



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ERNANDO IGO TEIXEIRA DE ASSIS

**EFEITOS PROTETORES *IN VITRO* E *IN VIVO* DA *ALOE VERA* CONTRA DANOS
OVARIANOS INDUZIDOS POR DOXORRUBICINA EM CAMUNDONGOS
FÊMEAS**

FORTALEZA

2025

ERNANDO IGO TEIXEIRA DE ASSIS

EFEITOS PROTETORES *IN VITRO* E *IN VIVO* DA *ALOE VERA* CONTRA DANOS
OVARIANOS INDUZIDOS POR DOXORRUBICINA EM CAMUNDONGOS FÊMEAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – RENORBIO da Universidade Federal do Ceará (UFC), como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia em Agropecuária.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Viana Silva.

FORTALEZA

2025

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

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

A865e Assis, Ernando Igo Teixeira de.
Efeitos protetores in vitro e in vivo da Aloe vera contra danos ovarianos induzidos por doxorubicina em camundongos fêmeas / Ernando Igo Teixeira de Assis. – 2025.
158 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Rede Nordeste de Biotecnologia), Fortaleza, 2025.
Orientação: Prof. Dr. José Roberto Viana Silva.

1. Doxorubicina. 2. Ovário. 3. Fertilidade. 4. Camundongos. 5. Aloe vera. I. Título.

CDD 660.6

ERNANDO IGO TEIXEIRA DE ASSIS

EFEITOS PROTETORES *IN VITRO* E *IN VIVO* DA *ALOE VERA* CONTRA DANOS
OVARIANOS INDUZIDOS POR DOXORRUBICINA EM CAMUNDONGOS FÊMEAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – RENORBIO da Universidade Federal do Ceará (UFC), como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia em Agropecuária.

Aprovado em: 29 / 07 / 2025.

BANCA EXAMINADORA

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

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

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

Prof.^a Dra. Alexsandra Fernandes Pereira (Examinadora)
Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA)

Prof.^a Dra. Maria Helena Tavares de Matos (Examinadora)
Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF)

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus pela dádiva da vida, pelas inúmeras bênçãos concedidas e pelas oportunidades de evolução que me foram proporcionadas. Obrigado, Senhor, por colocar em meu caminho pessoas maravilhosas e inestimáveis, que contribuíram para meu crescimento pessoal e acadêmico.

Agradeço aos meus amados pais, Maria Antonia Teixeira de Assis e José Gerardo de Assis, por representarem meus maiores exemplos de força, coragem, altruísmo e superação, sendo meus pilares e os principais responsáveis por me impulsionar na busca pelo sucesso. Sinto-me imensamente privilegiado por ter pais tão especiais, que, com amor incondicional, tantas vezes colocaram meus sonhos acima dos próprios, renunciando aos seus para que eu pudesse seguir os meus caminhos. Às minhas irmãs, Erlandia Teixeira, Eterlandia Teixeira e Evilandia Teixeira, agradeço pelo amor, pelo carinho constante e pela compreensão nos momentos mais difíceis. Estendo minha gratidão a toda a minha família, que sempre esteve presente com apoio e afeto.

Ao meu orientador, Professor Prof. Dr. José Roberto Viana Silva, expresso minha profunda gratidão por todo o conhecimento compartilhado, pela paciência e dedicação. Agradeço sinceramente por acreditar no meu trabalho e no meu potencial, e por todas as oportunidades que me foram concedidas ao longo desses anos. Foi uma honra tê-lo como referência e guia nesta trajetória.

Ao Prof. Dr. Anderson Weiny Barbalho Silva, meu grande exemplo, agradeço profundamente por todos os ensinamentos que ultrapassaram os limites do conteúdo acadêmico, trazendo aprendizados valiosos também para a vida. Não há palavras que expressem plenamente minha gratidão por tê-lo como coorientador. Sou imensamente grato pelas oportunidades concedidas, pelos ensinamentos que contribuíram para minha formação profissional e por todo o tempo dedicado a mim ao longo da iniciação científica, mestrado e doutorado. O seu entusiasmo, apoio constante e amizade tornaram essa trajetória mais leve e significativa, e foram fundamentais para que eu conseguisse chegar até aqui. Obrigado por acreditar em mim, e por ter tornado possível a realização de um grande sonho.

Às professoras Dra. Alana Nogueira Godinho e Dra. Jordania Marques de Oliveira Freire, deixo meu muito obrigado por todo apoio, incentivo e dedicação que recebi ao longo desses anos. Desde que cheguei ao Núcleo de Pesquisa em Experimentação Animal (NUPEX), fui acolhido com muita generosidade e carinho, e isso fez toda a diferença para transformar meu sonho em algo real. A compreensão, o cuidado e a paciência de vocês estiveram presentes em

cada passo da caminhada, e são ensinamentos que vou levar comigo para sempre. Vocês não foram só professoras, mas também exemplos e motivação diária. Sou muito grato por tudo que fizeram por mim e por acreditarem no meu potencial. Muito obrigado por tudo!

Aos queridos amigos que o laboratório me presenteou, Venância Azevedo, Danisvânia Ripardo, Pedro Alves e Erlandia Vasconcelos, agradeço por estarem sempre ao meu lado, dispostos a ajudar e a me incentivar nos momentos difíceis. Muito obrigado por me acolherem com tanta amizade e carinho ao longo dessa caminhada.

A todos os integrantes do Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia da Reprodução (LABIREP) e NUPEX, agradeço profundamente pela colaboração, pelo apoio direto e indireto, e pelo constante compartilhamento de ideias, experiências e aprendizados. Este trabalho só foi possível graças à contribuição de cada um de vocês. Minha sincera e imensa gratidão.

Às parcerias externas, em especial à Prof.^a Dra. Maria Helena Tavares de Matos e à Prof.^a Dra. Alane Pains Oliveira do Monte, do grupo de pesquisa Biotecnologia Aplicada ao Desenvolvimento de Folículos Ovarianos (BIOFOV) da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), pela colaboração e valiosas contribuições para este trabalho.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), pela valiosa oportunidade de ensino, aprendizado e crescimento acadêmico.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pelo apoio financeiro às pesquisas, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos durante o doutorado, ambos fundamentais para a concretização das minhas atividades de pesquisa.

Expresso minha gratidão à banca examinadora pela pronta aceitação do convite e, sobretudo, pela significativa contribuição para o aprimoramento desta tese.

Agradeço também a todos os funcionários da UFC, pelo zelo e dedicação ao funcionamento da Universidade. Estendo minha gratidão a todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigado!

Aos animais utilizados nesta pesquisa, parte essencial do estudo, meu reconhecimento pela valiosa contribuição à ciência.

*“A vida é fruto da decisão de cada momento.
Talvez seja por isso, que a idéia de plantio seja
tão reveladora sobre a arte de viver.
Viver é plantar. É atitude de constante
semeadura, de deixar cair na terra de nossa
existência as mais diversas formas de
sementes...”*

(Padre Fábio de Melo)

RESUMO

A doxorubicina (DOX) é utilizada para tratar vários tipos de cânceres, mas causa toxicidade nos ovários pelo aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), causando estresse oxidativo e uma resposta inflamatória exacerbada. Assim, o uso de compostos naturais com propriedades antioxidantes e anti-inflamatória contra os efeitos colaterais tóxicos induzidos por drogas antineoplásicas tem se destacado. Este estudo visou investigar a ação do extrato de *Aloe vera* contra os efeitos deletérios da DOX na sobrevivência e crescimento folicular em camundongos fêmeas. Para tanto, foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas com ciclo estral regular nas fases 1 e 2. Para a fase 1, os animais (n= 37) tiveram seus ovários coletados e cultivados individualmente em placa de 24 poços a 37,5° C, em 5% CO₂, por 6 dias. Os ovários foram cultivados em DMEM⁺ sozinho; em meio suplementado com DOX (0,3 µg/mL); ou neste caso em DMEM⁺ suplementado com DOX (0,3 µg/mL) combinado com *Aloe vera* (5%, 10%, 25% ou 50%). Após o cultivo, os ovários foram fixados para análise. Na fase 2, os animais (n = 24) foram divididos em seis grupos (8 por grupo): controle positivo (NAC+DOX), que recebeu pré-tratamento com N-acetilcisteína por via oral (VO) e, 1 hora depois, dose única intraperitoneal (IP) de DOX; controle negativo (SAL+DOX), com pré-tratamento VO de solução salina seguido, após 1 hora, de DOX (IP); três grupos pré-tratados com extrato de *Aloe vera* (0,1, 1,0 ou 10,0 mg/kg, VO) e, 1 hora depois, submetidos a dose de DOX (IP) (AV0,1+DOX, AV1,0+DOX e AV10,0+DOX); e controle (SAL+SAL), que recebeu solução salina por VO e IP. A DOX foi administrada em dose única e a administração de *Aloe vera* ocorreu em três dias consecutivos; 24 horas após a última aplicação (no quarto dia), os ovários foram coletados, com isso, e o experimento teve duração de quatro dias. Os ovários coletados nas fases 1 e 2 foram destinados para análise histológica (morfologia, crescimento, ativação, configuração da matriz extracelular (MEC) e densidade do estroma), imunohistoquímica (TNF- α) e avaliação dos níveis de mRNA para superóxido dismutase (*SOD*), catalase (*CAT*), fator nuclear-eritroide 2 relacionado ao fator 2 (*NRF2*) e fator de necrose tumoral- α (*TNF- α*) por PCR em tempo real. A análise estatística foi realizada com o programa *GraphPad Prism* e as diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. Os resultados da fase 1 mostraram que os ovários cultivados apenas com DOX apresentaram redução na porcentagem de folículos normais e na densidade de células estromais. Entretanto, a adição de extrato de *Aloe vera* ao meio não apenas atenuou esses danos estruturais, mas também aumentou a deposição de colágeno. Além disso, os ovários cultivados com DOX e *Aloe vera* (10 e 25%) apresentaram redução na imunocoloração de TNF- α e aumento na expressão

de mRNA para enzimas antioxidantes (*SOD*, *CAT* e *NRF2*). Já os resultados da fase 2 mostraram que 0,1 e 1,0 mg/kg de *Aloe vera* preservaram tanto os folículos ovarianos quanto a densidade estromal frente aos danos induzidos pela DOX. Além disso, 0,1 e 1,0 mg/kg de *Aloe vera* reduziram a imunomarcção de TNF- α e aumentaram a porcentagem de fibras de colágeno. Ademais, a dose de 1,0 mg/kg de *Aloe vera* aumentou a expressão de mRNA para enzimas antioxidantes (*SOD*, *CAT* e *NRF2*), enquanto 0,1 mg/kg de *Aloe vera* manteve esses níveis de expressão semelhantes ao grupo salina. Em conclusão, os resultados obtidos indicam que o extrato de *Aloe vera*, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, demonstrou efeito protetor nos ovários de camundongos fêmeas contra os danos induzidos pela DOX. Esse efeito foi evidenciado pelo aumento da resposta antioxidante, redução da inflamação, preservação do estroma e manutenção da morfologia folicular.

Palavras-chave: doxorubicina; ovário; fertilidade; camundongos; *Aloe vera*.

ABSTRACT

Doxorubicin (DOX) is used to treat several types of cancer, but it causes ovarian toxicity by increasing the formation of reactive oxygen species (ROS), causing oxidative stress and an exacerbated inflammatory response. Thus, the use of natural compounds with antioxidant and anti-inflammatory properties against the toxic side effects induced by antineoplastic drugs has been highlighted. This study aimed to investigate the action of *Aloe vera* extract against the deleterious effects of DOX on follicular survival and growth in female mice. For this purpose, female *Swiss* mice with a regular estrous cycle in phases 1 and 2 were used. For phase 1 the animals ($n = 37$) had their ovaries collected and cultured individually in a 24-well plate at 37.5° C, in 5% CO₂, for 6 days. The ovaries were cultured in DMEM+ alone; in medium supplemented with DOX (0.3 µg/mL); or in this case in DMEM+ supplemented with DOX (0.3 µg/mL) combined with *Aloe vera* (5%, 10%, 25% or 50%). After culture, the ovaries were collected and fixed for analysis. In phase 2, the animals ($n = 48$) were divided into six groups (8 per group): positive control (NAC+DOX), which received pretreatment with N-acetylcysteine orally (PO) and, 1 hour later, a single intraperitoneal (IP) dose of DOX; negative control (SAL+DOX), with PO pretreatment with saline followed, 1 hour later, by DOX (IP); three groups pretreated with *Aloe vera* extract (0.1, 1.0 or 10.0 mg/kg, PO) and, 1 hour later, subjected to a dose of DOX (IP) (AV0.1+DOX, AV1.0+DOX and AV10.0+DOX); and control (SAL+SAL), which received saline solution by PO and IP. DOX was administered in a single dose and *Aloe vera* was administered on three consecutive days; 24 hours after the last application (on the fourth day), the ovaries were collected, thus, the experiment lasted four days. The ovaries collected in phases 1 and 2 were intended for histological analysis (morphology, growth, activation, extracellular matrix (ECM) configuration and stromal density), immunohistochemistry (TNF- α) and evaluation of mRNA levels for superoxide dismutase (*SOD*), catalase (*CAT*), nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (*NRF2*) and tumor necrosis factor- α (*TNF- α*) by real-time PCR. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism and differences were considered significant when $P < 0.05$. Phase 1 results showed that ovaries cultured with DOX alone showed a reduction in the percentage of normal follicles and in the density of stromal cells. However, the addition of *Aloe vera* extract to the medium not only attenuated these structural damages but also increased collagen deposition. Furthermore, ovaries cultured with DOX and *Aloe vera* (10 and 25%) showed a reduction in TNF- α immunostaining and an increase in mRNA expression for antioxidant enzymes (*SOD*, *CAT* and *NRF2*). The results of phase 2 showed that 0.1 and 1.0 mg/kg of *Aloe vera* preserved both

ovarian follicles and stromal density against DOX-induced damage. In addition, 0.1 and 1.0 mg/kg of *Aloe vera* reduced TNF- α immunostaining and increased the percentage of collagen fibers. Furthermore, the 1.0 mg/kg dose of *Aloe vera* increased the mRNA expression for antioxidant enzymes (*SOD*, *CAT* and *NRF2*), while 0.1 mg/kg of *Aloe vera* maintained these expression levels similar to the saline group. In conclusion, the results obtained indicate that *Aloe vera* extract, both in vitro and in vivo, demonstrated a protective effect on the ovaries of female mice against damage induced by DOX. This effect was evidenced by increased antioxidant response, reduced inflammation, preservation of the stroma and maintenance of follicular morphology.

Keywords: doxorubicin; ovary; fertility; mice; *Aloe vera*.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 –	Representação esquemática do ovário de mamíferos, destacando as principais estruturas e estágios do desenvolvimento folicular.....	21
Figura 2 –	Representação do estroma ovariano evidenciando tecido com morfologia preservada e alterada, além de suas funções estruturais e secretoras para a manutenção do ambiente folicular.....	23
Figura 3 –	Esquema ilustrativo da foliculogênese e das fases de desenvolvimento folicular.....	26
Figura 4 –	A catepsina L promove a ativação de folículos primordiais próximos ao folículo ovulatório por meio da degradação da matriz extracelular e regulação da dinâmica nuclear e expressão de FOXO3a.....	27
Figura 5 –	Esquema ilustrando a ativação do folículo primordial e as principais vias envolvidas. A via PI3K-AKT, ativada por KIT Ligand (KL), promove o crescimento do ovócito e a inativação do Foxo3a, permitindo a saída da dormência.....	28
Figura 6 –	Ilustração do desenvolvimento folicular desde o estágio embrionário até o período reprodutivo, destacando a formação, maturação, atresia e ovulação dos folículos, bem como a depleção da reserva ovariana ao longo do tempo..	31
Figura 7 –	Esquema dos principais mecanismos pelos quais a quimioterapia promove dano ovariano e depleção da reserva folicular.....	34
Figura 8 –	Localização e mecanismos dos efeitos gonadotóxicos de agentes quimioterápicos.....	35
Figura 9 –	Estruturas de diferentes drogas antraciclina. Diferenças estruturais comparadas com a doxorubicina são indicadas em vermelho.....	40
Figura 10 –	Indução de dano ao DNA após tratamento de células com doxorubicina. (A) Indução de dano ao DNA após tratamento de células com doxorubicina. (B) Ativação da via de resposta a dano ao DNA. (C) Indução de apoptose ou parada do ciclo celular por doxorubicina.....	41
Figura 11 –	Representação esquemática dos mecanismos pelos quais a doxorubicina induz estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e morte celular, impactando vias antioxidantes e de sobrevivência celular. ABCB8 –	

membro 8 da subfamília B do cassete de ligação ao ATP; AMPK – proteína quinase ativada por AMP; BNIP-3 – proteína 3 interativa com proteína BCL2 de 19 kD; Cyt C – citocromo C; CTE – cadeia de transporte de elétrons; Gli – glicose; HO-1 – heme oxigenase 1; KEAP – proteína associada à ECH semelhante a Kelch; mPTP – poro de transição de permeabilidade mitocondrial; PGC-1 α – coativador 1 alfa do PPAR γ ; PPAR – receptor ativado por proliferador de peroxissomo; EROS – espécies reativas de oxigênio; SIRT1 – sirtuína 1; TCTP – proteína tumoral controlada translacionalmente; TOP1mt – topoisomerase mitocondrial 1..... 42

Figura 12 –	Efeitos dos danos causados por antineoplásicos no ovário: perda de folículos primordiais por apoptose, ativação acelerada de folículos primordiais, atresia folicular, inflamação estromal, dano ao tecido estromal ou dano à vascularização intraovariana. FPM: folículos primordiais; FP: folículos primários; FS: folículos secundários.....	45
Figura 13 –	Toxicidade celular ovariana causada pela doxorrubicina.....	47
Figura 14 –	<i>Aloe vera</i> cultivada diretamente no solo.....	49

CAPÍTULO I

Figura 1 –	PRISMA 2020 flow diagram for systematic reviews.....	65
------------	--	----

CAPÍTULO II

Figura 1 –	Percentage of normal follicles in uncultured ovaries (D0) and in ovaries cultured in control medium (DMEM ⁺) alone or supplemented with DOX (0.3 μ g/ml), <i>Aloe vera</i> (AV) 5% + DOX, AV 10% + DOX, AV 25% + DOX, and AV 50% + DOX. a, b, and c indicate statistically significant differences between treatments (P < 0.05).....	110
Figura 2 –	Representative images of ovarian sections from female mice cultured in vitro for 6 days showing morphologically normal (A-C) and degenerated (D-F) follicles of different developmental stages stained with hematoxylin and eosin. (A) Normal and (D) degenerated primordial follicle; (B) Normal and (E) degenerated primary follicle; (C) Normal and (F) degenerated secondary follicle. Granulosa cells (GC); Oocyte (O); Oocyte nucleus (N). (400x - Scale bar: 100 μ m).....	110

Figura 3 –	Percentage of primordial (a) and developing (b) follicles in uncultured (D0) and cultured ovaries in control medium (DMEM ⁺) alone or supplemented with DOX (0.3 µg/ml), AV 5% + DOX, AV 10% + DOX, AV 25% + DOX and AV 50% + DOX. a, b and c indicate statistically significant differences between treatments (P < 0.05).....	111
Figura 4 –	Collagen levels (mean ± SD) in the ovaries of mice before or after culture in DMEM ⁺ alone or supplemented with DOX (0.3 µg/ml), AV 5% + DOX, AV 10% + DOX, AV 25% + DOX and AV 50% + DOX. a, b and c indicate statistically significant differences between treatments (P < 0.05).....	111
Figura 5 –	Representative images of collagen fibers labeled by Picrosirius red. (A) D0; (B) DMEM ⁺ ; (C) DOX; (D) AV5% + DOX; (E) AV10% + DOX; (F) AV25% + DOX; (G) AV50% + DOX. (Magnification:400x).....	112
Figura 6 –	Stromal cell density of ovarian tissue after culture in DMEM ⁺ alone or supplemented with DOX (0.3 µg/ml), AV 5% + DOX, AV 10% + DOX, AV 25% + DOX and AV 50% + DOX.....	112
Figura 7 –	Representative images of ovarian stromal density after 6 days of culture. (A) Non cultured control; (B) DMEM ⁺ ; (C) DOX; (D) AV 5% + DOX; (E) AV 10% + DOX; (F) AV 25% + DOX; (G) AV 50% + DOX. (Magnification:400x).....	113
Figura 8 –	Immunohistochemical staining for <i>TNF-α</i> in mice ovaries cultured <i>in vitro</i> for 6 days in the presence or absence of AV or DOX: (A) negative control; (B) fresh control; (c) DMEM ⁺ alone or supplemented with (d) DOX (0.3 µg/ml), (e) AV10% + DOX and (f) AV25% + DOX. (Magnification:400x)	113
Figura 9 –	mRNA levels for <i>TNF-α</i> (A), <i>NRF2</i> (B), <i>SOD</i> (C) and <i>CAT</i> (D) in ovaries after 6 days culture in the control medium (DMEM ⁺) alone or supplemented with DOX (0.3 µg/ml), AV10% + DOX and AV25% + DOX. a and b indicate significant difference between treatments (P < 0.05).....	114

CAPÍTULO III

Figura 1 –	Percentage of normal follicles in ovaries of mice treated with doxorubicin (DOX), saline (SAL), N-acetylcysteine (NAC), and <i>Aloe vera</i> (AV) (0.1, 1.0, or 10.0 mg/kg). Different letters indicate significant differences between treatments (P < 0.05; ANOVA).....	130
------------	---	-----

Figura 2 –	Morphologically normal and degenerated primordial (A, E), primary (B, F), secondary follicles (C, G) and tertiary follicles (D, H), respectively. Granulosa cells (GC); Oocyte (O); Oocyte nucleus (N). Arrows indicate follicles. Scale bar: 100 μ m.....	130
Figura 3 –	Percentage of normal follicles per category in ovaries of mice treated with doxorubicin (DOX), saline (SAL), N-acetylcysteine (NAC), and Aloe vera (AV) (0.1, 1.0, or 10.0 mg/kg). Different letters indicate significant differences between treatments ($P<0.05$; ANOVA).....	131
Figura 4 –	A , Collagen levels (means $\pm$ SEM) in the ovaries of mice treated with doxorubicin (DOX), saline (SAL), N-acetylcysteine (NAC), and <i>Aloe vera</i> (AV) (0.1, 1.0, or 10.0 mg/kg). Different letters indicate significant differences between treatments ($P<0.05$; ANOVA). B , Collagen fibers (arrows) labeled by Picrossirius red. a , NAC+DOX; b , SAL+DOX; c , <i>Aloe vera</i> 0.1+DOX; d , <i>Aloe vera</i> 1.0+DOX; e , <i>Aloe vera</i> 10.0+DOX; f , SAL+SAL. Scale bar: 100 μ m.....	131
Figura 5 –	A , Stromal cell density (means $\pm$ SEM) in ovaries of mice treated with doxorubicin (DOX), saline (SAL), N-acetylcysteine (NAC), and <i>Aloe vera</i> (AV) (0.1, 1.0, or 10.0 mg/kg). Different letters indicate significant differences between treatments ($P<0.05$; ANOVA). B , Representative images of ovarian stromal cell density in ovaries of mice. a , NAC+DOX; b , SAL+DOX; c , <i>Aloe vera</i> 0.1+DOX; d , <i>Aloe vera</i> 1.0+DOX; e , <i>Aloe vera</i> 10.0+DOX; f , SAL+SAL. Arrows indicate areas with affected stroma. Scale bar: 100 μ m.....	132
Figura 6 –	Immunohistochemical staining for TNF- α in ovaries of mice treated with doxorubicin (DOX), saline (SAL), N-acetylcysteine (NAC), <i>Aloe vera</i> (AV) (0.1, 1.0, or 10.0 mg/kg), and control groups. A , Negative control; B , NAC+DOX; C , SAL+DOX; D , <i>Aloe vera</i> 0.1+DOX; E , <i>Aloe vera</i> 1.0+DOX; F , <i>Aloe vera</i> 10.0+DOX; G , SAL+SAL. Triangles indicate absent coloration; arrows indicate weak coloration, stars indicate moderate coloration; asterisks indicate strong coloration. Scale bar: 100 μ m.....	133
Figura 7 –	mRNA levels (means $\pm$ SEM) for (A) tumor necrosis factor (TNF)- α , (B) nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2), (C) superoxide dismutase (SOD), and (D) catalase (CAT) in mice treated with doxorubicin	

(DOX), saline (SAL), N-acetylcysteine (NAC), and *Aloe vera* (0.1, 1.0, or 10.0 mg/kg). Different letters indicate significant differences between treatments ($P < 0.05$; ANOVA)..... 134

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1 -	Propriedades gonadotóxicas da Doxorubicina em estudos realizados em modelos animais. Via intraperitoneal (ip); Via intravenosa (vi).....	44
------------	--	----

CAPÍTULO I

Tabela 1 -	Characteristics of the Included Studies.	67
Tabela 2 -	Assessment of the risk of bias of the studies included in the systematic review, based on SYRCLE's Risk of Bias Tool for studies with animal models.....	69
Tabela 3 -	Properties of natural compounds used to reduce deleterious effects on ovaries..	70
Tabela 4 -	Percentage of morphologically normal ovarian follicles by group.....	73
Tabela 5 -	Count of morphologically normal ovarian follicles by group.....	75
Tabela 6 -	Percentage of normal and atretic follicles.....	77

CAPÍTULO II

Tabela 1 -	Primers pairs used for real-time PCR.....	109
Tabela 2 -	Relative intensity of immunohistochemistry staining for <i>TNF-α</i> in ovaries of mice.....	109

CAPÍTULO III

Tabela 1 -	Chemical composition of <i>Aloe vera</i> leaf extract.....	135
Tabela 2 -	Primers pairs used for real-time PCR.....	136

LISTA DE QUADROS

REVISÃO DE LITERATURA

Quadro 1 - Principais antineoplásicos e seus impactos na função ovariana.....	33
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
4EBP	Fator de Iniciação da Tradução 4E Eucariótica
ACSL4	Sintetase de Acil-CoA de Cadeia Longa Membro 4
AMPK	Proteína Quinase Ativada Por AMP
ASCO	<i>American Society Of Clinical Oncology</i>
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutante
ATP	Trifosfato de Adenosina
AV	<i>Aloe Vera</i>
BCL-2	Célula-B de Linfoma 2
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
BMP-15	Proteína Morfogenética Óssea 15
BSA	Albumina Sérica Bovina
CAT	Catalase
CDC42	Ciclo de Divisão Celular 42
CGPS	Células Germinativas Primordiais
CO ²	Gás Carbônico
COX-2	Ciclo-Oxigenase-2
CTSL	Catepsina L
DMEM	Meio de Eagle modificado de Dulbecco
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DOX	Doxorrubicina
E2	Estradiol
E-CAD	E-Caderina
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
ESMO	<i>European Society For Medical Oncology</i>
FDA	<i>Food And Drug Administration</i>
FOP	Falência Ovariana Prematura
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GDF-9	Fator de Diferenciação e Crescimento 9
GNRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
GPX	Glutathione Peroxidase

GSH	Glutathione
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HDAC6	Histona Desacetilase 6
HO-1	Heme Oxigenase-1
IGF	Fator de Crescimento Semelhante À Insulina
IL-1B	Interleucina 1 Beta
IRE1	Enzima 1 Que Requer Inositol
ITS	Insulina, Transferrina, Selênio
LH	Hormônio Luteinizante
LPCAT3	Lisofosfatidilcolina Aciltransferase 3
MEC	Matriz Extracelular
MTOR	Alvo Mamífero da Rapamicina
NAC	N-Acetilcisteína
NACL	Cloreto de Sódio
NRF2	Fator Nuclear Eritroide 2 Relacionado Ao Fator 2
O ₂	Oxigênio
OMS	Organização Mundial Da Saúde
PBS	<i>Phosphatebuffered Saline</i> (Tampão Fosfato Salino)
PKD1	Quinase 1 Dependente de Fosfoinosítídeo
PI3K	Fosfoinosítídeo 3-Quinase
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5-Bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-Trifosfato
PTEN	Fosfatase Homóloga À Tensina
RFSH	Receptores de Hormônio Folículo-Estimulante
SAL	Salina
SLC7A11	Transportador de Solutos da Família 7, Membro 11
SOD	Superóxido Dismutase
SOP	Síndrome dos Ovários Policísticos
STAR	Proteína Reguladora Aguda da Esteroidogênese
TGF- B	Fatores de Crescimento Transformante Beta
TNF-A	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TRA	Tecnologia de Reprodução Assistida
TSC1/2	Complexo da Esclerose Tuberosa

LISTA DE SÍMBOLOS

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

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1	Aspectos morfofisiológicos dos ovários	24
2.1.1	<i>Papel da matriz extracelular e do estroma na dinâmica folicular ovarian</i>	25
2.2	Oogênese e foliculogênese: aspectos fundamentais	27
2.2.1	<i>Desenvolvimento e características dos folículos ovarianos</i>	28
2.3	Regulação da população folicular e mecanismos de atresia	33
2.4	Impactos de agentes antineoplásicos na função ovariana	36
2.5	Influência do estresse oxidativo e da inflamação no ovário	38
2.6	Estudo da foliculogênese e da proteção ovariana frente à citotoxicidade por meio do cultivo folicular <i>in vitro</i>	40
2.7	Doxorrubicina e seus efeitos nos folículos ovarianos	42
2.7.1	<i>Efeitos adversos da doxorrubicina</i>	44
2.7.2	<i>Impacto da toxicidade ovariana na fertilidade e na fisiologia reprodutiva</i>	47
2.8	Estratégias para mitigar a toxicidade ovariana e preservar a fertilidade	50
2.9	Propriedades terapêuticas da <i>Aloe vera</i>	51
2.10	Relevância da preservação da função ovariana em pacientes oncológicas	54
3	JUSTIFICATIVA	57
4	HIPÓTESES CIENTÍFICAS	58
5	OBJETIVOS	59
5.1	Objetivo geral	59
5.2	Objetivos específicos	59
6	CAPÍTULO I	60
7	CAPÍTULO II	92
8	CAPÍTULO III	117
9	CONCLUSÕES GERAIS	139
10	PERSPECTIVAS	140

REFERÊNCIAS	141
--------------------------	------------

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um dos maiores desafios do século XXI, com impactos sociais, de saúde pública e econômicos expressivos. Projeções demográficas indicam que o número anual de novos casos poderá atingir 35 milhões até 2050 (Bray *et al.*, 2025). No Brasil, o câncer é um entrave crítico à saúde pública, devido ao aumento na incidência e impacto significativo na qualidade de vida da população (Oliveira; Santo, 2024). Além disso, a ocorrência de câncer em mulheres em idade fértil é uma questão de saúde importante. Em 2019, a incidência mundial de câncer em mulheres de 15 a 39 anos foi de 766.692 casos (Hernández Martínez *et al.*, 2025). Os tratamentos oncológicos têm um impacto extremamente negativo na fertilidade feminina, diminuindo ou mesmo eliminando o potencial reprodutivo dessas pacientes (Moragón *et al.*, 2021). Entretanto, com os avanços no tratamento do câncer e o aumento da sobrevida a longo prazo, um número crescente de pacientes na pré-menopausa tende a enfrentar os impactos adversos da terapia oncológica sobre a fertilidade (Roof *et al.*, 2024).

A Doxorubicina (DOX) é um antineoplásico amplamente usado no tratamento de diversos tipos de câncer (Lopes *et al.*, 2020). A ação antitumoral da DOX ocorre por sua intercalação no DNA, ligação a proteínas de replicação e transcrição, inibição da topoisomerase II e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Meinag *et al.*, 2024). Apesar de sua eficácia, a DOX não tem especificidade para células cancerígenas, afetando potencialmente células saudáveis, impactando particularmente a fertilidade feminina (Nguyen *et al.*, 2025). O aumento do estresse oxidativo e a deficiência de fatores antioxidantes desempenham papéis importantes na toxicidade induzida por DOX (Sheibani *et al.*, 2022). Recentemente, foi observado que o uso de produtos naturais possui a capacidade de proteger células contra os efeitos tóxicos da DOX. Os mecanismos subjacentes envolvem ações antioxidantes e anti-inflamatórias (Yi *et al.*, 2024; Szponar *et al.*, 2024).

Nesse contexto, estudos *in vitro* e *in vivo* que investigam o efeito de antioxidantes naturais sobre os folículos ovarianos representam uma abordagem essencial para avaliar o potencial citoprotetor de diferentes substâncias no ovário. A proposta é viabilizar a preservação da reserva e da função ovariana frente à exposição a agentes gonadotóxicos, além de aprofundar o entendimento sobre a ativação dos folículos primordiais, os mecanismos de ação envolvidos e as vias de sinalização que regulam a foliculogênese inicial, ampliando significativamente o potencial de aplicações clínicas e reprodutivas, especialmente em animais com alto valor genético e econômico (Silva *et al.*, 2023; Assis *et al.*, 2022; Lins *et al.*, 2020; Herrero *et al.*, 2023). Assim, a utilização de produtos naturais para mitigar a toxicidade provocada pela DOX

tem despertado interesse crescente, tornando-se um foco promissor de pesquisa na busca por estratégias protetoras para a função ovariana e fertilidade.

A *Aloe vera*, pertencente à família *Liliaceae*, tem composição química rica e diversificada, que inclui polissacarídeos, compostos fenólicos e outras moléculas bioativas. Além disso, suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas reforçam seu valor como um agente promissor em diferentes aplicações medicinais (Farid *et al.*, 2021; Hakeem *et al.*, 2025). Estudos *in vitro* e com modelos animais mostram que a *Aloe vera* possui um potencial significativo para atuar sobre as células ovarianas (Costa *et al.*, 2021; Azevedo *et al.*, 2022; Manouchehri *et al.*, 2023; Mathur; Choudhary; Bhatnagar, 2022). Assim, o potencial terapêutico da *Aloe vera* na fisiologia reprodutiva pode abrir novas perspectivas para sua aplicação, seja na otimização de meios de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos ou no desenvolvimento de formulações terapêuticas. Essas abordagens emergentes podem ser empregadas como estratégias de tratamento para mulheres submetidas à quimioterapia, contribuindo para a preservação da reserva ovariana e a redução dos danos decorrentes.

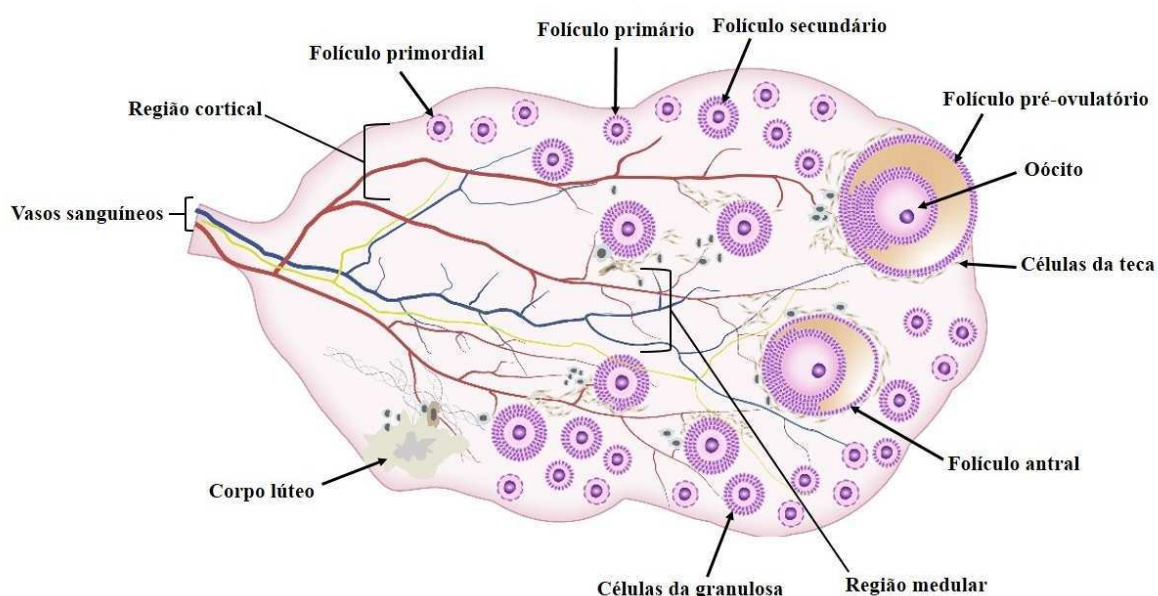
Para uma compreensão mais aprofundada da relevância desta tese, a revisão de literatura a seguir explora aspectos relacionados à morfofisiologia ovariana, os processos de oogênese e foliculogênese, o impacto dos agentes quimioterápicos na função ovariana e as abordagens experimentais no estudo da toxicidade ovariana. Além disso, discute estratégias para mitigar essa toxicidade, explora o potencial terapêutico da *Aloe vera* e destaca a importância da preservação da função ovariana em pacientes oncológicos. O presente estudo teve como objetivos gerais analisar estratégias de proteção contra danos ovarianos induzidos por quimioterapia antineoplásica, com foco em compostos naturais, e avaliar o potencial do extrato de *Aloe vera* na atenuação dos efeitos da DOX sobre a função ovariana de camundongos fêmeas, por meio de modelos *in vitro* e *in vivo*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos morfofisiológicos dos ovários

O ovário de mamíferos possui duas funções principais: a produção e liberação de oócitos maduros capazes de fertilização, e a síntese e secreção de esteroides, que são essenciais para garantir a ovulação e a gestação, e impactar as características sexuais secundárias, bem como a saúde óssea, cerebral, imunológica, cardiovascular e o metabolismo (Fletcher *et al.*, 2025; Xiao; Lai, 2025). No ovário, os folículos representam a unidade funcional básica, exercendo um papel essencial na dupla função do órgão. A Figura 1 ilustra as principais estruturas do ovário e os diferentes estágios do desenvolvimento folicular (Matsushige *et al.*, 2024).

Figura 1. Representação esquemática do ovário de mamíferos, destacando as principais estruturas e estágios do desenvolvimento folicular.



Fonte: Adaptado de Shen *et al.* (2023).

Os folículos ovarianos que consistem em células da teca e da granulosa, formam o microambiente necessário para o desenvolvimento e maturação apropriada dos oócitos. Os folículos ovarianos maduros se rompem durante a ovulação, liberando oócitos nas trompas uterinas, enquanto o restante do folículo se transforma no corpo lúteo, uma estrutura altamente vascularizada e produtora de progesterona, onde as células da granulosa e da teca originam, respectivamente, as células lúteas pequenas e grandes (Przygodzka *et al.*, 2025). Adicionalmente, o ovário contém dois tipos principais de células esteroidogênicas: células da teca, que são responsáveis pela síntese de andrógenos, e células da granulosa, que são responsáveis pela conversão de andrógenos em estrogênios e progestinas. Os hormônios

endócrinos são amplamente reconhecidos como os principais fatores que regulam o desenvolvimento ovariano, e a secreção hormonal anormal está intimamente associada à ocorrência de doenças ovarianas (Xiao *et al.*, 2025). Dessa forma, a produção de hormônios esteroides é uma função ovariana importante e, se interrompida, pode impactar a saúde reprodutiva e sistêmica (Potts *et al.*, 2025).

Nos folículos antrais, as células da granulosa constituem a principal fonte de estrogênio, hormônio sexual feminino fundamental para o controle da reprodução (Merico *et al.*, 2021). Em roedores, por exemplo, a senescência reprodutiva tem sido associada, em parte, ao envelhecimento neural, evidenciado pelo aumento dos níveis basais de hormônio luteinizante (LH), possivelmente decorrente da alteração na pulsatilidade do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e da redução da receptividade ao 17β -estradiol (E2) no hipotálamo. Embora os mecanismos subjacentes ao envelhecimento hipotalâmico não sejam totalmente compreendidos, alguns estudos apontam para uma diminuição no número de neurônios de kisspeptina e um aumento do tônus inibitório GABAérgico nos neurônios GnRH (Chester *et al.*, 2025).

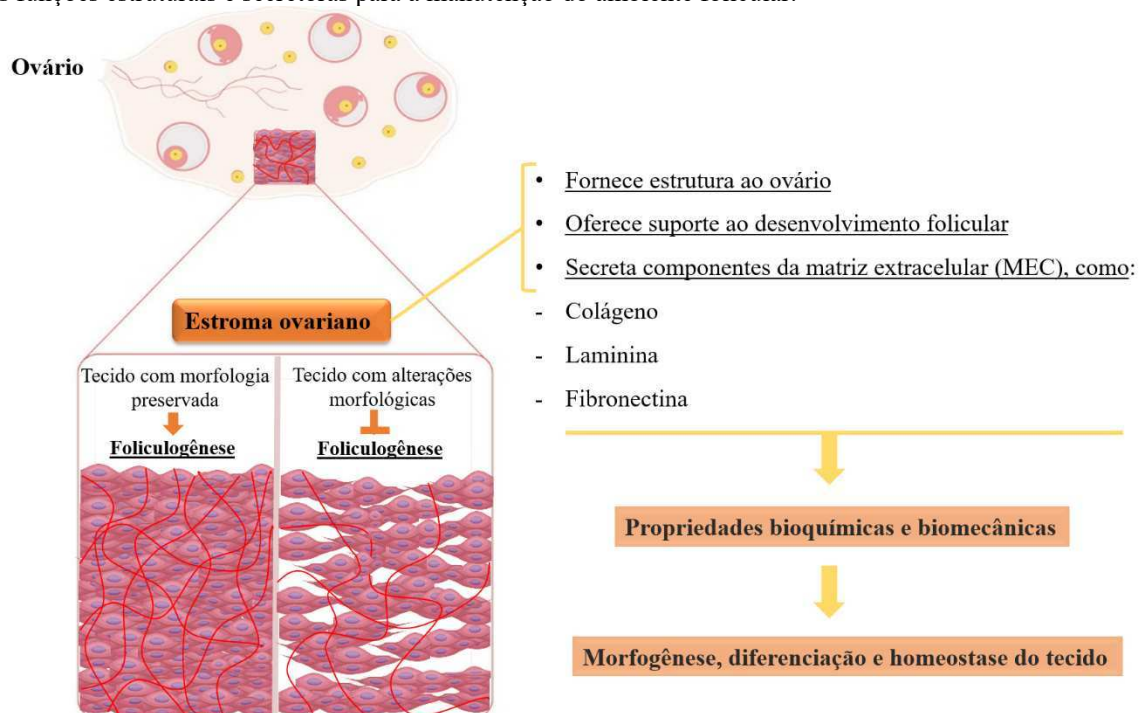
É importante notar que a gônada feminina envelhece de forma acelerada em comparação a outros sistemas do corpo, sendo que as mulheres já nascem com um número finito de oócitos, cerca de 1 a 2 milhões, armazenados como folículos primordiais nos ovários. Após o nascimento, essa reserva folicular diminui gradualmente, um processo que se intensifica por volta dos 31 anos de idade, resultando na redução da qualidade dos oócitos e na perda progressiva da fecundidade. Paralelamente, a depleção folicular leva à queda na produção de estrogênios, os principais esteroides gonadais ovarianos. Quando o número de folículos ovarianos atinge menos de 1.000, a mulher entra na menopausa, marco natural da esterilidade feminina, que ocorre por volta dos 50 anos de idade (King *et al.*, 2024).

2.1.1 Papel da matriz extracelular e do estroma na dinâmica folicular ovariana

O estroma ovariano é um componente fundamental do ovário, constituído predominantemente por tecido conjuntivo de suporte que abriga uma população celular heterogênea, incluindo células estromais incompletamente caracterizadas, como células fusiformes semelhantes a fibroblastos e células intersticiais (Sharma *et al.*, 2024). Esse compartimento estromal se diferencia do tecido parenquimatoso especializado, responsável por envolver os folículos ovarianos em crescimento que contêm oócitos. Além das células estromais, o córtex ovariano compreende populações de células imunes, perivasculares e endoteliais, que também desempenham funções essenciais para o ambiente folicular e são

necessárias em condições de cultivo *in vitro* (Grubliauskaitė *et al.*, 2024). As células estromais participam da sustentação estrutural e funcional do ovário, sendo responsáveis pela secreção de proteínas da matriz extracelular (MEC), como colágeno, laminina e fibronectina (Jiang *et al.*, 2025). A MEC atua como um arcabouço estrutural estável que fornece suporte físico aos constituintes celulares e contribui com propriedades bioquímicas e biomecânicas indispensáveis à morfogênese, diferenciação e homeostase do tecido ovariano (figura 2) (Grosbois *et al.*, 2023).

