. **Toxicology Letters**, v. 68, n. 1-2, p. 91-99, 1993.

DI MICCO, R.; KRIZHANOVSKY, V.; BAKER, D.; D'ADDA DI FAGAGNA, F. Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 22, n. 2, p. 75-95, 2021.

DU, Yongrui *et al.* Evidence of cancer therapy-induced chronic inflammation in the ovary across multiple species: A potential cause of persistent tissue damage and follicle depletion. **Journal of reproductive immunology**, v. 150, p. 103491, 2022.

DUERRSCHMIDT, N *et al.* Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1-mediated autophagy in human granulosa cells as an alternative of programmed cell death. **Endocrinology**, v. 147, n. 8, p. 3851-3860, 2006.

ESHRE, Guideline Group on Female Fertility Preservation *et al.* ESHRE guideline: female fertility preservation. **Human Reproduction Open**, v. 2020, n. 4, 2020.

EVANGELOU, K.; GORGOULIS, V.G. Sudan Black B, the specific histochemical stain for lipofuscin: a novel method to detect senescent cells. **Oncogene-induced senescence: Methods and protocols**, p. 111-119, 2017.

FADDY, M.J *et al.* Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. **Human Reproduction**, v. 7, n. 10, p. 1342-1346, 1992.

FIGUEIREDO J.R.; CELESTINO J.J.H.; RODRIGUES A.P.R.; SILVA J.R.V. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção *in vitro* de embriões em larga escala. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n. 2, p. 143-152, 2007.

FLORÊNCIO, K.G.D *et al.* Chromomycin A<sub>5</sub> induces bona fide immunogenic cell death in melanoma. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 941757, 2022.

GALLARDO, T.D *et al.* Sequence variation at the human FOXO3 locus: a study of premature ovarian failure and primary amenorrhea. **Human Reproduction**, v. 23, n. 1, p. 216-221, 2008.

GAO, Y.; WU, T.; TANG, X.; WEN, J.; ZHANG, Y.; ZHANG, J.; WANG, S. Increased cellular senescence in doxorubicin-induced murine ovarian injury: effect of senolytics. **GeroScience**, p. 1-16, 2023.

GASTAL, M.O.; JACOMINI, J.O.; BELETTI, M.E.; FIGUEIREDO, J.R.; GAMBARINI, M.L.; GASTAL, E.L. Number and density of equine preantral follicles in different ovarian histological section thicknesses. **Theriogenology**, v. 83, n. 6, p. 1048-1055, 2015.

GEORGES, A.; AUGUSTE, A.; BESSIERE, L.; VANET, A.; TODESCHINI, A.L.; VEITIA, R.A. FOXL2: a central transcription factor of the ovary. **Journal Of Molecular Endocrinology**, v. 52, n. 1, p. R17-R33, 2014.

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

GHOSH, S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. **Bioorganic Chemistry**, v. 88, p. 102925, 2019.

GOZARI, M *et al.* An "olivomycin A" derivative from a sponge-associated *Streptomyces* sp. strain SP 85. **3 Biotech**, v. 9, n. 12, p. 439, 2019.

GUERREIRO, D.D.; ANDRADE, C.A.; LIMA, L.F.; RODRIGUES, G.Q.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Impacto dos agentes antineoplásicos sobre os folículos ovarianos e importância das técnicas reprodutivas na preservação da fertilidade humana. **Reprod Clim**, v. 30, n. 2, p.90-99, 2016.

GUERREIRO, D.D.; MBEMYA, T.G.; BRUNO, J.B.; FAUSTINO, L.R.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.R. *In vitro* culture systems as an alternative for female reproductive toxicology studies. **Zygote**, v. 27, n. 2, p. 1-9, 2019.

GUERREIRO, D.D *et al.* Response of preantral follicles exposed to quinoxaline: A new compound with anticancer potential. **Research In Veterinary Science**, v. 128, p. 261-268, 2020.

HERRANZ, N.; GIL, J. Mechanisms and functions of cellular senescence. **The Journal Of Clinical Investigation**, v. 128, n. 4, p. 1238-1246, 2018.

HERRERO, Y *et al.* Resveratrol alleviates doxorubicin-induced damage in mice ovary. **Chemico-Biological Interactions**, v. 376, p. 110431, 2023.

JENSEN, J.R.; MORBECK, D.E.; CODDINGTON III, C.C. Fertility preservation. In: Mayo Clinic Proceedings. **Elsevier**, 2011. p. 45-49.

KALINOVSKAYA, N.I.; ROMANENKO, L.A.; KALINOVSKY, A.I.; ERMAKOVA, S.P.; DMITRENOK, P.S.; AFIYATULLOV, S.S. The antitumor antibiotics complex of aureolic acids from the marine sediment-associated strain of *Streptomyces* sp. KMM 9048. **Natural Product Communications**, v. 12, n. 4, p. 1934578X1701200427, 2017.

KAZUFUMI, T.; KENTARO, T.; HANAKO, I.; MIDORI, A.A.; MASAMI, I. Chromomycins A<sub>2</sub> and A<sub>3</sub> from Marine Actinomycetes with TRAIL Resistance-Overcoming and Wnt Signal Inhibitory Activities. **Marine Drugs**, v. 12, n. 6, p. 3466–3476, 2014.

KIERSZENBAUM, A.L.; TRES, L.L. Histologia e Biologia Celular: uma introdução à patologia. **Elsevier**, Rio de Janeiro, p. 157-188, 2016.

KILIC, S.; YUKSEL, B.; LORTLAR, N.; SERTYEL, S.; AKSU, T.; BATIOGLU, S. Environmental tobacco smoke exposure during intrauterine period promotes granulosa cell apoptosis: a prospective, randomized study. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 25, n. 10, p. 1904-1908, 2012.

KLANDORF, H.; VAN DYKE, K. Oxidative and nitrosative stresses: their role in health and disease in man and birds. **Chapter**, 2012.

LLARENA, N.C.; ESTEVEZ, S.L.; TUCKER, S.L.; JERUSS, J.S. Impact of fertility concerns on tamoxifen initiation and persistence. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 10, p. djv202, 2015.

LEBON, C.; RODRIGUEZ, G.V.; EL ZAOUI, I.; JAADANE, I.; BEHAR-COHEN, F.; TORRIGLIA, A. On the use of an appropriate TdT-mediated dUTP–biotin nick end labeling assay to identify apoptotic cells. **Analytical biochemistry**, v. 480, p. 37-41, 2015.

LECLUYSE, E.L.; BULLOCK, P.L.; PARKINSON, A. Strategies for restoration and maintenance of normal hepatic structure and function in long-term cultures of rat hepatocytes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 22, n. 1-2, p. 133-186, 1996.

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

LI, D *et al.* Dynamic transcriptome and chromatin architecture in granulosa cells during chicken folliculogenesis. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 131, 2022.

LICHOTA, A.; GWOZDZINSKI, K. Anticancer activity of natural compounds from plant and marine environment. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, p. 3533, 2018.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOMBÓ, F.; MENÉNDEZ, N.; SALAS, J.A.; MÉNDEZ, C. The aureolic acid family of antitumor compounds: structure, mode of action, biosynthesis, and novel derivatives. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 73, p. 1-14, 2006.

LUO, Y.; CHEB, M.; LIUC, C.; LIUA, H.; FUD, X.; HOUA, Y. Toxicity and related mechanisms of dihydroartemisinin on porcine oocyte maturation *in vitro*. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 341, p. 8–15, 2018.

MAGOFFIN, D.A. Ovarian theca cell. **The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, n. 7, p. 1344-1349, 2005.

MARTELLI, A *et al.* Insights into Ovarian Follicle Angiogenesis: Morphological and Chronological Vascular Remodeling from Primordial to Ovulating Follicles. **SM Vascular Medicine**, v. 2, n.1, 2017.

MASCIANGELO, R *et al.* Role of the PI3K and Hippo pathways in follicle activation after grafting of human ovarian tissue. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 37, p. 101-108, 2020.