Figura 2. Representação do estroma ovariano evidenciando tecido com morfologia preservada e alterada, além de suas funções estruturais e secretoras para a manutenção do ambiente folicular.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A dinâmica da MEC é essencial para o desenvolvimento folicular, uma vez que ela passa por modificações contínuas para acomodar e regular a reorganização celular nos folículos em desenvolvimento (Nikanfar *et al.*, 2025; León-Félix *et al.*, 2025). O ovário é considerado um órgão mecanorresponsivo, e a interação entre a MEC, os folículos e as células ovarianas é vital para a foliculogênese e a oogênese. A densidade das células estromais, por sua vez, é um marcador relevante da integridade tecidual e pode influenciar a foliculogênese por meio de mecanismos de mecanossensibilização celular (figura 2) (Grosbois *et al.*, 2023). Os componentes da MEC, como a fibronectina e a laminina, contêm sequências específicas de ligação à integrina — principalmente Arg-Gly-Asp (RGD) — que regulam diretamente a proliferação das células foliculares e a diferenciação das células germinativas (Shen *et al.*, 2023). Dessa forma, o estroma ovariano exerce um papel multifuncional ao integrar suporte

estrutural, sinalização bioquímica e influência mecânica no microambiente ovariano e consequentemente no processo de oogênese e foliculogênese.

2.2 Oogênese e foliculogênese: aspectos fundamentais

Em mamíferos, a reprodução sexual baseia-se na fusão de uma célula germinativa haploide feminina com uma masculina, formando um embrião diploide que dará origem à próxima geração. As células germinativas de ambos os sexos surgem de um tipo de célula comum, chamadas células germinativas primordiais (CGPs), que seguem o caminho feminino ou masculino de diferenciação, denominado oogênese ou espermatogênese, respectivamente. As CGPs se originam como um pequeno grupo de células epiblasticas proximais que se movem para os tecidos extraembrionários na base do alantoide (Pereira *et al.*, 2024; Ginsburg *et al.*, 1990, Lawson e Hage, 1994). Em seguida, elas proliferam e se deslocam ao longo do intestino posterior do embrião para alcançar as cristas genitais, estruturas inicialmente bipotenciais oriundas do mesoderma intermediário. Sob a influência das vias de sinalização WNT4/RSPO1/CTNNB1, essas cristas genitais femininas se diferenciam em ovários, onde, por exemplo, em camundongos, as CGPs proliferam até atingir cerca de 25.000 células germinativas nas gônadas fetais (Perrotta; Condrea; Ghyselinck, 2025; Ford *et al.*, 2020).

A oogênese é um processo essencial para a continuidade das espécies, e o desenvolvimento folicular nos ovários de mamíferos ocorre em estágios bem definidos. O crescimento de folículos em estágio inicial, como folículos primordiais, folículos primários ou folículos secundários não são dependentes das gonadotrofinas. Notavelmente, esses folículos prematuros crescem nos estágios fetal, neonatal e infantil, momento em que as gonadotrofinas não são secretadas; portanto, o crescimento inicial dos folículos é uma etapa crítica para gerar oócitos férteis de alta qualidade após a puberdade (Kawada *et al.*, 2025).

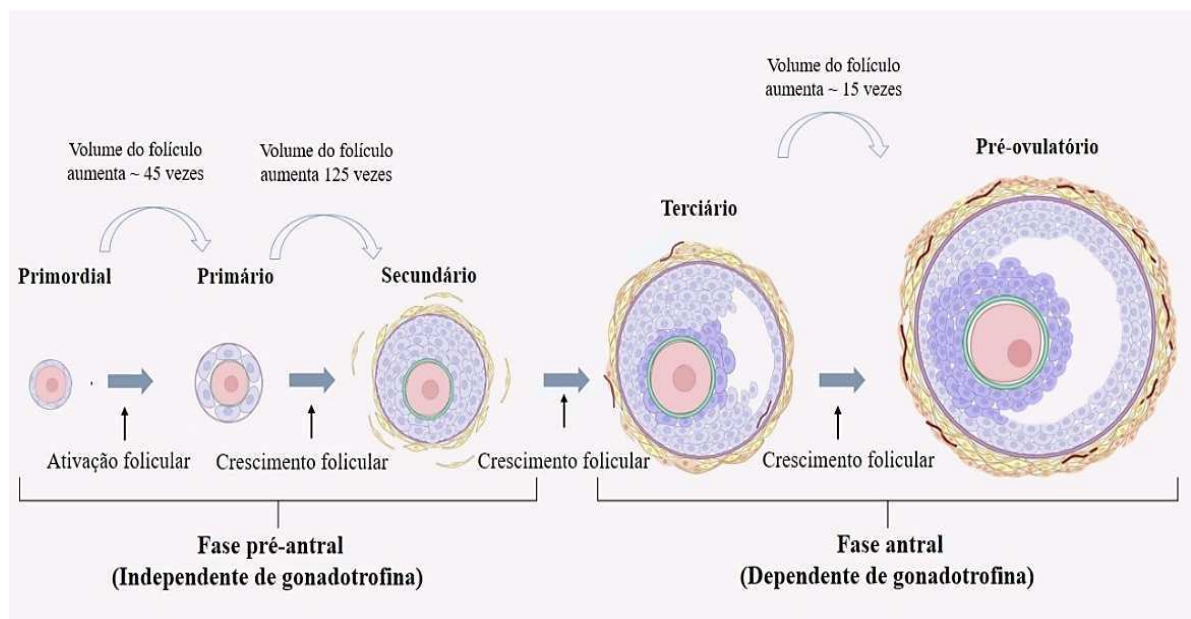
A seleção folicular é um processo único e fisiologicamente importante pelo qual folículos dominantes contendo oócitos de alta qualidade são selecionados da coorte recrutada ou onda de folículos em crescimento. Embora a maioria dos folículos seja perdida por meio da atresia, e apenas alguns folículos atingem o estágio pré-ovulatório e a ovulação. Um dos principais processos responsáveis pela perda folicular no ovário é a atresia folicular, que é iniciada pela apoptose das células da granulosa. Até o momento, muitos estudos relataram fatores envolvidos na seleção folicular e propuseram modelos para o mecanismo de seleção folicular em algumas espécies (Paulino *et al.*, 2022). As gonadotrofinas, em especial o hormônio folículo-estimulante (FSH) e o LH são considerados os fatores mais importantes que regulam a promoção e/ou supressão do crescimento folicular e/ou atresia folicular (Wang *et al.*,

2020). Outros hormônios influenciam o crescimento e sobrevivência do folículo, incluindo o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e membros da superfamília do fator de crescimento transformador β (inibinas e ativinas), embora o processo de seleção do folículo tenha sido investigado em muitos estudos, seu mecanismo completo permanece desconhecido (Ueno *et al.*, 2025).

2.2.1. Desenvolvimento e características dos folículos ovarianos

O crescimento e o desenvolvimento dos folículos ovarianos são regulados por hormônios e ocorrem em estágios bem definidos, que incluem folículos primordiais, folículos primários, folículos secundários, folículos antrais e folículos pré-ovulatórios (Figueiredo *et al.*, 2009). O volume do folículo murino aumenta aproximadamente 45 vezes durante a transição do estágio primordial para o primário, enquanto o desenvolvimento até o folículo secundário abrange aumentos de 125 vezes no volume. A partir do início do folículo antral até os maiores folículos pré-ovulatórios, observou-se rápido aumento, de aproximadamente 15 vezes no volume, com o contínuo acúmulo de fluido folicular (Figura 3) (Feng *et al.*, 2018).

Figura 3. Esquema ilustrativo da foliculogênese e das fases de desenvolvimento folicular.



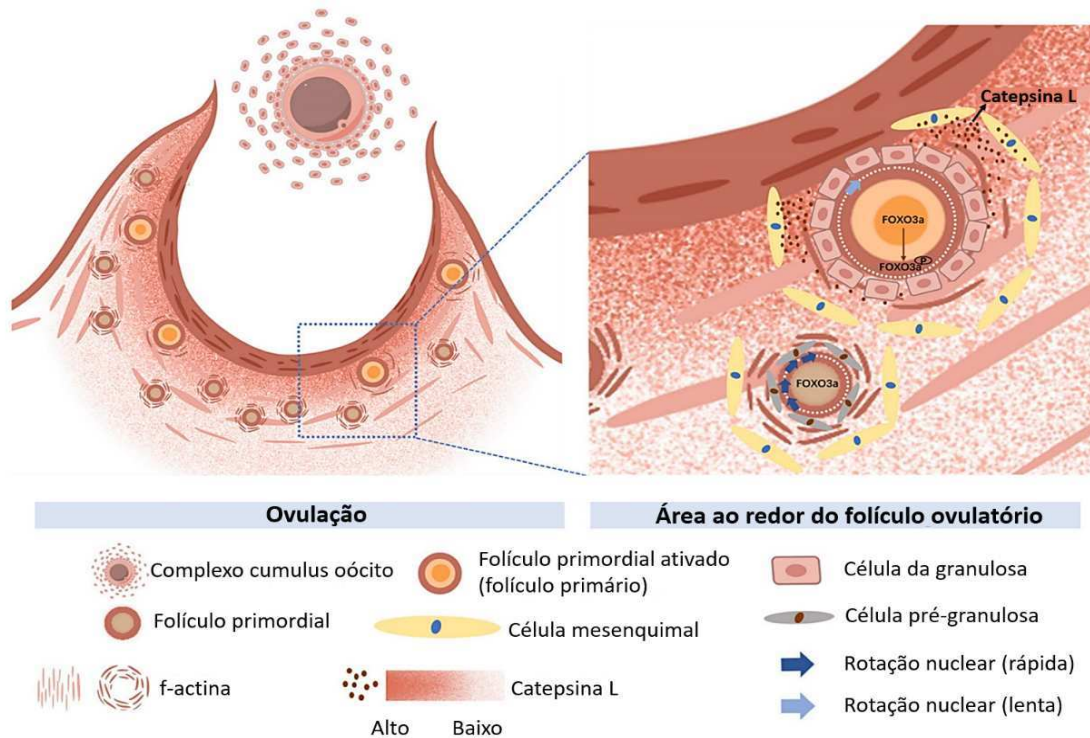
Fonte: Elaborado pelo autor.

O FSH e o LH, secretados pela glândula adenohipófise, são os dois principais hormônios que regulam o desenvolvimento folicular. De acordo com a dependência do FSH, o desenvolvimento folicular é dividido em fase dependente de FSH e fase independente de FSH. O FSH exerce um papel crucial no crescimento dos folículos antrais e na síntese de hormônios esteroides, sendo que folículos em diferentes estágios apresentam variados níveis de expressão

de seus receptores (FSHR), o que os torna distintamente sensíveis à estimulação (Wang *et al.*, 2020). O FSH atua ao se ligar aos FSHR expressos nas células da granulosa ovariana, estimulando a produção de estradiol. Em camundongos o FSH é essencial para a fertilidade, conforme evidenciado pela infertilidade e anovulação em animais *Fshb knockout* (Walters *et al.*, 2025). Ademais, em camundongos imaturos, com cerca de 21 a 22 dias de idade, a secreção cíclica de gonadotrofinas ainda não se estabeleceu, mantendo níveis plasmáticos de FSH baixos (Ueno *et al.*, 2025). A maioria das evidências para essa independência da gonadotrofina vem de modelos de *knockout* ou hipofisectomizados de roedores, em que as gonadotrofinas estão ausentes ou muito reduzidas. Nesses modelos, os folículos pré-antrais ainda crescem e param na transição para a fase antral (Morton *et al.*, 2023).

A regulação precisa do desenvolvimento folicular depende, em grande parte, das células da granulosa, que envolvem o oócito e coordenam seu desenvolvimento por meio de uma rede eficaz de troca de material (Li *et al.*, 2024). Recentemente, identificou-se uma relação molecular entre folículos ovulatórios e a ativação ordenada de folículos primordiais adjacentes, fenômenos cruciais na manutenção da fertilidade feminina. Em camundongos multiovulatórios, sinais emanados dos folículos ovulatórios estimulam os folículos não crescidos circundantes, promovendo sua ativação em cada ciclo reprodutivo. Esse recrutamento inicial de folículos primordiais ocorre nos ovários fetais, mesmo na ausência de folículos em crescimento, e é impulsionado por sinais derivados dos próprios oócitos, e não das células precursoras da granulosa. Em camundongos adultos, alguns folículos primordiais dentro da zona definida de folículos pré-ovulatórios podem não ser recrutados. Curiosamente, a ativação de folículos primordiais dentro de um ovário não é selecionada aleatoriamente em cada ciclo, mas depende de sua proximidade com os folículos ovulatórios. A ovulação provoca degradação e remodelação significativas da MEC dentro de uma faixa de 40 μm ao redor do folículo. O gradiente enzimático, em especial a secreção da proteína catepsina L (CTSL) pelas células mesenquimais do folículo periovulatório, provavelmente contribui para a ativação dos folículos primordiais adjacentes ao aliviar o estresse mecânico associado à MEC. Esse alívio reduz a tensão sobre os folículos, diminuindo a taxa de rotação nuclear. Como resultado, os folículos primordiais mais próximos ao folículo ovulatório apresentam maior probabilidade de serem ativados primeiro (Figura 4). Este processo sequencial de ovulação seguido pela ativação de folículos primordiais é crucial para manter a reserva de folículos primordiais (Richard *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2024; Luo *et al.*, 2019).

Figura 4. A cathepsina L promove a ativação de folículos primordiais próximos ao folículo ovulatório por meio da degradação da matriz extracelular e regulação da dinâmica nuclear e expressão de FOXO3a.

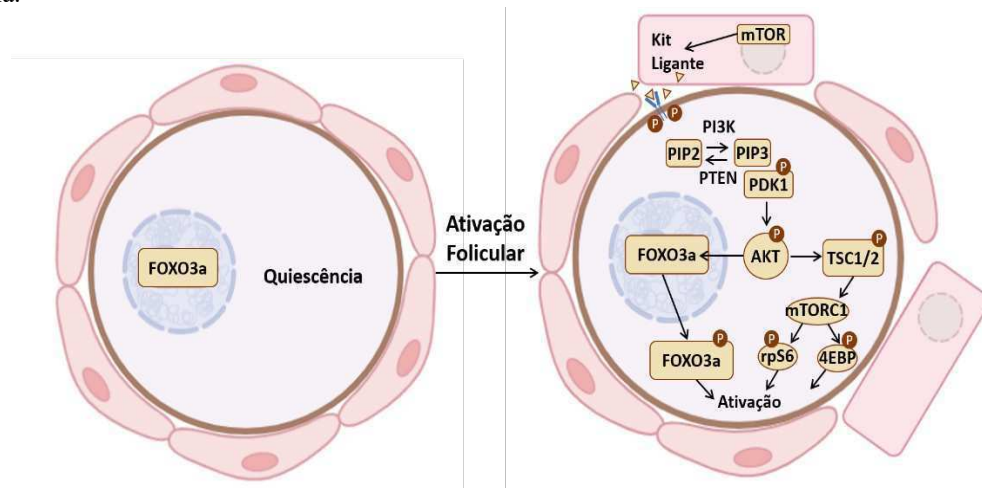


Fonte: Adaptado de Zhang *et al.* (2024).

A via de sinalização PI3K/AKT é um regulador-chave da ativação do folículo primordial. A ativação induzida por células da granulosa da via do alvo mamífero da rapamicina (mTOR) estimula a secreção do ligante Kit, que se liga ao seu receptor c-KIT nos oócitos, iniciando a cascata da fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K). A PI3K catalisa a conversão de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) em fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), recrutando a quinase 1 dependente de fosfoinositídeo (PDK1) para fosforilar e ativar o AKT. O AKT ativado é translocado para o núcleo, onde fosforila e inibe o fator de transcrição FOXO3, levando à sua exportação nuclear e à supressão de suas funções de manutenção de dormência, promovendo assim a ativação do folículo primordial. A AKT também fosforila o complexo da esclerose tuberosa (TSC1/2), ativando ainda mais o complexo 1 do mTOR (mTORC1). O mTORC1, por sua vez, regula efetores a jusante, como a cinase S6 (S6K), a proteína ribossômica S6 (rpS6) e a proteína de ligação ao fator de iniciação da tradução 4E eucariótica (4EBP), promovendo a síntese proteica, a proliferação de células da granulosa e o desenvolvimento folicular geral (Figura 5). Além disso, outras moléculas, como o ciclo de divisão celular 42 (CDC42), E-caderina (E-cad), Sirtuína 1 (SIRT1), histona desacetilase 6 (HDAC6) e fator de crescimento transformador β (TGF- β), também foram relatadas como reguladoras do processo de ativação folicular. Embora as funções das vias PI3K e mTOR estejam bem estabelecidas nesse contexto, as moléculas a montante ainda não foram identificadas, e os mecanismos regulatórios

homeostáticos da ativação do folículo primordial permanecem pouco compreendidos (He *et al.*, 2025; Wang *et al.*, 2022).

Figura 5. Esquema ilustrando a ativação do folículo primordial e as principais vias envolvidas. A via PI3K-AKT, ativada por KIT Ligante (KL), promove o crescimento do ovócito e a inativação do Foxo3a, permitindo a saída da dormência.



Fonte: Adaptado de Wang; Yang (2025).

Em camundongos jovens, a transição de um folículo em estágio primordial para um estágio pré-ovulatório dura aproximadamente 19 a 21 dias. Durante esse período, o oócito transcricionalmente ativo deve acumular os transcritos necessários para dar suporte à maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário inicial (Ramírez-Martín *et al.*, 2025). Ademais, estudos recentes indicam que a MEC desempenha um papel crucial na manutenção da dormência dos folículos primordiais, atuando na ligação das fibras de actina e colágeno para gerar estresse mecânico. Esse mecanismo influencia a rotação do núcleo do oócito dentro do folículo primordial. A ativação desses folículos ocorre quando a MEC circundante é degradada, permitindo sua transição para estágios mais avançados do desenvolvimento folicular (Zhang *et al.*, 2024).

Um folículo primário inicial pode conter apenas seis células pré-granulosas, o que aumenta para cerca de 70 células da granulosa no final da fase primária. Isso requer que cada célula da granulosa passe por três a quatro rodadas de mitose para atingir o final do estágio primário. No entanto, em folículos primários de animais adultos, a proliferação das células da granulosa é raramente observada, sugerindo que essa fase pode ser prolongada. Ainda não está claro se isso ocorre porque as células da granulosa têm períodos prolongados de quiescência celular (fase G0) ou se um ou mais estágios de divisão celular são prolongados durante esse estágio da foliculogênese. Essa incerteza impacta o delineamento experimental e a interpretação de modelos matemáticos que estudam a dinâmica folicular (Richard *et al.*, 2023).

Durante o crescimento do folículo secundário, a camada de células da teca se diferencia em duas regiões distintas: a teca externa, situada na periferia, é composta por células não diferenciadas, enquanto a teca interna, mais próxima ao folículo, abriga células precursoras de fibroblastos, capazes de se diferenciar e secretar esteroides (Cavalcanti *et al.*, 2023). Esse processo depende da comunicação bidirecional entre o oócito e as células somáticas circundantes. Diversas moléculas de sinalização envolvidas nesse mecanismo pertencem à superfamília do TGF- β , incluindo ativina, GDF-9 e BMP-15, além de neurotrofinas, como a neurotrofina tipo 5 (NTF5) e o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Rimon-Dahari *et al.*, 2016). Além disso, o folículo secundário se forma quando uma camada de células da teca se origina do tecido conjuntivo circundante. Nessa fase do desenvolvimento folicular, os FSHR tornam-se funcionais, sendo detectados nos ovários de ratas recém-nascidas entre o quarto e o quinto dia de vida, atingindo um pico de transcrição por volta do décimo dia em camundongos (Richards *et al.*, 2018; O'shaughnessy *et al.*, 1997).

Com a contínua proliferação de células somáticas e o aumento do diâmetro do oócito, começam a surgir pequenas cavidades repletas de fluido dentro das camadas de células da granulosa. Essas cavidades eventualmente se fundem em uma única cavidade chamada antro, uma estrutura preenchida por fluido folicular contendo nutrientes e fatores críticos para o crescimento final do oócito (Wang *et al.*, 2025; Merico *et al.*, 2021). O volume total do folículo continua a se expandir até o estágio pré-ovulatório. Perto do momento da formação do antro, os oócitos mostram um grande aumento em seu volume, o que está associado ao acúmulo de mitocôndrias e outras organelas, mRNA e proteínas que darão suporte ao desenvolvimento embrionário inicial após a fertilização (Paulino *et al.*, 2022).

Ao longo do desenvolvimento do folículo antral, as células da granulosa e da teca se diferenciam em subtipos distintos. A teca interna, ou a camada mais próxima da lâmina basal, torna-se altamente vascularizada e se especializa na conversão do colesterol em andrógenos em resposta ao LH. Já a camada externa das células da teca se torna a teca externa, que desempenha um papel importante na ovulação ao se contrair em resposta ao aumento do LH, contribuindo assim para a ruptura do folículo. Nas células da granulosa, observa-se uma diferenciação funcional: as células da granulosa mural, localizadas próximas à lâmina basal e contendo rFSH, convertem andrógenos da teca interna em estrogênios. Por outro lado, as células do cumulus, que envolvem diretamente o oócito, produzem fatores essenciais para o seu crescimento e maturação. É nesse estágio que o oócito adquire competência meiótica, embora permaneça bloqueado na prófase I até o pico de LH na fase folicular do ciclo estral ou menstrual (Morton *et al.*, 2023).

A ovulação envolve mudanças estruturais e fisiológicas no folículo, incluindo a degradação da MEC, ruptura da parede do folículo, extrusão de um oócito maduro envolto em células cumulus expandidas e colapso da estrutura folicular restante. Essas modificações são acompanhadas por uma transição na esteroidogênese, com a produção de estradiol sendo substituída pela síntese de progesterona. O pico de LH, ou a administração de hCG ovulatório, ativa múltiplas vias de sinalização interconectadas nas células foliculares pré-ovulatórias. Esse processo resulta na indução e ativação de diversos fatores celulares e extracelulares, que coordenam as mudanças morfológicas e bioquímicas necessárias para a ovulação e posterior luteinização (Jo *et al.*, 2025; Zhang *et al.*, 2024). Os camundongos ovulam cerca de 10 oócitos por ciclo estral, que geralmente tem uma duração de 4 a 6 dias (mas ciclos mais longos não são incomuns). A fase folicular do camundongo dura todo o ciclo e os corpos lúteos persistem pelos três ciclos subsequentes (Richard *et al.*, 2024). Todo esse processo de desenvolvimento folicular é fortemente regulado para selecionar os folículos aptos à ovulação, e os demais acabam sofrendo atresia ao longo do processo.

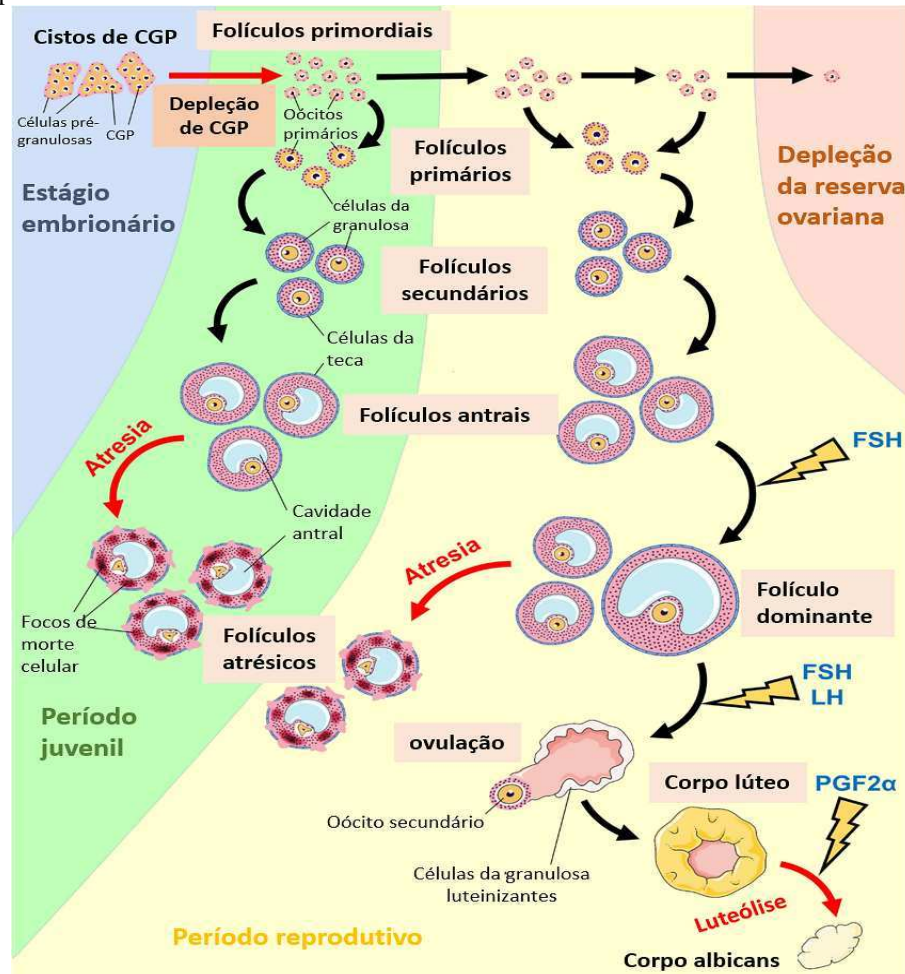
2.3 Regulação da população folicular e mecanismos de atresia

No ovário, o destino de cada folículo reflete um delicado equilíbrio entre sinais de sobrevivência e morte celular, regulados por hormônios e fatores intraovarianos. Desde o estágio embrionário, quando se formam os cistos de CGPs, até a depleção final da reserva ovariana, dezenas de milhares de folículos primordiais compõem essa reserva, mas cerca de 99 % não alcançará a ovulação, sendo destinados à atresia ao longo da vida reprodutiva (Liu *et al.*, 2023). Durante o período juvenil, observa-se predominantemente a degeneração dos folículos antrais, enquanto, após a puberdade, picos de FSH e hormônio LH secretados pela hipófise resgatam por ciclo um pequeno grupo de folículos, promovendo seu recrutamento com base na sensibilidade hormonal e em citocinas e fatores de crescimento intraovarianos (Yang *et al.*, 2022). O folículo selecionado ovula, formando o corpo lúteo, que posteriormente envolve por ação da prostaglandina $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$) (Figura 6). A maior parte, entretanto, degenera sem atingir a fase antral dominante, ilustrando a seletividade rigorosa que preserva apenas os folículos de melhor qualidade para ovulação.

No nível molecular, o recrutamento de folículos primordiais depende da via PI3K/AKT/mTOR, que integra sinais metabólicos, hormonais e de estresse para decidir o destino folicular. A PI3K transforma PIP2 em PIP3, que recruta AKT à membrana plasmática, permitindo sua fosforilação e ativação. A AKT, por sua vez, ativa o complexo mTORC1, que regula a síntese proteica e o crescimento celular por meio dos efetores S6K e 4E-BP1 (Zhang

et al., 2025). Para evitar a ativação indiscriminada, a fosfatase homóloga à tensina (PTEN) deleta PIP3, limitando a sinalização de AKT e mantendo fatores como FOXO3 no núcleo, onde reprimem genes de ativação folicular. Quando PTEN falha ou a sinalização PI3K é excessiva, ocorre recrutamento exagerado de folículos, esgotando a reserva com perda de qualidade e predispondo à falência ovariana prematura (FOP) (Lopez *et al.*, 2023).

Figura 6. Ilustração do desenvolvimento folicular desde o estágio embrionário até o período reprodutivo, destacando a formação, maturação, atresia e ovulação dos folículos, bem como a depleção da reserva ovariana ao longo do tempo.



Fonte: Adaptado de Chesnokov *et al.* (2024).

A atresia inicia-se tipicamente pela apoptose das células da granulosa nos folículos em crescimento. À medida que a taxa de células da granulosa apoptóticas ultrapassa cerca de 10%, a arquitetura folicular colapsa, provocando a morte do oócito e das células da teca adjacentes (Zhang *et al.*, 2025). Morfologicamente, as células da granulosa apoptóticas exibem condensação da cromatina, retração celular, formação de bolhas na membrana e fagocitose por macrófagos ou células da granulosa vizinhas (Vieyra *et al.*, 2024). A clivagem da caspase-3 executora cliva proteínas estruturais e regulatórias, enquanto as proteínas antiapoptóticas da família BCL-2 antagonizam a permeabilização da membrana mitocondrial externa, atrasando a

liberação de citocromo c (Cardoso *et al.*, 2023). Vias pró-sobrevivência como PKA, PKB/AKT, ERK1/2, p38-MAPK, EGF e BMPs modulam esse equilíbrio, promovendo a viabilidade das células da granulosa em resposta a estímulos hormonais e de fatores de crescimento (Yang *et al.*, 2024).

Além da apoptose, a autofagia desempenha um papel essencial na manutenção da homeostase folicular: em níveis fisiológicos, ela remove organelas danificadas e resíduos do corpo lúteo, mas, quando exacerbada, degrada componentes essenciais à sobrevivência das células da granulosa e dos oócitos, acelerando a atresia (Xie *et al.*, 2021). Em células da granulosa, a autofagia regula a degradação do fator de transcrição WT1, modula a diferenciação celular e interage com vias de estresse, como a da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) e a da enzima 1 que requer inositol (IRE1), ajustando a resposta a carências nutricionais, hipóxia e estresse oxidativo (Xi *et al.*, 2025; Bhardwaj *et al.*, 2022). Marcadores como BECN1 e LC3-II indicam a formação de autofagossomos, mas sua superativação pode provocar lise autofágica e morte celular, prejudicando a qualidade do folículo e a integridade do oócito (Wu *et al.*, 2024).

Pesquisas recentes ampliaram ainda mais o conceito de atresia, incorporando modos de morte celular regulada como ferroptose, piroptose e necroptose. A ferroptose, caracterizada pelo acúmulo de ferro livre e espécies reativas de oxigênio (EROs), envolve inibição de glutathione peroxidase 4 (GPX4) e de transportador de solutos da família 7, membro 11 (SLC7A11), aumento de ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e disfunção mitocondrial, culminando em peroxidação lipídica (Zhang *et al.*, 2025; Ye *et al.*, 2025). Enzimas como sintetase de acil-CoA de cadeia longa membro 4 (ACSL4) e lisofosfatidilcolina aciltransferase 3 (LPCAT3) incorporam ácidos graxos poli-insaturados em fosfolípidios que, na presença de Fe^{2+} , geram EROS pela reação de Fenton, promovendo dano de membrana (Ruan *et al.*, 2025; Pan *et al.*, 2024). A piroptose, ativada por gasderminas como gasdermin D (GSDMD), cria poros na membrana e libera citocinas pró-inflamatórias, alterando o microambiente folicular (Wang *et al.*, 2023). Por fim, a necroptose, mediada por RIPK1, RIPK3 e MLKL, resulta em inchaço celular, ruptura da membrana plasmática e disfunção das células da granulosa, privando oócitos de nutrientes essenciais e acelerando a regressão folicular (Wu *et al.*, 2024; Tang *et al.*, 2024; Yang *et al.*, 2025).

Em última instância, todos esses mecanismos — apoptose, autofagia, ferroptose, piroptose e necroptose — interagem de maneira complexa. Níveis elevados de EROS podem disparar diferentes vias de morte celular dependendo da intensidade e do contexto do estresse. A coordenação entre sinais pró-sobrevivência (PI3K/AKT/mTOR), respostas de estresse (AMPK, IRE1) e vias de morte celular assegura a seleção rigorosa de folículos de alta

qualidade, ao mesmo tempo em que elimina eficientemente folículos danificados. Entender essa rede multifacetada abre caminhos para intervenções terapêuticas destinadas a modular esses processos, preservar a reserva ovariana e prevenir a FOP (Chaudhary *et al.*, 2019) o que ocorre quando há agentes estressores como por exemplo o uso de antineoplásicos.

2.4 Impactos de agentes antineoplásicos na função ovariana

A infertilidade é um problema de saúde que afeta milhões de pessoas em idade reprodutiva ao redor do mundo. É prevalente em aproximadamente 15–180 milhões de indivíduos, representando cerca de 15% da população mundial. Assim, a infertilidade é um importante problema de saúde pública (Oteyola *et al.*, 2025; Mo *et al.*, 2025). Os ovários de adultos não possuem células-tronco da linha germinativa, tornando os folículos um recurso não renovável que é gradualmente esgotado ao longo da vida, resultando em senescência reprodutiva. A depleção prematura de folículos pré-antrais pode resultar em FOP, afetando a saúde reprodutiva e causando infertilidade em mulheres em idade fértil (Qin *et al.*, 2025; Cui; Wang, 2024). Nesse contexto, diversos agentes antineoplásicos têm sido associados a impactos negativos na função ovariana, contribuindo para a FOP e comprometendo a fertilidade feminina, conforme demonstrado no quadro 1.

Quadro 1. Principais antineoplásicos e seus impactos na função ovariana.

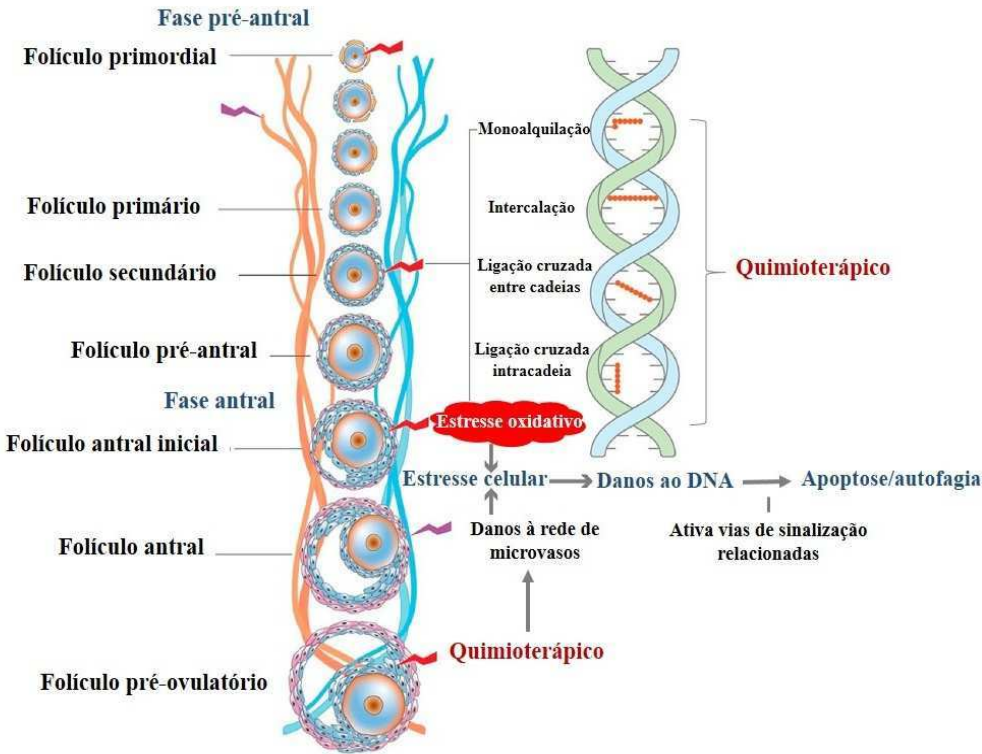
Agente antineoplásico	Mecanismo de ação	Risco de falência ovariana	Retomada da função ovariana	Taxa de gravidez após o tratamento
Agentes alquilantes	Inibir a replicação do DNA	42,2% após tratamento	Desconhecido	Desconhecido
Agentes de platina	Ligação cruzada de cadeias de DNA e inibição da replicação e transcrição	50% (com bleomicina)	Desconhecido	Desconhecido
Taxanos	Instabilidade dos microtúbulos	57,1% em 12 meses	75% em 24 meses	Desconhecido
Antraciclinas	Quebras de fita dupla de DNA que levam à apoptose	85% no final do tratamento (quando combinado com paclitaxel) 98% (40–49 anos) <10–34% (<40 anos)	67,4% em 24 meses	Dados limitados a modelos murinos
Antimetabólitos (metotrexato)	Inibe a di-hidrofolato redutase que causa apoptose de células T	Desconhecido	60% com menstruação normal	46–57,1%

Bleomicina, etopósido e cisplatina	Terapia combinada	7% após o tratamento	94–100% com menstruação normal	95%
Etoposídeo, metotrexato e actinomicina	Terapia combinada	Desconhecido	Desconhecido	36,4–56%

Fonte: Adaptado de Roof *et al.* (2024).

Os mecanismos por trás da perda de folículos primordiais induzida pela quimioterapia têm sido investigados, mas permanecem em grande parte obscuros (Pirzaman *et al.*, 2023). Os mecanismos relatados incluem um efeito primário ou secundário nos folículos primordiais resultando na depleção da reserva ovariana. Como efeito primário, os antineoplásicos podem induzir diretamente danos ao DNA (por exemplo, quebras de fita dupla, ligações cruzadas inter e intrafita, intercalação e monoalquilação), o que resulta na ativação de vias relacionadas à apoptose e/ou autofagia, ou podem causar indiretamente danos ao DNA aumentando o estresse oxidativo ou danificando a rede de microvasos ovarianos, levando ao estresse celular, como isquemia e privação de nutrientes (Figura 7) (Mattiello *et al.*, 2021; Huang *et al.*, 2020; Szymanska, Tan, Oktay, 2020).

Figura 7. Esquema dos principais mecanismos pelos quais a quimioterapia promove dano ovariano e depleção da reservasa folicular.

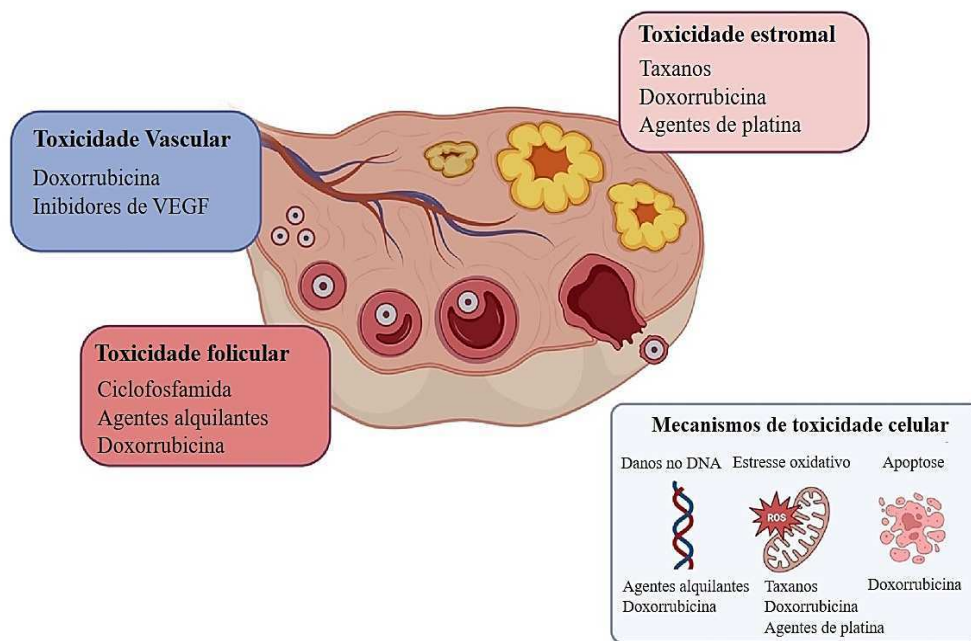


Fonte: Adaptado de Hao *et al.* (2019).

Além disso, estudos relatam que alguns antineoplásicos que são amplamente utilizados, como ciclofosfamida, cisplatina e doxorrubicina (DOX), podem induzir a FOP

devido a danos causados a diversas estruturas do ovário (Figura 8) (Bahrehbar *et al.*, 2022). Relatórios mostraram que a incidência de FOP antes dos 40 anos é de 1%. De acordo com as projeções da Organização Mundial de Saúde (OMS), a incidência de infertilidade está aumentando em todo o mundo e se tornará a terceira doença mais prevalente depois de tumores e doenças cardiovasculares. As evidências mostram que os sobreviventes tratados após o início do período puberal com agentes alquilantes tiveram uma taxa 29 vezes maior de FOP quando comparados com os sobreviventes tratados antes do início da puberdade sem agentes alquilantes. Diante do crescimento da incidência de câncer em faixas etárias mais jovens, a FOP, causada por quimioterapia e radioterapia, tem atraído atenção. Portanto, a preservação da fertilidade e a melhora da função ovariana em mulheres jovens não grávidas com tumores tornam-se considerações centrais no manejo clínico (Mo *et al.*, 2025).

Figura 8. Localização e mecanismos dos efeitos gonadotóxicos de agentes quimioterápicos.



Fonte: Adaptado de Roof *et al.* (2024).

2.5 Influência do estresse oxidativo e da inflamação no ovário

O desequilíbrio do estresse oxidativo é reconhecido como um dos fatores patogênicos associados à reserva ovariana diminuída. Estudos indicam que o estresse oxidativo contribui para prejudicar a função ovariana, a má qualidade dos oócitos e os distúrbios da ovulação em mulheres contemporâneas, pois o excesso de EROs pode perturbar o equilíbrio dos sistemas oxidativo e antioxidante do corpo. Além disso, o estresse crônico está associado ao aumento dos níveis de estresse oxidativo, afetando diferentes estágios do desenvolvimento folicular, desde a formação do folículo primordial até sua maturação e atresia. Esse

desequilíbrio também contribui para patologias ovarianas, incluindo apoptose de células da granulosa, disfunção mitocondrial e alterações nos níveis de íons cálcio (Qian *et al.*, 2025).

As EROs, são moléculas derivadas de oxigênio que podem causar danos ao DNA e às proteínas, se os níveis de EROs forem dramaticamente aumentados e não neutralizados por antioxidantes. EROs, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), são produtos normais do metabolismo e estão envolvidos em múltiplas vias de sinalização celular. No entanto, níveis aumentados induzidos por estresse ambiental ou atividade antioxidante reduzida podem levar ao estresse oxidativo, que por sua vez resulta em dano oxidativo (Hiensch *et al.*, 2020).

O sistema reprodutivo feminino é um dos primeiros a sofrer os efeitos do envelhecimento, sendo um indicador precoce desse processo. O envelhecimento reprodutivo precoce está associado ao início precoce da infertilidade e a um risco aumentado de várias doenças. Durante esse processo, o estresse oxidativo sistêmico e reprodutivo e os níveis de inflamação aumentam por meio da ativação do inflamossomo, levando à perda do folículo ovariano (Lliberos *et al.*, 2021). Nesse sentido, foi observado que camundongos fêmeas com *TNF- α knockout* (*TNF- α -/-*) apresentam maior frequência de ciclos estrais, maior proliferação de células da granulosa e redução da apoptose de oócitos, produzindo 21% mais filhotes do que camundongos controle durante um período reprodutivo de 12 meses (Lopez *et al.*, 2023). Ademais, outros marcadores do envelhecimento reprodutivo incluem aumento da fibrose e encurtamento dos telômeros nas células ovarianas. Embora os fatores que aceleram esse processo não sejam completamente compreendidos, acredita-se que a exposição a substâncias químicas e desreguladores endócrinos tenha um papel relevante (Santacruz-Márquez *et al.*, 2025).

Apesar dos efeitos deletérios do excesso de EROs, essas moléculas desempenham funções essenciais na fisiologia ovariana, como a maturação dos oócitos, a fertilização e o desenvolvimento embrionário. Em contrapartida, o excesso de EROs resulta em estresse oxidativo que danifica as células, promove inflamação através das vias do fator nuclear- κ B (NF- κ B) e inflamossomo e interrompe o metabolismo e a regulação epigenética. No ovário, níveis elevados de EROs podem danificar os cromossomos do oócito, induzindo defeitos do fuso e instabilidade meiótica que inibem a fertilização bem-sucedida e promovem distúrbios reprodutivos, incluindo a síndrome dos ovários policísticos (SOP) e FOP (Qin *et al.*, 2025).

A ativação do NF- κ B por EROs ocorre por meio da via clássica dependente da cinase I κ B (IKK), resultando no aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina-6 (IL-6). Estudos demonstraram que a administração de DOX em camundongos elevou os níveis plasmáticos de

TNF- α em apenas uma hora após o tratamento (Du *et al.*, 2021). Diante disso, antioxidantes como N-acetilcisteína (NAC), flavonoides, vitaminas C e E e coenzima Q10 (CoQ10) vêm sendo investigados em modelos animais por seus efeitos protetores contra o estresse oxidativo. Além de neutralizar as EROs, esses compostos apresentam propriedades pró-longevidade no sistema reprodutivo feminino, contribuindo para a preservação da reserva ovariana, o aumento do número de folículos saudáveis, a redução da atresia folicular e a melhora na fertilidade, refletida pelo aumento do tamanho da ninhada e na regularidade do ciclo estral (King *et al.*, 2024).