MATZUK, M.M *et al.* Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. **Science**, v. 296, n. 5576, p. 2178-2180, 2002.

MAURI, D *et al.* Chemotherapy associated ovarian failure. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, p. 572388, 2020.

MELO, R.M.; MARTINS, Y.S.; LUZ, R.K.; RIZZO, E.; BAZZOLI, N. PCNA and apoptosis during post-spawning ovarian remodeling in the teleost *Oreochromis niloticus*. **Tissue and Cell**, v. 47, n. 6, p. 541-549, 2015.

MIRZAYANS, R.; MURRAY, D. Do TUNEL and other apoptosis assays detect cell death in preclinical studies? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 23, p. 9090, 2020.

MORGAN S.; LOPES, F.; GOURLEY, C.; ANDERSON R.A.; SPEARS, N. Cisplatin and doxorubicin induce distinct mechanisms of ovarian follicle loss; imatinib provides selective protection only against cisplatin. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e70117, 2013.

MURASE, H.; NOGUCHI, T.; SASAKI, S. Evaluation of simultaneous binding of Chromomycin A3 to the multiple sites of DNA by the new restriction enzyme assay. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 28, n. 10, p. 1832-1835.

ÑAUPAS, L.V.S *et al.* Alpha lipoic acid supplementation improves ovarian tissue vitrification outcome: an alternative to preserve the ovarian function of Morada Nova Ewe. **Reproductive Sciences**, v. 28, n. 11, p. 3109-3122, 2021.

OHNISHI, S.; TAKEDA, H. Herbal medicines for the treatment of cancer chemotherapy-induced side effects. **Frontiers in pharmacology**, v. 6, p. 14, 2015.

OKTEM, O.; OKTAY, K. Quantitative assessment of the impact of chemotherapy on ovarian follicle reserve and stromal function. **Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society**, v. 110, n. 10, p. 2222-2229, 2007.

OKTEM, O.; KIM, S.S.; SELEK, U.; SCHATMANN, G.; URMAN, B. Ovarian and Uterine Functions in Female Survivors of Childhood Cancers. **The oncologist**, v. 23, n. 2, p. 214–224, 2018.

PALOMINO, G.J.Q *et al.* Induced-damages on preantral follicles by withanolide D, a potent chemotherapy candidate are not attenuated by melatonin. **Reproductive Toxicology**, v. 104, p. 125-133, 2021.

PARK, S.U.; WALSH, L.; BERKOWITZ, K.M. Mechanisms of ovarian aging. **Reproduction**, v. 162, n. 2, p. R19-R33, 2021.

PETTIT, G.R.; TAN, R.; PETTIT, R.K.; DOUBEK, D.L.; CHAPUIS, J.C.; WEBER, C.A. Isolation and structure of chromomycin A<sub>5</sub> from a Beaufort Sea microorganism. **RSC Advances**, v. 5, n. 12, p. 9116-9122, 2015.

PIEME, C.A *et al.* Antiproliferative activity and induction of apoptosis by *Annona muricata* (Annonaceae) extract on human cancer cells. **BMC Complementary And Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, p. 1-10, 2014.

PINTO, F.C.L *et al.* Dextrorotatory Chromomycins from the Marine *Streptomyces sp.* Associated to *Palythoa caribaeorum*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 1, p. 143-152, 2020.

REDDI, A.H. Bone morphogenetic proteins: an unconventional approach to isolation of first mammalian morphogens. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 8, n. 1, p. 11-20, 1997.

RIVANKAR, S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. **Journal of cancer research and therapeutics**, v. 10, n. 4, p. 853-858, 2014.

ROSSELLO, M.; ADELL, T. TUNEL Staining in Sections of Paraffin-Enabled Planarians. In: *Schmidtea Mediterranea: Methods and Protocols*. **New York, NY: Springer US**, 2023. p. 245-251.

SA, N *et al.* Anethole supplementation during oocyte maturation improves *in vitro* production of bovine embryos. **Reproductive Sciences**, 27, 1602-1608, 2019.

SAHM, Bianca Del B. *et al.* Targeting the oncogenic TBX2 transcription factor with chromomycins. **Frontiers in chemistry**, v. 8, p. 110, 2020.

SALMONOWICZ, H.; PASSOS, J.F. Detecting senescence: a new method for an old pigment. **Aging Cell**, v. 16, n. 3, p. 432-434, 2017.

SÁNCHEZ, F.; SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 12, p. 1896-1912, 2012.

SCHEFFER, G.J *et al.* The number of antral follicles in normal women with proven fertility is the best reflection of reproductive age. **Human Reproduction**, v. 18, n. 4, p. 700-706, 2003.

SCHMIDT, D *et al.* The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. **Development**, v. 131, n. 4, p. 933-942, 2004.

SHEN, J *et al.* Protective effect of moxibustion preconditioning in rats with premature ovarian insufficiency. **Zhen ci yan jiu= Acupuncture Research**, v. 48, n. 3, p. 267-273, 2023.

SIEGEL, R.L.; MILLER, K.D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2020. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 70, n. 1, p. 7-30, 2020.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology: Translation and Integration**, v. 82, n. 2, p. 291-295, 1997.

SILVA, G.M.; ARAÚJO, V.R.; DUARTE, A.B.G.; CHAVES, R.N.; SILVA, C.M.G., LOBO, C. H.; *et al.* Ascorbic acid improves the survival and *in vitro* growth of isolated caprine preantral follicles. **Anim Reprod**, v. 8, n. 1, 14-24, 2011.

SILVA, I.P *et al.* *In vitro* exposure of sheep ovarian tissue to the xenoestrogens zearalenone and enterolactone: Effects on preantral follicles. **Theriogenology**, v. 174, p. 124-130, 2021.

SILVA, S.R.L *et al.* Protective effect of gallic acid on doxorubicin-induced ovarian toxicity in mouse. **Reproductive Toxicology**, v. 115, p. 147-156, 2023.

SONIGO, C.; BEAU, I.; GRYNBERG, M.; BINART, N. AMH prevents primordial ovarian follicle loss and fertility alteration in cyclophosphamide-treated mice. **The FASEB Journal**, v. 33, n. 1, p. 1278-1287, 2019.

SPEARS, N.; LOPES, F.; STEFANSDOTTIR, A.; ROSSI, V.; DE FELICI, M.; ANDERSON R.A.; KLINGER, F.G. Ovarian damage from chemotherapy and current approaches to its protection. **Human Reproduction Update**, v. 25, n. 6, p. 673-693, 2019.

SPEARS, N *et al.* Ovarian damage from chemotherapy and current approaches to its protection. **Human reproduction update**, v. 25, n. 6, p. 673-693, 2019.

STRINGER, J.M.; ALESI, L.R.; WINSHIP, A.L.; HUTT, K.J. Beyond apoptosis: evidence of other regulated cell death pathways in the ovary throughout development and life. **Human Reproduction Update**, p. dmad005, 2023.

SUKSWAI, N.; KHOURY, J.D Immunohistochemistry innovations for diagnosis and tissue-based biomarker detection. **Current hematologic malignancy reports**, v. 14, p. 368-375, 2019.

SUN, Y.; LIU, Y.; MA, X.; HU, H. The influence of cell cycle regulation on chemotherapy. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 22, n. 13, p. 6923, 2021.

SUNG, H *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.

TAL, R.; SEIFER, D.B. Ovarian reserve testing: a user's guide. **American Journal Of Obstetrics And Gynecology**, v. 217, n. 2, p. 129-140, 2017.

TAKAHASHI, Y.; OMURA, S. Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds. **The Journal Of General And Applied Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 141-154, 2003.

TETKOVA, A.; SUSOR, A.; KUBELKA, M.; NEMCOVA, L.; JANSOVA, D.; DVORAN, M.; DEL LLANO, E.; HOLUBCOVA, Z.; KALOUS, J. Follicle-stimulating hormone administration affects amino acid metabolism in mammalian oocytes. **Biology Of Reproduction**, v. 101, n. 4, p. 719-732, 2019.