2.6 Estudo da foliculogênese e da proteção ovariana frente à citotoxicidade por meio do cultivo folicular *in vitro*

Em 1996, um estudo marcante demonstrou pela primeira vez com sucesso o crescimento de oócitos de ovários neonatais, com potencial para se desenvolver em descendentes (Eppig; O'Brien, 1996). Esse avanço foi alcançado usando um método de cultivo de duas etapas. O processo começou com o cultivo de tecido ovariano de camundongos recém-nascidos em um meio suplementado com soro bovino fetal por oito dias. Posteriormente, complexos de células oócitos-granulosa, que foram isolados de ovários cultivados em tecido, foram desenvolvidos por meio de cultivo em um meio quimicamente definido por mais 14 dias (Chen *et al.*, 2024).

Os modelos de cultivo de folículos *in vitro* permitem a investigação de mecanismos regulatórios específicos relacionados à foliculogênese *in vivo*, bem como a busca de diversos fatores suplementares para sustentar o desenvolvimento folicular e a avaliação de agentes terapêuticos contra vários distúrbios reprodutivos. Contudo, a produção e o acúmulo de EROs a partir de processos metabólicos celulares nos folículos em desenvolvimento afetam o desenvolvimento e a sobrevivência dos folículos durante o cultivo de longo prazo (Islam *et al.*, 2025). Esse desequilíbrio é responsável por danos a macromoléculas, membranas e organelas em oócitos e embriões, prejudicando sua qualidade e potencial de desenvolvimento e causando resultados abaixo do ideal (Musapoor *et al.*, 2025; Liu *et al.*, 2020). Para atenuar esses efeitos, antioxidantes têm sido adicionados ao meio, a fim de neutralizar as EROs, reduzir a peroxidação lipídica intracelular e prevenir a fragmentação do DNA (He *et al.*, 2025).

Nos últimos anos, pesquisas sobre reprodução assistida têm se concentrado na foliculogênese, especificamente em relação ao cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais e à maturação de oócitos. Esses estudos visam melhorar a compreensão da foliculogênese e dos hormônios e fatores de crescimento envolvidos nesse processo; os achados podem ser

relevantes para a reprodução humana e para determinar o potencial reprodutivo de animais geneticamente superiores ou para preservar espécies extintas (Neto *et al.*, 2020). Diversas biotecnologias foram desenvolvidas para promover o crescimento e a maturação de oócitos a partir de folículos pré-antrais que poderiam ser usados para reprodução assistida em humanos e produção animal. A combinação de biotecnologias de gametas, como o cultivo de folículos pré-antrais *in vitro* seguida de maturação e fertilização *in vitro*, obteve bons resultados com a produção de embriões em algumas espécies domésticas e descendentes saudáveis em camundongos (Figueiredo *et al.*, 2020).

Considerando esse processo de desenvolvimento folicular, estudos no campo da tecnologia de reprodução assistida (TRA) têm tido inúmeros esforços para desenvolver protocolos *in vitro* para o uso de folículos e/ou oócitos para produzir óvulos viáveis (Kohama *et al.*, 2024). O crescimento e o desenvolvimento de folículos ovarianos *in vitro* são uma abordagem para salvaguardar a fertilidade e obter oócitos clinicamente competentes residindo nos folículos em conexão com a preservação da fertilidade. O desenvolvimento bem-sucedido dessas novas terapias tem o potencial de melhorar significativamente o tratamento da infertilidade feminina e o gerenciamento da saúde (Mihajlovic *et al.*, 2024).

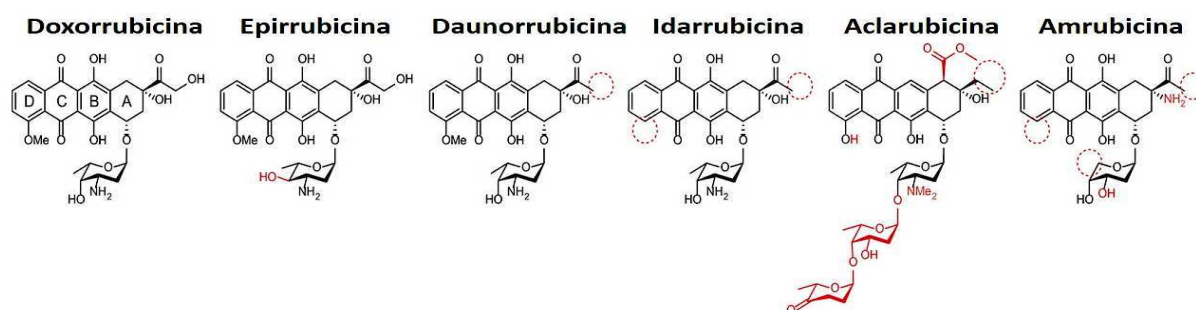
Para o sucesso do cultivo de folículos ovarianos, é de extrema importância manter a morfologia folicular intacta, preservando as interações entre as células da granulosa somática circundante e o oócito (Mihajlovic *et al.*, 2024). Os sistemas de cultivo de folículos pré-antrais incluem cultivo bidimensional e tridimensional, esses sistemas foram desenvolvidos e estão evoluindo rapidamente. O sistema bidimensional é comumente usado no cultivo de folículos pré-antrais de camundongos. Como o sistema de cultivo bidimensional não requer encapsulamento de folículos, a operação é relativamente simples. Portanto, este sistema pode não apenas ser usado para expandir a fonte de oócitos disponíveis, mas também se tornar um bom modelo de pesquisa para prever a FOP e rastrear substâncias tóxicas ovarianas, para reduzir o uso de animais experimentais e melhorar o bem-estar animal (Wang *et al.*, 2020; Simon *et al.*, 2020). Dessa forma, o cultivo de folículos ovarianos representa uma abordagem inovadora para investigar a foliculogênese e a oogênese em um ambiente sob condições controladas. Este método não só permitiu uma visão sem precedentes da biologia fundamental do desenvolvimento do folículo, mas também tem aplicações translacionais de longo alcance, incluindo na preservação da fertilidade para mulheres cujos folículos ovarianos podem ser danificados por doenças ou seu tratamento ou na conservação da vida selvagem (Simon *et al.*, 2020).

O desenvolvimento de sistemas de cultivo *in vitro* para explorar oócitos imaturos inseridos em folículos pré-antrais tem um grande potencial para fornecer muitos oócitos para fertilização *in vitro* em espécies humanas e animais domésticos. É importante considerar que os folículos pré-antrais representam 90 a 95% de toda a população folicular e armazenam a maioria dos oócitos presentes nos ovários de mamíferos (Paulino *et al.*, 2022). Além disso, o crescimento folicular *in vitro* é um método único e versátil para preservar a fertilidade em pacientes com câncer e estudar a biologia ovariana e folicular (Matsushige *et al.*, 2024) frente a toxicidade causada por antineoplásicos como por exemplo a DOX.

2.7 Doxorrubicina e seus efeitos nos folículos ovarianos

A DOX é um quimioterápico amplamente utilizado e pertence à família das antraciclina, um grupo de medicamentos anticancerígenos (Figura 9). É comumente conhecido por seus principais nomes comerciais, como Adriamicina e Rubex. Foi originalmente isolado de *Streptomyces peucetius* na década de 1970 e agora é usado para tratar uma grande variedade de cânceres, incluindo mama, pulmão, gástrico, ovário, bexiga, tireoide, leucemia, sarcoma, linfoma, neuroblastoma, tumores de Wilms e cânceres pediátricos (Nguyen *et al.*, 2025; Spears *et al.*, 2019; Xia *et al.*, 2017). Além disso, foi demonstrado que a DOX tem um potencial terapêutico significativo e é reconhecida como um dos medicamentos quimioterápicos mais eficientes que foram aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) (KCIUK *et al.*, 2023).

Figura 9. Estruturas de diferentes drogas antraciclina. Diferenças estruturais comparadas com a doxorrubicina são indicadas em vermelho.



Fonte: Adaptado de Zanden *et al.* (2021).

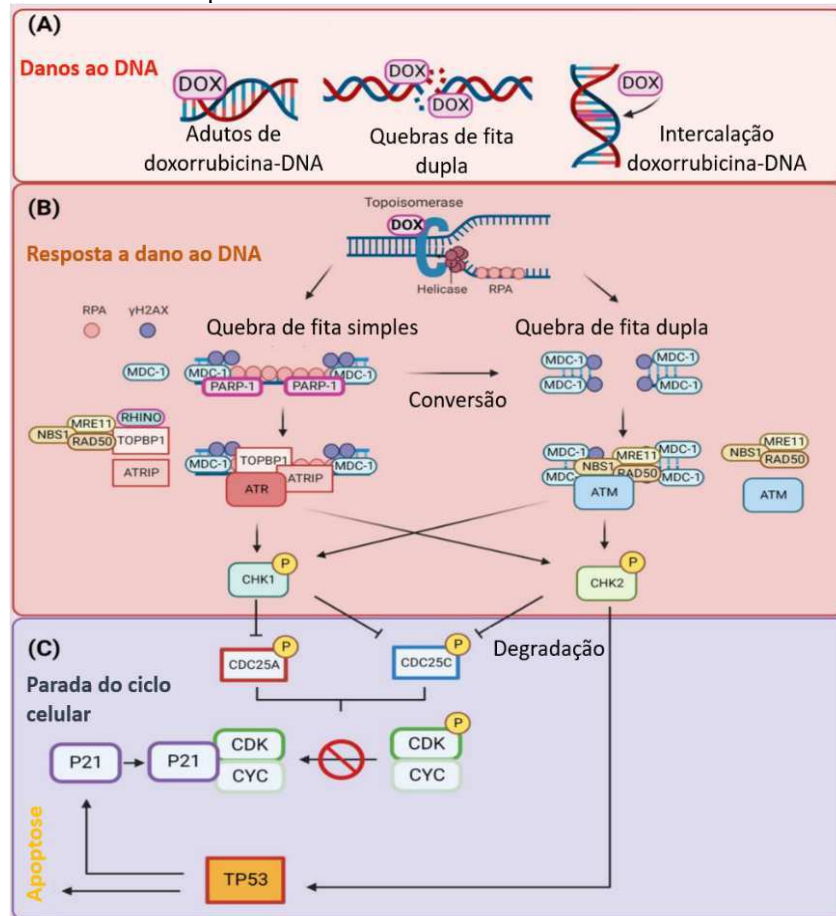
Em sua forma líquida, a DOX é facilmente identificável devido à sua coloração vermelho-intensa. A administração ocorre predominantemente por via intravenosa, com ciclos

de tratamento geralmente realizados em intervalos de 21 dias. A DOX exibe rápida distribuição nos tecidos e tem uma meia-vida de eliminação de até 48 horas. Embora possa ser administrada rapidamente (15 a 20 minutos), a administração lenta da formulação lipossomal é recomendada para reduzir o risco de reações à infusão. Além disso, a DOX é incompatível com heparina e fluorouracil e pode causar precipitação se misturada com esses medicamentos (Johnson-Arbor; Dubey, 2023).

O principal e mais amplamente reconhecido mecanismo da DOX é a inibição da enzima nuclear topoisomerase II. A topoisomerase II previne o superenrolamento e a torção do DNA durante a replicação, produzindo corte de fita dupla e resselagem do DNA clivado e, portanto, é particularmente abundante na transição de fase do ciclo celular G2/M. No entanto, a DOX impede a formação do complexo topoisomerase II-DNA após a fase de corte, com um acúmulo de fragmentos de DNA que, em última análise, induz a morte celular. Além disso, a DOX induz a produção de radicais livres e outras EROs (Spears *et al.*, 2019; Steć *et al.*, 2025; Kalvala *et al.*, 2023).

A partir desses mecanismos iniciais, a ação da DOX se estende a processos mais complexos de dano ao DNA, envolvendo múltiplas vias celulares de detecção e resposta, que reforçam sua eficácia citotóxica (Ma *et al.*, 2024). A figura 10 apresenta os danos ao DNA induzidos pela DOX por meio de três mecanismos principais: formação de adutos DOX-DNA, quebras de fita simples e quebras de fita dupla, além da intercalação na molécula de DNA. As quebras de fita simples são detectadas pela poli [ADP-ribose] polimerase 1 (PARP-1) e recobertas pela proteína de replicação A (*replication protein A* – RPA), promovendo o recrutamento de proteínas como a proteína de ligação de topoisomerase 2 de DNA 1 (TOPBP1), o órfão nuclear interativo de HUS1 (RHINO), a proteína interativa de ATR (*ATR-interacting protein* – ATRIP) e o complexo MRE11–RAD50–NBS1. Esse conjunto ativa a quinase relacionada à ataxia telangiectasia e Rad3 (ATR). As quebras de fita dupla são reconhecidas pelo mesmo complexo MRE11–RAD50–NBS1, que recruta o mediador da proteína de ponto de verificação de dano ao DNA 1 (MDC1) e ativa a quinase mutada na ataxia telangiectasia (*ataxia telangiectasia mutated* – ATM). As quinases ATR e ATM fosforilam as quinases de ponto de verificação CHK1 (*checkpoint kinase 1*) e CHK2 (*checkpoint kinase 2*), que inibem as fosfatases CDC25A e CDC25C (*cell division cycle 25 A/C*), bloqueando a ativação dos complexos ciclina-CDK (*cyclin-dependent kinase*) e interrompendo o ciclo celular. CHK2 também ativa o fator de transcrição p53 (*tumor protein p53* – TP53), que induz a expressão de P21 (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1A* – CDKN1A), reforçando a inibição das CDKs e podendo levar à apoptose. (Jones; Dass, 2022; Sangweni *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2023).

Figura 10. Indução de dano ao DNA após tratamento de células com doxorubicina. (A) Indução de dano ao DNA após tratamento de células com doxorubicina. (B) Ativação da via de resposta a dano ao DNA. (C) Indução de apoptose ou parada do ciclo celular por doxorubicina.



Fonte: Adaptado de Kciuk *et al.* (2023).

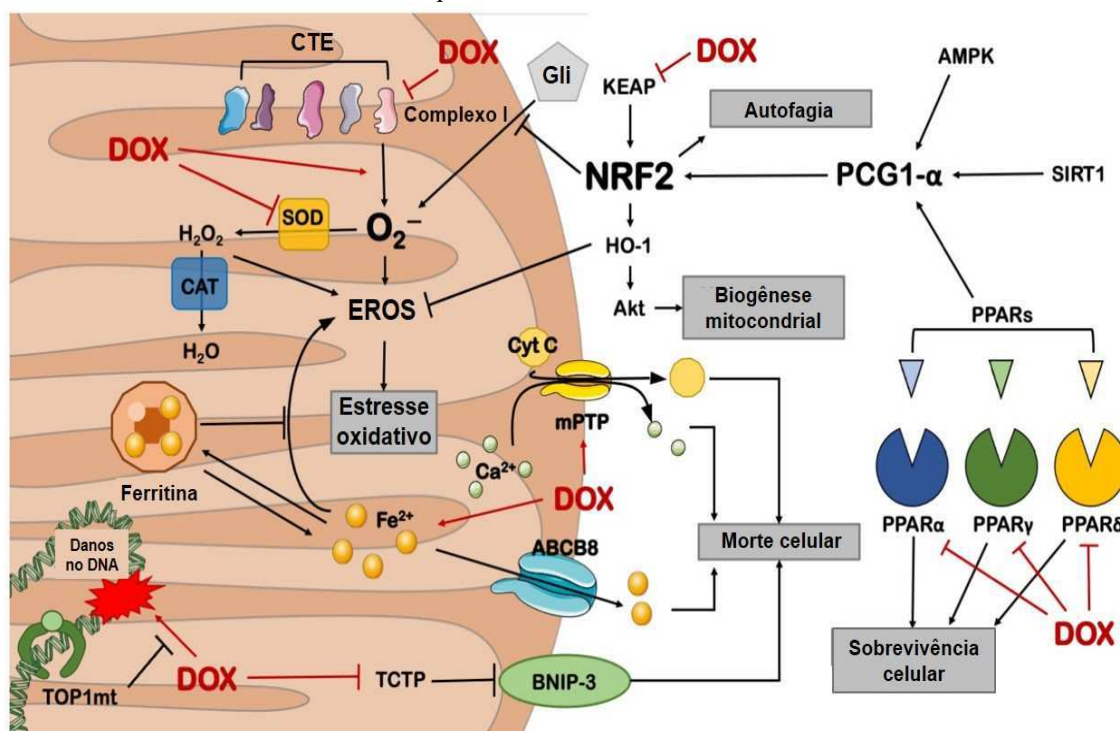
Apesar de sua eficácia no combate ao câncer, a DOX está associada a diversos efeitos adversos, incluindo toxicidade cardíaca, imunossupressão e danos teciduais. Além disso, foi relatado que a DOX pode induzir respostas pró-inflamatórias e pró-angiogênicas dentro de tumores, o que pode impactar a progressão da doença (Abou-Shanab *et al.*, 2025).

2.7.1 Efeitos adversos da doxorubicina

Embora a DOX seja um dos pilares no tratamento do câncer há quase cinco décadas, seu uso é severamente limitado por efeitos colaterais graves. Além dos efeitos adversos comuns geralmente agudos e reversíveis relacionados à quimioterapia, como náusea, vômito, diarreia e supressão da medula óssea, o tratamento com antraciclina está associado a efeitos adversos de longo prazo, a saber, cardiotoxicidade, malignidades relacionadas à terapia e gonadotoxicidade. Esses efeitos adversos de longo prazo impactam severamente a qualidade de vida dos sobreviventes do câncer, o que limita a aplicação posterior de antraciclina (van der Zanden *et al.*, 2021).

O uso prolongado de DOX pode desencadear uma série de efeitos tóxicos, representando um dos principais desafios para sua aplicação clínica. Estudos demonstraram que a DOX pode comprometer significativamente o sistema de defesa antioxidante do organismo ao inibir a expressão de fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), heme oxigenase-1 (HO-1), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione (GSH) e outros níveis, levando eventualmente ao desequilíbrio redox no corpo (Wang *et al.*, 2025). Esse efeito pode ser visualizado na Figura 11, que ilustra os mecanismos pelos quais a DOX induz estresse oxidativo, danos ao DNA e morte celular, além de inibir vias protetoras como a biogênese mitocondrial e a ativação de fatores de sobrevivência celular.

Figura 11. Representação esquemática dos mecanismos pelos quais a doxorubicina induz estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e morte celular, impactando vias antioxidantes e de sobrevivência celular. ABCB8 – membro 8 da subfamília B do cassete de ligação ao ATP; AMPK – proteína quinase ativada por AMP; BNIP-3 – proteína 3 interativa com proteína BCL2 de 19 kD; Cyt C – citocromo C; CTE – cadeia de transporte de elétrons; Gli – glicose; HO-1 – heme oxigenase 1; KEAP – proteína associada à ECH semelhante a Kelch; mPTP – poro de transição de permeabilidade mitocondrial; PGC-1 α – coativador 1 alfa do PPAR γ ; PPAR – receptor ativado por proliferador de peroxissomo; EROS – espécies reativas de oxigênio; SIRT1 – sirtuína 1; TCTP – proteína tumoral controlada translacionalmente; TOP1mt – topoisomerase mitocondrial 1.



Fonte: Adaptado de Schirone *et al.* (2022).

Além disso, a DOX estimula a formação de EROs, causando peroxidação lipídica dos fosfolipídios da membrana celular. Esse mecanismo é responsável por vários efeitos adversos observados durante o tratamento com DOX, incluindo cardiomiopatia (Stec *et al.*, 2025). A produção de radicais livres pela DOX envolve duas vias distintas. A primeira envolve a ação de numerosas redutases dependentes de NADPH na conversão da DOX na semiquinona equivalente da DOX. Os radicais oxigênio e superóxido são produzidos durante o ciclo redox

da semiquinona quinina gerada a partir da DOX. A segunda via usa ferro e processos não enzimáticos. O complexo de radicais livres ferroso-DOX é criado quando ocorre uma reação redox entre o férrico e a DOX. O peróxido de hidrogênio e outras espécies ativas de oxigênio são produzidos quando o oxigênio é reduzido por esse complexo. As EROs induzidas pela DOX levam a uma elevação notável na expressão de biomarcadores inflamatórios (Abdel-Megeed *et al.*, 2024).

Estudos recentes indicam que o excesso de EROs aumenta a peroxidação lipídica, um potencial mecanismo de gatilho de um mecanismo de morte celular dependente de ferro denominado ferroptose, que é mecanicamente distinto da apoptose. Os mecanismos que regulam a ferroptose em condições fisiológicas não são totalmente compreendidos, mas as interrupções genéticas e derivadas da quimioterapia no equilíbrio redox demonstraram induzir a ferroptose em oócitos, levando à redução da qualidade do oócito, diminuição das reservas ovarianas e FOP (Qin *et al.*, 2025).

Nos últimos anos, os mecanismos reguladores da ferroptose nos processos fisiológicos e patológicos do sistema reprodutor feminino, como a SOP, placenta prévia e gravidez ectópica, têm recebido atenção crescente. No entanto, os estudos sobre distúrbios reprodutivos relacionados à ferroptose ainda são limitados e inconsistentes, e poucos estudos sobre morte por ferro na FOP foram relatados até agora (Mo *et al.*, 2025). A DOX também pode causar danos ovarianos significativos (Tabela 1) (Nguyen *et al.*, 2025). Seu uso tem sido associado à depleção dos folículos primordiais e à disfunção ovariana, resultando na depleção da reserva ovariana e consequente FOP (Silva *et al.*, 2023). O dano ao DNA induzido pela DOX ativa mediadores da via Tp53 em células ovarianas, sendo o p53 um dos principais reguladores desse processo. Além de sua função como supressor tumoral, o p53 atua como regulador do ciclo celular, indutor de apoptose e mediador da resposta ao dano genômico (Abdel-Megeed *et al.*, 2024; Nguyen *et al.*, 2025).

Tabela 1. Propriedades gonadotóxicas da Doxorubicina em estudos realizados em modelos animais. Via intraperitoneal (ip); Via intravenosa (vi).

Medicamento	Modelo	Dose	Duração	Efeitos no ovário	Autor
Doxorrubicina	Camundongos CD-1 de 5 dias, 21 dias ou 8 semanas	10 mg/kg (ip)	Dose única	Depleção da reserva ovariana, atresia dos folículos primordiais, ativação excessiva dos folículos primordiais	Wang <i>et al.</i> , 2019
	Camundongos ICR de 7 a 8 semanas de idade	10 mg/kg (vi)	Dose única	Efeitos sobre os oócitos	Bar-Joseph <i>et al.</i> , 2010

Camundongos ICR de 4 semanas ou 7–8 semanas de idade	7,5 ou 10 mg/kg (ip)	Dose única	Redução do tamanho e peso do ovário, redução da ovulação, redução da população de folículos primordiais e folículos secundários	Ben-Aharon <i>et al.</i> , 2010
Camundongos C57BL/6 ou 129/Sv de 6 semanas ou 10–22 semanas de idade	10 mg/kg (ip)	Dose única	Expressão prejudicada de colágeno IV, células luteínicas menos diferenciadas (citoplasma menor, expressão reduzida de StAR)	Andersen <i>et al.</i> , 2021
Ratos Sprague-Dawley	15 mg/kg (dose cumulativa; ip)	7 injeções	Diminuição do número de folículos, diminuição do volume dos ovários e do útero	Samare-Najaf <i>et al.</i> , 2020

Fonte: Adaptado de Markowska *et al.* (2024).

Notavelmente, apesar de sua passagem limitada pela barreira hematoencefálica (BHE), a DOX ainda pode causar neurotoxicidade grave no cérebro, e vários estudos clínicos relataram que pacientes de todas as idades tratados com DOX exibiram capacidade prejudicada em avaliações cognitivas (DU *et al.*, 2021).

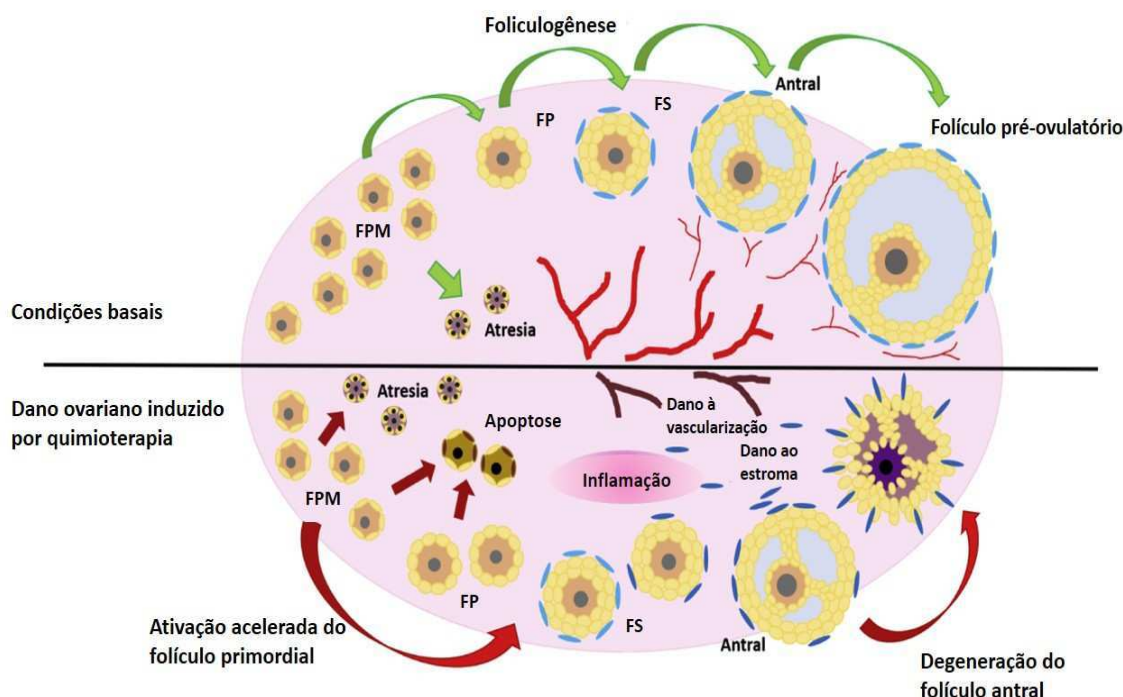
2.7.2 Impacto da toxicidade ovariana na fertilidade e na fisiologia reprodutiva

O dano ovariano induzido por antineoplásicos é um problema significativo para mulheres em idade reprodutiva, pois pode levar à FOP e à infertilidade. Especificamente, a quimioterapia antineoplásica com agentes alquilantes é conhecida por induzir estresse oxidativo, danos ao DNA em tecidos ovarianos, levando à ativação folicular acelerada, atresia, apoptose e danos vasculares, além do esgotamento das reservas foliculares e da redução da qualidade dos oócitos (Figura 12) (Ramírez-Martín *et al.*, 2025).Entretanto, as taxas de amenorreia após uso de DOX parecem variar drasticamente com a idade, mulheres de 40 a 49 anos apresentam uma taxa de amenorreia de 96% em comparação com pacientes mais jovens, com taxas variando de menos de 10% a 34% (Ben-Aharon; Shalgi, 2012).

Além de impactar diretamente os folículos ovarianos, os antineoplásicos também afetam o estroma e a vasculatura ovariana, o que afeta indiretamente a fertilidade e a função ovariana (Lima de Andrade *et al.*, 2024; Üstüner *et al.*, 2024). Ademais, estudos *in vitro* com murinos mostraram que a exposição a DOX afeta a estrutura normal do estroma ovariano, contribuindo para atrofia ovariana (Assis *et al.*, 2022). O tratamento com DOX também compromete as células da granulosa, causando disfunção mitocondrial devido à presença excessiva de EROs, que desencadeiam apoptose celular. Um estudo que cultivou folículos

ovarianos de camundongos expostos à DOX por 24 horas analisou a secreção hormonal, o desenvolvimento folicular e a maturação do oócito, revelando um efeito dose-dependente sobre a sobrevivência dos folículos. As taxas de sobrevivência foram de 90% para folículos tratados com 100 nM de DOX e de apenas 50% para aqueles expostos a 200 nM, em comparação com os controles no segundo dia de experimento (Xiao *et al.*, 2017).

Figura 12. Efeitos dos danos causados por antineoplásicos no ovário: perda de folículos primordiais por apoptose, ativação acelerada de folículos primordiais, atresia folicular, inflamação estromal, dano ao tecido estromal ou dano à vascularização intraovariana. FPM: folículos primordiais; FP: folículos primários; FS: folículos secundários.



Fonte: Adaptado de Donnez (2020).

A DOX também compromete os vasos sanguíneos corticais no modelo murino, bem como no ovário humano, induzindo fibrose. Evidências sugerem que a DOX atravessa a membrana basal do folículo e se acumula no DNA e nas mitocôndrias do oócito (Spears *et al.*, 2019). Além disso, a função mitocondrial prejudicada nas células estromais ovarianas surge como um fator fundamental na inflamação e fibrose do estroma, potencialmente impedindo o crescimento do folículo. A disfunção mitocondrial, caracterizada pela produção prejudicada de trifosfato de adenosina (ATP), dinâmica mitocondrial alterada e aumento da produção de EROs, causando estresse oxidativo. Essa cascata desencadeia inflamação e apoptose, facilitando a ativação dos fibroblastos e a deposição de proteínas da matriz extracelular no estroma ovariano (Zhu *et al.*, 2025).

O sistema de defesa antioxidante *in vivo*, composto por enzimas como SOD, CAT, GPx, tioredoxina redutase (TrxR), HO-1 e NAD(P)H quinona oxidoredutase 1 (NQO1), juntamente com componentes não enzimáticos, regula os níveis de EROs. No entanto, a

capacidade antioxidante desses sistemas diminui com a idade. A suplementação com substâncias como glutatona, selênio, vitamina C, resveratrol, coenzima Q10 e melatonina demonstrou mitigar o estresse oxidativo. SOD1, um oxidante intracelular essencial, converte radicais superóxido prejudiciais em peróxido de hidrogênio, que é posteriormente neutralizado em água e oxigênio. Camundongos fêmeas sem SOD1 exibem sinais de envelhecimento reprodutivo acelerado, incluindo menores taxas de prenhez, menores tamanhos de ninhadas e redução do tamanho do corpo lúteo e dos níveis de progesterona (Qin *et al.*, 2025).

Os efeitos dos agentes antineoplásicos diferem em seus efeitos sobre a função ovariana dependendo de fatores específicos da paciente, especialmente a idade. Além disso, a reserva ovariana basal e a duração do tratamento podem contribuir para o resultado de fertilidade de uma paciente, no entanto, o aspecto multifatorial e a falta de informações prognósticas precisas tornam difícil para os clínicos fornecerem informações específicas sobre a magnitude dos potenciais efeitos gonadotóxicos (Roof *et al.*, 2024).

A figura 13 ilustra, de forma esquemática, as vias de estresse celular ativadas em resposta à DOX que podem desencadear danos em uma célula ovariana, que culminam em apoptose. O estresse do retículo endoplasmático (mediado por PERK) leva à ativação da caspase 12 e calpaína, que se comunica com a mitocôndria, promovendo aumento de cálcio intracelular e liberação do citocromo C. Paralelamente, há ativação da caspase 2, contribuindo para a cascata apoptótica. No núcleo, a DOX causa estresse genotóxico, ou seja, danos ao DNA. Esse dano ativa a proteína Ataxia Telangiectasia Mutante (ATM), que é uma quinase envolvida na resposta ao dano no DNA. A ATM, por sua vez, estimula a proteína p53, um fator de transcrição que regula a expressão de genes envolvidos na resposta ao estresse e na apoptose. A ativação da p53 leva à fragmentação do DNA, um dos principais sinais de morte celular programada. Além disso, a proteína poli(ADP-ribose) polimerase (PARP) também é ativada em resposta ao dano no DNA, contribuindo para os processos de reparo ou, quando o dano é severo, para a apoptose (Sun *et al.*, 2025; Mohan *et al.*, 2021). Além disso, a DOX pode comprometer a homeostase do cálcio (Ca^{2+}), afetando o potencial transmembrana e a permeabilidade mitocondrial. Um estudo conduzido com folículos ovarianos secundários tratados com DOX (200 nM) revelou um aumento nos níveis de Ca^{2+} no citosol, enquanto os níveis de Ca^{2+} no retículo endoplasmático diminuíram e permaneceram baixos ao longo do experimento. Isso indica que a DOX pode induzir a liberação de cálcio do retículo endoplasmático, um fator crucial para o equilíbrio celular. Esse achado é relevante, pois a homeostase do cálcio desempenha um papel essencial na fisiologia do oócito, no crescimento folicular e na regulação da secreção de gonadotrofinas. Além disso, a DOX mostrou reduzir significativamente a

com câncer atraíram ampla atenção desde que a “oncofertilidade” foi proposta pela primeira vez em 2007 (Xie *et al.*, 2024). A medida que mais pacientes na pré-menopausa passam por tratamentos de câncer, a necessidade de aconselhamento sobre fertilidade e de estratégias para preservação ovariana torna-se cada vez mais evidente (Roof *et al.*, 2024). Assim, é fundamental desenvolver abordagens que protejam os ovários dos efeitos adversos da quimioterapia ou que otimizem sua função após o término do tratamento oncológico (Ramírez-Martín *et al.*, 2025).

É importante destacar que qualquer estratégia para reduzir os efeitos adversos dos agentes quimioterápicos no ovário necessita da combinação certa de fármacos. Por exemplo, o imatinibe protegeu os ovários de camundongos recém-nascidos de danos causados pela cisplatina, mas não pela DOX, evidenciando que diferentes agentes quimioterápicos afetam os ovários por mecanismos distintos (Morgan *et al.*, 2013). Há um interesse crescente na terapia combinada que se baseia na administração de dois ou mais medicamentos que atuam em diferentes locais-alvo, dificultando a mutação e a adaptação das células cancerígenas a novas condições. Os efeitos sinérgicos observados entre diferentes tipos de medicamentos podem levar a uma redução da dosagem, toxicidade, resistência e a um aumento da eficiência terapêutica (Kazantseva *et al.*, 2022). Nesse contexto, o uso de compostos naturais com propriedades antioxidantes pode ser uma estratégia promissora para prevenir ou atenuar os danos ovarianos induzidos pela DOX (Silva *et al.*, 2023). A administração de agentes de proteção ovariana antes ou junto com a quimioterapia pode aliviar os danos à reserva ovariana, sendo adequado para pacientes de todas as idades e estágios de vida, essas aplicações podem ser promissoras na preservação da fertilidade (Xie *et al.*, 2024).

2.9 Propriedades terapêuticas da *Aloe vera*

A *Aloe vera* é uma planta medicinal suculenta, sem caule, pertencente à família *Liliaceae*, com folhas túrgidas, lanceoladas, com pontas afiadas e bordas irregulares (Figura 14). A palavra árabe “Alloeh”, que significa brilhante e amargo, é a fonte do nome *Aloe vera*. Fisiologicamente, o membro mais ativo do gênero *Aloe* é *Aloe barbadensis*. Com mais de 75 compostos bioativos, é amplamente utilizado na China, Índia e Egito, e tem sido utilizada para fins medicinais desde os tempos antigos, e ainda é usada para fazer cosméticos, medicamentos e alimentos para humanos (Khan *et al.*, 2022). A *Aloe vera* ganhou popularidade pela primeira vez com o relato de seu sucesso no tratamento de queimaduras de raios X nos Estados Unidos na década de 1930 (Bala *et al.*, 2017).

Figura 14. *Aloe vera* cultivada diretamente no solo.



Fonte: Autor.

As folhas maduras das plantas *Aloe vera* são compostas por três camadas principais: epiderme verde externa que protege a planta e sintetiza proteínas e carboidratos; a camada intermediária produtora de látex sintetizando seiva amarela contendo antraquinona e glicosídeos, e o mesofilo parenquimatoso interno macio, transparente e escorregadio — a única fonte de gel de *Aloe vera* - A *Aloe vera* é cultivada principalmente pela camada interna, que é uma substância esbranquiçada, viscosa, semissólida e transparente, semelhante a um gel, com potencial terapêutico (Jodhani *et al.*, 2025). Suas folhas armazenam água em células de parênquima contendo mucilagem viscosa, composta principalmente de polissacarídeos, enzimas, minerais e ácidos orgânicos, com um teor de água superior a 98% (Gome *et al.*, 2025; Laux A, Gouws C, Hamman, 2019). O gel de *Aloe vera* é aprovada pela FDA como um aditivo alimentar para consumo humano devido à sua segurança e compatibilidade com aplicações de grau alimentício. É comumente usada em bebidas em todo o mundo, e processos industriais foram desenvolvidos para preservar suas propriedades nutricionais, semelhantes às usadas nas indústrias cosméticas (Gome *et al.*, 2025).

A *Aloe vera* tem sido usada há séculos como um remédio popular por seu poder de cura, por exemplo, no tratamento de queimaduras solares, hidratando e acelerando a cicatrização de feridas. Vários trabalhos relataram que o acemanano é responsável pelas

propriedades semelhantes à mucilagem do gel de *Aloe vera*, que se espera ser uma matriz conectiva flexível potencial. Além disso, é relatado que o acemanano possui várias propriedades terapêuticas, como propriedades antiinflamatórias e anticancerígenas ou promoção da regeneração óssea (Huynh *et al.*, 2025). A ação combinada de vitaminas, aminoácidos, compostos fenólicos, enzimas, minerais, ácidos orgânicos, lipídios e carboidratos contidos neste gel parece ser responsável pelas múltiplas propriedades benéficas da *Aloe vera* (Fehrmann-Cartes *et al.*, 2020). Ademais, a *Aloe vera* é bem conhecida por suas propriedades hidratantes, antiinflamatórias, antioxidantes, anticancerígenas, antibacterianas, antivirais e antifúngicas (Paul *et al.*, 2020; Irfan *et al.*, 2024). A atividade anti-inflamatória com possível regulação negativa de MMP-9 em células sanguíneas foi encontrada em extrato aquoso de *Aloe vera*. A aplicação de sua preparação de gel tópico foi encontrada para acelerar o tempo de cicatrização de queimaduras e induzir epitelização. Também aumenta a contração da ferida, alinhamento e organização do tecido cicatricial regenerado e exerce ações antimicrobianas e antifúngicas (Widjaja *et al.*, 2023).

O potencial antioxidante da *Aloe vera* é devido aos flavonoides, carotenoides, alfa-tocoferol e ácido ascórbico, que podem auxiliar na eliminação dos íons hidroxila e na produção da proteína crucial metalotioneína e também podem melhorar o nível de SOD e GPX (Nauroze *et al.*, 2024). Dessa forma, a *Aloe vera* como uma fonte de antioxidantes natural *in vitro*, pode ter aplicação na redução da peroxidação lipídica/estresse oxidativo com consequentes benefícios à saúde (Mirzaalizadeh *et al.*, 2018). A atividade de eliminação de radicais livres do extrato da folha de *Aloe vera* é de 67% a 89% (de 50 a 300 µg/ml) (Majumder *et al.*, 2020). Nesse sentido, os antioxidantes naturais têm atraído considerável interesse devido à sua suposta segurança, potenciais efeitos nutricionais e terapêuticos. Extratos vegetais e produtos naturais oferecem uma solução alternativa como radioprotetores devido à sua baixa toxicidade em seus níveis ideais de dose protetora (Bala *et al.*, 2017).

Estudos mostram que plantas como *Aloe vera* melhoram a fertilidade aumentando o número de folículos ovarianos (Manouchehri *et al.*, 2023). Dey *et al.* (2022) em seu estudo observou a eficácia do LP3, isolado do gel de *Aloe vera*, contra a SOP induzida por letrozol em camundongos. O grupo com LP3 exibiu folículos maduros, corpos lúteos e poucos folículos císticos e atresícos, podendo ser usado no tratamento da SOP como uma alternativa à metformina. Em um estudo anterior também foi observado que a formulação de gel de *Aloe vera* exerce um efeito protetor contra o fenótipo da SOP restaurando o estado esteroide ovariano e alterando a atividade esteroidogênica chave. Isso pode ser atribuído aos fitocomponentes presentes no extrato (Maharjan *et al.*, 2010). Ademais, em ratas albinas Wistar que receberam

Aloe vera foi observado por meio da análise histológica que os ovários apresentavam alterações que implicavam um efeito angiogênico e um efeito semelhante ao do hormônio foliculo-estimulante nos ovários (Kosif; Aktas, 2009). Além disso, o uso do gel de *Aloe vera* é bem tolerado, seu uso foi descrito em medicamentos veterinários. O extrato de gel tem sido usado no tratamento de uma série de condições externas em muitos animais. Essas condições incluem micose, alergias, abscessos, infecções fúngicas, vários tipos de inflamação, dor e coceira. Dessa forma, as atividades antioxidantes e imunossupressoras da *Aloe vera* foram indicadas (Werawatganon *et al.*, 2014).

Em estudos *in vitro*, observou-se que a adição de *Aloe vera* ao meio de cultivo em concentração de 10% aumentou a expressão de mRNA de genes antioxidantes, como PRDX6, GPX1 e SOD, em tecidos ovarianos vitrificados, promovendo a ativação e o desenvolvimento folicular e preservando a viabilidade dos folículos (Costa *et al.*, 2021). Além disso, 2,5% de *Aloe vera* favoreceu a formação do antro, a viabilidade e a expressão de mRNA para SOD em folículos secundários cultivados, mas concentrações mais altas de *Aloe vera* têm efeitos negativos na ultraestrutura folicular (Azevedo *et al.*, 2022). No entanto, ainda são escassos os estudos que avaliam, de forma integrada, os efeitos da *Aloe vera* sobre o ovário de camundongos expostos à doxorrubicina.

2.10 Relevância da preservação da função ovariana em pacientes oncológicas

A *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) e a *European Society for Medical Oncology* (ESMO) recomendam que os profissionais de saúde que cuidam de pacientes com câncer abordem a possibilidade de infertilidade e discutam abordagens de preservação da fertilidade o mais cedo possível antes do início do tratamento, independentemente do tipo ou estágio da doença (Hernández Martínez *et al.*, 2025). O momento certo para as discussões sobre preservação da fertilidade é um desafio significativo para os profissionais de saúde. De acordo com as diretrizes de prática clínica da ASCO, discussões precoces e abrangentes antes do tratamento são essenciais para fornecer opções aos pacientes e melhorar a qualidade de vida de forma geral (Wang *et al.*, 2025; Ferro *et al.*, 2023).

A preservação da fertilidade ganhou força nos últimos anos. À medida que as taxas de sobrevivência ao câncer melhoram, os efeitos tardios da perda da função gonadal aumentaram a necessidade de considerar a preservação da fertilidade (Latif *et al.*, 2023). Mais de 80% dos pacientes infantis e adolescentes com câncer se tornam sobreviventes de longo prazo. Pesquisas atuais sugerem a necessidade do desenvolvimento de uma estratégia nacional para garantir que pacientes pediátricos submetidos a regimes gonadotóxicos sejam educados,

junto com suas famílias, sobre opções de fertilidade e resultados posteriores (Brungardt; Burns; Dasgupta, 2022). Além disso, vários estudos relatam que os pacientes possuem desejo por filhos biológicos futuros no momento do diagnóstico em cerca de metade dos pacientes jovens com câncer, e que suas principais preocupações gerais eram o medo do aumento do risco de câncer pessoal ou da prole e a incapacidade de cuidar de seus filhos em caso de recidiva da doença. Notavelmente, 51–66% dessas pacientes relataram estar preocupadas em se tornarem inférteis e, em um quarto dos casos, as preocupações com a fertilidade afetaram a tomada de decisão sobre o tratamento (Moragón *et al.*, 2021).

De acordo com as recomendações de preservação da fertilidade de pacientes femininas com câncer, para mulheres que desejam ser mães no futuro, a criopreservação do tecido ovariano, o congelamento de oócitos, o congelamento de embriões, o transplante de ovário artificial e outras abordagens de preservação da fertilidade podem ser usadas. Atualmente, com a ajuda da tecnologia de congelamento de tecido ovariano, mais de 200 bebês nasceram em todo o mundo, e o primeiro na China nasceu com sucesso em 2021. No entanto, as células tumorais acompanharão a circulação sanguínea no tecido ovariano, e o transplante de tecido ovariano contendo células tumorais pode fazer com que o câncer recidive (Ren *et al.*, 2023). Além disso, a criopreservação de tecido ovariano é discutida mais detalhadamente na seção pré-púbere. A criopreservação de oócitos requer 1–2 semanas de estimulação ovariana para coleta ideal de oócitos, o que pode atrasar o tratamento. Isso pode ser preocupante para a quimioterapia. Embora muitas vezes a família e a equipe de oncologia possam elaborar um plano razoável para atraso, isso pode não ser recomendado para certos pacientes e cânceres. Ademais, a técnica possui um custo alto, variando de US\$ 12.000 a US\$ 20.000 para o processo inicial, mas deve ser discutido que o uso de oócitos preservados exigirá fertilização *in vitro* no futuro, o que pode adicionar outros US\$ 12.000 a US\$ 15.000 no futuro. Como em todas as criopreservações, também há uma taxa anual de armazenamento, que varia de US\$ 300 a US\$ 1.000 (Vogt; Malhotra, 2024).

Nesse sentido, a proteção dos ovários contra danos e distúrbios de fertilidade associados à exposição a agentes quimioterápicos criou um novo campo, a “oncofertilidade”, que se preocupa com a preservação da função hormonal ovariana e da fertilidade e com a prevenção da FOP (Markowska *et al.*, 2024). Com mais mulheres sobrevivendo ao câncer após quimioterapia ou adiando a idade da maternidade, o foco mudou para o desenvolvimento de estratégias para proteger a função ovariana e a fertilidade feminina contra os efeitos deletérios da quimioterapia (Ramírez-Martín *et al.*, 2025). Atualmente, a cultura *in vitro* de folículos pré-antrais e a obtenção de oócitos maduros podem efetivamente evitar o risco de recorrência

do tumor após a remigração (Ren *et al.*, 2023). Assim, várias terapias atuais podem ser utilizadas em combinação, ou podem ser usadas sozinhas no futuro. Essas estratégias podem auxiliar mulheres jovens que não são elegíveis para métodos convencionais devido à idade ou tempo limitado antes do início do tratamento da doença (Kim *et al.*, 2021).

A taxa de morbidade de FOP na população é de 1% a 5%, embora tenha aumentado significativamente nos últimos anos. Mais importante, a maioria dos FOP ocorre em mulheres jovens que têm uma alta predisposição genética, o que tem um sério impacto na saúde reprodutiva das mulheres. A terapia de reposição hormonal (TRH) é um tratamento amplamente utilizado para melhorar a função folicular equilibrando os níveis de estrogênio. No entanto, não há medicamentos clínicos para tratar a infertilidade em pacientes com POF. Dado que o FOP é atualmente reconhecido como um dos principais gatilhos da infertilidade feminina, é importante encontrar medicamentos seguros e eficazes para restaurar a função ovariana em pacientes com FOP (Hong *et al.*, 2025). Adicionalmente, o adiamento da gravidez, comum nos dias de hoje, tem levado ao aumento das taxas de infertilidade. As TRH não conseguem superar completamente o declínio reprodutivo associado à idade avançada da mulher. O envelhecimento reprodutivo também está relacionado a uma maior incidência de osteoporose, doenças cardiovasculares e disfunção neurológica após a menopausa (Gu *et al.*, 2025). A TRH se tornou mais acessível e popular como alternativa para contornar a perda de quantidade e qualidade dos oócitos, além das dificuldades com fertilização e embriogênese. Estratégias adjuntas, como a criopreservação de oócitos e de tecido ovariano, também se aperfeiçoaram, aumentando as taxas de sucesso. No entanto, essas estratégias têm limitações, pois abordam os efeitos da perda ovariana sem atacar diretamente sua causa — o envelhecimento ovariano. Embora permitam que uma mulher tente engravidar, não garantem o sucesso reprodutivo, uma vez que a qualidade dos oócitos diminui com a idade, tornando a idade materna avançada o fator mais comum para o fracasso da fertilização *in vitro* (King *et al.*, 2024). Dessa forma, a preservação da fertilidade é um setor crescente da saúde reprodutiva, devido à tecnologia aprimorada e a um número crescente de indicações clínicas além daquelas relacionadas à oncologia (Henry *et al.*, 2023). Dessa forma, o fornecimento de informações e suporte precisos, bem como opções realistas para proteção e preservação da fertilidade, para esses pacientes jovens e suas famílias, é absolutamente possível. Também é uma parte fundamentalmente importante da medicina reprodutiva, em termos de processos clínicos e avanço científico (Stern; Agresta, 2019).

3 JUSTIFICATIVA

Com o aumento do número de pacientes que sobrevivem ao câncer, torna-se essencial reconhecer a preservação da fertilidade como prioridade, alocando recursos para o aprimoramento contínuo de protocolos integrados à oncoterapia, de modo que, em um futuro próximo, seja possível proteger a reserva ovariana durante o tratamento. O desenvolvimento de novas estratégias para a preservação dos folículos ovarianos de pacientes submetidas a agentes antineoplásicos requer um entendimento dos mecanismos que regulam a sobrevivência e morte folicular. A doxorrubicina, um antineoplásico amplamente utilizado, induz a depleção acelerada da reserva ovariana, efeito que tem sido associado, em parte, à indução de estresse oxidativo e de processos inflamatórios no ovário. Diante disso, torna-se imperativa a busca por estratégias adjuvantes capazes de atenuar esses efeitos deletérios. Nesse contexto, compostos naturais com comprovada ação antioxidante e anti-inflamatória emergem como potenciais agentes citoprotetores. A *Aloe vera*, em particular, apresenta um perfil bioativo rico em polissacarídeos, compostos fenólicos e vitaminas que já demonstraram, em diferentes modelos celulares e teciduais, reduzir marcadores de dano oxidativo e modular respostas inflamatórias, protegendo células sujeitas a insultos químicos (Huynh *et al.*, 2025). No entanto, ainda são escassos os estudos que avaliam, de forma integrada, os efeitos da *Aloe vera* sobre o ovário de camundongos expostos à doxorrubicina. O uso de modelos experimentais com roedores, por sua vez, é de grande relevância, pois permite a padronização de protocolos e o aprimoramento de técnicas reprodutivas, podendo servir de base para outras espécies, incluindo humanos.

Este estudo se destaca pela inovação ao investigar os efeitos da *Aloe vera* na preservação da função ovariana, especialmente em condições de estresse oxidativo induzido. Sua originalidade é ainda mais evidente pela avaliação da *Aloe vera* tanto em modelo *in vitro* quanto *in vivo*, o que possibilita uma análise abrangente de seu potencial protetor e de suas implicações terapêuticas para a preservação da fertilidade. Ao explorar os efeitos da *Aloe vera* sobre o desenvolvimento folicular e a integridade do estroma ovariano, esta pesquisa abre caminho para estratégias terapêuticas que visam preservar a fertilidade. Diante do impacto devastador da terapia antineoplásica sobre a reserva ovariana, os resultados deste estudo poderão contribuir significativamente para o desenvolvimento de novas abordagens reprodutivas em humanos e em animais, ampliando estratégias biotecnológicas e fortalecendo a reprodução assistida no Brasil e no mundo.

4 HIPÓTESES CIENTÍFICAS

Diante do exposto, foram formuladas as seguintes hipóteses científicas:

A adição de *Aloe vera* ao cultivo *in vitro* de ovários de camundongos *Swiss* fêmeas promove a ativação e desenvolvimento folicular mantendo a morfologia adequada das células foliculares e do tecido ovariano.

Os efeitos *in vitro* da *Aloe vera* no ovário de camundongos *Swiss* fêmeas são mediados pelas vias antioxidante e anti-inflamatória.

A *Aloe vera* protege os folículos e o estroma ovariano contra os danos induzidos pela doxorrubicina em ovário de camundongos *Swiss* fêmeas *in vivo*.

A *Aloe vera* age no ovário de camundongos *Swiss* fêmeas *in vivo* reduzindo o estresse oxidativo e a inflamação.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

- Discutir as estratégias para a proteção contra os danos ovarianos induzidos pela quimioterapia, com ênfase no papel dos compostos naturais.
- Investigar o potencial do extrato de *Aloe vera* na atenuação dos efeitos adversos da doxorrubicina sobre a função ovariana de camundongos *Swiss* fêmeas, utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*.

5.2 Objetivos específicos

- Analisar os efeitos dos compostos naturais na preservação da integridade dos folículos ovarianos em murinos submetidos à quimioterapia.
- Avaliar, por histologia clássica, a morfologia, ativação e desenvolvimento folicular, além da densidade estromal, em ovários cultivados *in vitro* por 6 dias com doxorrubicina (0,3 µg/mL) e *Aloe vera* (5, 10, 25 ou 50%);
- Analisar a organização da matriz extracelular, com base na quantificação dos níveis de colágeno nos ovários cultivados *in vitro* por 6 dias;
- Investigar, por imunohistoquímica, a expressão da citocina inflamatória TNF- α nos ovários cultivados *in vitro* por 6 dias;
- Avaliar, por RT-qPCR, a expressão relativa de RNAm dos genes antioxidantes (*NRF2*, *SOD* e *CAT*) e do gene inflamatório (*TNF- α*) nos ovários cultivados *in vitro* por 6 dias;
- Avaliar, por histologia clássica, a morfologia, ativação e desenvolvimento folicular, além da densidade estromal, em ovários de camundongos *Swiss* fêmeas tratados *in vivo* com *Aloe vera* (0,1, 1,0 ou 10 mg/kg) e doxorrubicina (10 mg/kg);
- Analisar a configuração da matriz extracelular nos ovários de camundongos *Swiss* fêmeas tratados *in vivo*, com base na quantificação dos níveis de colágeno;
- Investigar, por imunohistoquímica, a expressão de TNF- α como marcador inflamatório nos ovários de camundongos *Swiss* fêmeas tratados *in vivo*;
- Avaliar, por RT-qPCR, a expressão de RNAm dos genes antioxidantes (*NRF2*, *SOD* e *CAT*) e inflamatório (*TNF- α*) nos ovários camundongos *Swiss* fêmeas tratados *in vivo*;

6 CAPÍTULO I

Effects of Natural Antioxidants on the Preservation of Reproductive Physiology in Mice Treated with Chemotherapeutic Agents: A Systematic Review

[Efeitos de antioxidantes naturais na preservação da fisiologia reprodutiva em camundongos
tratados com agentes quimioterápicos: uma revisão sistemática]

Manuscrito submetido ao periódico: *Reproductive Sciences*
Qualis CAPES A2 (área de Biotecnologia); Fator de impacto (2024): 2,5

Effects of Natural Antioxidants on the Preservation of Reproductive Physiology in Mice Treated with Chemotherapeutic Agents: A Systematic Review

Ernando I. T. de Assis¹, Jhonatta P. Costa¹, José R. V. Silva^{1*}

¹ Federal University of Ceara, Laboratory of Biotechnology and Physiology of Reproduction (LABIREP), Av. Maurocélío Rocha Ponte 100, CEP 62041-040, Sobral, CE, Brazil.

*Corresponding author: José R. V. Silva (jrvsilva@ufc.br), ID ORCID: 0000-0002-5970-6177; Federal University of Ceara, Av. Mauricélio Rocha Ponte 100, CEP 62041 040, Sobral, CE, Brazil. Phone/Fax: +55 8836118000.

ORCID: Ernando I. T. de Assis - 0000-0001-8164-3937; Jhonatta P. Costa - 0000-0001-8528-8901; José R. V. Silva - 0000-0002-5970-6177.

Abstract

Chemotherapy, while essential for cancer treatment, entails side effects that impair reproductive function, often leading to premature ovarian failure (POF). Based on the question "What is the impact of natural compounds on the preservation of reproductive physiology in mice subjected to chemotherapy treatment?", this systematic review investigated the role of these protective agents in murine models. Searches were conducted in the PubMed and Scopus databases using specific terms such as: "natural products, chemotherapy and ovary", "doxorubicin, ovary and mice", "cisplatin, ovary and mice", and "Cyclophosphamide, ovary and mice". Experimental studies conducted in mice from 2019 to December 2024 were included. The 11 included studies demonstrated that natural antioxidants compounds play a crucial role in preserving ovarian follicle integrity by reducing apoptosis levels and attenuating chemotherapy-induced oxidative stress. Specifically, resveratrol and gallic acid showed significant protection of ovarian follicles in mice treated with doxorubicin, while quercetin and epigallocatechin-3-gallate mitigated

damage induced by cyclophosphamide. Rosmarinic acid and rutin preserved the ovarian follicles in mice undergoing cisplatin treatment. Additionally, phenolic acids (protocatechuic and gallic), *Amburana cearensis* extract, flavonoids (rutin and quercetin), polyphenols (resveratrol and epigallocatechin-3-gallate), rosmarinic acid and curculigoside demonstrated follicle preservation via modulation of the PTEN/Akt and AKT/mTOR pathways, regulation of autophagy, and enhanced antioxidant defense. These findings highlight the potential of natural antioxidant compounds as adjuvants in protecting ovarian function, offering promising prospects for fertility preservation. Clinical application requires further studies to confirm the safety and efficacy of natural compounds without compromising chemotherapy.

Keywords: Chemotherapy; Natural products; Fertility; Ovary; Mice.

Introduction

Chemotherapy aims to interrupt or prevent the proliferation of cancer cells, thus constituting the primary therapeutic strategy in oncology [1]. Anticancer drugs represent a broad and diverse array of medications [2]. Over the past decades, significant therapeutic advances have been achieved in oncology, contributing to improved survival rates among children and young adults. Nevertheless, reproductive function is often compromised, leading to subsequent premature ovarian failure (POF) [3], due to the interaction of antineoplastic drugs with healthy ovarian cells [2]. The POF is defined as the loss of ovarian function before the age of 40, with diagnostic criteria including the occurrence of oligomenorrhea or amenorrhea for at least four months and two or more basal follicle-stimulating hormone (FSH) measurements >25 mIU/mL, taken at least four weeks apart. According to etiology, POF can be classified into primary and secondary forms, with chemotherapy-induced POF being categorized as the secondary type [4].

Chemotherapy disrupts the delicate balance of the ovarian microenvironment, thereby reducing oocyte developmental competence and increasing follicular atresia [5]. Consequently, various agents and a number of protective strategies have been developed to mitigate the adverse effects of chemotherapy on the ovaries. Available options include embryo, oocyte, and ovarian tissue cryopreservation. Furthermore, Kartlasimis *et al.* [6] reported the use of agents such as sphingosine-1-phosphate, tamoxifen, crocetin, mechanistic target of rapamycin complex inhibitors, and tyrosine kinase inhibitors to counteract the damage caused by alkylating agents. These agents improve follicular and ovarian vascular development, preventing follicular death. However, it remains imperative to demonstrate that these agents not only protect the ovary from damage but also do not impair the efficacy of chemotherapy itself [7].

In recent years, natural antioxidants have attracted increasing attention due to their low toxicity and potential to modulate oxidative stress and inflammatory processes in cells, potentially alleviating the side effects of chemotherapy on healthy tissues [8]. Moreover, natural compounds can exert anticancer effects by targeting cancer stem cells and inhibiting their signaling pathways. Phytochemicals, characterized by low toxicity, efficacy at minimal doses, and a broad spectrum of biological activities—such as anti-inflammatory, antiproliferative, antioxidant, and anticancer effects—are promising candidates for cancer treatment [9]. Therefore, understanding the mechanisms underlying ovarian damage is crucial to the development of therapeutic strategies capable of mitigating these effects and preserving fertility. In this context, increasing interest has been directed toward protective approaches, with particular emphasis on natural compounds whose antioxidant and anti-inflammatory properties show potential in attenuating chemotherapy-induced damage.

This study aims to discuss strategies for protecting against chemotherapy-induced ovarian damage, with a particular focus on the role of natural compounds. Accordingly, this

research seeks to answer the following questions: What is the impact of natural compounds on the preservation of reproductive physiology in mice undergoing chemotherapy? What is the efficacy and safety profile of these compounds?

Methodology

Protocol Registration and Reporting Guideline

The protocol for this systematic review was registered in PROSPERO (CRD420250622133) under the title *"Evaluation of the Effect of Natural Compounds on the Preservation of Reproductive Physiology in Mice Treated with Chemotherapy: A Systematic Review."* To ensure transparency and reporting quality, this study was conducted in accordance with PRISMA guidelines.

Data Sources and Search Strategy

Searches were conducted from 2019 to December 2024 in the PubMed and Scopus databases. The search strategy employed the following terms: “natural products and chemotherapy and ovary,” “doxorubicin and ovary and mice,” “cisplatin and ovary and mice,” and “Cyclophosphamide and ovary and mice.” The search was restricted to experimental studies conducted in animals. No language restrictions were imposed. Additionally, the reference lists of selected primary studies were examined to identify further relevant citations not retrieved during the initial search.

Study Selection

Two investigators (E.I.T.A. and J.P.C.) independently screened titles and abstracts using a review management platform (Rayyan QCRI). Studies deemed potentially eligible were subjected to full-text review. In cases where there was a divergence of opinion, a third

investigator (J.R.V.S.) was engaged to facilitate a discussion and determine the inclusion or non-inclusion of these elements.

PICO Definition

Population (P): Female mice subjected to chemotherapy. Intervention (I): Administration of natural compounds in association with chemotherapy. Comparator (C): Control groups consisting of mice not receiving natural compounds – either treated with vehicle or untreated – provided they allow comparison with the experimental group. Outcome (O): Assessment of reproductive physiology preservation, measured, for example, by the count or percentage of morphologically normal ovarian follicles.

Data Extraction and Quality Assessment

Two investigators (E.I.T.A. and J.P.C.) independently extracted data using a standardized form. The following data were collected:

- Study characteristics: experimental design, number of groups, number of animals per group;
- Animal model details: species, age, and sex;
- Intervention details: type of chemotherapeutic agent, dosage, frequency, treatment duration, and specifics of the administered natural compounds;
- Outcomes: primary outcomes (e.g., count or percentage of morphologically normal ovarian follicles) and secondary outcomes (types of chemotherapeutic agents and natural compounds, among other relevant parameters).

In the event of a divergence of opinion, the two investigators were required to engage in a dialogue or consult with a third investigator (J.R.V.S.).

Assessment of risk of bias

The included studies were assessed by two independent investigators (E.I.T.A. and J.P.C.) with SYRCLE's risk of bias tool. The tool under consideration comprises six domains, namely selection bias, performance bias, detection bias, attrition bias, reporting bias, and other sources of bias. The tool contains 10 items, with each item being assigned a judgment of “+” = Low risk of bias (clearly described and adequate methodology); “–” = High risk of bias (inadequate or absent methodology); “?” = Unclear risk of bias (insufficient information for judgment). Disagreements were subject to either negotiation or adjudication by a third researcher (J.R.V.S.).

Data Synthesis and Analysis

Due to the heterogeneity among studies – in terms of doses, experimental protocols, and outcome measures – data were synthesized narratively. Methodological characteristics and main findings of the included studies were described and qualitatively compared.

Results

Results of literature screening

The initial database search yielded a total of 491 studies, of which 449 records were retained subsequent to the exclusion of duplicates. Following a thorough review of the titles and abstracts, seventeen studies were selected for further consideration. Following a thorough review of the complete text, 11 studies were ultimately incorporated into the analysis, contingent upon meeting the predetermined inclusion and exclusion criteria. The screening process for the included studies is depicted in Fig. 1.

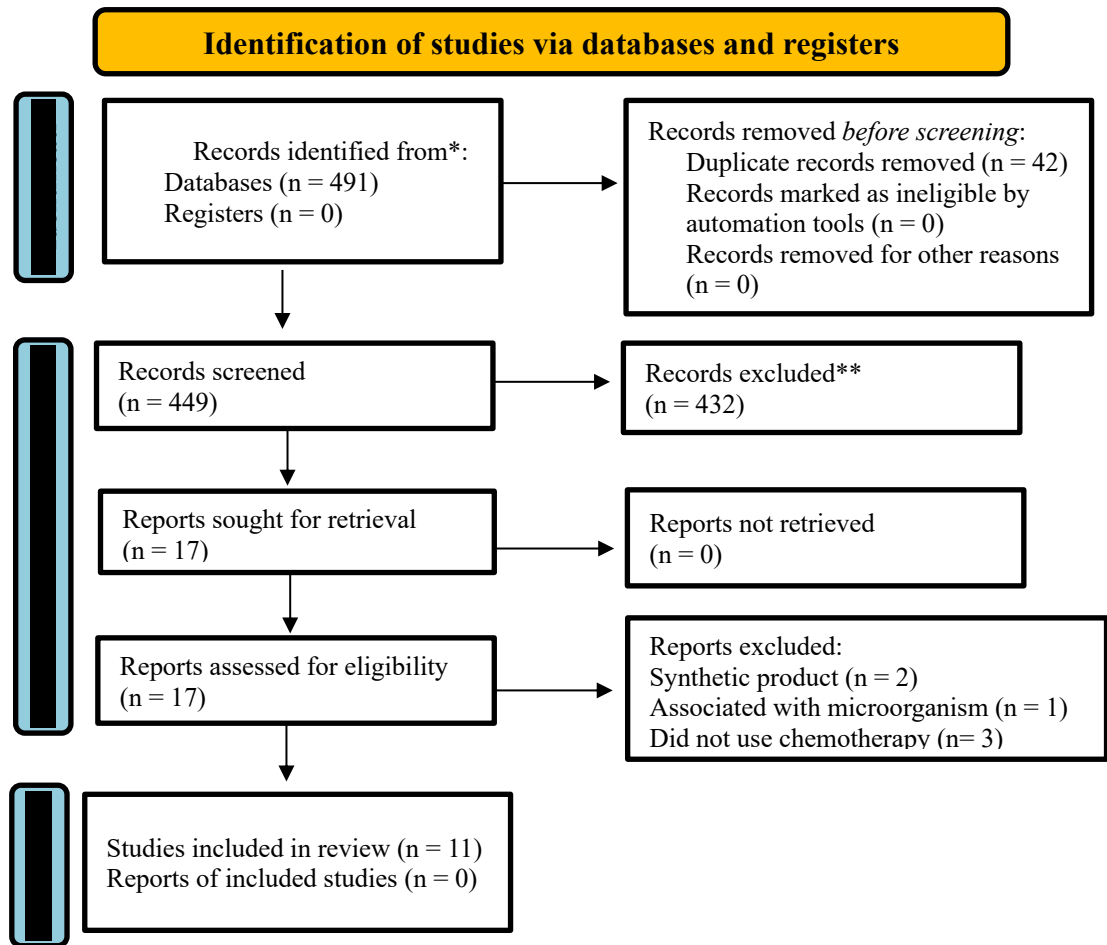


Fig. 1 PRISMA 2020 flow diagram for systematic reviews

Characteristics of the Included Studies

The eleven included studies were published between 2020 and 2024 and involved a total of mice aged between 5 and 8 weeks, corresponding to the reproductive age in women. Table 1 summarizes the characteristics of the included studies, presenting information regarding the type of female mice used, the experimental interventions, the chemotherapeutic agents administered, and the main findings obtained. In this synthesis, studies employing cisplatin highlighted the efficacy of antioxidant agents in preserving ovarian follicles. Lins *et al.* [10] demonstrated that pre-treatment with N-acetylcysteine (NAC) or rutin – particularly at a dose of 10 mg/kg – prior to cisplatin administration (5 mg/kg, intraperitoneally) maintained the number of morphologically normal follicles close to control levels. Complementarily, Gouveia

et al. [11] observed that administration of protocatechuic acid at 20 mg/kg preserved normal follicles more effectively compared to higher doses. Gui *et al.* [12] and Gouveia *et al.* [13] reinforced these findings, showing that treatment with rosmarinic acid, NAC, or *Amburana cearensis* extract contributed to the maintenance of normal follicles by reducing apoptosis and oxidative stress through modulation of the Phosphatase and Tensin Homolog (PTEN)/Protein Kinase B (Akt) signaling pathway.

Moreover, several studies employing cyclophosphamide reported notable protection of ovarian follicles through the use of natural compounds. Li *et al.* [14] demonstrated that quercetin attenuates the loss of primordial follicles, while Barberino *et al.* [15] reported that pre-treatment with epigallocatechin-3-gallate at doses of 25 and 50 mg/kg protected both follicular morphology and the primordial follicle reserve. In a model of ovarian insufficiency induced by cyclophosphamide (90 mg/kg), Chen *et al.* [16] found that administration of quercetin at doses of 25 and 50 mg/kg increased the proportion of normal follicles and eliminated atretic follicles, suggesting the involvement of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha (PGC-1 α) pathway. Similarly, Meng *et al.* [17] observed that treatment with curculigoside in a cyclophosphamide-induced POF model (100 mg/kg) promoted follicular development and inhibited atresia, possibly mediated through the Akt/mechanistic Target of Rapamycin (mTOR) pathway. Hu *et al.* [18] further supported these findings, showing that resveratrol- β cd treatment in a POF model induced by busulfan and cyclophosphamide recovered primary, secondary, and antral follicles, inhibiting ovarian insufficiency progression and modulating autophagy pathways.

In models employing doxorubicin, studies highlighted the protection of the follicular reserve through the use of various natural compounds. In hybrid mice (C57BL/6 $\times$ Balb/c), Herrero *et al.* [20] found that administration of resveratrol combined with doxorubicin increased the numbers of primary and antral follicles, prevented the formation of atretic

follicles, and preserved the primordial reserve. Similarly, Silva *et al.* [21] demonstrated that pre-treatment with gallic acid at a dose of 50 mg/kg protected follicular morphology in mice treated with doxorubicin. It is noteworthy that primordial follicles were not analyzed in the study by Herrero *et al.* [20], whereas secondary and antral follicles were not evaluated in the study by Barberino *et al.* [15].

Table 1 Characteristics of the Included Studies

Species/Authors	Intervention	Results
Female Swiss mice Lins <i>et al.</i> [10]	Control (saline solution) vs. pretreatment with NAC (150 mg/kg, po) or RT (10, 30, or 50 mg/kg, po) for 3 days before CP (5 mg/kg) per day	RT 10 mg/kg prevented the reduction of normal follicles, maintaining results similar to the control
Female Swiss mice Gouveia <i>et al.</i> 2021 [11]	Saline, CP (5 mg/kg), or pretreatment with NAC (150 mg/kg) or PCA (20 or 50 mg/kg, po) for 3 days before CP	PCA 20 mg/kg better preserves normal follicles
Female C57BL/6 mice Li <i>et al.</i> [14]	Single injection of CY (75 mg/kg) with or without Que (20 or 40 mg/kg)	Que attenuates primordial follicle loss caused by CY
Female Swiss mice Barberino <i>et al.</i> [15]	CY (200 mg/kg, ip) or pretreatment with NAC (150 mg/kg, ip) or EGCG (5, 25, or 50 mg/kg, ip) for 3 days before CY	EGCG (25 and 50 mg/kg) preserves follicular morphology and primordial follicle reserve
Female C57BL/6 mice Chen <i>et al.</i> [16]	POF model with CY (90 mg/kg) followed by treatment with Q10 or Que (12.5; 25; 50 mg/kg)	Que (25 and 50 mg/kg) increased the number of normal follicles and decreased atretic follicles, protecting ovarian reserve via PGC1- α
Female Balb/c mice Meng <i>et al.</i> [17]	POF induced by CY (100 mg/kg, ip) and treatment with CUR (10, 20 or 40 mg/kg/day) or estradiol valerate	CUR promoted follicular development and prevented atresia, acting through the AKT/mTOR pathway
Female C57BL/6 mice Hu <i>et al.</i> [18]	POF induced by BF (30 mg/kg) + CY (120 mg/kg) and resveratrol- β cd treatment (50 mg/kg, oral, alternate days)	RES recovered primary, secondary and antral follicles by inhibiting POI progression and modulating autophagy
Cross breeding C57BL/6 $\times$ Balb/c female Herrero <i>et al.</i> [19]	7 injections of RES (7 or 15 mg/kg, ip, every 48h) and DOX (10 mg/kg, ip, in the 3rd injection)	RES increased primary/antral follicles and decreased atretic follicles, preserving the reserve of primordial follicles compared to the DOX group
Female Swiss mice Silva <i>et al.</i> [20]	Pretreatment with NaCl (0.15 M, po) or GA (50, 100 or 200 mg/kg, po) for 5 days; DOX (10 mg/kg, ip) on the 3rd day	GA 50 mg/kg maintained normal follicles, reduced apoptosis and prevented inflammation

Female Swiss mice Gui <i>et al.</i> [12]	CP injection (7 mg/kg, ip) and treatment with RA (2.5; 5 or 10 mg/kg) for 14 days	RA Reduced Inflammation and Oxidative Stress, Protecting the Ovary
Female Swiss mice Gouveia <i>et al.</i> [13]	Control: oral saline + ip; or pretreatment with NAC (150 mg/kg) or AC extract (50 or 200 mg/kg, po) followed by CP (5 mg/kg, ip)	NAC and AC extract maintained normal follicles, decreased apoptosis/ROS and regulated PTEN/Akt expression

CY: Cyclophosphamide; CP: Cisplatin; DOX: Doxorubicin; NAC: N-acetylcysteine; EGCG: Epigallocatechin-3-gallate; RT: Rutin; AC: *Amburana cearensis*; GA: Gallic acid; PCA: Protocatechuic acid; RES: Resveratrol; BF/CY: Busulfan and cyclophosphamide; RA: Rosmarinic acid; CUR: Curculigoside; Que: Quercetin; Q10: Coenzyme Q10; POF: Premature ovarian failure

Risk of bias assessment results

In evaluating the 11 included studies (Table 2), it was observed that, in the domain of selection bias, eight studies reported random sequence generation, while three lacked sufficient detail for assessment. Baseline characteristics of age, sex and weight were clearly described in eight studies and remained unclear in three. Allocation concealment was not reported in any of the studies, representing a high risk of selection bias. In terms of performance bias, no study documented randomization of animal housing or blinding of caretakers or researchers, indicating methodological weaknesses at this stage. For detection bias, random selection of animals for outcome assessment could not be verified in any study, but eight studies reported blinding of outcome assessors, two did not present sufficient information and only one did not apply the procedure. All studies presented complete outcome data, indicating a low risk of attrition bias. Selective reporting bias and other sources of bias could not be assessed in any of the publications due to lack of information. These findings highlight the need for greater rigor in allocation concealment, randomization of housing and blinding of evaluators in future experiments, to reduce biases and increase the reliability of the results.

Table 2 Assessment of the risk of bias of the studies included in the systematic review, based on SYRCLE's Risk of Bias Tool for studies with animal models

Author	Selection Bias			Performance Bias		Detection Bias		Attrition Bias	Reporting Bias	
	Random sequence generation	seline characteristics	Allocation concealment	Random housing	Blinding caregivers/investigators)	Random outcome assessor)	Blinding outcome assessor)	Incomplete outcome data	Selective outcome reporting	Other bias
Herrero <i>et al.</i> [19]	+	?	—	—	—	?	+	+	?	?
Lins <i>et al.</i> [10]	+	+	—	—	—	?	+	+	?	?
Barberino <i>et al.</i> [15]	+	+	—	—	—	?	+	+	?	?
Silva <i>et al.</i> [20]	+	+	—	—	—	?	+	+	?	?
Gouveia <i>et al.</i> [11]	+	+	—	—	—	—	+	+	?	?
Gui <i>et al.</i> [12]	?	+	—	—	—	?	?	+	?	?
Gouveia <i>et al.</i> [13]	+	+	—	—	—	?	+	+	?	?
Li <i>et al.</i> [14]	?	+	—	—	—	?	+	+	?	?
Chen <i>et al.</i> [16]	+	+	—	—	—	?	?	+	?	?
Hu <i>et al.</i> [18]	+	?	—	—	—	?	?	+	?	?
Meng <i>et al.</i> [17]	?	?	—	—	—	?	?	+	?	?

Legend of symbols: “+” Low risk of bias; “—” High risk of bias; “?” Unclear risk of bias. Other bias: lack of justification for sample size, lack of prior registration of the experimental protocol or statistical plan, and insufficient information on funding sources or potential conflicts of interest

Natural antioxidant compounds and chemotherapeutics agents

Table 3 presents a comprehensive analysis of the natural antioxidant compounds investigated for their ability to protect ovarian function against the deleterious effects of various chemotherapeutic agents. The results demonstrate that these compounds exert multifaceted effects, with properties extending beyond simple antioxidant and anti-inflammatory actions, including cardioprotective, neuroprotective, and anti-apoptotic effects, which vary depending on the type of chemotherapeutic agent used. In the case of doxorubicin, resveratrol emerges as

a particularly effective compound, combining antimicrobial, anti-aging, cardioprotective, and antioxidant properties [19]. Its action is complemented by gallic acid, which presents an even broader pharmacological profile, including gastroprotective, neuroprotective, antimicrobial, and anticancer effects, along with marked antioxidant activity [20]. For treatments involving cyclophosphamide, a diverse set of protective compounds is observed: quercetin [16, 14] epigallocatechin-3-gallate [15], and Curculigoside [17] act synergistically through antioxidant, anti-inflammatory, and immunomodulatory mechanisms. Particularly noteworthy is resveratrol- β cd, which demonstrates efficacy even against the combined busulfan and cyclophosphamide regimen [18], suggesting potential for more aggressive treatments. Moreover, regarding cisplatin, ovarian protection is mediated by a distinct set of compounds. Rosmarinic acid [12] and protocatechuic acid [11] act mainly through anti-inflammatory and antioxidant mechanisms, while rutin adds antidiabetic and antitumor properties to these effects [10]. *Amburana cearensis* extract [13] stands out due to its additional antinociceptive effect, suggesting potential benefits in reducing treatment-associated pain.

The results described not only confirm the therapeutic value of natural compounds in preserving ovarian function during chemotherapy but also reveal important differences in their pharmacological profiles. Thus, the selection of the most suitable compound can be guided by both the type of chemotherapeutic agent used and the specific adverse effects targeted for mitigation, paving the way for personalized therapeutic strategies in reproductive oncology.

Table 3 Properties of natural compounds used to reduce deleterious effects on ovaries

Compounds / Author	Properties	Chemotherapy
Resveratrol - Herrero <i>et al.</i> [19]	Antimicrobial, anti-aging, anti-inflammatory, cardioprotective and antioxidant	Doxorubicin
Gallic acid - Silva <i>et al.</i> [20]	Cardioprotective, gastroprotective, neuroprotective, antimicrobial, anti-inflammatory, anticancer and antioxidant	Doxorubicin

Quercetin - Chen <i>et al.</i> [16]	Anti-inflammatory and antioxidant	Cyclophosphamide
Epigallocatechin-3-gallate - Barberino <i>et al.</i> [15]	Antioxidants, anti-inflammatory and anti-apoptotic	Cyclophosphamide
Quercetin - Li <i>et al.</i> [14]	Anti-inflammatory, antioxidant and anti-cancer	Cyclophosphamide
Curculigoside - Meng <i>et al.</i> [17]	Anti-inflammatory, antioxidant and immune-boosting	Cyclophosphamide
Resveratrol- β cd - Hu <i>et al.</i> [18]	Antioxidants and antiapoptotics	Busulfan and cyclophosphamide
Rosmarinic acid - Gui <i>et al.</i> [12]	Anti-inflammatory and antioxidants	Cisplatin
<i>Amburana cearensis</i> - Gouveia <i>et al.</i> [13]	Antinociceptive, anti-inflammatory and antioxidant	Cisplatin
Routine - Lins <i>et al.</i> [10]	Antidiabetic, antiinflammatory, antitumor, antibacterial and antioxidant	Cisplatin
Protocatechuic acid – Gouveia <i>et al.</i> [11]	Antioxidants, antibacterials, anti-inflammatories and neuroprotectors	Cisplatin

Impact of treatments on ovarian follicles

Recent studies have demonstrated the potential of natural antioxidant compounds in mitigating the damage caused by chemotherapeutic agents to murine reproductive physiology, specifically in preserving the follicular reserve (Table 4). Data presented by Barberino *et al.* [15] show that the administration of NAC in combination with cyclophosphamide resulted in greater preservation of primordial follicles (50%) compared to mice treated with cyclophosphamide alone (30%). Additionally, follicle protection was also observed with different concentrations of epigallocatechin-3-gallate. Doses of 25 mg/kg and 50 mg/kg of epigallocatechin-3-gallate combined with cyclophosphamide led to significant maintenance of morphologically normal primordial follicles (50%), compared to the lowest dose (5 mg/kg epigallocatechin-3-gallate + cyclophosphamide), which preserved only 25% of such follicles. These findings suggest that antioxidant compounds such as NAC and epigallocatechin-3-gallate play a crucial role in mitigating follicular damage induced by chemotherapy.

Lins *et al.* [10] also reported that NAC preserved ovarian function in mice treated with cyclophosphamide. The combination of NAC and cisplatin led to a considerable recovery of primordial (70%) and antral follicles (85%), compared to 50% and 75%, respectively, in the cisplatin-only group. Furthermore, different doses of rutin (10 mg/kg; 30 mg/kg; 50 mg/kg) combined with cisplatin revealed varying degrees of follicle preservation, with the lowest dose (10 mg/kg) resulting in the highest preservation rate of primordial (75%) and primary follicles (80%). These findings support the hypothesis that combined antioxidant therapies, such as with rutin, can significantly reduce the adverse effects of chemotherapy on ovarian reserve.

Similarly, Gouveia *et al.* [11,13] and Silva *et al.* [20] evaluated the protective effects of natural compounds in murine models exposed to chemotherapeutic agents such as cisplatin and doxorubicin. In Gouveia *et al.* [11], treatment with protocatechuic acid at doses of 20 mg/kg and 50 mg/kg preserved primordial follicles at 70%, compared to 45% in the cisplatin-only group. Regarding antral follicles, both doses of protocatechuic acid preserved 50% and 40%, respectively, while the cisplatin-only group presented only 30%. In a subsequent study, Gouveia *et al.* [13] investigated *Amburana cearensis* extract and observed that the 50 mg/kg dose preserved 60% of primordial follicles and 50% of antral follicles, compared to 30% and 25%, respectively, in the cisplatin-only group. Moreover, Silva *et al.* [20] demonstrated that gallic acid, particularly at the dose of 50 mg/kg combined with doxorubicin, preserved 85% of primordial follicles, while the doxorubicin-only group showed only 35%. These findings reinforce the role of natural antioxidants in preserving different follicular populations and in mitigating chemotherapy-induced ovarian damage.

Herrero *et al.* [19] further supported the potential of resveratrol in preserving murine reproductive physiology exposed to doxorubicin. In the control group, 40% of antral follicles were preserved while doxorubicin alone reduced this rate to 20%. However, treatment with 7 mg/kg of resveratrol increased preservation to 40%, and the 15 mg/kg dose resulted in 35%.

Regarding primary follicles, doxorubicin alone preserved only 4% of morphologically normal follicles, while resveratrol increased this to 12% at 7 mg/kg and 9% at 15 mg/kg. These results suggest that the 7 mg/kg dose was more effective in reducing reproductive damage, indicating that moderate doses may be more beneficial in follicular protection.

Table 4 Percentage of morphologically normal ovarian follicles by group

Authors / Treatments		Primordial follicle	Primary follicle	Secondary (preantral follicle)	Antral follicle
Barberino et al. [15]	Control	55%	25%	Not evaluate	Not evaluate
	CY	30%	50%	Not evaluate	Not evaluate
	NAC+CY	50%	30%	Not evaluate	Not evaluate
	5 mg/kg EGCG+CY	25%	50%	Not evaluate	Not evaluate
	25 mg/kg EGCG+CY	50%	25%	Not evaluate	Not evaluate
	50 mg/kg EGCG+CY	50%	25%	Not evaluate	Not evaluate
Lins et al. [10]	Control	80%	75%	75%	76%
	CP	50%	40%	20%	75%
	NAC+CP	70%	60%	60%	85%
	10 RT + CP	75%	80%	75%	85%
	30 RT + CP	50%	75%	40%	85%
	50 RT + CP	45%	35%	20%	75%
Gouveia et al. [11]	Control	80%	70%	75%	60%
	CP	45%	40%	20%	30%
	NAC	65%	60%	65%	50%
	20 mg/kg PCA	70%	80%	60%	50%
	50 mg/kg PCA	70%	65%	60%	40%
Gouveia et al. [13]	Control	80%	70%	70%	85%
	CP	30%	30%	25%	25%
	NAC	60%	70%	85%	85%
	50 mg/kg AC	60%	55%	60%	50%

	200 mg/kg AC	50%	70%	60%	45%
Silva et al. [20]	Control	80%	80%	80%	95%
	DOX	35%	35%	30%	20%
	50 mg/kg GA+DOX	85%	80%	80%	80%
	100 mg/kg GA+DOX	80%	65%	40%	20%
	200 mg/kg GA+DOX	60%	60%	25%	20%
Herrero et al. [19]	Control	Not evaluate	9%	25%	40%
	DOX	Not evaluate	4%	20%	20%
	7 mg/kg RES+DOX	Not evaluate	12%	20%	40%
	15 mg/kg RES+DOX	Not evaluate	9%	20%	35%

CY: Cyclophosphamide; CP: Cisplatin; DOX: Doxorubicin; NAC: N-acetylcysteine; EGCG: Epigallocatechin-3-gallate; RT: Rutin; AC: *Amburana cearensis*; GA: Gallic acid; PCA: Protocatechuic acid; RES: Resveratrol

Gui *et al.* [12] investigated the impact of cisplatin on mice and the protective effect of different doses of rosmarinic acid. In the control group, 23 primordial follicles, 12 primary, 6 secondary, and 4 antral follicles were observed. Treatment with cisplatin led to a reduction in primordial (17) and antral follicles (2), highlighting its toxicity. Administration of rosmarinic acid at 2.5 mg/kg and 5 mg/kg did not show significant improvements compared to cisplatin alone. However, the 10 mg/kg dose restored the count of primordial (22) and antral follicles (4) to levels close to the control group, suggesting a significant protective effect of rosmarinic acid against cisplatin (Table 5).

Hu *et al.* [18] evaluated the effect of resveratrol- β cd on follicular preservation in a model of premature ovarian insufficiency (POI) induced by busulfan and cyclophosphamide. In the POI group, a sharp decrease in follicle numbers was observed: 50 primary, 100 secondary, and 50 antral follicles. In contrast, treatment with resveratrol- β cd significantly restored these structures, with 200 primary, 300 secondary, and 310 antral follicles. These findings show that resveratrol- β cd was able to significantly restore the follicular population, even surpassing the levels observed in the control group (390 primary, 800 secondary, and 410 antral follicles),

suggesting a potent regenerative and protective effect of the compound against chemotherapy-induced damage.

Chen *et al.* [16] evaluated the effects of different treatments following cyclophosphamide exposure. Cyclophosphamide alone resulted in minimal follicle preservation (10 primordial and 1 antral follicle), indicating severe ovarian damage. Administration of low and medium doses of quercetin (12.5 mg/kg and 25 mg/kg) and coenzyme Q10 showed some preservation, but they were not as effective as the high-dose quercetin group (50 mg/kg), which preserved 7 primordial and 3 antral follicles. Coenzyme Q10 showed lower counts, suggesting quercetin may be more effective in protecting against cyclophosphamide-induced damage (Table 5).

Li *et al.* [14] demonstrated the effects of quercetin on ovarian follicle preservation in mice treated with cyclophosphamide. In the control group, 600 primordial and 250 primary follicles were observed. These values dropped drastically in the group treated only with cyclophosphamide (200 primordial and 150 primary follicles), evidencing the drug's deleterious effect. Administration of quercetin at doses of 20 mg/kg and 40 mg/kg resulted in a substantial recovery of primordial follicles (500 and 550, respectively) and primary follicles (148 and 145, respectively), indicating a dose-dependent protective effect. These findings reinforce the antioxidant and cytoprotective potential of quercetin in preserving the follicular reserve in the face of cyclophosphamide-induced toxicity.

Table 5 Count of morphologically normal ovarian follicles by group

Authors / Treatments	Primordial follicle	Primary follicle	Secondary (preantral follicle)	Antral follicle
Control	23	12	6	4
CP	17	7	3	2
CP+2.5 mg/kg AR	17	7	3	2

Gui et al. [12]	CP+5mg/kg AR	20	8	4	3
	CP+10mg/kg AR	22	10	6	4
Hu et al. [18]	Control	Not evaluate	390	800	400
	Resv	Not evaluate	390	800	410
	BF/CY	Not evaluate	50	100	50
	BF/CY + Resv	Not evaluate	200	300	310
Chen et al. [16]	Control	9	6	5	2
	CY	10	1	1	1
	Que 12.5 mg/kg	7	2	1	3
	Que 25 mg/kg	6	3	1	3
	Que 50 mg/kg	7	4	2	3
	Q10	6	5	2	2
Li et al. [14]	Control	600	250	Not evaluate	Not evaluate
	CY	200	150	Not evaluate	Not evaluate
	Que 20 mg/kg	500	148	Not evaluate	Not evaluate
	Que 40 mg/kg	550	145	Not evaluate	Not evaluate

CP: Cisplatin; CY: Cyclophosphamide; BF/CY: Busulfan and cyclophosphamide; RA: Rosmarinic acid; RES: Resveratrol; Que: Quercetin; Q10: Coenzyme Q10

Tble 6 shows the percentage of atretic and normal follicles in different experimental groups, highlighting the protective effect of Curculigoside and estradiol valerate in mice treated with cyclophosphamide. The control group shows the lowest atresia percentage (19%) and the highest percentage of normal follicles (100%), whereas the group treated exclusively with cyclophosphamide displays the worst outcome (30% atresia and 80% normal follicles). In the groups treated with curcumin at doses of 10, 20, or 40 mg/kg, there is a significant reduction in atretic follicles (20%, 21%, and 22%, respectively) and an increase in normal follicles (90%–91%), values similar to those observed in the group treated with estradiol valerate (21% atretic follicles and 90% normal follicles), confirming the potential of these treatments in protecting against chemotherapeutic-induced reproductive injury.