TORINO, F *et al.* Chemotherapy-induced ovarian toxicity in patients affected by endocrine-responsive early breast cancer. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 89, n. 1, p. 27-42, 2014.

UDA, M *et al.* Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. **Human Molecular Genetics**, v. 13, n. 11, p. 1171-1181, 2004.

VAN WOUDEBERG, A.B.; GROLLERS-MULDERIJ, M.; SNEL, C.; JEURISSEN, N.; STIERUM, R.; WOLTERBEEK, A. The bovine oocyte *in vitro* maturation model: a potential tool for reproductive toxicology screening. **Reproductive Toxicology**, v. 34, n. 2, p. 251–260, 2012.

VATANPARAST, M.; KARIMI ZARCHI, M.; NABI, A.; ALI KHALILI, M. Proliferating cell nuclear antigen presentation, as a marker of folliculogenesis, in the transplanted ovarian tissue. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 47, n. 12, p. 4340-4349, 2021.

VLIEGHE, H.; LEONEL, E.C.; ASIABI, P.; AMORIM, C.A. The characterization and therapeutic applications of ovarian theca cells: An update. **Life sciences**, v. 317, p. 121479, 2023.

WANG, Y *et al.* Doxorubicin obliterates mouse ovarian reserve through both primordial follicle atresia and overactivation. **Toxicology And Applied Pharmacology**, v. 381, p. 114714, 2019.

WIGGLESWORTH, K.; LEE K.B.; EMORI, C.; SUGIURA K.; EPPIG, J.J. Transcriptomic diversification of developing cumulus and mural granulosa cells in mouse ovarian follicles. **Biology of reproduction**, v. 92, n. 1, p. 23, 1-14, 2015.

WILKE, D.V *et al.* Anticancer Potential of Compounds from the Brazilian Blue Amazon. **Planta Med**, 2020.

WINSHIP, A.L.; STRINGER, J.M.; LIEW S.H.; HUTT K.J. The importance of DNA repair for maintaining oocyte quality in response to anti-cancer treatments, environmental toxins and maternal ageing. **Human Reproduction Update**, v. 24, n. 2, p. 119-134, 2018.

XIA, Y.; ZHANG, H.Y.; MA, S.; ZHOU, F. Age-related Changes in Humanin Expression in the Ovarian Tissue of Rat. **Current Medical Science**, v. 43, n. 3, p. 579-584, 2023.

XIAO, S.; ZHANG, J.; LIU, M.; IWAHATA, H.; ROGERS, H.B.; WOODRUFF, T.K. Doxorubicin has dose-dependent toxicity on mouse ovarian follicle development, hormone secretion, and oocyte maturation. **Toxicological Sciences**, v. 157, n. 2, p. 320-329, 2017.

XING, F *et al.* Protective Effect and Mechanism of Melatonin on Cisplatin-Induced Ovarian Damage in Mice. **Journal of Clinical Medicine**, v. 11, n. 24, p. 7383, 2022.

XU, Z *et al.* The Role of Cellular Senescence in Cyclophosphamide-Induced Primary Ovarian Insufficiency. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 24, p. 17193, 2023.

YOSEF, R *et al.* Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. **Nature communications**, v. 7, n. 1, p. 11190, 2016.

ZHANG, S *et al.* Post-Translational Modifications of PCNA in Control of DNA Synthesis and DNA Damage Tolerance-the Implications in Carcinogenesis. **International Journal of Biological Sciences**, v. 17, n. 14, p. 4047, 2021.

ZHAO, P *et al.* Chemotherapy-induced ovarian damage and protective strategies. **Human Fertility**, v. 26, n. 4, p. 887-900, 2023.

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

ZIHLIF, M.; CATCHPOOLE, D.R.; STEWART B.W.; WAKELIN L.P. Effects of DNA minor groove binding agents on global gene expression. **Cancer Genomics & Proteomics**, v. 7, n. 6, p. 323-330, 2010.