Table 6 Percentage of normal and atretic follicles

Author / Treatments		Atretic follicles	Normal follicles
Meng <i>et al.</i> [17]	Control	19%	100%
	CY	30%	80%
	CUR10 mg/kg	20%	90%
	CUR20 mg/kg	21%	90%
	CUR40 mg/kg	22%	91%
	Estradiol valerate	21%	90%

CY: Cyclophosphamide; CUR: Curculigoside

Discussion

In preclinical models, chemotherapeutic agents exert deleterious effects on ovarian reserve, directly affecting follicle viability and granulosa cell function [21,22]. Oxidative stress and inflammation play a crucial role in chemotherapy-induced follicular atresia. Activation of the Nuclear Factor kappa B (NF- κ B) pathway amplifies the expression of pro-inflammatory mediators, intensifying tissue stress and exacerbating ovarian damage [23,24]. Markowska *et al.* [25] showed that elevated levels of inflammatory cytokines, such as Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) and Interleukin-6 (IL-6), are correlated with a reduction in primordial and primary follicles, compromising long-term fertility. Nguyen *et al.* [26] emphasized that granulosa cells are particularly vulnerable to excess Reactive Oxygen Species (ROS) generated by chemotherapy treatment, presenting accumulation of lipid peroxides and decreased activity of antioxidant enzymes. Furthermore, Xie *et al.* [27] confirmed that oxidative stress precipitates granulosa cell apoptosis through the activation of pro-apoptotic proteins, such as BCL2-Associated X Protein (Bax), and the reduction of B-Cell Lymphoma 2 (Bcl-2), promoting

follicular atresia. This scenario creates a vicious cycle in which DNA damage and oxidative stress feed back into the inflammatory response, accelerating the loss of ovarian reserve.

In this context, the Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/PTEN/Akt/Forkhead Box Protein O3 (FOXO3a) signaling pathway emerges as a critical regulator of follicular activation and cell survival [28]. Chi *et al.* [29] demonstrated that in mice and human ovarian tissue, dysregulated activation of this pathway can lead to premature activation of primordial follicles, exhaustion of the reserve and a drop in Anti-Müllerian Hormone (AMH) levels. Zatalian *et al.* [30] added that cyclophosphamide-induced hyperactivation of PI3K/Akt/mTOR in primordial follicles enhances the phosphorylation of key proteins, reducing AMH and promoting early activation. Furthermore, p-Akt phosphorylates FOXO3a, translocating it to the cytoplasm and interrupting its function of maintaining follicular quiescence, which culminates in granulosa cell apoptosis and follicular loss [14,15,11]. Thus, modulation of this pathway has proven to be a promising target for ovarian protection strategies.

In this context, several natural compounds have been widely investigated for their ability to attenuate ovarian damage induced by chemotherapeutic agents [31]. Doxorubicin significantly reduces the number of primordial follicles and causes premature activation of the follicular reserve, associated with decreased proliferation of granulosa cells [21]. Furthermore, it induces DNA double-strand breaks that activate apoptotic pathways via p53 and caspase-3 [22]. Herrero *et al.* [19] demonstrated that treatment with resveratrol significantly reduces oxidative stress levels, such as Malondialdehyde (MDA) concentration, in addition to decreasing apoptosis in the ovarian cortex of mice exposed to doxorubicin, preserving follicular architecture and the expression of the antioxidant enzyme Superoxide Dismutase (SOD). Additionally, Hu *et al.* [18] developed a formulation of resveratrol complexed with β -cyclodextrin, which improved its stability and bioavailability. This formulation was able to suppress the progression of ovarian failure in a POI model induced by busulfan and

cyclophosphamide, promoting the positive modulation of IL-6 secretion, the stimulation of autophagy in granulosa cells and the restoration of hormonal markers essential for reproductive function. The relationship between oxidative stress and autophagy, in this scenario, is particularly relevant: when ovarian cells face redox imbalances, the activation of autophagy represents a crucial adaptive response for the removal of damaged organelles and proteins, favoring cellular recovery and the maintenance of tissue homeostasis [32].

Among phenolic acids, gallic acid and rosmarinic acid have been shown to be effective in attenuating oxidative stress. Silva *et al.* [20] demonstrated that co-treatment of gallic acid (50 mg/kg) with doxorubicin preserved the percentage of normal follicles, maintained cell proliferation, reduced caspase-3 expression, and increased Reduced Glutathione (GSH) levels and mitochondrial activity in mice. Furthermore, studies indicate that cisplatin cycles lead to degeneration of the ovarian cortex and histological changes typical of follicular atresia [33]. In this adverse scenario, Gui *et al.* [12] demonstrated that rosmarinic acid was able to significantly reduce the levels of Nitric Oxide (NO) and Myeloperoxidase (MPO) in the ovarian tissue of mice treated with cisplatin, while increasing the antioxidant enzymes GSH, SOD, Catalase (CAT) and Glutathione Peroxidase (GPx). Furthermore, this compound inhibited pro-inflammatory cytokines, such as IL-6, TNF- α and Interleukin-1 Beta (IL-1 β), and suppressed the expression of Cyclooxygenase-2 (COX-2) and Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS), culminating in relevant histological improvement. These combined actions attenuate ROS overload and preserve redox homeostasis, preventing excessive apoptosis of granulosa cells.

In the case of flavonoids, both rutin and quercetin have remarkable protective effects. Lins *et al.* [10] observed that pretreatment with 10 mg/kg rutin, before cisplatin administration, preserved the percentage of normal follicles and granulosa cell proliferation, reducing apoptosis and ROS levels by inhibiting PTEN phosphorylation and maintaining p-FOXO3a in the nucleus. Similarly, Li *et al.* [14] showed that quercetin attenuates cyclophosphamide-induced

follicular loss by inhibiting the phosphorylation of PI3K, Akt, and FOXO3a, maintaining basal AMH levels and preserving primordial pool quiescence, which prevents premature activation. Furthermore, Chen *et al.* [16] reported that quercetin not only elevated AMH, Estradiol (E2), and progesterone, but also activated Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha (PGC-1 α) and Mitochondrial Transcription Factor A (TFAM), promoting mitochondrial biogenesis and reducing pyroptosis in granulosa cells by suppressing NOD-, LRR-, and Pyrin Domain-Containing Protein 3 (NLRP3), caspase-1, and IL-1 β , enhancing cell survival and follicular integrity. Cyclophosphamide induces intense follicular atresia, inflammation, and mitochondrial dysfunction, resulting in premature ovarian failure [15,23]. In addition, it is worth noting that apoptosis or dysfunction of granulosa cells is considered one of the main factors associated with follicular atresia and the development of POF, since these cells play an essential role in the support, nutrition, and hormonal signaling for the developing oocyte [34].

Additionally, *Amburana cearensis* and protocatechuic acid — one of its main phenolic compounds — also play a relevant role in modulating cell survival pathways. Gouveia *et al.* [11] demonstrated that pretreatment with protocatechuic acid (20 mg/kg) reduced cisplatin-induced p-PTEN expression, increased nuclear export of p-FOXO3a, decreased markers of apoptosis and maintained mitochondrial activity, in addition to increasing GSH levels. It is worth noting that cisplatin tends to accumulate preferentially in mitochondria, where it triggers crosslinking of mitochondrial DNA (mtDNA) and opening of the permeability transition pore, resulting in bioenergetic collapse characterized by oxidative stress and mitochondrial dysfunction [35]. Similarly, Gouveia *et al.* [13] showed that *Amburana cearensis* extract, rich in protocatechuic acid, was able to preserve the integrity of normal follicles, maintain cell proliferation, reduce ROS levels and increase GSH concentration, in addition to positively modulating p-PTEN and p-Akt proteins after exposure to cisplatin. This combination of effects

- involving the balance between PTEN/Akt pathway signaling and control of the redox state
- proves to be essential to protect the ovarian reserve against chemotherapeutic insult.

Epigallocatechin-3-gallate, a widely studied catechol, stands out for its remarkable cytoprotective properties. Barberino *et al.* [15] demonstrated that pretreatment with epigallocatechin-3-gallate (25 mg/kg) was able to regulate the phosphorylation of Akt, FOXO3a and ribosomal protein S6 (rpS6), preventing follicular loss, reducing oxidative stress, attenuating inflammation and decreasing apoptosis in a model of cyclophosphamide-induced follicular atresia. This precise modulation of the mTOR and apoptotic pathways contributed to preserving cellular integrity and functional balance, maintaining not only follicular morphology but also steroidogenic function. In this context, it is important to highlight that cyclophosphamide is widely known to disrupt ovarian function, potentially causing follicular depletion and a reduction in serum estrogen levels, which compromises fertility and hormonal balance [36].

Finally, curculigoside has been shown to be a promising agent in preserving ovarian function against chemotherapy-induced toxicity. Meng *et al.* [17] demonstrated that this compound reduces follicular atresia, improves body weight and ovarian index, and increases the expression of AMH, E2 and FSH in cyclophosphamide-induced POF models. Granulosa cell apoptosis, in turn, directly compromises AMH secretion and accelerates the depletion of the dormant follicle pool, promoting early activation of primordial follicles and contributing to ovarian failure [37]. Curculigoside also exerts a protective effect by inhibiting excessive autophagy and activating the Akt/mTOR pathway, mechanisms that reduce apoptosis in granulosa cells and favor the production of factors associated with mitochondrial survival. It is noteworthy that autophagy occurs predominantly in these cells and is directly involved in follicular atresia, acting as a link between cellular stress and the progressive loss of ovarian function [38]. These findings reinforce the therapeutic potential of natural compounds capable

of acting in an integrated manner in the regulation of the redox state and in the modulation of intracellular pathways essential for the maintenance of the follicular reserve.

In short, the protective effects observed by the different natural compounds converge on two main axes: the reduction of oxidative stress and the modulation of cell survival pathways (PI3K/PTEN/Akt/FOXO3a and Akt/mTOR). While exacerbated ROS generation and the inflammatory response mediated by NF- κ B and pro-inflammatory cytokines accelerate follicular atresia, administration of specific antioxidants restores redox balance, preserves mitochondrial function and maintains quiescence of the primordial pool. At the same time, by positively modulating Akt signaling and inhibiting FOXO3a hyperphosphorylation, these compounds delay premature follicle activation, preventing their exhaustion. Furthermore, the elucidation of the mechanisms underlying chemotherapy-induced ovarian toxicity – from irreversible DNA damage and oxidative stress to the dysregulated activation of apoptotic and inflammatory pathways – supports the use of natural products as protective agents. By modulating cellular and molecular responses, these adjuvants not only preserve follicular reserve, but also emerge as a valuable strategy for maintaining fertility and quality of life in young women undergoing chemotherapy, representing an advance in the integrated and multidisciplinary approach to cancer treatment [39,40].

Conclusion

Chemotherapeutic agents impair ovarian function by causing follicular atresia, reducing the follicular reserve, and inducing apoptosis due to the inhibition of granulosa cell proliferation and irreversible DNA damage. These deleterious effects lead to premature depletion of the ovarian reserve and reduced fertility. The natural antioxidant compounds have emerged as effective and safe alternatives to preserve ovarian function during chemotherapy, acting on multiple molecular targets. Agents such as resveratrol, epigallocatechin-3-gallate, rutin, quercetin, curculigoside, gallic acid, rosmarinic acid, protocatechuic acid, and *Amburana*

cearensis extract have demonstrated antioxidant and anti-inflammatory activity in preclinical models by neutralizing free radicals, restoring endogenous antioxidant levels, and attenuating apoptosis. Their ability to modulate critical pathways, such as oxidative stress and apoptotic responses, makes them ideal adjuvants to counteract chemotherapy-induced ovarian failure. Translating these findings into clinical practice requires further studies to validate their efficacy in humans, ensuring that the protective action does not compromise the antitumor effectiveness. Thus, this review highlights the importance of integrated strategies that balance oncologic efficacy with fertility preservation, offering new perspectives for the management of young cancer patients.

Author Contributions

All authors contributed to the conception and design of the study. E.I.T.A. and J.P.C. conducted the literature search and data analysis, while J.R.V.S. developed the idea for the article and was responsible for writing and/or critically reviewing the manuscript.

Declarations

IRB Approval: This study is a systematic review and therefore no IRB or IACUC approval was required.

Ethical Approval: Not applicable.

Consent to Participate: Not applicable.

Consent for Publication: Not applicable

Conflict of Interest: The authors have no conflicts of interest or financial conflicts to disclose.

References

1. Prajapati J, Bhatt N, Rawal R. Hepatoprotective effects of phytochemicals and plant extracts against chemotherapy-induced liver damage in animal models: a systematic review. *Arch Toxicol.* 2025; <https://doi.org/10.1007/s00204-024-03928-7>
2. Bingul E, Bulut S, Mammadov R, Cicek B, Dogru TE, Suleyman H, Mendil AS. Effect of ethyl acetate extract from *Usnea longissima* on chemotherapy-associated multiple organ dysfunction in rats. *Biomed Pharmacother.* 2024; <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.117636>
3. Cetin C, Okten SB, Tok OE, Ozcan P, Karasu AFG, Tanoglu FB, Taha HS, Ates S. Treatment of ovarian damage induced by chemotherapeutic drugs in female rats with G-CSF and platelet-rich plasma (PRP): an immunohistochemical study correlation with novel marker INSL-3. *Gynecol Endocrinol.* 2024; <https://doi.org/10.1080/09513590.2023.2301551>
4. Wang R, Geng J. The melatonin-FTO-ATF4 signaling pathway protects granulosa cells from cisplatin-induced chemotherapeutic toxicity by suppressing ferroptosis. *J Assist Reprod Genet.* 2024; <https://doi.org/10.1007/s10815-024-03276-6>
5. Guo Y, Xue L, Tang W, Xiong J, Chen D, Dai Y, Wu C, Wei S, Dai J, Wu M, Wang S. Ovarian microenvironment: challenges and opportunities in protecting against chemotherapy-associated ovarian damage. *Hum Reprod Update.* 2024; <https://doi.org/10.1093/humupd/dmae020>
6. Kartlasimis K, Cakir Gungor AN, Kuyucu Y, Kara S. Overview of the evaluation of the destructive effect of procarbazine on the ovarian reserve in the apoptotic, inflammatory, and oxidative pathways. *Arch Med Sci.* 2024; <https://doi.org/10.5114/aoms/184349>
7. Sellami I, Beau I, Sonigo C. Chemotherapy and female fertility. *Ann Endocrinol (Paris).* 2023; <https://doi.org/10.1016/j.ando.2023.03.013>

8. Mentese A, Demir S, Yulug E, Kucuk H, Alemdar NT, Demir EA, Aliyazicioglu Y. Gentisic acid attenuates 5-fluorouracil-induced ovotoxicity in rats via modulating Nrf2 signalling: An experimental approach. *Reprod Toxicol.* 2024; <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2024.108661>
9. Pachal S, Kumar H, Jain R, Goel B, Kesharwani S, Kesharwani SS, Jain V. A review of the current status of biological effects of plant-derived therapeutics in breast cancer. *Mol Biol Rep.* 2025; <https://doi.org/10.1007/s11033-025-10261-4>
10. Lins TLBG, Gouveia BB, Barberino RS, Silva RLS, Monte APO, Pinto JGC, Campinho DSP, Palheta RC, Matos MHT. Rutin prevents cisplatin-induced ovarian damage via antioxidant activity and regulation of PTEN and FOXO3a phosphorylation in mouse model. *Reprod Toxicol.* 2020; <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2020.10.001>
11. Gouveia BB, Barberino RS, Dos Santos Silva RL, Lins TLBG, da Silva Guimarães V, do Monte APO, Palheta RC Jr, de Matos MHT. Involvement of PTEN and FOXO3a Proteins in the Protective Activity of Protocatechuic Acid Against Cisplatin-Induced Ovarian Toxicity in Mice. *Reprod Sci.* 2021; <https://doi.org/10.1007/s43032-020-00305-4>
12. Gui H, Jin Y, Lin A, Wang P, Wang Y, Zhu H. Rosmarinic acid relieves cisplatin-induced ovary toxicity in female mice via suppression of oxidative stress and inflammation. *J Biochem Mol Toxicol.* 2021; <https://doi.org/10.1002/jbt.22839>
13. Gouveia BB, Barberino RS, Menezes VG, Monte APO, Silva RLS, Palheta RC Jr, Rolim LA, Pereira ECV, Oliveira RG Jr, Almeida JRGS, Matos MHT. Amburana cearensis leaf extract protects against cisplatin-induced ovarian damage through regulation of p-PTEN and p-Akt proteins in mice. *Iran J Basic Med Sci.* 2022; <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2022.58927.13092>

14. Li J, Long H, Cong Y, Gao H, Lyu Q, Yu S, Kuang Y. Quercetin prevents primordial follicle loss via suppression of PI3K/Akt/Foxo3a pathway activation in cyclophosphamide-treated mice. *Reprod Biol Endocrinol*. 2021; <https://doi.org/10.1186/s12958-021-00743-y>
15. Barberino RS, Lins TLBG, Monte APO, Silva RLS, Andrade KO, Campinho DSP, Palheta Junior RC, Smitz JEJ, Matos MHT. Epigallocatechin-3-gallate attenuates cyclophosphamide-induced damage in mouse ovarian tissue via suppressing inflammation, apoptosis, and expression of phosphorylated Akt, FOXO3a and rpS6. *Reprod Toxicol*. 2022; <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2022.08.010>
16. Chen Y, Zhao Y, Miao C, Yang L, Wang R, Chen B, Zhang Q. Quercetin alleviates cyclophosphamide-induced premature ovarian insufficiency in mice by reducing mitochondrial oxidative stress and pyroptosis in granulosa cells. *J Ovarian Res*. 2022; <https://doi.org/10.1186/s13048-022-01080-3>
17. Meng Y, Lyu Y, Gong J, Zou Y, Jiang X, Xiao M, Guo J. Therapeutic effects of curculigoside on cyclophosphamide-induced premature ovarian failure in mice. *Climacteric*. 2024; <https://doi.org/10.1080/13697137.2024.2354742>
18. Hu B, Zheng X, Zhang W. Resveratrol- β cd inhibited premature ovarian insufficiency progression by regulating granulosa cell autophagy. *J Ovarian Res*. 2024; <https://doi.org/10.1186/s13048-024-01344-0>
19. Herrero Y, Velázquez C, Pascuali N, May M, Abramovich D, Scotti L, Parborell F. Resveratrol alleviates doxorubicin-induced damage in mice ovary. *Chem Biol Interact*. 2023; <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2023.110431>
20. Silva RLDS, Lins TLBG, Monte APOD, de Andrade KO, de Sousa Barberino R, da Silva GAL, Campinho DDSP, Junior RCP, Matos MHT. Protective effect of gallic acid on

- doxorubicin-induced ovarian toxicity in mouse. *Reprod Toxicol*. 2023;
<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2022.12.008>
21. Zhang S, Liu Q, Chang M, Pan Y, Yahaya BH, Liu Y, Lin J. Chemotherapy impairs ovarian function through excessive ROS-induced ferroptosis. *Cell Death Dis*. 2023; <https://doi.org/10.1038/s41419-023-05859-0>
 22. Roof KA, Andre KE, Modesitt SC, Schirmer DA. Maximizing ovarian function and fertility following chemotherapy in premenopausal patients: Is there a role for ovarian suppression? *Gynecol Oncol Rep*. 2024; <https://doi.org/10.1016/j.gore.2024.101383>
 23. Eid BG, Binmahfouz LS, Shaik RA, Bagher AM, Sirwi A, Abdel-Naim AB. Icariin inhibits cisplatin-induced ovarian toxicity via modulating NF- κ B and PTEN/AKT/mTOR/AMPK axis. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2025; <https://doi.org/10.1007/s00210-024-03395-y>
 24. Du D, Tang X, Li Y, Gao Y, Chen R, Chen Q, Wen J, Wu T, Zhang Y, Lu H, Zhang J, Wang S. Senotherapy protects against cisplatin-induced ovarian injury by removing senescent cells and alleviating DNA damage. *Oxid Med Cell Longev*. 2022; <https://doi.org/10.1155/2022/9144644>
 25. Markowska A, Antoszczak M, Markowska J, Huczyński A. Gynotoxic effects of chemotherapy and potential protective mechanisms. *Cancers (Basel)*. 2024; <https://doi.org/10.3390/cancers16122288>
 26. Nguyen TTA, Condorelli M, Demeestere I. Can we really protect the ovary from chemotherapy damage? *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2025; <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2025.102603>
 27. Xie QE, Wang MY, Cao ZP, Du X, Ji DM, Liang D, Cao YX, Liu YJ. Melatonin protects against excessive autophagy-induced mitochondrial and ovarian reserve function

- deficiency through ERK signaling pathway in Chinese hamster ovary (CHO) cells. Mitochondrion. 2021; <https://doi.org/10.1016/j.mito.2021.09.009>
28. Qin W, Cao L, Massey IY. Role of PI3K/Akt signaling pathway in cardiac fibrosis. Mol Cell Biochem. 2021; <https://doi.org/10.1007/s11010-021-04219-w>
 29. Chi YN, Yang JM, Liu N, Cui YH, Ma L, Lan XB, Ma WQ, Liu YJ, Yu JQ, Du J. Development of protective agents against ovarian injury caused by chemotherapeutic drugs. Biomed Pharmacother. 2022; <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113731>
 30. Zatalian N, Dalman A, Afsharian P, Hezavehei M, Gourabi H. Metformin protects prepubertal mice ovarian reserve against cyclophosphamide via regulation of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and Yap-1. J Ovarian Res. 2024; <https://doi.org/10.1186/s13048-024-01572-4>
 31. Helvacioğlu S, Hamitoğlu M, Yıldırım E, Vural Korkut Ş, Yaba A, Aydın A. Protective Effects of Rosmarinic Acid and Epigallocatechin Gallate Against Doxorubicin-Induced Cytotoxicity and Genotoxicity in CHO-K1 Cells. Turk J Pharm Sci. 2025; <https://doi.org/10.4274/tjps.galenos.2024.80552>
 32. Zhong J, Lan G, Ma X, Zhang W, Jiang B, Qin L, Li X, Nian Y. Mechanism study on the regulation of autophagy and oxidative stress through SIRT1/PI3K/AKT pathway by Liuwei Dihuang pill to improve ovarian function. J Ovarian Res. 2025; <https://doi.org/10.1186/s13048-025-01689-0>
 33. Hao Y, Huang Y, Chen J, Li J, Yuan Y, Wang M, Han L, Xin X, Wang H, Lin D, Peng F, Yu F, Zheng C, Shen C. Exopolysaccharide from *Cryptococcus heimaeyensis* S20 induces autophagic cell death in non-small cell lung cancer cells via ROS/p38 and ROS/ERK signalling. Cell Prolif. 2020; <https://doi.org/10.1111/cpr.12869>
 34. Yu X, Liu J, Ge P, Wang W, Zhang Y, Xie D, Fu X. American ginseng improves ovarian dysfunction through miR-151-5p activation of BDNF/AKT/BCl-2/Bax signaling pathway

- in premature ovarian failure model rats: protein macromolecules and expression. *Int J Biol Macromol*. 2025; <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.143475>
35. Zhu S, Tang M, Chen J, Li S, Xue R. Mitophagy Protects Against Cisplatin-Induced Injury in Granulosa Cells. *Toxics*. 2025; <https://doi.org/10.3390/toxics13050332>
 36. Ogunro OB, Ofeniforo BE. Fertility protective effects of Brillantaisia patula leaf extract against cyclophosphamide-induced ovarian damage in Wistar rats. *BMC Biotechnol*. 2024; <https://doi.org/10.1186/s12896-024-00916-8>
 37. Feng J, Ma WW, Li HX, Pei XY, Deng SL, Jia H, Ma WZ. Melatonin prevents cyclophosphamide-induced primordial follicle loss by inhibiting ovarian granulosa cell apoptosis and maintaining AMH expression. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022; <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.895095>
 38. Wang R, Wang L, Wang L, Cui Z, Cheng F, Wang W, Yang X. FGF2 Is Protective Towards Cisplatin-Induced KGN Cell Toxicity by Promoting FTO Expression and Autophagy. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022; <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.890623>
 39. Teiko DA, N'guessan BB, Adinortey MB, Iheagwara IB, Amponsah SK, Seidu MA, Appiah-Opong R, Asiedu-Gyekye IJ. In vivo assessment of chronic, genotoxic, and reproductive toxicity of a combination of *Termitomyces schimperi* (Lyophillacea) and kaolin. *J Ethnopharmacol*. 2025; <https://doi.org/10.1016/j.jep.2025.119739>
 40. Soliman SS, Suliman AA, Fathy K, Sedik AA. Ovario-protective effect of *Moringa oleifera* leaf extract against cyclophosphamide-induced oxidative ovarian damage and reproductive dysfunction in female rats. *Sci Rep*. 2025; <https://doi.org/10.1038/s41598-024-82921-7>

7 CAPÍTULO II

Protective *in vitro* effects of *Aloe vera* on doxorubicin-induced ovarian toxicity in mice

[Efeitos protetores *in vitro* da *Aloe vera* na toxicidade ovariana induzida por doxorubicina em camundongos]

Artigo submetido e em fase de ajuste ao periódico: *Biotechnic & Histochemistry*
Qualis CAPES A4 (área de Biotecnologia); Fator de impacto (2023): 1,6

Protective *in vitro* effects of *Aloe vera* on doxorubicin-induced ovarian toxicity in mice

Ernando I. T. de Assis^{1,2}, Venância A. N. Azevedo^{1,2}, Miguel F. De Lima Neto^{1,2}, Francisco C. Costa^{1,2}, Laís R. F. M. Paulino^{1,2}, Alane P. O. Do Monte³, Maria H. T. Matos³, Alana N. Godinho², Jordânia M. O. Freire², Ana L. P. Souza^{1,2}, José R.V. Silva^{1*}, Anderson W. B. Silva^{1,2}

¹ Federal University of Ceara, Laboratory of Biotechnology and Physiology of Reproduction (LABIREP), Av. Maurocéllo Rocha Ponte 100, CEP 62041-040, Sobral, CE, Brazil.

² Federal University of Ceara, Nucleus of Research in Animal Experimentation (NUPEX), Av. Maurocéllo Rocha Ponte 100, CEP 62041-040, Sobral, CE, Brazil.

³ Federal University of São Francisco Valley, Nucleus of Biotechnology Applied to Ovarian Follicle Development, Rodovia BR 407, Km 12, Lote 543 - Projeto de Irrigação Nilo Coelho - S/N, CEP 56300-990, Petrolina, PE, Brazil

*Corresponding author: José R. V. Silva (jrvsilva@ufc.br), ID ORCID: 0000-0002-5970-6177: Federal University of Ceara, Av. Mauricéllo Rocha Ponte 100, CEP 62041 040, Sobral, CE, Brazil. Phone/Fax: +55 8836118000.

Abstract

The present study investigated the protective effect of *Aloe vera* extract against the toxic effects of doxorubicin (DOX) on mice ovaries cultured *in vitro*. Female *Swiss* mice with regular estrous cycle were used. The animals (n= 37) had their ovaries collected and cultured individually in a 24-well plate at 37.5°C in 5% CO₂ for 6 days. The ovaries were culture DMEM⁺ alone or supplemented with DOX (0.3 µg/ml), as well as both DOX and *Aloe vera* (5%, 10%, 25% or 50%). After culture, ovaries were fixed for histological analysis (follicle morphology, growth and activation, extracellular matrix (ECM) configuration and stromal cell density), immunohistochemistry (*TNF-α* expression) or stored at -80oC to evaluate the levels of mRNA for superoxide dismutase (*SOD*), catalase (*CAT*), nuclear factor- erythroid 2-related factor 2

(*NRF2*) and tumoral necrosis factor- α (*TNF- α*) by real-time PCR. The results showed that ovaries cultured with DOX had a lower percentage of normal follicles and reduced stromal cell density, but when *Aloe vera* extract was added to the culture medium, there was a protective effect on the ovarian structure against the deleterious effects of DOX. In addition, ovaries cultured with both DOX and *Aloe vera* (10 and 25%) had reduced *TNF- α* immunostaining and increased expression of mRNA for antioxidant enzymes (*SOD*, *CAT* and *NRF2*). In conclusion, *Aloe vera* is associated with a protective effect on ovarian follicles and stromal cells against DOX-induced toxicity. Therefore, *Aloe vera* has great potential to preserve fertility in patients undergoing chemotherapy treatment, which often cause irreversible damage to oocytes.

Keywords: *Aloe vera*; doxorubicin; fertility preservation; *in vitro* culture; mice.

1 Introduction

The technological advances in diagnosis and therapy of cancer has contributed to increase the survival rate of patients (Owumi *et al.* 2023). For women in reproductive age, understanding and reducing the long-term adverse effects of cancer therapy has increasingly become a critical issue to preserve reproductive capacity (Nelson and Levine 2023). Premature ovarian failure and infertility are serious side effects of chemotherapy protocols in young female cancer survivors (Herrero *et al.* 2023). Doxorubicin (DOX) is one of the most widely prescribed first-line chemotherapy drugs, demonstrating significant therapeutic potential (Methaneethorn *et al.* 2023). It is recognized as one of the most effective chemotherapy drugs approved by the Food and Drug Administration (FDA) to treat various cancer types, like breast cancer, carcinomas, sarcomas and hematological malignancies (Kciuk *et al.* 2023). The cytotoxic effects of DOX are associated with topoisomerase II inhibition, cytochrome c release from mitochondria, DNA intercalation, DNA unwinding/splitting, increased alkylation, and generation of free radicals leading to oxidative stress (Peter *et al.* 2022). The DOX oxidative effects include a significant reduction in the level of endogenous antioxidant enzymes, such as

superoxide dismutase (*SOD*), NAD(P)H quinone oxidoreductase-1 (NQO-1), heme oxygenase-1 (HO-1), glutathione peroxidase (*GPX*) and catalase (*CAT*), which significantly reduces antioxidant defense system and cause redox imbalance (Qi *et al.* 2020). It increases the levels of kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), inhibits the expression of erythroid-related nuclear factor 2 (*NRF2*) HO-1, NAD(P)H oxidase, and aggravates oxidative stress (Shi *et al.* 2023). In the ovaries, DOX has been mainly associated with reduced antioxidant capacity, increased reactive oxygen species (ROS), and inflammatory response, leading to cell apoptosis (Han *et al.* 2020).

In this sense, the administration of natural compounds with antioxidant and anti-inflammatory properties may be a potential strategy to prevent or attenuate DOX-induced ovarian damage (Silva *et al.* 2023). Thus, medicinal plants and their derivatives have several beneficial effects, including the reduction of ROS, the prevention of cell apoptosis and the modulation of pro-inflammatory factors (Silva *et al.* 2023; Lins *et al.* 2020). In particular, *Aloe vera* extract has several pharmacological properties such as antioxidant, immunomodulatory, bactericidal, antiviral, antifungal and anti-inflammatory because of a variety of chemicals compounds, such as flavonoids, anthraquinones, enzymes, vitamins and phenolic acids (Ceravolo *et al.* 2021). Recently, *Aloe vera* was used as an adjuvant therapy in the treatment of polycystic ovary syndrome (PCOS) in mice (Ghagane *et al.*, 2023). Furthermore, *Aloe vera* extract improves extracellular matrix distribution and increases mRNA expression for peroxirredoxin 6 in bovine ovarian tissue culture in vitro (Costa *et al.*, 2022). In secondary follicles, *Aloe vera* extract also increased antrum formation, viability and mRNA expression for superoxide dismutase (bovine: Azevedo *et al.*, 2021). Thus, we hypothesize that *Aloe vera* extract can protect ovarian follicles and stromal cells against DOX-induced toxicity.

The present study aims to investigate (I) the protective effects of *Aloe vera* extract on DOX-induced ovarian toxicity and (II) the underlying mechanisms that mediate these effects.

Thus, the effects of *Aloe vera* on follicular morphology, activation of primordial follicles, maintenance of ovarian stromal cell density, extracellular matrix (ECM) configuration, *TNF- α* immunostaining and expression of antioxidant enzymes were evaluated in vitro cultured ovaries.

2 Material and methods

2.1 Chemicals

Doxorubicin (CAS number: 25316-40-9, Sigma), the culture medium and other chemicals used in this study were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA).

2.2 Plant material and extract preparation

The plant was cultured in Sobral - CE, northeast of Brazil (3° 40' 26" S, 40° 14' 20" W), with semi-arid tropical climate and temperatures ranging from 24° to 36 °C. To get the crude extract of *Aloe vera*, leaves at an intermediate stage of maturation were collected. Identification of maturation stage of *Aloe vera* was performed according to Ahlawat *et al.* (2013). The selected leaves had a yellowish-green color and were at the intermediate position of the plant central axis. Immediately after collection, the leaves were disinfected, placed in a thermal box and transported to the laboratory within 1 h at room temperature (~25 °C). Then, the leaves were washed with distilled water and their surface parts were removed to expose colorless gel that was extracted from parenchyma. After extraction, the gel was filtered through a sieve and stored at 4 °C in sterile 50 mL Falcon tubes until used (Costa *et al.* 2021). Before supplementation of culture medium, the extract was filtered again through membranes of 0.45 μ m.

2.3 Animals and evaluation of estrous cycle

This study was conducted in accordance with the guidelines and normative resolutions of the National Council for Control in Animal Experimentation (CONCEA) and the ethical guidelines from Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of Federal University Ceará (approved under protocol N°. 08/20). Adult Swiss female mice (*Mus musculus*) were kept in

polyethylene boxes lined with wood shavings (6 animals/box), with free access to filtered water and feed. The animals were kept at an average temperature of $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, following 12h light-dark cycles.

All female mice from 18 g and/or 2 months of age had their estrous cycle evaluated once a day, for 15 days, between 9:00 h and 10:00 h a.m., by a single evaluator, as established by Marcondes *et al.* (2002). Briefly, the vaginal smear was collected with pipettes filled with saline solution (10 μL , NaCl 0.5 M) and placed on histological slides and evaluated under a light microscope (Nikon, Eclipse, TS 100, Japão). According to the observed cells, the cycle stage, i.e., proestrus, estrus, metestrus or diestrus was determined. Only females with a regular cycle, that lasts 4 to 5 days, were used to carry out the experiment.

2.4 *In vitro culture of ovaries*

The ovaries were cultured according to the protocol described by O'Brien *et al.* (2003), with modifications. Mice ovaries (n=37) were collected and cultured individually in 24-well plates containing 0.5 ml of DMEM/HAMS F12 supplemented with penicillin G (75 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and bovine serum albumin (BSA) (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). This base medium was called DMEM⁺. Then, the ovaries were cultured in DMEM⁺ alone or supplemented with DOX (0,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$); both DOX (0,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and 5% *Aloe vera* (v/v); DOX (0,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and 10% *Aloe vera* (v/v); DOX (0,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and 25% *Aloe vera* (v/v); DOX (0,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and 50% *Aloe vera* (v/v). The *Aloe vera* percentages (5, 10, 25 and 50%) represent a proportion in relation to the total medium (0.5 ml) of each well. The concentrations of *Aloe vera* used in the present study were based on a previous study by Costa *et al.* (2022). The culture was carried out in a humidified incubator at 37.5°C , in 5% CO_2 , for 6 days. Half of the culture medium was replaced every 2 days.

2.5 *Morphological assessment of ovarian follicles and cell density evaluation*

Uncultured and cultured ovaries were fixed in 10% buffered formalin for 24 h and processed for classical histology. After fixation, the ovaries were dehydrated in gradual series

of ethanol, clarified with xylene and embedded in paraffin wax. For each ovary, 5 μm sections were mounted on slides and stained using the hematoxylin-eosin (HE) method. Quantitative analysis of ovarian sections was carried out by an experienced researcher who is unaware of the treatments of each group under analysis. The follicles were classified as primordial or growing follicles (primary and secondary follicles) according to Lins *et al.* (2020). These follicles were classified as morphologically normal when an intact oocyte was surrounded by granulosa cells well organized in one or more layers, and which had no pycnotic nucleus. Degenerated follicles were defined as those with retracted oocyte, pycnotic nucleus and/or surrounded by disorganized granulosa cells, detached from the basement membrane (Gouveia *et al.* 2021).

To evaluate ovarian cellular density, the number of stromal cells was calculated in an area of 100 μm^2 in all treatments. The average number of stromal cells per field was calculated as previously described by Cavalcante *et al.* (2019). All evaluations and measurements were performed by a single operator.

2.6 Analysis of extracellular matrix

To assess collagen fibers of extracellular matrix (ECM) in ovarian cortex, staining with Picrosirius Red (Abcam Kit) was performed following the methodology described by Rittié (2017), with modifications. Ovarian sections of 7 μm were dewaxed in xylene and incubated in Sirius Red solution (0.1%) for 1 hour at room temperature. Then, the excess dye was removed with acetic acid solution (0.5%) and the sections were dehydrated and subjected to slide assembly with subsequent observation under an optical microscope (Nikon, Eclipse, TS 100, Japan) under magnification 400x. For each treatment, the percentage of the area occupied by collagen fibers in ten different fields was measured with the aid of a DS Cooled DS DS-Ri1 camera attached to a microscope (Nikon, Eclipse, TS 100, Japan), and the images were analyzed by Image J Software (Version 1.51p, 2017) with 400x magnification. Only the collagen fibers

were marked in red color, while the follicles remained colorless (white). The analyzer software automatically excludes the circumference of unstained follicles from the total area marked in red. The Image J software was used to quantify the percentage of collagen fiber in uncultured and cultured tissues. The staining intensity of collagen fibers was determined by measuring the average pixel intensity of the total area imaged after background subtraction.

2.7 Immunohistochemistry assay

Ovaries from mice were collected and fixed in 10% buffered formalin. The ovarian tissue was dehydrated with increasing concentrations of ethanol (Dinamica), clarified in xylene (Dinamica), and embedded in paraffin (Dinamica). Section (5 μ m thick) from each paraffin block were cut using a microtome, mounted in Starfrost glass slides (Knittel, Braunschweig, Germany), and taken for immunohistochemistry using procedures previously described by Barberino *et al.* (2019). The slides were incubated in citrate buffer at 95°C in a decloaking chamber (Biocare, Concord, USA) for 40 min to retrieve antigenicity, and endogenous peroxidase activity was prevented by incubation with peroxidase blocker (H₂O₂) for 10 min. Nonspecific binding sites were blocked using 10% normal goat serum for 10 min. Subsequently, the sections were incubated in a humidified chamber for 50 min at room temperature with anti-*TNF- α* antibody. Thereafter, the sections were incubated for 20 min with EasyLink One polymer, followed by DAB staining for protein localization, and counterstaining with hematoxylin for 1 min. For reaction control (no primary antibody), the tissues were incubated with blocking buffer, without the primary antibody included. Images were taken using a Nikon microscope with a camera. For inflammatory activity, the immunostaining of *TNF- α* in the ovarian tissue was subjectively classified as absent (complete absence of detectable labeling), weak (light labeling, visible only under high magnification), moderate (moderate labeling, observable at intermediate magnification) and strong (intense labeling, evident even at low magnification) (Silva *et al.* 2023).

2.8 RNA isolation and real time quantitative PCR (RT-qPCR)

After 6 days of culture, the ovaries of each treatment were collected and stored at -80 °C until total RNA extraction for further analysis of mRNA levels for *SOD*, *CAT*, *TNF- α* and *NRF2*. Total RNA extraction was performed using a TRIzol® purification kit (Invitrogen, São Paulo, Brazil) according to the manufacturer instructions. The mRNA quantification was performed using SYBR Green. The qPCR reactions were composed of 1 µl of cDNA as a template in 9.4 µl of SYBR Green Master Mix (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 9.4 µl of ultra-pure water and 0.5 µM of each primer. The primers were designed to perform amplification of *SOD*, *CAT*, *TNF- α* , *NRF2* and *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* (Table 1). The *GAPDH* was used as the reference gene. The specificity of each primer pair was confirmed using melting curve analysis of qPCR products. The thermal cycling profile for the first round of qPCR was initial denaturation and polymerase activation for 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C, 30 s at 58 °C and 30 s at 72 °C. The final extension was for 10 min at 72°C. All reactions were performed on a Step One Plus instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method was used to transform C_t values into normalized values for relative expression levels.

2.9 Statistical analysis

The statistical analysis was performed using the software GraphPad Prism (8.0). The Chi-square test was used to evaluate the percentages of normal follicles, as well as those of primordial and developing follicles. Data of collagen fibers distribution and stromal cell density passed the normality test and were analyzed by analysis of variance (ANOVA) and Tukey test. The data of levels of mRNA for *SOD*, *CAT*, *TNF- α* and *NRF2* were analyzed by the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's multiple comparisons test. The results were expressed as mean and standard error (mean $\pm$ S.E.M). Differences were considered significant when $P < 0.05$.

3. Results

3.1 Evaluation of follicular morphology after *in vitro* culture of ovaries

Ovaries cultured with DOX alone had reduced percentage of morphologically normal follicles when compared to uncultured ovaries ($P = 0.0013$). However, the presence of 10% or 25% *Aloe vera* was able to block the toxic effects of DOX on ovarian follicles, since ovaries cultured in these treatments and uncultured ovaries had similar percentages of normal follicles ($P > 0.05$). In addition, ovaries cultured in control medium (DMEM⁺) alone or supplemented with both DOX and 10% *Aloe vera* or DOX and 25% *Aloe vera* showed similar percentage of morphologically normal follicles ($P > 0.05$). Moreover, ovaries cultured with DOX and 5% *Aloe vera* or DOX and 50% *Aloe vera* had similar percentages of morphologically normal follicles when compared to ovaries cultured in control medium (DMEM⁺) ($P > 0.05$). However, ovaries cultured in those treatments (DOX and 5% *Aloe vera* or DOX and 50% *Aloe vera*) showed similar percentages of normal follicles compared to ovaries cultured with DOX alone ($P > 0.05$) (Figure 1). Figure 2 shows morphologically normal or degenerated follicles after *in vitro* culture.

3.2 Follicular activation and development in cultured ovaries

Ovaries cultured in presence of DOX showed reduced percentage of primordial follicles when compared to uncultured ovaries ($P < 0.0001$) or ovaries cultured in control medium ($P = 0.0267$) (Figure 3A). Uncultured ovaries and those cultured in control medium alone and supplemented with both DOX and 10% or 25% *Aloe vera* had similar percentages of primordial/developing follicles ($P > 0.05$), showing that *Aloe vera* blocked the effects of DOX. Furthermore, ovaries cultured with both DOX and 5% *Aloe vera* or DOX and 50% *Aloe vera* showed a similar percentage of primordial follicles compared to ovaries cultured in control medium ($P > 0.05$), but did not differ from ovaries cultured with only DOX ($P > 0.05$). Furthermore, ovaries cultured in presence of DOX showed higher percentage of developing follicles when compared to uncultured control. Furthermore, ovaries with DOX and 10% *Aloe*

vera or DOX and 25% *Aloe vera* showed percentage of developing follicles similar to uncultured control ($P = 0.0356$). In addition, ovaries culture with DOX and 5% *Aloe vera*, DOX and 50% *Aloe vera* and DOX alone showed similar percentages of developing follicles when compared to ovaries cultured in control medium ($P > 0.05$) (Figure 3B).

3.3 Evaluation of ovarian extracellular matrix after *in vitro* culture

Ovaries cultured with DOX and 10% *Aloe vera* or DOX and 25% *Aloe vera* showed similar collagen levels per area to each other but significantly higher levels than the uncultured groups ($P = 0.0002$), those cultured in control medium ($P = 0.0001$), or those treated with DOX alone ($P < 0.05$) or DOX and 5% *Aloe vera* ($P < 0.05$) (Figure 4). Figure 5 shows collagen fibers after *in vitro* culture of female mice ovaries.

3.4 Stromal cell density after *in vitro* culture of mice ovaries

Ovaries cultured in medium supplemented with DOX alone had a significantly reduced stromal cell density when compared to uncultured ovaries ($P = 0.0001$) or ovaries cultured in other treatments ($P = 0.0001$) (Figure 6). However, the presence of *Aloe vera* in all concentrations prevented the toxic effects of DOX. Furthermore, ovaries cultured with both DOX and 10% *Aloe vera* or DOX and 25% *Aloe vera* had a stromal cell density statistically similar to uncultured ovaries ($P > 0.05$), indicating preservation of tissue structure. In contrast, ovaries cultured with both DOX and 5% *Aloe vera* or both DOX and 50% *Aloe vera* had a stromal cell density comparable to ovaries cultured in control medium ($P > 0.05$), suggesting a protective effect of these concentrations against DOX toxicity. Figure 7 shows histological sections of uncultured ovaries and ovaries cultured in control medium, with DOX alone or combined with different concentrations of *Aloe vera* (5%, 10%, 25%, and 50%).

3.5 Expression of *TNF-α* in mice ovaries

Uncultured ovaries and ovaries cultured with both DOX and 25% *Aloe vera* did not have *TNF-α* staining in stromal cells. However, stromal cells from ovaries cultured in control

medium alone or supplemented with both DOX and 10% *Aloe vera* showed weak staining, while ovaries cultured with DOX showed moderate staining for *TNF- α* . In addition, a weak staining for *TNF- α* was observed in oocytes from primordial follicles from ovaries cultured with only DOX. Furthermore, granulosa cells from primary follicles showed weak staining in ovaries cultured in medium supplemented with DOX alone, while ovaries cultured in other treatments showed no immunolabeling. Oocytes from secondary follicles stained weakly for *TNF- α* in all cultured ovaries, while oocytes from uncultured control stained moderately. Furthermore, granulosa cells from secondary follicles had moderate staining in uncultured ovaries, or ovaries cultured in control medium alone or supplemented with both DOX with 10% *Aloe vera*. On the other hand, ovaries cultured only with only DOX and both DOX with 25% *Aloe vera* showed weak staining (Table 2). The control reaction showed no staining (Figure 8A).

3.6 mRNA levels for *SOD*, *CAT*, *NRF2* and *TNF- α* in mice ovaries

Ovaries cultured with both DOX and 10% *Aloe vera* had significantly increased mRNA levels of *NRF2* ($p = 0.0046$), *SOD* ($p = 0.0338$), and *CAT* ($p = 0.0035$) when compared to ovaries cultured in medium supplemented with DOX alone (Figure 9B, C, D). In addition, ovaries cultured with both DOX and 10% *Aloe vera* or DOX and 25% *Aloe vera* showed statistically similar mRNA levels of *CAT* and *NRF2* when compared to ovaries cultured in control medium ($P > 0.05$). However, *SOD*, *CAT*, and *NRF2* mRNA levels in ovaries cultured in control medium alone or supplemented with DOX and 25% *Aloe vera* did not differ significantly from those in ovaries cultured with DOX alone ($P > 0.05$). Furthermore, no significant differences were observed in *TNF- α* mRNA levels across treatments ($P > 0.05$) (Figure 9A).

4 Discussion

This study shows that the presence of *Aloe vera* extract (10% and 25%) in culture medium is associated with a protective effect on ovarian follicles and stromal cells against the

deleterious effects of DOX. In the ovary, DOX-mediated toxicity occurs through the induction of oxidative stress and increased inflammatory response (Silva *et al.* 2023; Fabbri *et al.* 2019). In addition, chemotherapeutic drugs can also have detrimental effects on ovarian stroma (Spears *et al.* 2019). *Aloe vera* extract has several bioactive compounds such as α -tocopherol, carotenoids, ascorbic acid, tannins, flavonoids that can control oxidative stress and inflammation (Farrugia *et al.* 2019; López *et al.* 2019). Aloin, a compound from *Aloe vera*, attenuated lipopolysaccharide-induced inflammation by inhibiting ROS-mediated activation (Ma *et al.* 2018). Results from previous studies indicate that *Aloe vera* extract has beneficial effects on *in vitro* culture of bovine ovarian tissue (Costa *et al.* 2022) and bovine secondary follicles (Azevedo *et al.* 2022).

The presence of *Aloe vera* (10% and 25%) in the culture medium increased the levels of collagen fibers present in the ECM. The ECM, which provides structural strength to tissues, also plays a role in cell differentiation, development and migration, which may have significant effects on follicular growth and oocyte quality (Parkes *et al.* 2021). It is clear from the literature that *Aloe vera* can stimulate faster wound healing by increasing the collagen content within the wound (Khan *et al.* 2023; Gao *et al.* 2019). This property of *Aloe vera* to influence healing includes modulating collagen production, migration, and cell proliferation (Genesi *et al.* 2023). In addition, it may influence through the modulation of proteases such as matrix metalloproteinases (MMP) and collagenases. Curto *et al.* (2014) showed that *Aloe vera* increases the synthesis of type III collagen. In addition, a significant increase in the matrix metalloproteinases MMP9 and MMP2 was reported after DOX treatment (Fabbri *et al.* 2019). The MMPs play a role in the pathogenesis of inflammatory diseases with focal tissue destruction (Nissinen and Kähäri 2014).

In our study, ovaries cultured with DOX showed a higher staining for *TNF- α* , mainly in the ovarian stroma and oocytes of primordial follicles, but the presence of 25% *Aloe vera*

blocked this expression. The *TNF- α* is an important pro-inflammatory cytokine and inducer of apoptosis (Hussain *et al.* 2021). It is known that ovarian stromal cells play an important role in follicular growth and maintenance by producing cytokines, growth factors and intracellular proteins (Yoon *et al.* 2020). Kaipia *et al.* (1996) showed that *TNF- α* stimulates apoptotic DNA fragmentation and apoptosis in ovarian follicles *in vitro*. The underlying mechanism behind the inflammatory response may be elevated ROS levels, impaired tissue antioxidant defense system, and lipid peroxidation (Ma *et al.* 2018). Several factors, including ROS, can induce the expression of cyclooxygenase, a pro-inflammatory enzyme (Ma *et al.* 2019). The influence of *Aloe vera* on cyclooxygenase-2 (COX-2) may contribute to the anti-inflammatory and antioxidant properties, since *Aloe vera* can suppress the increase of mRNA for COX-2 (Farrugia *et al.* 2019; Ceravolo *et al.* 2021). The DOX causes an imbalance between free radicals and antioxidants, and stimulates the release of *TNF- α* (Spears *et al.* 2019; Hussain *et al.* 2021). In another study with human corneal epithelial cells, Ceravolo *et al.* (2021) observed that pretreatment with *Aloe vera* extract reduced inflammatory cytokine levels (*TNF- α* , IL -6 and IL-1 β) after hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced stress. Therefore, natural products, such as *Aloe vera* extract, with anti-inflammatory and antioxidant properties can protect ovaries against toxicity caused by DOX (López *et al.* 2019).

This study showed that co-treatment with both DOX and 10% *Aloe vera* increased the expression of *NRF2*. The *NRF2* is considered the key regulator of the cellular antioxidant response. Upon activation, *NRF2* is translocated to the nucleus and stimulates the expression of many genes encoding antioxidant, metabolic, and detoxification proteins, and orchestrates an important cellular defense mechanism. In addition, *NRF2* can reduce the expression of pro-inflammatory cytokines, such as *TNF- α* , interleukin (IL)-6 and IL-1 β (Rojo *et al.* 2018). Stern *et al.* (2022) showed that tissue-selective modulation of *NRF2* activity by CN06 confers cardioprotection without desensitizing the antitumor effect of DOX in triple-negative breast

cells. The presence of both DOX and 10% *Aloe vera* increased the expression of *SOD* and *CAT*. The DOX increases oxidative stress and reduces total antioxidant capacity, while the overproduction of ROS plays a vital role in the toxicity observed in different tissues (Zaręba *et al.* 2022; Spears *et al.* 2019). Antioxidant enzymes, such as *SOD*, *CAT* and glutathione peroxidase (*GPx*), detoxify oxygen free radicals and efficiently eliminate ROS under normal physiological conditions (Ahmed *et al.* 2022). In human corneal epithelial cells pre-incubated with *Aloe vera* extract, a significant reduction of oxidative stress markers and increased expression of *NRF2*, *SOD* and *CAT* were observed when compared to cells cultured with H₂O₂ alone (Ceravolo *et al.* 2021). These findings show that *Aloe vera* is associated with a reduction in DOX-induced damage in cultured ovaries by attenuating damage caused by oxidative stress.

In conclusion, the presence of *Aloe vera* (10% and 25%) in culture medium is associated with a protective effect in ovaries of mice against the in vitro toxic effects caused by DOX and has been associated with a positive effect on follicle survival, cell proliferation, and the expression of antioxidant enzymes.

Acknowledgments: The authors thank *Cearense Foundation for Supporting Scientific and Technological Development* – Funcap. Research productivity scholarship, stimulus to interiorization and technological innovation – BPI 02/2020. Number: BP4-0172-00319.01.00/20.

Conflicts of interest: The authors declare that they have no conflicts and competing interests.

References

- Ahlawat KS, Ahlawat S, Gulia N, khatkari B. 2013. Effect of plant maturity on leaf growth, yield and physicochemical properties of *Aloe vera* gel. *AgroFOOD industry hi-tech*. (Italy). 24: 22-24.
- Ahmed OM, Galaly SR, Mostafa MMA, Eed EM, Ali TM, Fahmy AM, Zaky MY. 2022. Thyme oil and thymol counter doxorubicin-induced hepatotoxicity *via* modulation of inflammation, apoptosis, and oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2022:6702773. doi: 10.1155/2022/6702773.

Azevedo VAN, Barroso PAA, Vasconcelos EM, Costa FC, Assis EIT, Silva BR, Paulino LRM, Silva AWB, Donato MMA, Peixoto CA, *et al.* 2022. Effects of *Aloe vera* extract on growth, viability, ultrastructure and expression of mRNA for antioxidant enzymes in bovine secondary follicles cultured *in vitro*. Anim Reprod Sci. 247:107078. doi: 10.1016/j.anireprosci.2022.107078.

Barberino RS, Lins TLBG, Monte APO, Gouveia BB, Campinho DSP, Palheta RC Jr, Smitz JEJ, Matos MHT. 2022. Melatonin attenuates cyclophosphamide-induced primordial follicle loss by interaction with MT₁ receptor and modulation of PTEN/Akt/FOXO3a proteins in the mouse ovary. Reprod Sci. 29:2505-2514. doi: 10.1007/s43032-021-00768-z.

Cavalcante BN, Matos-Brito BG, Paulino LRFM, Silva BR, Aguiar AWM, de Almeida EFM, Souza ALP, Vasconcelos GL, De Assis EIT, Silva AWB, *et al.* 2019. Effects of melatonin on morphology and development of primordial follicles during *in vitro* culture of bovine ovarian tissue. Reprod. Domest. Anim. 54:1567-1573.

Ceravolo I, Mannino F, Irrera N, Squadrito F, Altavilla D, Ceravolo G, Pallio G, Minutoli L. 2021. Health potential of *Aloe vera* against oxidative stress induced corneal damage: An "in vitro" study. Antioxidants (Basel). 10:318. doi: 10.3390/antiox10020318.

Costa FDC, Vasconcelos EM, Azevedo VAN, Teixeira de Assis EI, Paulino LRFM, Silva AWB, Silva JRV, Batista ALPS. 2022. *Aloe vera* increases collagen fibres in extracellular matrix and mRNA expression of peroxiredoxin-6 in bovine ovarian cortical tissues cultured *in vitro*. Zygote. 30:365-372. doi: 10.1017/S0967199421000824.

Costa FDC, Vasconcelos EM, Nunes Azevedo VA, Feitosa Melo Paulino LR, Soares MD, Viana Silva JR, Paz Souza AL. 2021. *Aloe vera* increases mRNA expression of antioxidant enzymes in cryopreserved bovine ovarian tissue and promotes follicular growth and survival after in vitro culture. Cryobiology. 102:104-113. doi: 10.1016/j.cryobiol.2021.07.005.

Curto EM, Labelle A, Chandler HL. 2014. *Aloe vera*: an *in vitro* study of effects on corneal wound closure and collagenase activity. Vet Ophthalmol. 17:403-10. doi: 10.1111/vop.12163. Fabbri R, Macciocca M, Vicenti R, Caprara G, Piccinni MP, Paradisi R, Terzano P, Papi A, Seracchioli R. 2019. Epigallocatechin-3-gallate inhibits doxorubicin-induced inflammation on human ovarian tissue. Biosci Rep. 39:1-15. doi: 10.1042/BSR20181424.

Farrugia CE, Burke ES, Haley ME, Bedi KT, Gandhi MA. 2019. The use of *Aloe vera* in cancer radiation: An updated comprehensive review. Complement Ther Clin Pract. 35:126-130. doi: 10.1016/j.ctcp.2019.01.013.

Gao Y, Kuok KI, Jin Y, Wang R. 2019. Biomedical applications of *Aloe vera*. Crit Rev Food Sci Nutr. 59:S244-S256. doi: 10.1080/10408398.2018.1496320.

Genesi BP, de Melo Barbosa R, Severino P, Rodas ACD, Yoshida CMP, Mathor MB, Lopes PS, Viseras C, Souto EB, Ferreira da Silva C. 2023. *Aloe vera* and copaiba oleoresin-loaded chitosan films for wound dressings: microbial permeation, cytotoxicity, and in vivo proof of concept. Int J Pharm. 634:122648. doi: 10.1016/j.ijpharm.2023.122648.

Ghagane SC, Toragall MM, Akbar AA, Hiremath MB. 2022. Effect of *Aloe vera* (*Barbadensis* Mill) on letrozole induced polycystic ovarian syndrome in Swiss albino mice. J Hum Reprod Sci. 15: 126-132. doi: 10.4103/jhrs.jhrs_22_22.

Gouveia BB, Barberino RS, Dos Santos Silva RL, Lins TLBG, da Silva Guimarães V, do Monte APO, Palheta RCJ, de Matos MHT. 2021. Involvement of PTEN and FOXO3a proteins in the protective activity of protocatechuic acid against cisplatin-induced ovarian toxicity in mice. Reprod. Sci. 28:865-876. doi:10.1007/s43032-020-00305-4.

Han J, Wang H, Zhang T, Chen Z, Zhao T, Lin L, Xia G, Wang C. 2020. Resveratrol attenuates doxorubicin-induced meiotic failure through inhibiting oxidative stress and apoptosis in mouse oocytes. Aging (Albany NY). 12:7717-7728. doi: 10.18632/aging.103061.

Herrero Y, Velázquez C, Pascuali N, May M, Abramovich D, Scotti L, Parborell F. 2023. Resveratrol alleviates doxorubicin-induced damage in mice ovary. Chem Biol Interact. 376:110431. doi: 10.1016/j.cbi.2023.110431.

Hussain MA, Abogresha NM, AbdelKader G, Hassan R, Abdelaziz EZ, Greish SM. 2021. Antioxidant and anti-inflammatory effects of crocin ameliorate doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats. Oxid Med Cell Longev. 2021:8841726. doi: 10.1155/2021/8841726.

Kaipia A, Chun SY, Eisenhauer K, Hsueh AJ. 1996. Tumor necrosis factor-alpha and its second messenger, ceramide, stimulate apoptosis in cultured ovarian follicles. Endocrinology. 137:4864-70. doi: 10.1210/endo.137.11.8895358.

Kciuk M, Gielecińska A, Mujwar S, Kołat D, Kałuzińska-Kołat Ż, Celik I, Kontek R. 2023. Doxorubicin-an agent with multiple mechanisms of anticancer activity. Cells. 12:659. doi: 10.3390/cells12040659.

Khan A, Andleeb A, Azam M, Tehseen S, Mehmood A, Yar M. 2023. *Aloe vera* and ofloxacin incorporated chitosan hydrogels show antibacterial activity, stimulate angiogenesis and accelerate wound healing in full thickness rat model. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 111:331-342. doi: 10.1002/jbm.b.35153.

Lins TLBG, Gouveia BB, Barberino RS, Silva RLS, Monte APO, Pinto JGC, Campinho DSP, Palheta RC, Matos MHT. 2020. Rutin prevents cisplatin-induced ovarian damage via antioxidant activity and regulation of PTEN and FOXO3a phosphorylation in mouse model. Reproductive Toxicology. 98:209-217. doi.org/10.1016/j.reprotox.2020.10.001.

López Z, Femenia A, Núñez-Jinez G, Salazar Zúñiga MN, Cano ME, Espino T, Knauth P. 2019. *In Vitro* Immunomodulatory effect of food supplement from *Aloe vera*. Evid Based Complement Alternat Med. 2019:5961742. doi: 10.1155/2019/5961742.

Ma T, Kandhare AD, Mukherjee-Kandhare AA, Bodhankar SL. 2019. Fisetin, a plant flavonoid ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity in experimental rats: the decisive role of caspase-3, COX-II, cTn-I, iNOs and *TNF-α*. Mol Biol Rep. 46:105-118. doi: 10.1007/s11033-018-4450-y.

- Ma Y, Tang T, Sheng L, Wang Z, Tao H, Zhang Q, Zhang Y, Qi Z. 2018. Aloin suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation by inhibiting JAK1-STAT1/3 activation and ROS production in RAW264.7 cells. *Int J Mol Med*. 42:1925-1934. doi: 10.3892/ijmm.2018.3796.
- Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. 2002. Determination of the estrous cycle phases of rats: some help- 502 full considerations. *Braz. J. Biol.* 62:609-14. doi:10.1590/s1519-69842002000400008.
- Methaneethorn J, Tengcharoen K, Leelakanok N, AlEjjeilat R. 2023. Population pharmacokinetics of doxorubicin: A systematic review. *Asia Pac J Clin Oncol*. 19:9-26. doi: 10.1111/ajco.13776.
- Nelson M, Levine J. 2023. Current issues in fertility preservation among pediatric and adolescent cancer patients. *Curr Oncol Rep*. 25:793-802. doi: 10.1007/s11912-023-01401-9.
- Nissinen L, Kähäri VM. 2014. Matrix metalloproteinases in inflammation. *Biochim Biophys Acta*. 1840:2571-80. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.03.007.
- O'Brien MJ, Pendola JK, Eppig JJ. 2003. A revised protocol for *in vitro* development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. *Biol. Reprod*. 68:1682-6. doi: 10.1095/biolreprod.102.013029.
- Owumi SE, Adebisi GE, Odunola OA. 2023. Epirubicin toxicity in rat's ovary and uterus: A protective role of 3-Indolepropionic acid supplementation. *Chem Biol Interact*. 374:110414. doi:10.1016/j.cbi.2023.110414.
- Parkes WS, Amargant F, Zhou LT, Villanueva CE, Duncan FE, Pritchard MT. 2021. Hyaluronan and collagen are prominent extracellular matrix components in bovine and porcine ovaries. *Genes (Basel)*. 12:1186. doi: 10.3390/genes12081186.
- Peter S, Alven S, Maseko RB, Aderibigbe BA. 2022. Doxorubicin-based hybrid compounds as potential anticancer agents: A Review. *Molecules*. 27:4478. doi: 10.3390/molecules27144478.
- Qi W, Boliang W, Xiaoxi T, Guoqiang F, Jianbo X, Gang W. 2020. Cardamonin protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice by restraining oxidative stress and inflammation associated with *NRF2* signaling. *Biomed Pharmacother*. 122:109547. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109547.
- Rittié, L. 2017. Method for Picrosirius red-polarization detection of collagen fibers in tissue sections. *Methods Mol. Biol*. 1627:395-407. doi:10.1007/978-1-4939-7113-8_26.
- Rojo de la Vega M, Chapman E, Zhang DD. 2018. *NRF2* and the hallmarks of cancer. *Cancer Cell*. 34:21-43. doi: 10.1016/j.ccell.2018.03.022.
- Shi S, Chen Y, Luo Z, Nie G, Dai Y. 2023. Role of oxidative stress and inflammation-related signaling pathways in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Cell Commun Signal*. 21:61. doi: 10.1186/s12964-023-01077-5.
- Silva RLDS, Lins TLBG, Monte APOD, de Andrade KO, de Sousa Barberino R, da Silva GAL, Campinho DDSP, Junior RCP, Matos MHT. 2023. Protective effect of gallic acid on

doxorubicin-induced ovarian toxicity in mouse. *Reprod Toxicol.* 115:147-156. doi: 10.1016/j.reprotox.2022.12.008.

Spears N, Lopes F, Stefansdottir A, Rossi V, Felici M, Anderson RA, Klinger FG. 2019. Ovarian damage from chemotherapy and current approaches to its protection, *Human Reproduction Update.* 25:673–693. doi.org/10.1093/humupd/dmz027.

Stern S, Liang D, Li L, Kurian R, Lynch C, Sakamuru S, Heyward S, Zhang J, Kareem KA, Chun YW, *et al.* 2022. Targeting CAR and *NRF2* improves cyclophosphamide bioactivation while reducing doxorubicin-induced cardiotoxicity in triple-negative breast cancer treatment. *JCI Insight.* 7:e153868. doi: 10.1172/jci.insight.153868.

Yoon SY, Yoon JA, Park M, Shin EY, Jung S, Lee JE, Eum JH, Song H, Lee DR, Lee WS, *et al.* 2020. Recovery of ovarian function by human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells in cisplatin-induced premature ovarian failure in mice. *Stem Cell Res Ther.* 11:255. doi: 10.1186/s13287-020-01769-6.

Zaręba N, Więclawik K, Kizek R, Hosnedlova B, Kepinska M. 2022. The Impact of Fullerenes as Doxorubicin Nano-Transporters on Metallothionein and Superoxide Dismutase Status in MCF-10A Cells. *Pharmaceutics.* 14:102. doi: 10.3390/pharmaceutics14010102.

Tables

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

Target gene	Primer sequence (5' → 3')	Forward (F) Reverse (R)	GenBank accession no.
<i>GAPDH</i>	GAACGGATTTGGCCGTATTG	F	GU214026.1
	GTGAGTGGAGTCATACTGGAAC	R	
<i>SOD</i>	CTCGTCTTGCTCTCTCTGGTC	F	NM_011434.2
	CTTGCCTTCTGCTCGAAGTG	R	
<i>CAT</i>	CCAATGGCAATTACCCGTCC	F	NM_009804.2
	CCTTGTGAGGCCAAACCTTG	R	
<i>TNF-α</i>	CAGAAAGCATGATCCGCGAC	F	D84199.2
	CCGCCTGGAGTTCTGGAAG	R	
<i>NRF2</i>	TTGCCCTAGCCTTTTCTCCG	F	NM_010902.4
	CTAGGAGATAGCCTGCTCGC	R	

Table 2. Relative intensity of immunohistochemistry staining for *TNF-α* in ovaries of mice.

<i>TNF-α</i>					
Structure	Uncultured ovaries	DMEM ⁺	DOX	AV10%+DOX	AV25%+DOX
Primordial Follicle					
Oocyte	-	-	+	-	-
Granulosa cells	-	-	-	-	-
Primary Follicle					
Oocyte	+	+	+	+	+
Granulosa cells	-	-	+	-	-
Secondary Follicle					
Oocyte	++	+	+	+	+
Granulosa cells	++	++	+	++	+
Stromal cells	-	+	++	+	-

(-) absent; (+) weak; (++) moderate; (+++) strong immunoreaction.

Figures

Figure 1. Percentage of normal follicles in uncultured ovaries (D0) and in ovaries cultured in control medium (DMEM⁺) alone or supplemented with DOX (0.3 µg/ml), *Aloe vera* (AV) 5% + DOX, AV 10% + DOX, AV 25% + DOX, and AV 50% + DOX. Statistically significant differences ($P < 0.05$).

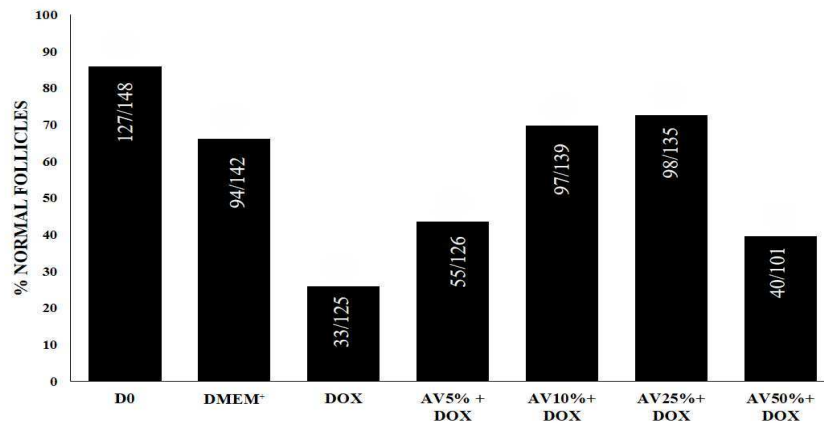


Figure 2. Representative images of ovarian sections from female mice cultured in vitro for 6 days showing morphologically normal (A-C) and degenerated (D-F) follicles of different developmental stages stained with hematoxylin and eosin. (A) Normal and (D) degenerated primordial follicle; (B) Normal and (E) degenerated primary follicle; (C) Normal and (F) degenerated secondary follicle. Granulosa cells (GC); Oocyte (O); Oocyte nucleus (N). (400x - Scale bar: 100 µm).

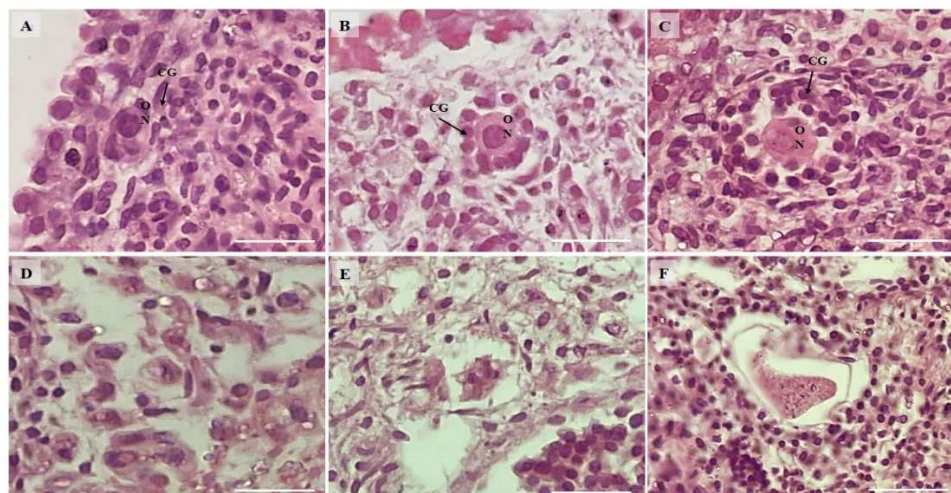


Figure 3. Percentage of primordial (a) and developing (b) follicles in uncultured (D0) and cultured ovaries in control medium (DMEM⁺) alone or supplemented with DOX (0.3 μ g/ml), AV 5% + DOX, AV 10% + DOX, AV 25% + DOX and AV 50% + DOX. Statistically significant differences ($P < 0.05$).

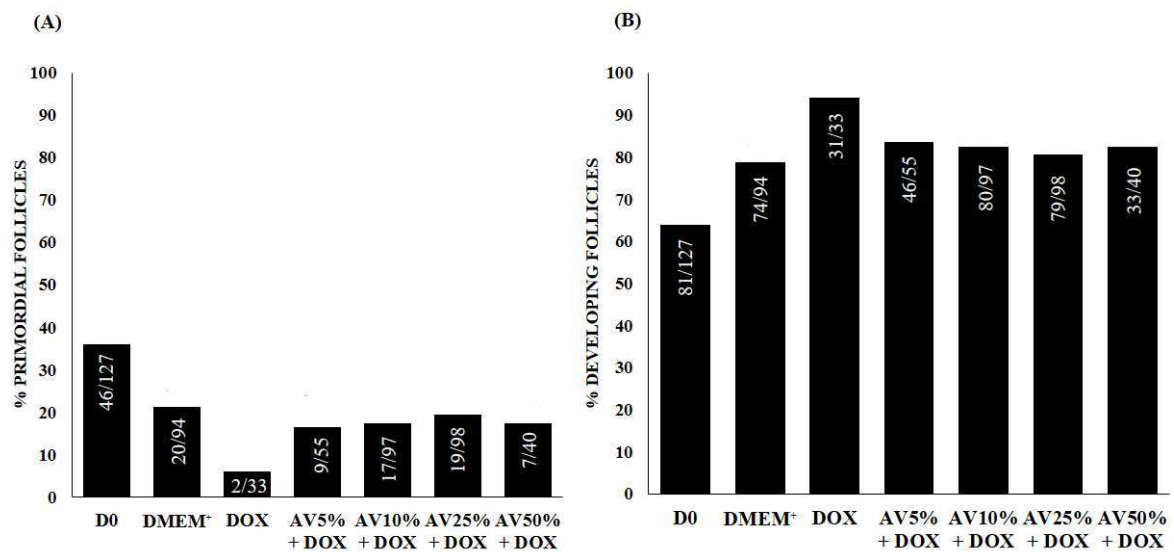


Figure 4. Collagen levels (mean $\pm$ SD) in the ovaries of mice before or after culture in DMEM⁺ alone or supplemented with DOX (0.3 μ g/ml), AV 5% + DOX, AV 10% + DOX, AV 25% + DOX and AV 50% + DOX. Statistically significant differences ($P < 0.05$).

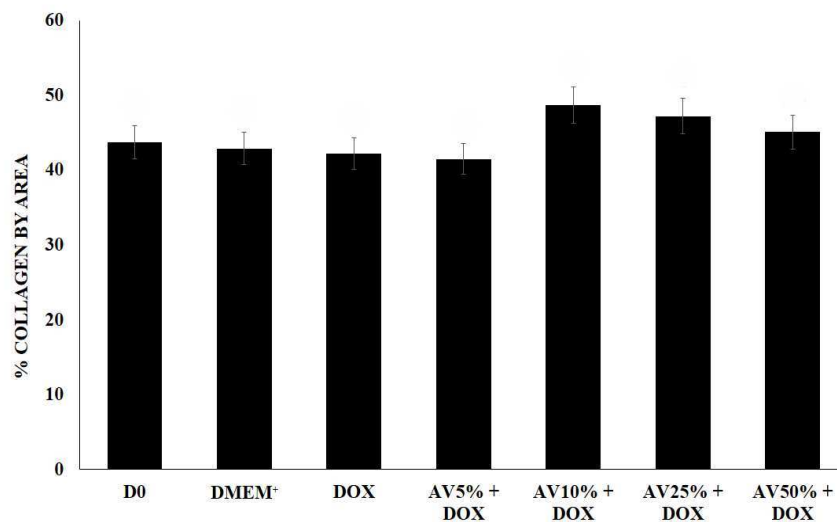


Figure 5. Representative images of collagen fibers labeled by Picrosirius red. (A) D0; (B) DMEM⁺; (C) DOX; (D) AV5% + DOX; (E) AV10% + DOX; (F) AV25% + DOX; (G) AV50% + DOX. (Magnification: 400x).

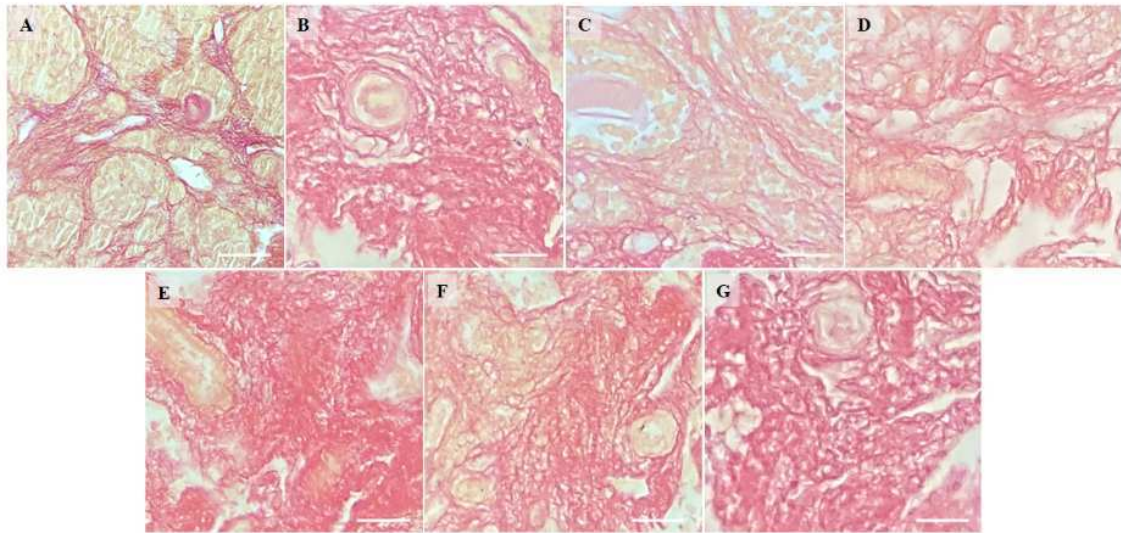


Figure 6. Stromal cell density of ovarian tissue after culture in DMEM⁺ alone or supplemented with DOX (0.3 μ g/ml), AV 5% + DOX, AV 10% + DOX, AV 25% + DOX and AV 50% + DOX. Statistically significant differences ($P < 0.05$).

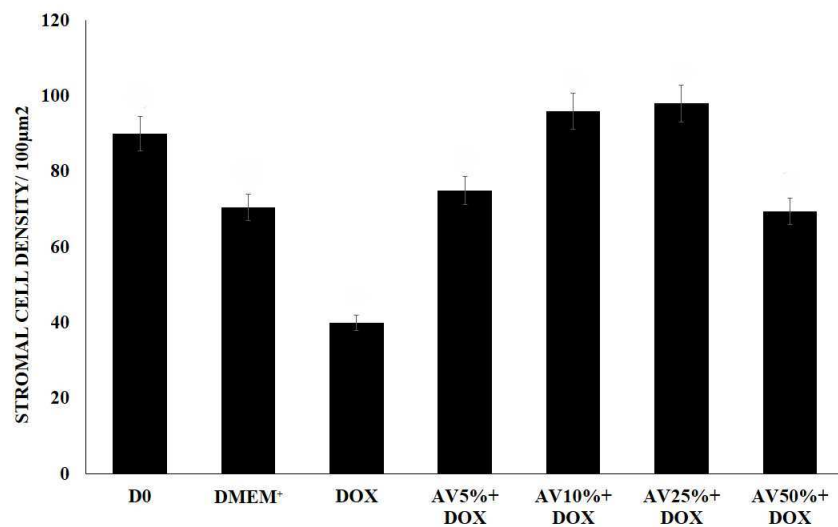


Figure 7. Representative images of ovarian stromal density after 6 days of culture. (A) Non cultured control; (B) DMEM⁺; (C) DOX; (D) AV 5% + DOX; (E) AV 10% + DOX; (F) AV 25% + DOX; (G) AV 50% + DOX. (Magnification: 400x).

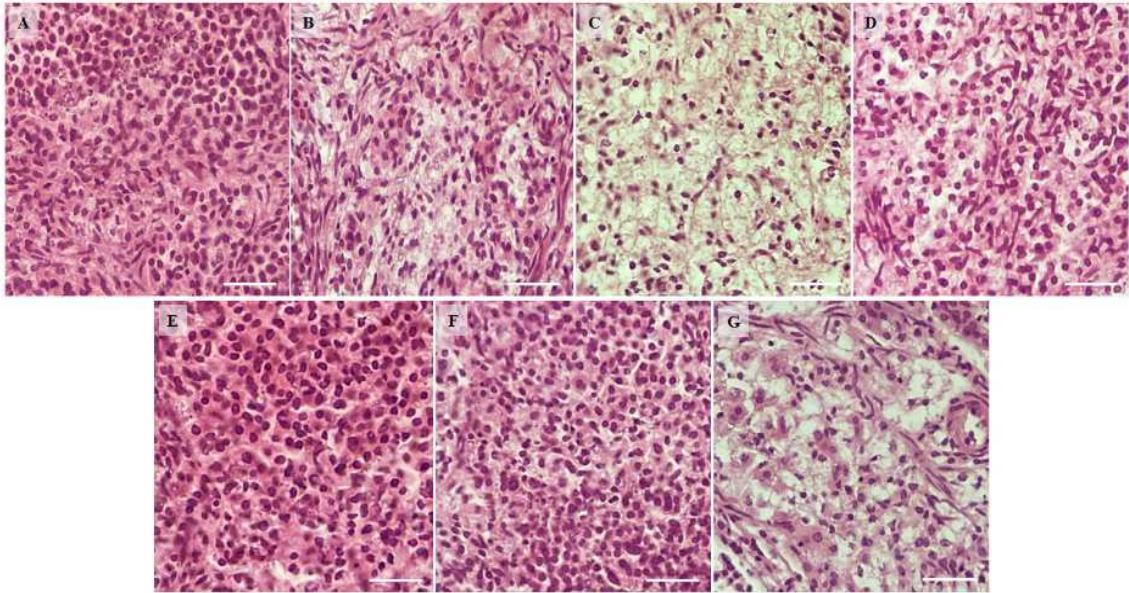


Figure 8. Immunohistochemical staining for *TNF- α* in mice ovaries cultured *in vitro* for 6 days in the presence or absence of AV or DOX: (A) negative control; (B) fresh control; (c) DMEM⁺ alone or supplemented with (d) DOX (0.3 μ g/ml), (e) AV10% + DOX and (f) AV25% + DOX. (Magnification:400x).

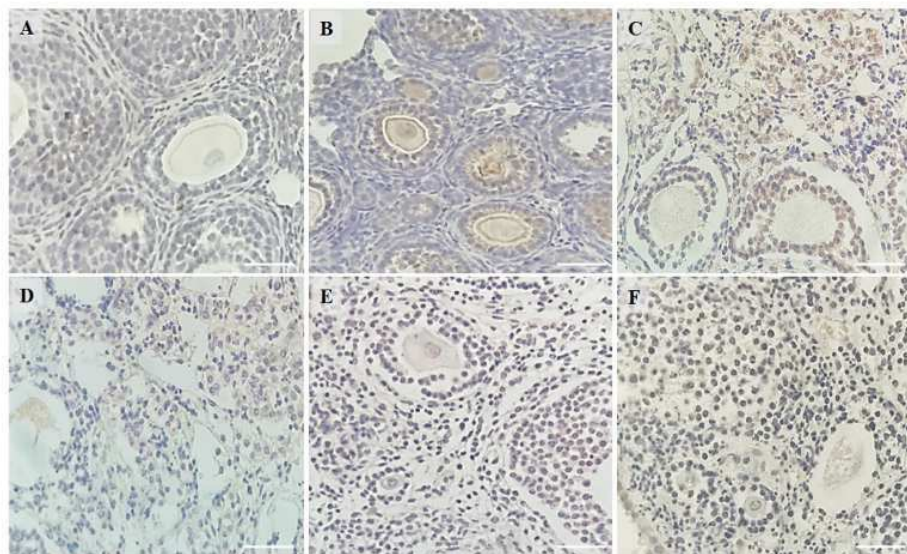
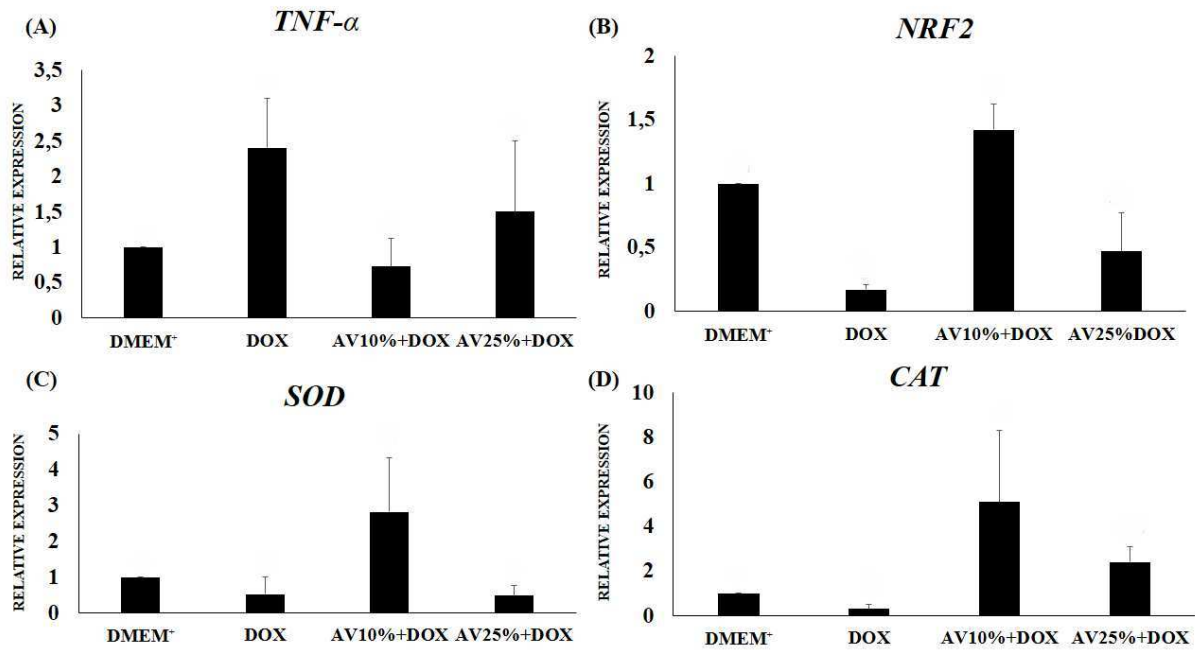


Figure 9. mRNA levels for *TNF- α* (A), *NRF2* (B), *SOD* (C) and *CAT* (D) in ovaries after 6 days culture in the control medium (DMEM⁺) alone or supplemented with DOX (0.3 μ g/ml), AV10% + DOX and AV25% + DOX. Statistically significant differences ($P < 0.05$).



8 CAPÍTULO III

The protective effects of *Aloe vera* extract against doxorubicin-induced degeneration in ovarian follicles and stromal cells in mice

[Os efeitos protetores do extrato de *Aloe vera* contra a degeneração induzida por doxorubicina em folículos ovarianos e células estromais em camundongos]

Artigo publicado em 2025 no periódico: *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*

Qualis CAPES A3 (área de Biotecnologia); Fator de impacto (2023): 1,9

DOI: <https://doi.org/10.1590/1414-431X2025e14402>

Protective effects of *Aloe vera* extract against doxorubicin-induced degeneration in ovarian follicles and stromal cells in mice

E.I.T. de Assis^{1,2}(<https://orcid.org/0000-0001-8164-3937>), A.N. Godinho²(<https://orcid.org/0000-0003-3410-2315>), J.M.O. Freire²(<https://orcid.org/0000-0002-3412-8964>), M.F. de Lima Neto^{1,2}(<https://orcid.org/0000-0003-0034-0606>), J.J.N. Costa^{1,2}(<https://orcid.org/0000-0003-3578-5664>), A.L.P. Souza^{1,2}(<https://orcid.org/0000-0002-0348-4026>), A.P.O. do Monte³(<https://orcid.org/0000-0001-9945-4552>), M.H.T. Matos³(<https://orcid.org/0000-0001-6215-5292>), A.L.M. de Sousa⁴(<https://orcid.org/0000-0002-4733-5102>), J.R.V. Silva¹([@">https://orcid.org/0000-0002-5970-6177](https://orcid.org/0000-0002-5970-6177))@, and A.W.B. Silva^{1,2}(<https://orcid.org/0000-0003-4105-426x>)

¹Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia da Reprodução, Universidade Federal do Ceará, Sobral, CE, Brasil

²Núcleo de Pesquisa em Experimentação Animal, Universidade Federal do Ceará, Sobral, CE, Brasil

³Núcleo de Biotecnologia Aplicada ao Desenvolvimento do Folículo Ovariano, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, PE, Brasil

⁴Embrapa Caprinos e Ovinos, Fazenda Três Lagoas, Sobral, CE, Brasil

Abstract

The present study aimed to evaluate the protective effects of *Aloe vera* on doxorubicin (DOX)-induced degeneration in ovarian follicles and stromal cells in mice. Mice (n=48) were randomly divided into six groups. The positive control group mice received pretreatment of N-acetylcysteine orally (*p.o.*), followed by a single intraperitoneal (*i.p.*) dose of DOX after 1 h (NAC+DOX). The negative control group mice were pre-treated with saline (*p.o.*) and administered a single DOX dose (*i.p.*) after 1 h (SAL+DOX). The other groups of mice were pre-treated with different concentrations (0.1, 1.0, or 10.0 mg/kg; *p.o.*) of *Aloe vera* and then received a single dose of DOX (*i.p.*) after 1 h (AV0.1+DOX, AV1.0+DOX, and AV10.0+DOX). The control group received saline *p.o.* and *i.p.* (SAL+SAL). *Aloe vera* was administered once daily for 3 consecutive days. On the fourth day, the ovaries were processed for histological analysis, immunohistochemistry, and real-time PCR (mRNA for superoxide dismutase (*SOD*), catalase (*CAT*), nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (*NRF2*), and tumor necrosis factor- α (*TNF- α*). Results showed that 0.1 and 1.0 mg/kg *Aloe vera* protected ovarian follicles and stromal density against DOX-induced degeneration. Furthermore, 0.1 and 1.0 mg/kg *Aloe vera*

reduced TNF- α protein expression and increased *NRF2*, *SOD*, and *CAT* mRNA levels. In conclusion, 0.1 and 1.0 mg/kg *Aloe vera* had protective effects against DOX-induced degeneration in ovarian follicles and stromal cells in mice.

Key words: *Aloe vera*; Doxorubicin; Chemotherapy; Mice; Fertility

Correspondence: J.R.V. Silva: <jrvsilva@ufc.br>

Running title: *Aloe vera* protects ovaries from doxorubicin damage

Introduction

Cancer is a public health problem worldwide and it is expected that by 2030 there will be over 25 million new cases (1). Advances in chemotherapy have improved the prognosis of cancer patients, and the survival rate has increased for most cancers, including those affecting young women (2). Doxorubicin (DOX), a broad-spectrum antineoplastic drug, is effective in a variety of tumors, including sarcomas (3), but has deleterious effects on female fertility, even at low doses (4). DOX exerts anticancer activities by mainly inhibiting DNA replication and RNA transcription, inhibiting topoisomerase II activity, and inducing free radical production and peroxidation (5). The toxic effects of DOX in the ovary have been associated with reduced antioxidant capacity, increased production of reactive oxygen species (ROS), mitochondrial damage, and inflammatory response, leading to cell apoptosis (6).

The administration of natural substances before or during antineoplastic chemotherapy has emerged as a strategy to prevent ovarian damage and preserve fertility in cancer patients (7). Recently, Silva *et al.* (6) showed that gallic acid protects the mouse ovary against DOX-induced damage by improving glutathione reductase (GSH) concentrations, mitochondrial activity, and cell proliferation, inhibiting inflammation and apoptosis. Furthermore, it has been observed that rutin has the potential to protect ovarian follicles against cisplatin-induced toxicity through its antioxidant effects via PTEN/FOXO3a (8). Oxidative stress and inflammation induced by antineoplastic drugs have been associated to ovarian injury, and the use of natural compounds with antioxidant and anti-inflammatory properties have been highlighted (6,8).

Aloe vera is a drought-resistant stemless succulent plant of the lily family native to warm climates and has been used medicinally by different cultures. Recently, Atiba *et al.* (9) reported that *Aloe vera* extract has anti-inflammatory and antioxidant effects. *Aloe vera* extract contains

a large amount of antioxidant substances (Table 1; 10–15) that are very efficient in modulating or inactivating ROS (16). Although many positive effects are attributed to polysaccharides, it is believed that biological activities result from the synergistic action of various compounds, rather than a single chemical substance. *Aloe vera* extract effectively inhibits inflammatory reactions by inhibiting interleukin (IL)-6 and IL-8, reducing leukocyte adhesion, increasing IL-10 levels, and decreasing tumor necrosis factor (TNF)- α levels (9). *In vitro* studies show that *Aloe vera* extract improves extracellular matrix distribution and increases mRNA expression for peroxiredoxin 6 (*PRDX6*) in bovine ovarian tissue cultured *in vitro* (17). Moreover, catalase (CAT) is an important enzyme that scavenges H₂O₂ and indirectly inhibits lipid peroxidation and membrane damage. The expression of antioxidant enzymes is positively regulated by transcription factor nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF-2) (18). Recently, the therapeutic benefits of *Aloe vera* as adjunctive therapy have been observed in the treatment of polycystic ovary syndrome (PCOS) in female mice (19). Thus, it is hypothesized that the bioactive compounds present in *Aloe vera* exert antioxidant and anti-inflammatory effects, which may protect the ovaries from the harmful effects of DOX, contributing to the preservation of ovarian health and mitigating the adverse side effects of chemotherapy.

The present study aimed to evaluate whether *Aloe vera* extract helps preserve follicular morphology and development, ovarian stromal cell density, and collagen fiber in the extracellular matrix by regulating mRNA expression of *SOD*, *CAT*, *TNF- α* , and *NRF2*, as well as the expression of TNF- α protein in mice treated with DOX.

Material and Methods

Aloe vera extract

The *Aloe vera* extract was obtained from the leaves of the plant at an intermediate stage of maturity. For this, the plant was cultivated in a region with temperatures ranging from 24°C to 36°C, a semi-arid tropical climate. Leaves were collected using properly sanitized slides and transported to the laboratory. In the laboratory, the leaves were washed with distilled water and their surface was removed to expose the liquid and clear gel (17). For lyophilization, the gel was homogenized and transferred to a sterile 15-mL falcon tube and stored for 24 h at –80°C, then the tubes were kept in the ScanVac CoolSafe Touch Superior lyophilizer (LaboGene A/S, Denmark) for 4 days (20). The lyophilized extract obtained was then diluted in saline solution for administration to the animals.

Chemicals

DOX (2 mg/mL injectable solution) was purchased from Libbs Fauldoso® (Brazil), while the other chemicals used in this study were from Sigma Chemical Co. (USA).

Animals and estrous cycle evaluation

This study was performed in accordance with the guidelines from the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of the Federal University of Ceará (approved under protocol No. 08/20). Adult *Swiss* female mice (*Mus musculus*, 18 g and/or 2 months old) were kept in boxes, at an average temperature of 22±2°C, with free access to filtered water and food in 12-h light-dark cycles. During a period of 15 days, the estrous cycle was evaluated once a day, between 9:00 and 10:00 a.m., as established by Marcondes *et al.* (21). According to the cell type, the estrus cycle stage was classified as proestrus, estrus, metestrus, or diestrus. Only mice with a regular cycle were used in the experiments.

Experimental groups

Animals (n=48) were randomly divided into six groups (8 animals per group): Positive control (N-acetylcysteine: 150 mg/kg, *p.o.*; Sigma Aldrich Chemical Co.) (NAC+DOX); Negative control, DOX (10 mg/kg) and saline (SAL+DOX); 0.1 mg/kg *Aloe vera* and DOX (AV0.1+DOX); 1.0 mg/kg *Aloe vera* and DOX (AV1.0+DOX); 10.0 mg/kg *Aloe vera* and DOX (AV10.0+DOX); and Control (0.15 M NaCl vehicle, 0.03 mL) (SAL+SAL). The animals in the positive control group were pre-treated with N-acetylcysteine orally (*p.o.*) and, after 1 h, DOX was administered intraperitoneally (*i.p.*) in a single dose. In the negative control, the mice were pre-treated with saline (0.15 M NaCl, 0.3 mL; *p.o.*) and after 1 h, DOX (*i.p.*) was administered in a single dose. The other groups of mice were pre-treated with different concentrations (0.1, 1.0, or 10.0 mg/kg; *p.o.*) of *Aloe vera* and then received a single dose of DOX (*i.p.*) after 1 h. In the control group, the animals were pre-treated with saline (0.15 M NaCl, 0.3 mL; *p.o.*) and after 1 h, with saline (0.15 M NaCl, 0.15 mL; *i.p.*) in a single dose. Then, *Aloe vera* was administered once a day for 3 days. On the fourth day, i.e., 24 h after the last administration of *Aloe vera* at different concentrations, the ovaries were collected.

Analysis of ovarian follicles and stromal cell density

The ovaries were fixed in 10% buffered formalin for 24 h, dehydrated in ethanol, clarified with xylene and embedded in paraffin wax. Then, 5-µm sections were mounted on slides and stained with hematoxylin-eosin (HE). The follicles were classified as primordial or

growing follicles (primary, secondary, and antral follicles) and as morphologically normal when an intact oocyte was surrounded by well-organized granulosa cells, without pycnotic nucleus. Follicles with retracted oocytes, pycnotic nucleus, and/or surrounded by disorganized granulosa cells were classified as degenerated (8).

To evaluate stromal cell density, the number of cells in 100 μm^2 was counted and the average number of stromal cells per field was calculated as previously described (22).

Analysis of collagen fiber in extracellular matrix

To evaluate collagen fibers, ovarian sections were stained with Picrosirius red (Abcam Kit, ab246832, USA) according to Rittié (23). The percent area occupied by collagen fibers in ten different fields in ovaries from each treatment group was measured using a camera attached to a microscope (Nikon, Eclipse, TS 100, Japan). The images were analyzed by ImageJ software (version 1.51p, 2017, NIH, USA) at 400x magnification. The collagen fibers were marked in red, while the follicles remained colorless. The software automatically excludes the circumference of unstained follicles from the total area marked in red. The percent area of collagen fibers in tissues and the staining intensity were determined by measuring the average pixel intensity of the total area after background subtraction (ImageJ Software).

Immunohistochemistry assay

Ovaries were fixed in 10% buffered formalin, dehydrated with ethanol, clarified in xylene, and embedded in paraffin. Sections (5- μm thick) from each ovary were mounted on Starfrost glass slides (Knittel, Germany) and used for immunohistochemical reaction according to Barberino *et al.* (24). The slides were incubated in citrate buffer at 95°C in a decloaking chamber (Biocare, USA) for 40 min to retrieve antigenicity, and endogenous peroxidase activity was prevented by incubation with peroxidase blocker (H_2O_2) for 10 min. Nonspecific binding sites were blocked using 10% normal goat serum for 10 min. Then, the sections were incubated in a humidified chamber at room temperature with anti-*TNF- α* antibody for 50 min. Subsequently, the sections were incubated for 20 min with EasyLink One (EasyPath, Brazil) polymer, stained with DAB, and counterstained with hematoxylin for 1 min. For negative control, the tissues were incubated with blocking buffer, without the primary antibody. *TNF- α* immunostaining in the ovarian tissue was classified as absent, weak, moderate, or strong (6).

Quantification of *SOD*, *CAT*, *TNF- α* , and *NRF2* mRNA levels

The ovaries were stored at -80°C until total RNA extraction. TRIzol[®] purification kit (Invitrogen, Brazil) was used to perform total RNA extraction, according to the manufacturer's instructions. The qPCR reactions were composed of 1 μL cDNA as a template in 9.4 μL of SYBR Green Master Mix (PE Applied Biosystems, USA), 9.4 μL of ultra-pure water, and 0.5 μM of each primer. The primers were designed to specifically amplify *SOD*, *CAT*, *TNF- α* , *NRF2* mRNAs and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), which was used as reference gene (Table 2). Melting curve analysis of PCR products was used to confirm the specificity of each primer pair. The thermal cycling profile for the first round of qPCR was initial denaturation and polymerase activation for 10 min at 95°C , followed by 40 cycles of 15 s at 95°C , 30 s at 58°C , and 30 s at 72°C (Step One Plus instrument, Applied Biosystems). The final extension was performed at 72°C for 10 min. The $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$ method was used to transform Ct values into normalized values for relative expression levels (25).

Statistical analysis

The GraphPad Prism (8.0, USA) software was used to perform the statistical analyses. Chi-squared test was used to compare the rate of normal follicles, as well as those of primordial and developing follicles. Data of collagen fiber distribution and stromal cell density were found to be normally distributed and analyzed by analysis of variance (ANOVA) and Tukey test. *SOD*, *CAT*, *TNF- α* , and *NRF2* mRNA levels were compared by Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's multiple comparison test. The results are reported as means $\pm$ SEM. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

Results

Evaluation of follicular morphology

Mice treated with saline solution and DOX had lower percentage of normal follicles compared to those treated only with saline solution. However, animals treated with NAC and DOX or *Aloe vera* (0.1, 1.0 mg/kg) and DOX had normal percentages of follicles similar to those that received saline solution, indicating a protective effects of the substance. No significant differences were found among mice treated with NAC and DOX, *Aloe vera* (0.1, 1.0, or 10.0 mg/kg) and DOX, or saline solution alone (Figure 1). Figure 2A–H shows the morphology of normal or degenerated follicles.

Ovaries of mice from all treatment groups had similar percentages of normal primary follicles compared to the saline group. However, animals treated with both 1.0 mg/kg *Aloe vera*

and DOX showed a higher percentage of primary follicles than the animals treated with saline solution and DOX. Furthermore, mice treated with NAC and DOX, and 0.1, 1.0, or 10.0 mg/kg *Aloe vera* and DOX showed a similar percentage of normal secondary follicles compared to the animals that received only saline solution. Similarly, mice treated with saline solution and DOX or 10.0 mg/kg *Aloe vera* and DOX showed a similar percentage of normal secondary follicles. The percentages of primordial and antral follicles did not differ among treatment groups (Figure 3).

Analysis of collagen fibers in the ovaries

Mice treated with 0.1 or 1.0 mg/kg *Aloe vera* and DOX showed a higher percentage of collagen fibers per area than those treated with saline solution and DOX or 10.0 mg/kg *Aloe vera* and DOX. Mice treated with NAC and DOX, saline solution and DOX, or 10.0 mg/kg *Aloe vera* and DOX showed a similar percentage of collagen fibers per area to the animals treated only with saline solution (Figure 4A). Figure 4B shows collagen fibers in mice ovaries.

Stromal cell density

As shown in Figure 5A, animals treated with 1.0 mg/kg of *Aloe vera* and DOX and those treated with saline alone exhibited a higher density of stromal cells compared to the other treatments. Furthermore, animals treated with NAC and DOX or 0.1 mg/kg *Aloe vera* and DOX showed similar stromal cell densities. Animals treated with 0.1 or 10.0 mg/kg *Aloe vera* together with DOX showed comparable stromal cell densities. On the other hand, the ovaries of animals treated with DOX and saline demonstrated a lower density of stromal cells. Figure 5B illustrates the ovarian stroma of all groups.

TNF- α immunostaining

The immunohistochemistry results (Figure 6) show that mice treated with saline solution and DOX showed weak labeling for *TNF- α* in the oocyte of primordial follicles, while granulosa cells and oocytes of secondary and antral follicles had strong staining. Moderate staining was seen in the ovarian stroma. Furthermore, animals treated with *Aloe vera* (0.1 and 1.0 mg/kg) and DOX or only saline solution showed absent staining in primordial follicles, weak or moderate staining in primary, secondary, and antral follicles, and absent staining in ovarian stroma. The reaction control showed no staining.

***TNF- α* , *NRF2*, *CAT*, and *SOD* mRNA Levels**

Ovaries from mice treated with saline solution and DOX had a higher expression of *TNF- α* than those treated with saline solution only. In addition, animals treated with NAC and DOX or *Aloe vera* (0.1 and 1.0 mg/kg) and DOX showed a similar expression for *TNF- α* to mice treated only with saline solution (Figure 7A). However, mice treated with NAC and DOX, saline solution and DOX, or *Aloe vera* (0.1 and 1.0 mg/kg) and DOX showed no difference in *TNF- α* mRNA levels. Furthermore, the animals treated with 1.0 mg/kg *Aloe vera* and DOX showed a higher expression for *NRF2*, *CAT*, and *SOD* than those treated only with saline solution. However, the mice treated with NAC and DOX, saline solution and DOX or 0.1 mg/kg *Aloe vera* and DOX, and only saline solution showed no difference in *NRF2*, *CAT*, and *SOD* levels (Figure 7B–D).

Discussion

This study found that co-administration of *Aloe vera* extract reduces DOX-induced damage in mice ovaries. This protective effect was characterized by a higher proportion of normal follicles, preservation of the ovarian stroma, and an increase in mRNA levels of antioxidant enzymes. These findings strongly suggest that *Aloe vera* extract protects the ovaries by enhancing the antioxidant response, thereby mitigating the severe damage inflicted by DOX. The identification of protective agents capable of preventing ovarian damage during antitumor treatment represents a fundamental advance in the preservation of fertility in cancer patients (26). The *Aloe vera* extract (0.1, 1.0, or 10.0 mg/kg) maintained the percentage of normal follicles similar to the control group and protected the ovarian stroma against DOX toxic effects.

DOX treatment reduced stromal density and consequently affected the supply of nutrients required for follicular development (26). Previous studies also showed that DOX damaged ovarian microvasculature and increased ROS production, which triggers apoptosis in stromal cells (2). It has been reported that *Aloe vera* can induce angiogenesis (27). Thus, we believe the antioxidant and angiogenic activities of *Aloe vera* extract reduced ROS production and protected the ovarian vascular network, protecting stromal cells and follicles against DOX toxicity (28). It is important to highlight that DOX administration results in vascular damage evidenced by reduced ovarian blood flow and decreased ovarian size (29). Primordial and early-preantral follicles do not have their own individual vascular supply and depend on blood vessels in the surrounding stroma (30).

In our study, ovaries of mice treated with *Aloe vera* extract (1.0 mg/kg) showed a higher percentage of collagen fibers. The maintenance of collagen and ovarian stromal cells observed

in the *Aloe vera*-treated mice may have contributed to the maintenance of the percentage of morphologically normal follicles, since the extracellular matrix (ECM) is composed of a protein network rich in collagen, polysaccharides and water. The stabilization of the ECM structure also allows a specialized microenvironment to regulate cell activity and development, including cell proliferation and survival, steroidogenesis, regulation of cell aggregation, and morphology (17). During inflammatory conditions or tissue damage, the expression of matrix metalloproteinases (MMP) is increased by the action of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α and transforming growth factor beta (TGF- β) (31). MMPs have the function of degrading ECM macromolecules, including collagen, fibronectin, laminin, and proteoglycans (32). Sánchez *et al.* (33) showed that *Aloe vera* gel had a protective effect in mice with alcohol-induced gastritis by increasing the inhibitory activity of MMP-9. Furthermore, Yagi (34) showed the ability of aloe emodin, a compound from *Aloe vera*, to reduce the cytotoxicity of TNF- α .

In the present study, DOX increased TNF- α protein expression in secondary and antral follicles, as well as in ovarian stroma. In contrast, animals treated with both *Aloe vera* (0.1 and 1.0 mg/kg) and DOX showed no immunostaining in primordial follicles and ovarian stroma, whereas primary, secondary, and antral follicles showed weak or moderate immunostaining. The cyclooxygenase (prostaglandin catalyst) inhibition may contribute to the anti-inflammatory and antioxidant properties of *Aloe vera* (35). The phytosterols (campesterol, β -sitosterol, lupeol, and cholesterol) present in *Aloe vera* have been shown to potentiate the anti-inflammatory actions (36). Nguyen *et al.* (37), using molecular docking, showed that many components of *Aloe vera* can directly interact with TNF- α , suggesting that binding to active compounds can destabilize TNF- α , shorten its half-life, or suppress its production since TNF- α can trigger apoptosis through activation of caspase-8. In this study, we observed that animals treated with DOX exhibited elevated TNF- α expression levels. However, when *Aloe vera* was administered at doses of 0.1 and 1.0 mg/kg, TNF- α expression levels resembled those of the animals in the control group. In a previous study, it was observed that *Aloe vera* can elevate the level of interleukin-10 (IL-10), an anti-inflammatory cytokine produced by various cells, including monocytes/macrophages and T lymphocytes (28). Therefore, *Aloe vera* showed beneficial effects in reducing inflammation, being able to neutralize the TNF- α present in the tissue and reduce its expression.

Our results also demonstrated that *Aloe vera* extract (1.0 mg/kg) can elevate the expression of *NRF2* and antioxidant enzymes such as *SOD* and *CAT*, thereby contributing to the preservation of the antioxidant environment and safeguarding against damage induced by

DOX. Oxidative stress is one of the primary mechanisms responsible for DOX toxicity (6). The structure of DOX has quinone and hydroquinone portions that form semiquinone radical intermediates, leading to increased oxidative stress and depletion of antioxidant defenses (38). Enzymes of the antioxidant system are actively involved in the maintenance of oxidant/antioxidant homeostasis and in the detoxification of xenobiotics in the biological system (36). Previous studies show that *Aloe vera* extract could increase the activity of important antioxidant enzymes such as CAT and SOD and increase GSH in plasma and tissues (39). In addition, glucomannan from *Aloe vera* extract activated NRF2, decreased ROS levels, and maintained the integrity of the intestinal barrier in mice (40).

In conclusion, co-administration of *Aloe vera* extract in DOX-treated mice helped preserve ovarian follicles and stromal cells. The *Aloe vera* extract reduced ROS through antioxidant enzymes and inhibited *TNF- α* expression. These findings suggest that *Aloe vera* extract may have potential as an adjuvant therapy in clinical settings, offering a protective strategy for patients undergoing chemotherapy, particularly in preserving ovarian function and fertility. Further clinical studies are needed to explore its efficacy and safety in humans.

Acknowledgments

The authors thank Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for scholarships.

Funding

This work was supported by the Cearense Foundation to Support Scientific and Technological Development (Funcap) within the scope of the Research Productivity Grant, Stimulus for Interiorization and Technological Innovation - BPI 02/2020; Number: BP4-0172-00319.01.00/20.

References

1. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin*. 2022 Jan;72(1):7-33.

2. Lopes F, Tholeti P, Adiga SK, Anderson RA, Mitchell RT, Spears N. Chemotherapy induced damage to spermatogonial stem cells in prepubertal mouse *in vitro* impairs long-term spermatogenesis. *Toxicol Rep*. 2020 Dec 26;8:114-23.
3. Maruzzo M, Rastrelli M, Lumachi F, Zagonel V, Basso U. Adjuvant and neoadjuvant chemotherapy for soft tissue sarcomas. *Curr Med Chem*. 2013;20(5):613-20.
4. Nishi K, Gunasekaran VP, Arunachalam J, Ganeshan M. Doxorubicin-induced female reproductive toxicity: an assessment of ovarian follicular apoptosis, cyclicity and reproductive tissue histology in Wistar rats. *Drug Chem Toxicol*. 2018 Jan;41(1):72-81.
5. Foglietta F, Macrì M, Panzanelli P, Francovich A, Durando G, Garello F, *et al*. Ultrasound boosts doxorubicin efficacy against sensitive and resistant ovarian cancer cells. *Eur J Pharm Biopharm*. 2023 Feb;183:119-31.
6. Silva RLDS, Lins TLBG, Monte APO, de Andrade KO, Barberino RS, da Silva GAL, *et al*. Protective effect of gallic acid on doxorubicin-induced ovarian toxicity in mouse. *Reprod Toxicol*. 2023 Jan;115:147-56.
7. Lambertini M, Ceppi M, Poggio F, Peccatori FA, Jr Azim HA, Ugolini D, *et al*. Ovarian suppression using luteinizing hormone-releasing hormone agonists during chemotherapy to preserve ovarian function and fertility of breast cancer patients: a meta-analysis of randomized studies. *Ann Oncol*. 2015 Dec;26(12):2408-19.
8. Lins TLBG, Gouveia BB, Barberino RS, Silva RLS, Monte APO, Pinto JGC, *et al*. Rutin prevents cisplatin-induced ovarian damage via antioxidant activity and regulation of PTEN and FOXO3a phosphorylation in mouse model. *Reprod Toxicol*. 2020 Dec;98:209-17.
9. Atiba A, Abdo W, Ali E, Abd-Elsalam M, Amer M, Abdel Monsef A, *et al*. Topical and oral applications of *Aloe vera* improve healing of deep second-degree burns in rats via modulation of growth factors. *Biomarkers*. 2022;27(6):608-17.
10. Nejatizadeh-Barandozi, F. Antibacterial activities and antioxidant capacity of *Aloe vera*. *Org Med Chem Lett*. 2013 Jul 19;3(1):5.
11. Ni S, Turner D, Yates KM, Tizard I. Isolation and characterization of structural components of *Aloe vera* L. leaf pulp. *Int Immunopharmacol*. 2004 Dec 20;4(14):1745-55.
12. Sadiq U, Gill H, Chandrapala J. Temperature and pH stability of anthraquinones from native *Aloe vera* Gel, spray-dried and freeze-dried *Aloe vera* powders during storage. *Foods*. 2022 May 30;11(11):1613.
13. Kim HS, Kacew S, Lee BM. *In vitro* chemopreventive effects of plant polysaccharides (*Aloe barbadensis* Miller, *Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum* and *Coriolus versicolor*). *Carcinogenesis*. 1999 Aug;20:1637-40.

14. Kumar S, Kumar R. Role of acemannan O-acetyl group in murine radioprotection. *Carbohydr Polym.* 2019 Mar 1;207:460-70.
15. Souza JRS, Da Silva RH, Zanachi JA. Características fitoterapêuticas da *Aloe vera* [in Portuguese]. *Unifunec Científica Multidisciplinar.* 2018;6(8):23–39.
16. Erfani Majd N, Shahraki R, Tabandeh MR, Hosseinifar S. Protective effects of *Aloe vera* gel on cisplatin-induced oxidative stress, apoptosis and neurons structure in rat hippocampus. *Vet Res Forum.* 2022 Mar;13(1):111-19.
17. Costa FC, Vasconcelos EM, Azevedo VAN, Paulino LRFM, Soares MD, Silva JRV, *et al.* *Aloe vera* increases mRNA expression of antioxidant enzymes in cryopreserved bovine ovarian tissue and promotes follicular growth and survival after *in vitro* culture. *Cryobiology.* 2021 Oct;102:104-13.
18. Jiang D, Guo Y, Niu C, Long S, Jiang Y, Wang Z, *et al.* Exploration of the antioxidant effect of spermidine on the ovary and screening and identification of differentially expressed proteins. *Int J Mol Sci.* 2023 Mar 17;24(6):5793.
19. Ghagane SC, Toragall MM, Akbar AA, Hiremath MB. Effect of *Aloe vera* (*Barbadensis* Mill) on letrozole induced polycystic ovarian syndrome in Swiss albino mice. *J Hum Reprod Sci.* 2022 Apr-Jun;15(2):126-32.
20. do Egito AS, Rosinha GMS, Laguna LE, Miclo L, Girardet JM, Gaillard JL. Fast electrophoretic detection method of adulteration of caprine milk by bovine milk. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2006;58(5):932-39.
21. Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some help- 502 full considerations. *Braz J Biol.* 2002;62:609-14.
22. Cavalcante BN, Matos-Brito BG, Paulino LRFM, Silva BR, Aguiar AWM, de Almeida EFM, *et al.* Effects of melatonin on morphology and development of primordial follicles during *in vitro* culture of bovine ovarian tissue. *Reprod Domest Anim.* 2019 Dec;54:1567-73.
23. Rittié L. Method for picrosirius red-polarization detection of collagen fibers in tissue section. *Methods Mol Biol.* 2017;1627:395-407.
24. Barberino RS, Lins TLBG, Monte APO, Gouveia BB, Campinho DSP, Jr Palheta RC, *et al.* Melatonin attenuates cyclophosphamide-induced primordial follicle loss by interaction with MT₁ receptor and modulation of PTEN/Akt/FOXO3a proteins in the mouse ovary. *Reprod Sci.* 2022 Sep;29(9):2505-14.
25. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C(T)$) Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8.

26. Herrero Y, Velázquez C, Pascuali N, May M, Abramovich D, Scotti L, *et al.* Resveratrol alleviates doxorubicin-induced damage in mice ovary. *Chem Biol Interact.* 2023 May 1;376:110431.
27. Eamlamnam K, Patumraj S, Visedopas N, Thong-Ngam D. Effects of *Aloe vera* and sucralfate on gastric microcirculatory changes, cytokine levels and gastric ulcer healing in rats. *World J Gastroenterol.* 2006;12(13):2034-39.
28. Ahmed OM, Galaly SR, Mostafa MMA, Eed EM, Ali TM, Fahmy AM, *et al.* Thyme oil and thymol counter doxorubicin-induced hepatotoxicity *via* modulation of inflammation, apoptosis, and oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev.* 2022 Feb 7;2022: 6702773.
29. Kim S, Kim SW, Han SJ, Lee S, Park HT, Song JY, *et al.* Molecular mechanism and prevention strategy of chemotherapy- and radiotherapy-induced ovarian damage. *Int J Mol Sci.* 2021 Jul 13;22(14):7484.
30. Kizuka-Shibuya F, Tokuda N, Takagi K, Adachi Y, Lee L, *et al.* Locally existing endothelial cells and pericytes in ovarian stroma, but not bone marrow-derived vascular progenitor cells, play a central role in neovascularization during follicular development in mice. *J Ovarian Res.* 2014 Jan 21;7:10.
31. Muncie JM, Weaver VM. The physical and biochemical properties of the extracellular matrix regulate cell fate. *Curr Top Dev Biol.* 2018;130:1-37.
32. McCarthy SM, Bove PF, Matthews DE, Akaike T, van der Vliet A. Nitric oxide regulation of MMP-9 activation and its relationship to modifications of the cysteine switch. *Biochemistry.* 2008 May 27;47:5832–40.
33. Sánchez M, González-Burgos E, Iglesias I, Gómez-Serranillos MP. Pharmacological update properties of *Aloe Vera* and its major active constituents. *Molecules.* 2020;25(6):1324.
34. Yagi A. Putative prophylaxes of *Aloe vera* for age-related diseases. *J Gastroenterol Hepatol Res.* 2015;4(1):1407-24.
35. Farrugia CE, Burke ES, Haley ME, Bedi KT, Gandhi MA. The use of *Aloe vera* in cancer radiation: an updated comprehensive review. *Complement Ther Clin Pract.* 2019 May;35:126-30.
36. Gupta VK, Kumar A, Pereira ML, Siddiqi NJ, Sharma B. Anti-inflammatory and antioxidative potential of *aloe vera* on the cartap and malathion mediated toxicity in Wistar rats. *Int J Environ Res Public Health.* 2020 Jul 17;17(14):5177.
37. Nguyen TK, Phung HH, Choi WJ, Ahn HC. Network pharmacology and molecular docking study on the multi-target mechanisms of *Aloe vera* for non-alcoholic steatohepatitis treatment. *Plants (Basel).* 2022 Dec 19;11(24):3585.

38. Birari L, Wagh S, Patil KR, Mahajan UB, Unger B, Belemkar S, *et al.* Aloin alleviates doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats by abrogating oxidative stress and pro-inflammatory cytokines. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2020 Sep;86(3):419-26.
39. Sumi FA, Sikder B, Rahman MM, Lubna SR, Ulla A, Hossain MH, *et al.* Phenolic content analysis of *Aloe vera* gel and evaluation of the effect of Aloe gel supplementation on oxidative stress and fibrosis in isoprenaline-administered cardiac damage in rats. *Prev Nutr Food Sci.* 2019 Sep;24(3):254-64.
40. Zhang D, Zhou X, Zhang K, Yu Y, Cui SW, Nie S. Glucomannan from *Aloe vera* gel maintains intestinal barrier integrity via mitigating anoikis mediated by Nrf2-mitochondria axis. *Int J Biol Macromol.* 2023 Apr 30;235:123803.

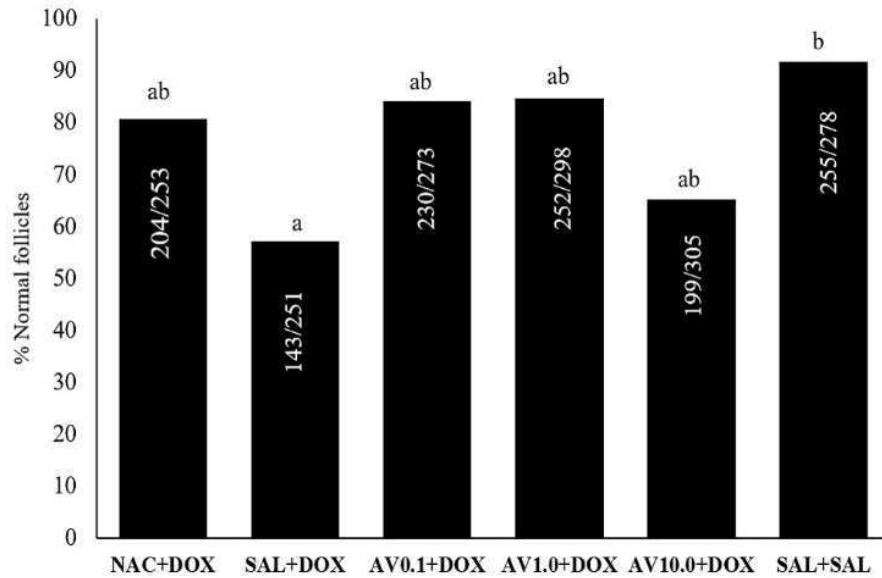


Figure 1. Percentage of normal follicles in ovaries of mice treated with doxorubicin (DOX), saline (SAL), N-acetylcysteine (NAC), and *Aloe vera* (AV) (0.1, 1.0, or 10.0 mg/kg). Different letters indicate significant differences between treatments ($P < 0.05$; ANOVA).

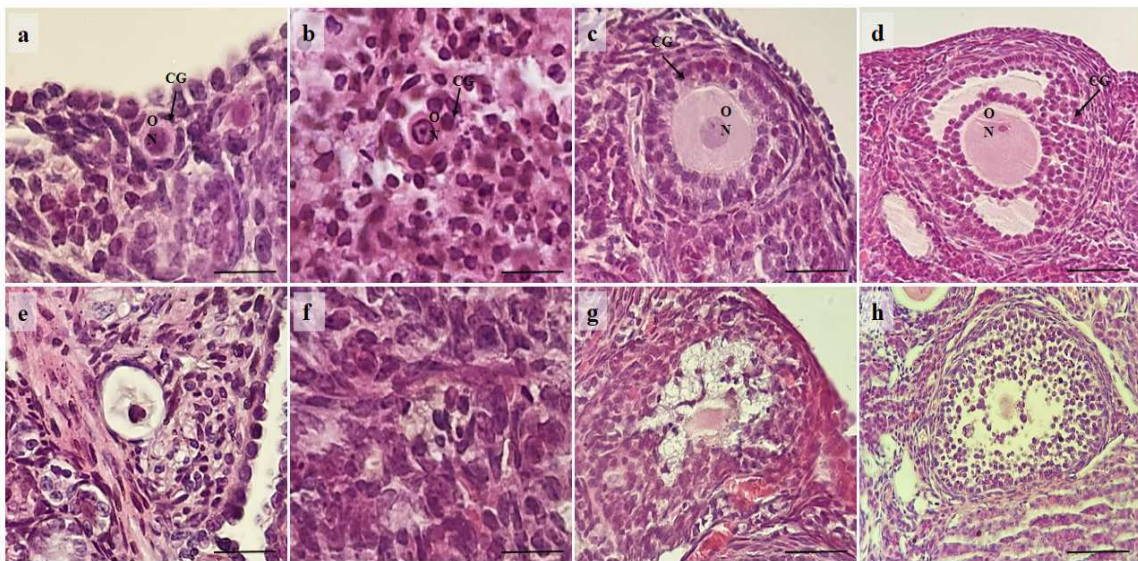


Figure 2. Morphologically normal and degenerated primordial (A, E), primary (B, F), secondary (C, G), and tertiary follicles (D, H), respectively. GC: granulosa cells; O: oocyte; N: oocyte nucleus. Arrows indicate follicles. Scale bar: 100 μm .

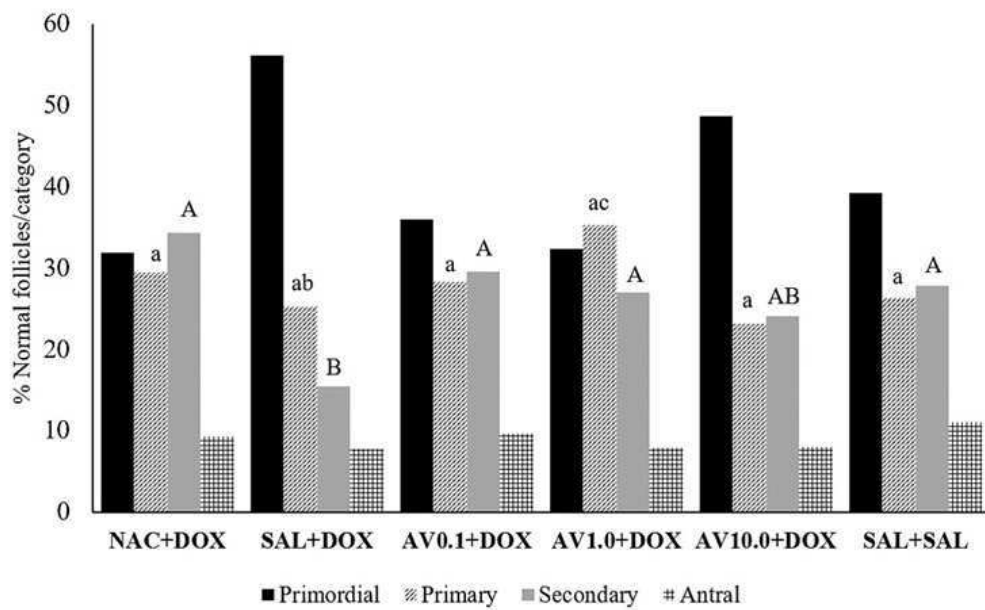


Figure 3. Percentage of normal follicles per category in ovaries of mice treated with doxorubicin (DOX), saline (SAL), N-acetylcysteine (NAC), and Aloe vera (AV) (0.1, 1.0, or 10.0 mg/kg). Different letters indicate significant differences between treatments ($P<0.05$; ANOVA).

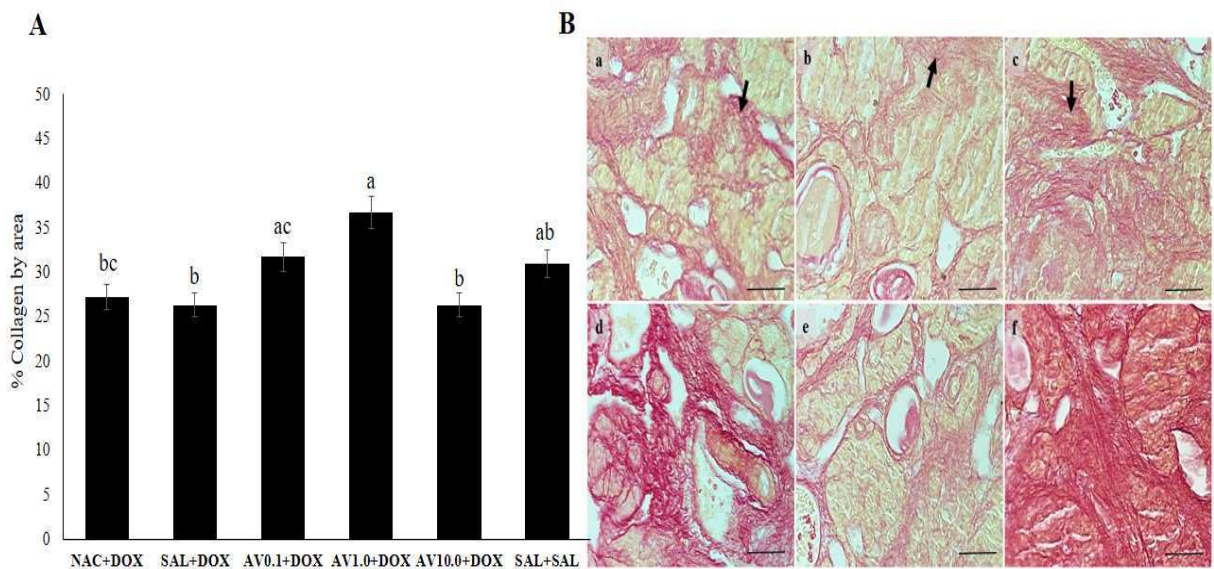


Figure 4. **A**, Collagen levels (means $\pm$ SEM) in the ovaries of mice treated with doxorubicin (DOX), saline (SAL), N-acetylcysteine (NAC), and *Aloe vera* (AV) (0.1, 1.0, or 10.0 mg/kg). Different letters indicate significant differences between treatments ($P<0.05$; ANOVA). **B**, Collagen fibers (arrows) labeled by Picrossirius red. **a**, NAC+DOX; **b**, SAL+DOX; **c**, *Aloe vera* 0.1+DOX; **d**, *Aloe vera* 1.0+DOX; **e**, *Aloe vera* 10.0+DOX; **f**, SAL+SAL. Scale bar: 100 μ m.

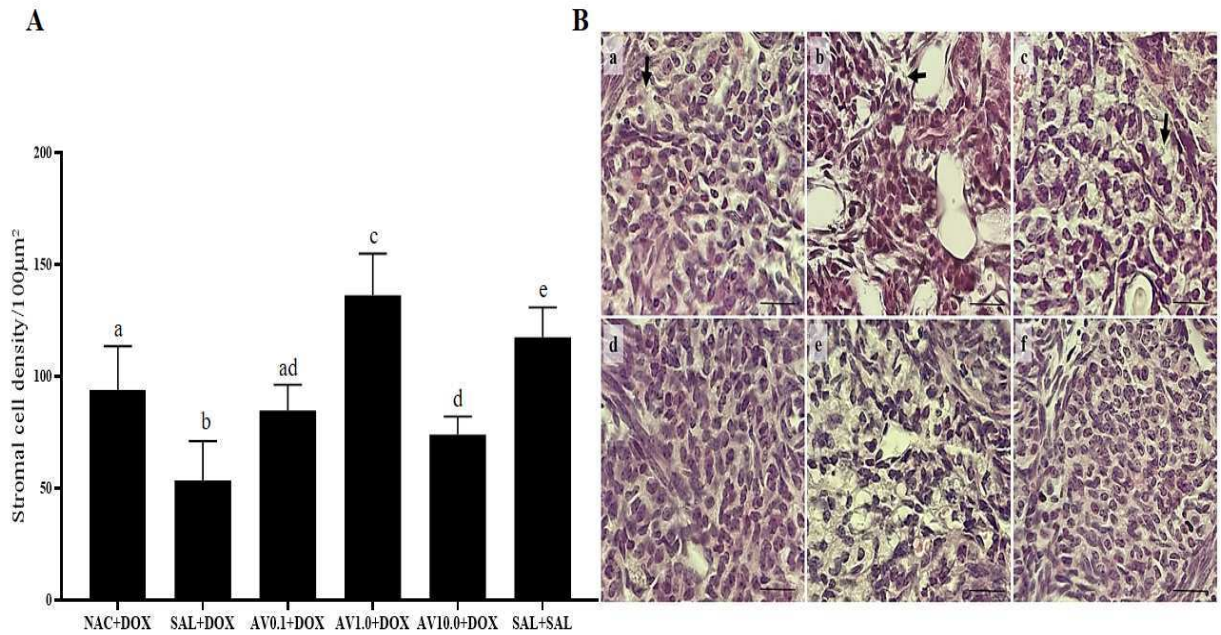


Figure 5. **A**, Stromal cell density (means±SEM) in ovaries of mice treated with doxorubicin (DOX), saline (SAL), N-acetylcysteine (NAC), and *Aloe vera* (AV) (0.1, 1.0, or 10.0 mg/kg). Different letters indicate significant differences between treatments ($P<0.05$; ANOVA). **B**, Representative images of ovarian stromal cell density in ovaries of mice. **a**, NAC+DOX; **b**, SAL+DOX; **c**, *Aloe vera* 0.1+DOX; **d**, *Aloe vera* 1.0+DOX; **e**, *Aloe vera* 10.0+DOX; **f**, SAL+SAL. Arrows indicate areas with affected stroma. Scale bar: 100 μm.

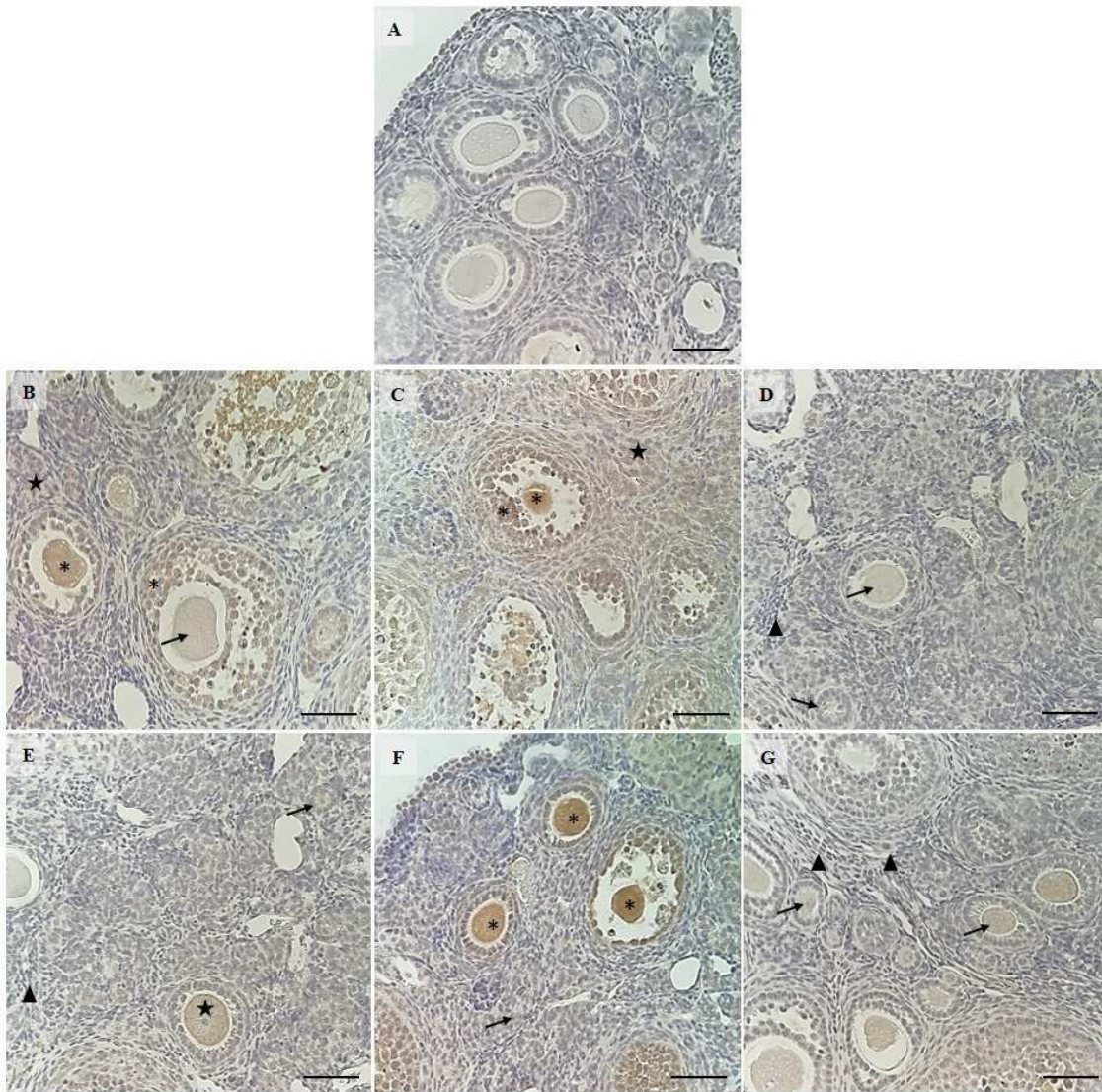


Figure 6. Immunohistochemical staining for TNF- α in ovaries of mice treated with doxorubicin (DOX), saline (SAL), N-acetylcysteine (NAC), *Aloe vera* (AV) (0.1, 1.0, or 10.0 mg/kg), and control groups. **A**, Negative control; **B**, NAC+DOX; **C**, SAL+DOX; **D**, *Aloe vera* 0.1+DOX; **E**, *Aloe vera* 1.0+DOX; **F**, *Aloe vera* 10.0+DOX; **G**, SAL+SAL. Triangles indicate absent coloration; arrows indicate weak coloration, stars indicate moderate coloration; asterisks indicate strong coloration. Scale bar: 100 μ m.

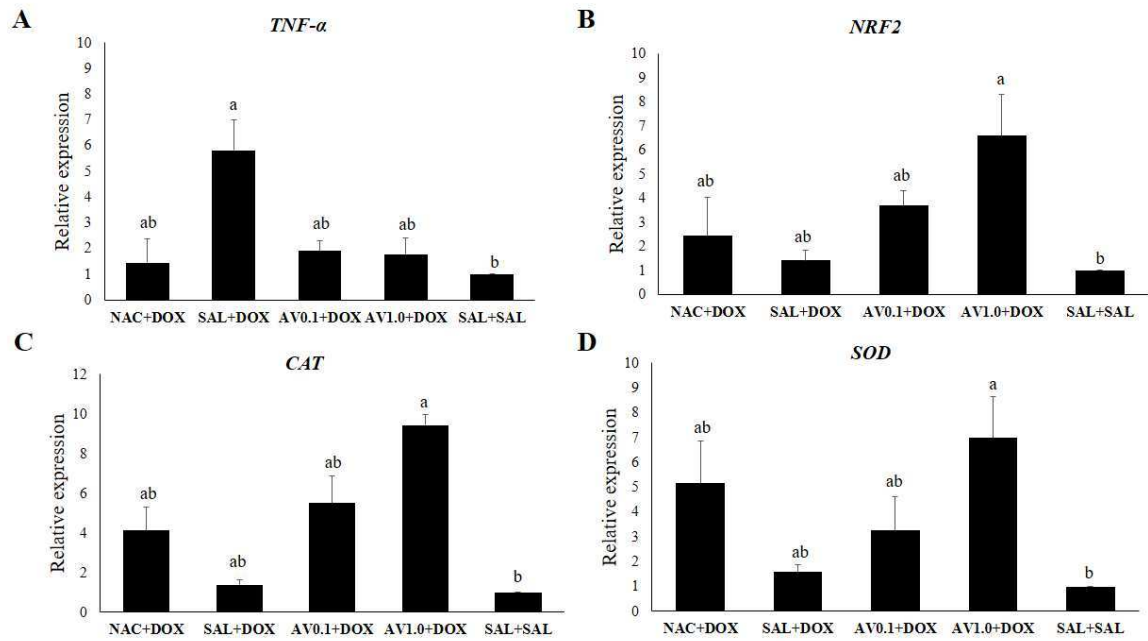


Figure 7. mRNA levels (means $\pm$ SEM) for (A) tumor necrosis factor (TNF)- α , (B) nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2), (C) superoxide dismutase (SOD), and (D) catalase (CAT) in mice treated with doxorubicin (DOX), saline (SAL), N-acetylcysteine (NAC), and *Aloe vera* (0.1, 1.0, or 10.0 mg/kg). Different letters indicate significant differences between treatments ($P < 0.05$; ANOVA).

Table 1. Chemical composition of *Aloe vera* leaf extract.

Class	Components	Effects	Reference
Polyphenols	Benzoic acid, p-toluic acid, p-coumaric acid, p-salicylic acid, protocatechuic acid, hydroxyphenylacetic acid, ferulic acid, aloe emodin, and vanillic acid	Antioxidant	(10)
Polysaccharides	Galactans, pectic substances, and polysaccharides containing glucuronic acid, fucose, arabinose, xylose, and rhamnose	Antibacterial, anti-inflammatory, and antiviral	(11)
Anthraquinone	Aloin (A and B), barbaloin, isobarbaloin, emodin, aloe-emodin, rhein, and chrysophanol	Antibacterial, antiviral, anti-inflammatory, antifungal, anticancer, and antioxidant	(12)
Polysaccharides	Glucose, mannose, galactose, and arabinose	Anti-genotoxic and antitumor	(13)
Carbohydrate	Acemannan	Immunomodulation/radioprotection	(14)
Minerals	Calcium, chromium, iron, magnesium, manganese, potassium, sodium, and zinc	Maintenance of physiological processes	(15)

Table 2. Primer pairs used for real-time PCR.

Target gene	Primer sequence (5'→3')	GenBank accession No.
<i>GAPDH</i>	F: GAACGGATTTGGCCGTATTG R: GTGAGTGGAGTCATACTGGAAC	GU214026.1
<i>SOD</i>	F: CTCGTCTTGCTCTCTCTGGTC R: CTTGCCTTCTGCTCGAAGTG	NM_011434.2
<i>CAT</i>	F: CCAATGGCAATTACCCGTCC R: CCTTGTGAGGCCAAACCTTG	NM_009804.2
<i>TNF-α</i>	F: CAGAAAGCATGATCCGCGAC R: CCGCCTGGAGTTCTGGAAG	D84199.2
<i>NRF2</i>	F: TTGCCCTAGCCTTTTCTCCG R: CTAGGAGATAGCCTGCTCGC	NM_010902.4

9 CONCLUSÕES GERAIS

A *Aloe vera* exerce um efeito protetor sobre os ovários de camundongos fêmeas submetidos à ação da doxorrubicina, evidenciado tanto em experimentos *in vitro* quanto *in vivo*. A utilização de *Aloe vera* em concentrações de 10% e 25% foi associada a um aumento notável na sobrevivência dos folículos ovarianos, na estimulação da proliferação celular e na elevação da expressão de enzimas antioxidantes, contribuindo para mitigar os efeitos tóxicos provocados pela doxorrubicina. Além disso, a co-administração de *Aloe vera* nas doses de 0,1 e 1,0 mg/kg em camundongos fêmeas submetidas à doxorrubicina preservou de modo significativo a integridade dos folículos ovarianos e do estroma, evidenciando o potencial terapêutico do extrato na atenuação dos danos ovarianos induzidos pela quimioterapia. Esse efeito protetor se deve, em parte, à capacidade do extrato de reduzir os níveis de EROs através da ativação de enzimas antioxidantes, bem como à inibição da expressão da citocina pró-inflamatória TNF- α , que está intimamente relacionada à cascata de danos celulares induzidos pela quimioterapia.

10 PERSPECTIVAS

A co-administração de *Aloe vera* pode representar uma estratégia promissora para proteger a função ovariana durante tratamentos quimioterápicos, contribuindo para a preservação da fertilidade. A integração do extrato em novas formulações ou meios de cultivo de folículos ovarianos pode não apenas aprimorar protocolos experimentais, mas também viabilizar o desenvolvimento de medicamentos inovadores destinados a proteger os ovários. Todavia, os estudos realizados até o momento foram conduzidos em modelos experimentais com animais saudáveis e em sistemas *in vitro*. Assim, torna-se fundamental expandir as investigações para cenários que envolvam condições patológicas, como organismos acometidos por neoplasias, a fim de determinar se os benefícios observados persistem em contextos clinicamente relevantes. Estudos futuros devem abordar, de maneira abrangente, a ação do extrato de *Aloe vera* em tratamentos prolongados, suas interações com agentes quimioterápicos e os mecanismos moleculares subjacentes a seus efeitos protetores. Antes de sua eventual aplicação clínica, serão essenciais ensaios rigorosos que confirmem a eficácia e segurança dessa abordagem, estabelecendo as condições ideais para sua utilização como terapia adjuvante na preservação da saúde reprodutiva.

REFERÊNCIAS

ABDEL-MEGEED, R. M. *et al.* Titanium nanostructure mitigating doxorubicin-induced testicular toxicity in rats via regulating major autophagy signaling pathways. **Toxicology Reports**, Amsterdam, v. 14, p. 101869, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2024.101869>. Acesso em: 12 jan. 2024.

ABOU-SHANAB, A. M. *et al.* PHD-2/HIF-1 α axis mediates doxorubicin-induced angiogenesis in SH-SY5Y neuroblastoma microenvironment: a potential survival mechanism. **Scientific Reports**, London, v. 15, n. 1, p. 7487, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-025-89884-3>. Acesso em: 17 mai. 2025.

ANDERSEN, C. L. *et al.* Varied effects of doxorubicin (DOX) on the corpus luteum of C57BL/6 mice during early pregnancy. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 105, p. 1521–1532, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/biolre/ioab180>. Acesso em: 21 jan. 2025.

ANG, L. *et al.* Supplementation of c-type natriuretic peptide during in vitro growth period benefits the development of murine preantral follicles. **Zygote**, Cambridge, v. 29, n. 2, p. 150–154, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S096719942000060X>. Acesso em: 21 jan. 2024.

AZEVEDO, V. A. N. *et al.* Effects of *Aloe vera* extract on growth, viability, ultrastructure and expression of mRNA for antioxidant enzymes in bovine secondary follicles cultured in vitro. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 247, p. 107078, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.107078>. Acesso em: 23 jan. 2024.

ALMEIDA, I. B. *et al.* **Princípios básicos de pesquisa de animais de laboratório**. Aracaju: Edifs, 2016. 54 p.

BAHREHBAR, K. *et al.* Embryonic stem cells-derived mesenchymal stem cells do not differentiate into ovarian cells but improve ovarian function in POF mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Amsterdam, v. 635, p. 92–98, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.10.014>. Acesso em: 27 jan. 2024.

BALA, S. *et al.* Protective role of *Aloe vera* against X-ray induced testicular dysfunction. **Andrologia**, Hoboken, v. 49, n. 7, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/and.12697>. Acesso em: 3 fev. 2024.

BAR-JOSEPH, H. *et al.* Doxorubicin-induced apoptosis in germinal vesicle (GV) oocytes. **Reproductive Toxicology**, Oxford, v. 30, p. 566–572, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.07.003>. Acesso em: 28 jan. 2024.

BEN-AHARON, I. *et al.* What lies behind chemotherapy-induced ovarian toxicity? **Reproduction**, Cambridge, v. 144, n. 2, p. 153–163, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/REP-12-0121>. Acesso em: 9 fev. 2024.

BEN-AHARON, I. *et al.* Doxorubicin-induced ovarian toxicity. **Reproductive Biology and Endocrinology**, London, v. 8, p. 20, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-20>. Acesso em: 17 jan. 2024.

BHARDWAJ, J. K. *et al.* Role of autophagy in follicular development and maintenance of primordial follicular pool in the ovary. **Journal of Cellular Physiology**, Hoboken, v. 237, n. 2, p. 1157–1170, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcp.30613>. Acesso em: 12 fev. 2024.

BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, Atlanta, v. 74, n. 3, p. 229–263, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3322/caac.21834>. Acesso em: 18 fev. 2024.

BRUNGARDT, J. G. *et al.* Fertility preservation in children and young adults with cancer. **Current Opinion in Pediatrics**, Philadelphia, v. 34, n. 1, p. 48–52, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000001091>. Acesso em: 21 fev. 2024.

CARDOSO, D. L. *et al.* Follicular atresia, cell proliferation, and anti-Mullerian hormone in two neotropical primates (*Aotus nancymae* and *Sapajus macrocephalus*). **Animals**, Basel, v. 13, n. 6, p. 1051, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ani13061051>. Acesso em: 2 mar. 2024.

CAVALCANTI, G. S. *et al.* Granulosa cells and follicular development: a brief review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 69, n. 6, e20230175, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1806-9282.20230175>. Acesso em: 4 mar. 2024.

CHAUDHARY, G. R. *et al.* Necroptosis in stressed ovary. **Journal of Biomedical Science**, London, v. 26, n. 1, p. 11, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0504-2>. Acesso em: 7 mar. 2024.

CHEN, Y. *et al.* Advancing fertility preservation in prepubertal mice: efficacy of ovarian tissue culture and in vitro growth in mature oocyte development. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, Tokyo, v. 50, n. 9, p. 1713–1721, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jog.16057>. Acesso em: 10 mar. 2024.

CHEN, Y. *et al.* Maternal exposure to PM2.5 decreases ovarian reserve in neonatal offspring mice through activating PI3K/AKT/FoxO3a pathway and ROS-dependent NF-κB pathway. **Toxicology**, Amsterdam, v. 481, p. 153352, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2022.153352>. Acesso em: 12 mar. 2024.

CHESNOKOV, M. S. *et al.* A matter of new life and cell death: programmed cell death in the mammalian ovary. **Journal of Biomedical Science**, London, v. 31, n. 1, p. 31, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12929-024-01017-6>. Acesso em: 15 mar. 2024.

CHESTER, M. *et al.* Reduction in minipubertal gonadotropin levels alters reproductive lifespan and ovarian follicular loss in female mice. **Human Reproduction**, Oxford, p. deaf019, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/humrep/deaf019>. Acesso em: 17 mar. 2024.

CHI, Y. N. *et al.* Protective effects of leonurine hydrochloride on pyroptosis in premature ovarian insufficiency via regulating NLRP3/GSDMD pathway. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 114, p. 109520, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.109520>. Acesso em: 20 mar. 2024.

CHORILLI, M. *et al.* Animais de laboratório: o camundongo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 11–23, 2007.

COSTA, F. D. C. *et al.* *Aloe vera* increases mRNA expression of antioxidant enzymes in cryopreserved bovine ovarian tissue and promotes follicular growth and survival after in vitro culture. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 102, p. 104–113, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.07.005>. Acesso em: 23 mar. 2024.

CUI, J.; WANG, Y. Premature ovarian insufficiency: a review on the role of tobacco smoke, its clinical harm, and treatment. **Journal of Ovarian Research**, London, v. 17, n. 1, p. 8, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13048-023-01330-y>. Acesso em: 25 mar. 2024.

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**, Basel, v. 13, n. 1, p. 18, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ani13010018>. Acesso em: 27 mar. 2024.

FIGUEIREDO, J. R. *et al.* Advances in in vitro folliculogenesis in domestic ruminants. **Animal Reproduction**, Fortaleza, v. 16, n. 1, p. 52–65, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-123>. Acesso em: 30 mar. 2024.

DE LA CRUZ BORTHIRY, F. L. *et al.* Maternal environmental enrichment affects the corpora lutea and progesterone levels in pregnant mice. **Frontiers in Endocrinology**, Lausanne, v. 16, p. 1483893, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fendo.2025.1483893>. Acesso em: 2 abr. 2024.

OLIVEIRA, M. S. *et al.* Estimativa de incidência de câncer no Brasil, 2023–2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 69, n. 1, 2023.

OLIVEIRA, C. S. A. *et al.* Câncer no Brasil: desafios e expectativas futuras. **Cuadernos de Educación y Desarrollo**, Málaga, v. 16, n. 12 (Edição Especial), p. e6552–e6552, 2024.

DEY, A. *et al.* Partially purified non-polar phytochemicals from *Aloe barbadensis* Mill. gel restores metabolic and reproductive comorbidities in letrozole-induced polycystic ovary syndrome rodent model—an “in-vivo” study. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 291, p. 115161, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115161>. Acesso em: 5 abr. 2024.

DU, J. *et al.* Doxorubicin-induced cognitive impairment: the mechanistic insights. **Frontiers in Oncology**, Lausanne, v. 11, p. 673340, 2021.

EPPIG, J. J. *et al.* Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 54, n. 1, p. 197–207, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod54.1.197>. Acesso em: 8 abr. 2024.

FARID, A. *et al.* In vitro and in vivo anti-Cryptosporidium and anti-inflammatory effects of *Aloe vera* gel in dexamethasone immunosuppressed mice. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, Amsterdam, v. 17, p. 156–167, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2021.09.002>. Acesso em: 10 abr. 2024.

FEHRMANN-CARTES, K. *et al.* Anti-inflammatory effects of *Aloe vera* on soy meal-induced intestinal inflammation in zebrafish. **Fish & Shellfish Immunology**, Amsterdam, v. 95, p. 564–573, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.10.075>. Acesso em: 12 abr. 2024.

FENG, Y. *et al.* Imaging the ovary. **Reproductive Biomedicine Online**, Amsterdam, v. 36, n. 5, p. 584–593, 2018.

FERRO, R. *et al.* Fertility preservation in women with haematological malignancies. **Human Fertility**, Cambridge, v. 26, n. 5, p. 998–1007, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14647273.2022.2042605>. Acesso em: 14 abr. 2024.

FIGUEIREDO, *et al.* Desenvolvimento e aplicações do ovário artificial em caprinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, n. 6 (Supl.), p. 55–58, 2009.

FLETCHER, E. J. *et al.* Prenatal exposure to an environmentally relevant phthalate mixture alters oxidative stress, apoptosis, cell cycle regulators, and steroidogenic factors in the ovaries of F1 mice. **Reproductive Toxicology**, Oxford, v. 132, p. 108858, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2025.108858>. Acesso em: 16 abr. 2024.

FORD, E. A. *et al.* Advances in human primordial follicle activation and premature ovarian insufficiency. **Reproduction**, Cambridge, v. 159, n. 1, p. R15–R29, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/REP-19-0201>. Acesso em: 18 abr. 2024.

GAO, Y. *et al.* Increased cellular senescence in doxorubicin-induced murine ovarian injury: effect of senolytics. **Geroscience**, Cham, v. 45, n. 3, p. 1775–1790, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11357-023-00728-2>. Acesso em: 19 abr. 2024.

GOME, G. *et al.* Cultivation of bovine lipid chunks on *Aloe vera* scaffolds. **NPJ Science of Food**, London, v. 9, n. 1, p. 26, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41538-025-00391-1>. Acesso em: 21 abr. 2024.

GU, J. *et al.* Salidroside improves oocyte competence of reproductively old mice by enhancing mitophagy. **Aging Cell**, Hoboken, p. e14475, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/accel.14475>. Acesso em: 23 abr. 2024.

HAKHEEM, M. K. *et al.* Innovative determination of phytohormones in *Aloe vera*. **Frontiers in Chemistry**, Lausanne, v. 12, p. 1490639, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fchem.2024.1490639>. Acesso em: 24 abr. 2024.

HAN, J. *et al.* Resveratrol attenuates doxorubicin-induced meiotic failure through inhibiting oxidative stress and apoptosis in mouse oocytes. **Aging (Albany NY)**, New Rochelle, v. 12, n. 9, p. 7717–7728, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.18632/aging.103061>. Acesso em: 26 abr. 2024.

HARSINI, R. *et al.* The effect of Coenzyme Q10 on mitochondrial biogenesis in mouse ovarian follicles during in vitro culture. **Zygote**, Cambridge, v. 32, n. 1, p. 14–20, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0967199423000461>. Acesso em: 28 abr. 2024.

HE, J. *et al.* Astaxanthin alleviates oxidative stress in mouse preantral follicles and enhances follicular development through the AMPK signaling pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 26, n. 5, p. 2241, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms26052241>. Acesso em: 30 abr. 2024.

HE, M. *et al.* p300 maintains primordial follicle activation by repressing VEGFA transcription. **American Journal of Physiology – Cell Physiology**, Rockville, v. 328, n. 2, p. C514–C527, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00198.2024>. Acesso em: 2 maio 2024.

HENRY, L. *et al.* FIGO statement: fertility preservation. **International Journal of Gynaecology and Obstetrics**, Oxford, v. 163, n. 3, p. 790–794, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ijgo.15187>. Acesso em: 3 maio 2024.

HERNÁNDEZ MARTÍNEZ, M. *et al.* Fertility preservation counselling and practice among women with lymphomas: a retrospective study. **Journal of Obstetrics and Gynaecology**, London, v. 45, n. 1, p. 2449679, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/01443615.2025.2449679>. Acesso em: 5 maio 2024.

HIENSCH, A. E. *et al.* Doxorubicin-induced skeletal muscle atrophy: elucidating the underlying molecular pathways. **Acta Physiologica**, Hoboken, v. 229, n. 2, p. e13400, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/apha.13400>. Acesso em: 7 maio 2024.

HONG, Z. *et al.* Growth hormone improves ovarian follicle health in premature ovarian failure mice by reducing apoptosis. **Reproductive Sciences**, Cham, doi:10.1007/s43032-025-01822-w, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s43032-025-01822-w>. Acesso em: 8 maio 2024.

HUANG, J. *et al.* Melatonin provides protection against cisplatin-induced ovarian damage and loss of fertility in mice. **Reproductive Biomedicine Online**, Amsterdam, v. 42, n. 3, p. 505–519, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2020.10.001>. Acesso em: 10 maio 2024.

HUYNH, N. *et al.* Exploiting the high affinity between cellulose nanofibrils and *Aloe vera* acemannan to develop elastic, crosslinker-free, all-polysaccharide hydrogels. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 304 (Pt 2), p. 140853, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.140853>. Acesso em: 12 maio 2024.

IRFAN, J. *et al.* Chemical modification of *Aloe vera* leaf hydrogel for efficient cadmium-removal from spiked high-hardness groundwater. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 259 (Pt 2), p. 128879, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.128879>. Acesso em: 14 maio 2024.

ISLAM, M. N. *et al.* Melatonin improves the in vitro growth of bovine oocytes collected from early antral follicles by maintaining oocyte–cumulus cell communication. **Reproductive Medicine and Biology**, Tokyo, v. 24, n. 1, p. e12629, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/rmb2.12629>. Acesso em: 16 maio 2024.

JO, M. *et al.* New insights into the ovulatory process in the human ovary. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 31, n. 1, p. 21–47, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmae027>. Acesso em: 17 maio 2024.

JODHANI, K. A. *et al.* The combined effects of *Aloe vera* gel enriched with *Adhatoda vasica* Nees leaves extract edible coating on improving postharvest shelf-life and quality of jamun fruit (*Syzygium cumini* L. Skeels). **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 298, p. 139965, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.139965>. Acesso em: 18 maio 2024.

JOHNSON-ARBOR, K.; DUBEY, R. Doxorubicin. In: **StatPearls**, Treasure Island, FL: StatPearls Publishing, 2025. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29083582>. Acesso em: 19 maio 2024.

JONES, I. C. *et al.* Doxorubicin-induced cardiotoxicity: causative factors and possible interventions. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Oxford, v. 74, n. 12, p. 1677–1688, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jpp/rgac063>. Acesso em: 20 maio 2024.

KALVALA, A. K. *et al.* The role of cannabidiol and tetrahydrocannabivarin to overcome doxorubicin resistance in MDA-MB-231 xenografts in athymic nude mice. **Biochimie**, Amsterdam, v. 208, p. 19–30, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.12.008>. Acesso em: 22 maio 2024.

KAWADA, T. *et al.* Ovarian tachykinin signaling system induces the growth of secondary follicles during the gonadotropin-independent process. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, p. 108375, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2025.108375>. Acesso em: 23 maio 2024.

KAZANTSEVA, L. *et al.* Oridonin enhances antitumor effects of doxorubicin in human osteosarcoma cells. **Pharmacological Reports**, Warsaw, v. 74, n. 1, p. 248–256, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s43440-021-00324-1>. Acesso em: 24 maio 2024.

KCIUK, M. *et al.* Doxorubicin — an agent with multiple mechanisms of anticancer activity. **Cells**, Basel, v. 12, n. 4, p. 659, 2023.

KHAN, R. U. *et al.* *Aloe vera*: a sustainable green alternative to exclude antibiotics in modern poultry production. **Antibiotics**, Basel, v. 12, n. 1, p. 44, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antibiotics12010044>. Acesso em: 26 maio 2024.

KIM, H. J. *et al.* Aloe emodin 3-O-glucoside inhibits cell growth and migration and induces apoptosis of non-small-cell lung cancer cells via suppressing MEK/ERK and Akt signalling pathways. **Life Sciences**, Amsterdam, v. 300, p. 120495, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120495>. Acesso em: 27 maio 2024.

KIM, S. *et al.* Genomic consideration in chemotherapy-induced ovarian damage and fertility preservation. **Genes**, Basel, v. 12, n. 10, p. 1525, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/genes12101525>. Acesso em: 28 maio 2024.

KING, T. L. *et al.* Chronological and reproductive aging-associated changes in resistance to oxidative stress in post-reproductive female mice. **Geroscience**, Cham, v. 46, n. 1, p. 1159–

1173, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11357-023-00865-8>. Acesso em: 29 maio 2024.

KOHAMA, T. *et al.* In vitro production of viable eggs from undeveloped oocytes in mouse preantral follicles by reconstructing granulosa cell–oocyte complexes. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 111, n. 5, p. 1156–1167, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/biolre/ioae125>. Acesso em: 30 maio 2024.

KOSIF, R.; AKTAŞ, R. G. Investigation of the effects of *Aloe barbadensis* on rat ovaries: a preliminary study. **Journal of Medicinal Food**, New Rochelle, v. 12, n. 6, p. 1393–1397, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/jmf.2009.0035>. Acesso em: 1 jun. 2024.

LATIF, S. *et al.* Fertility preservation provision in the NHS: a national assessment of care policies. **Human Fertility**, Cambridge, v. 26, n. 3, p. 433–438, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14647273.2022.2045519>. Acesso em: 2 jun. 2024.

LAUX, A. *et al.* *Aloe vera* gel and whole leaf extract: functional and versatile excipients for drug delivery? **Expert Opinion on Drug Delivery**, London, v. 16, n. 12, p. 1283–1285, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/17425247.2019.1675633>. Acesso em: 4 jun. 2024.

LETAI, A.; DE THÉ, H. Conventional chemotherapy: millions of cures, unresolved therapeutic index. **Nature Reviews Cancer**, London, v. 25, n. 3, p. 209–218, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41568-024-00778-4>. Acesso em: 6 jun. 2024.

LI, S. *et al.* Curcumin protects porcine granulosa cells and mouse ovary against reproductive toxicity of aflatoxin B1 via PI3K/AKT signalling pathway. **Environmental Pollution**, Amsterdam, v. 363 (Pt. 2), p. 125210, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.125210>. Acesso em: 8 jun. 2024.

ANDRADE, R. D. L. *et al.* Ultra-diluted/dynamized doxorubicin reduces the toxicity caused by doxorubicin during the in vitro culture of pig preantral follicles enclosed in ovarian tissue. **Reproductive Toxicology**, Oxford, v. 129, p. 108683, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2024.108683>. Acesso em: 10 jun. 2024.

LINS, T. L. B. G. *et al.* Rutin prevents cisplatin-induced ovarian damage via antioxidant activity and regulation of PTEN and FOXO3a phosphorylation in mouse model. **Reproductive Toxicology**, Oxford, v. 98, p. 209–217, 2020.

LIU, C. *et al.* Ascorbic acid ameliorates dysregulated folliculogenesis induced by mono-(2-ethylhexyl) phthalate in neonatal mouse ovaries via reducing ovarian oxidative stress. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 55, n. 10, p. 1418–1424, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/rda.13790>. Acesso em: 12 jun. 2024.

LIU, G. *et al.* Effect of animal-sourced bioactive peptides on the in vitro development of mouse preantral follicles. **Journal of Ovarian Research**, London, v. 13, n. 1, p. 108, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13048-020-00695-8>. Acesso em: 14 jun. 2024.

LIU, G. *et al.* PHB2 binds to ER β to induce the autophagy of porcine ovarian granulosa cells through mTOR phosphorylation. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 198, p. 114–122, 2023.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.12.031>. Acesso em: 15 jun. 2024.

LIU, J. *et al.* Comparative miRNA expression profile analysis of porcine ovarian follicles: new insights into initiation mechanism of follicular atresia. **Scientific Reports**, London, v. 14, p. 1338411, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1338411>. Acesso em: 17 jun. 2024.

LIU, W. *et al.* Zihuai recipe alleviates cyclophosphamide-induced diminished ovarian reserve via suppressing PI3K/AKT-mediated apoptosis. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 277, p. 113789, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.113789>. Acesso em: 18 jun. 2024.

LIU, Z. *et al.* Exposure to perfluorodecanoic acid impairs follicular development via inducing granulosa cell necroptosis. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 287, p. 117268, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2024.117268>. Acesso em: 19 jun. 2024.

LLIBEROS, C. *et al.* Evaluation of inflammation and follicle depletion during ovarian ageing in mice. **Scientific Reports**, London, v. 11, n. 1, p. 278, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79488-4>. Acesso em: 20 jun. 2024.

LOPES, F. *et al.* Single and combined effects of cisplatin and doxorubicin on the human and mouse ovary in vitro. **Reproduction**, Cambridge, v. 159, n. 2, p. 193–204, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/REP-19-0279>. Acesso em: 22 jun. 2024.

LOPEZ, J. *et al.* The aging ovary and the tales learned since fetal development. **Sexual Development**, Basel, v. 17, n. 2–3, p. 156–168, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000532072>. Acesso em: 23 jun. 2024.

LUO, H. *et al.* Cathepsin L causes proteolytic cleavage of Chinese-hamster-ovary cell-expressed proteins during processing and storage. **Biotechnology Progress**, Hoboken, v. 35, n. 1, p. e2732, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/btpr.2732>. Acesso em: 24 jun. 2024.

LV, Y. *et al.* Decreased miR-128-3p in serum exosomes from polycystic ovary syndrome induces ferroptosis in granulosa cells. **Cell Death Discovery**, London, v. 11, n. 1, p. 64, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41420-025-02331-0>. Acesso em: 25 jun. 2024.

MA, J. *et al.* Effects of melatonin on development and hormone secretion of sheep theca cells in vitro. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 198, p. 172–182, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.12.036>. Acesso em: 3 mar. 2024.

MA, Q. *et al.* The mechanistic study of mitochondrial autophagy and ferroptosis in the progression of decreased ovarian reserve. **Reproductive Sciences**, Cham, v. 32, n. 4, p. 1202–1212, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s43032-025-01811-z>. Acesso em: 22 abr. 2024.

MA, R. *et al.* Enhanced cellular doxorubicin uptake via delayed exposure following nanosecond pulsed electric field treatment: an in vitro study. **Pharmaceutics**, Basel, v. 16, n.

7, p. 851, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16070851>. Acesso em: 7 fev. 2025.

MAHARJAN, R. *et al.* Effect of *Aloe barbadensis* Mill. formulation on letrozole-induced polycystic ovarian syndrome rat model. **Journal of Ayurveda and Integrative Medicine**, New Delhi, v. 1, n. 4, p. 273–279, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/0975-9476.74090>. Acesso em: 15 out. 2024.

MAJUMDER, R. *et al.* In vitro and in silico study of *Aloe vera* leaf extract against human breast cancer. **Natural Product Research**, London, v. 34, n. 16, p. 2363–2366, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1534848>. Acesso em: 29 nov. 2024.

MANOUCHEHRI, A. *et al.* Polycystic ovaries and herbal remedies: a systematic review. **JBRA Assisted Reproduction**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 85–91, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20220024>. Acesso em: 12 jan. 2025.

MARKOWSKA, A. *et al.* Gynotoxic effects of chemotherapy and potential protective mechanisms. **Cancers**, Basel, v. 16, n. 12, p. 2288, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers16122288>. Acesso em: 8 dez. 2024.

MATHUR, P. *et al.* *Aloe vera* protects against fluoride-induced teratogenic effects during pre- and postnatal development in mice. **Environmental Science and Pollution Research International**, Berlin, v. 29, n. 42, p. 63577–63587, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-022-20225-x>. Acesso em: 5 set. 2024.

MATSUSHIGE, C. *et al.* RGD peptide promotes follicle growth through integrins $\alpha\beta3/\alpha\beta5$ in three-dimensional culture. **Reproduction**, Cambridge, v. 169, n. 1, p. e240151, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/REP-24-0151>. Acesso em: 16 fev. 2024.

MATTIELLO, L. *et al.* Asciminib mitigates DNA damage stress signaling induced by cyclophosphamide in the ovary. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 22, n. 3, p. 1395, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms22031395>. Acesso em: 11 jul. 2024.

MEINAG, F. E. *et al.* Modulatory effects of miRNAs in doxorubicin resistance: a mechanistic view. **Functional & Integrative Genomics**, Berlin, v. 24, n. 5, p. 150, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10142-024-01431-x>. Acesso em: 27 mar. 2025.

MERICO, V. *et al.* In vitro maturation of fully grown mouse antral follicles in the presence of 1 nM 2-hydroxyestradiol improves oocytes' developmental competence. **Reproductive Sciences**, Cham, v. 28, n. 1, p. 121–133, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s43032-020-00276-6>. Acesso em: 19 abr. 2024.

MIHAJLOVIC, M. *et al.* 3D culture of ovarian follicles in granular and nanofibrillar hydrogels. **Biomaterials Advances**, Amsterdam, v. 164, p. 213987, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2024.213987>. Acesso em: 3 mar. 2025.

MIRZAALIZADEH, B. *et al.* Effects of *Aloe vera* and *Eucalyptus* methanolic extracts on experimental toxoplasmosis in vitro and in vivo. **Experimental Parasitology**, Amsterdam, v.

192, p. 6–11, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.07.010>. Acesso em: 28 set. 2024.

MO, J. *et al.* Human hair follicle-derived mesenchymal stem cells improve ovarian function in cyclophosphamide-induced POF mice. **Stem Cell Research & Therapy**, London, v. 16, n. 1, p. 67, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13287-024-04097-1>. Acesso em: 3 jan. 2025.

MOHAN, U. P. *et al.* Mechanisms of doxorubicin-mediated reproductive toxicity – a review. **Reproductive Toxicology**, Oxford, v. 102, p. 80–89, 2021.

MORAGÓN, S. *et al.* Fertility and breast cancer: a literature review of counseling, preservation options and outcomes. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, Amsterdam, v. 166, p. 103461, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2021.103461>. Acesso em: 14 ago. 2024.

MORGAN, S. *et al.* Cisplatin and doxorubicin induce distinct mechanisms of ovarian follicle loss; imatinib provides selective protection only against cisplatin. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 7, p. e70117, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070117>. Acesso em: 26 jun. 2024.

MORTON, A. J. *et al.* Review: roles of follicle-stimulating hormone in preantral folliculogenesis of domestic animals. **Animal**, Cambridge, v. 17, suppl. 1, p. 100743, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.animal.2023.100743>. Acesso em: 4 out. 2024.

MUSAPOOR, S. *et al.* Media supplementation with gamma-oryzanol improves the outcome of ovine oocyte maturation in vitro. **Veterinary Medicine and Science**, Hoboken, v. 11, n. 1, p. e70134, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/vms3.70134>. Acesso em: 30 dez. 2024.

NAUROZE, T. *et al.* Therapeutic potential of *Aloe vera* and *Aloe vera*-conjugated silver nanoparticles on mice exposed to hexavalent chromium. **Biological Trace Element Research**, New York, v. 202, n. 12, p. 5580–5595, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12011-024-04105-8>. Acesso em: 8 abr. 2024.

NETO, C. C. *et al.* The effect of bioidentical nanostructured progesterone in the in vitro culture of preantral follicles and oocyte maturation. **Cell and Tissue Research**, Berlin, v. 382, n. 3, p. 657–664, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03233-6>. Acesso em: 11 mai. 2024.

NEVES, S. M. P. *et al.* Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP. São Paulo: FCF-IQ/USP, 2013. 216 p.

NGUYEN, N. M. P. *et al.* AMH protects the ovary from doxorubicin by regulating cell fate and the response to DNA damage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 122, n. 5, p. e2414734122, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.2414734122>. Acesso em: 17 jan. 2025.

O'SHAUGHNESSY, P. J. *et al.* Regulation of luteinizing hormone-receptor and follicle-stimulating hormone-receptor messenger ribonucleic acid levels during development in the neonatal mouse ovary. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 57, n. 3, p. 602–608, 1997.

OTHEYOLA, A. O. *et al.* Chronic fat consumption affects metabolic aspects of murine physiology and influences ovarian follicle atresia. **Reproductive Toxicology**, Oxford, p. 108836, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2025.108836>. Acesso em: 9 jan. 2025.

PAN, Y. *et al.* tRF-Gly-GCC in atretic follicles promotes ferroptosis in granulosa cells by down-regulating MAPK1. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 25, n. 16, p. 9061, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms25169061>. Acesso em: 17 abr. 2024.

PAUL, B. *et al.* Effect of *Aloe vera* as a preprocedural rinse in reducing aerosol contamination during ultrasonic scaling. **Journal of Indian Society of Periodontology**, Mumbai, v. 24, n. 1, p. 37–41, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.4103/jisp.jisp_188_19. Acesso em: 3 nov. 2024.

PAULINO, L. R. F. M. *et al.* Why is it so difficult to have competent oocytes from in vitro cultured preantral follicles? **Reproductive Sciences**, Cham, v. 29, n. 12, p. 3321–3334, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s43032-021-00840-8>. Acesso em: 25 maio 2024.

PEREIRA, L. A. A. C. *et al.* Ovarian puncture triggers an inflammatory response that did not affect late folliculogenesis, ovulation rate, and fertility. **Reproductive Sciences**, Cham, v. 31, n. 10, p. 3202–3214, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s43032-024-01654-0>. Acesso em: 12 fev. 2025.

PERROTTA, G. *et al.* Meiosis and retinoic acid in the mouse fetal gonads: an unforeseen twist. **Current Topics in Developmental Biology**, San Diego, v. 161, p. 59–88, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2024.10.006>. Acesso em: 6 jul. 2024.

PIRZAMAN, A. T. *et al.* 5-Fluorouracil-induced toxicity in both male and female reproductive systems: a narrative review. **Human & Experimental Toxicology**, London, v. 42, p. 9603271231217988, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/09603271231217988>. Acesso em: 14 out. 2024.

POTTS, C. *et al.* A common phthalate replacement disrupts ovarian function in young adult mice. **Reproductive Toxicology**, Oxford, v. 131, p. 108748, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2024.108748>. Acesso em: 12 abr. 2024.

PRZYGRÓDZKA, E. *et al.* Metabolic control of luteinizing hormone-responsive ovarian steroidogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 301, n. 1, p. 108042, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2024.108042>. Acesso em: 1 fev. 2025.

QIAN, F. *et al.* Chlorogenic acid ameliorates chronic unpredictable stress-induced diminished ovarian reserve through the ovarian renin–angiotensin system. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 69, n. 5, p. e202400814, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mnfr.202400814>. Acesso em: 9 jan. 2025.

QIN, S. *et al.* Oocytes maintain low ROS levels to support the dormancy of primordial follicles. **Aging Cell**, Hoboken, v. 24, n. 1, p. e14338, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ace1.14338>. Acesso em: 27 abr. 2024.

RAMÍREZ-MARTÍN, N. *et al.* Nicotinamide mononucleotide supplementation improves oocyte developmental competence in different ovarian damage conditions. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, New York, p. S0002-9378(25)00087-0, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2025.02.006>. Acesso em: 16 mar. 2025.

REN, H. *et al.* Optimized study of an in vitro 3D culture of preantral follicles in mice. **Journal of Veterinary Science**, Seoul, v. 24, n. 1, p. e4, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.4142/jvs.22223>. Acesso em: 5 dez. 2024.

RICHARD, S. *et al.* Mouse primary follicles experience slow growth rates after activation and progressive increases that influence the duration of the primary follicle phase. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 109, n. 5, p. 684–692, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/biolre/ioad095>. Acesso em: 29 jun. 2024.

RICHARD, S. *et al.* Ovarian follicle size or growth rate can both be determinants of ovulatory follicle selection in mice. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 110, n. 1, p. 130–139, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/biolre/ioad134>. Acesso em: 2 set. 2024.

RICHARDS, J. S. *et al.* Ovarian follicular theca cell recruitment, differentiation, and impact on fertility: 2017 update. **Endocrine Reviews**, Oxford, v. 39, n. 1, p. 1–20, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/er.2017-00164>. Acesso em: 1 abr. 2025.

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

ROOF, K. A. *et al.* Maximizing ovarian function and fertility following chemotherapy in premenopausal patients: is there a role for ovarian suppression? **Gynecologic Oncology Reports**, Amsterdam, v. 53, p. 101383, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gore.2024.101383>. Acesso em: 14 fev. 2025.

RUAN, H. *et al.* FSP1 regulates ferroptosis and mitochondrial function during mouse oocyte maturation. **Experimental Cell Research**, Amsterdam, v. 447, n. 2, p. 114524, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2025.114524>. Acesso em: 6 abr. 2025.

RUSSO, C. *et al.* Resveratrol and vitamin D: eclectic molecules promoting mitochondrial health in sarcopenia. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 25, p. 7503, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms25147503>. Acesso em: 18 maio 2024.

SAINI, B. L. *et al.* Expression profile analysis of estrous-phased ovarian tissue of high and low prolific lines of inbred Swiss albino mice. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 52, n. 1, p. 167, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11033-025-10233-8>. Acesso em: 9 dez. 2024.

SAMARE-NAJAF, M. *et al.* Primary and secondary markers of doxorubicin-induced female infertility and the alleviative properties of quercetin and vitamin E in a rat model.

Reproductive Toxicology, Oxford, v. 96, p. 316–326, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2020.07.015>. Acesso em: 12 fev. 2025.

SAMARE-NAJAF, M. *et al.* Stereological and histopathological evaluation of doxorubicin-induced toxicity in female rats' ovary and uterus and palliative effects of quercetin and vitamin E. **Human & Experimental Toxicology**, London, v. 39, p. 1710–1724, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/09603271231217988>. Acesso em: 28 abr. 2024.

SANGWENI, N. F. *et al.* Molecular insights into the pathophysiology of doxorubicin-induced cardiotoxicity: a graphical representation. **Archives of Toxicology**, Berlin, v. 96, n. 6, p. 1541–1550, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00204-022-03262-w>. Acesso em: 19 nov. 2024.

SANTACRUZ-MÁRQUEZ, R. *et al.* Dietary exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate for 6 months alters markers of female reproductive aging in mice. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 112, n. 1, p. 191–202, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/biolre/ioae164>. Acesso em: 7 jan. 2025.

SCHIRONE, L. *et al.* Mitochondria and doxorubicin-induced cardiomyopathy: a complex interplay. **Cells**, Basel, v. 11, n. 13, p. 2000, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells11132000>. Acesso em: 22 set. 2024.

SCUDIERI, A. *et al.* Autophagy is involved in granulosa cell death and follicular atresia in ewe ovaries. **Theriogenology**, New York, v. 226, p. 236–242, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.06.024>. Acesso em: 30 out. 2024.

SHEIBANI, M. *et al.* Doxorubicin-induced cardiotoxicity: an overview on pre-clinical therapeutic approaches. **Cardiovascular Toxicology**, New York, v. 22, n. 4, p. 292–310, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12012-022-09721-1>. Acesso em: 14 maio 2024.

SIEGEL, R. L. *et al.* Cancer statistics, 2025. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, Hoboken, v. 75, n. 1, p. 10–45, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.3322/caac.21871>. Acesso em: 4 fev. 2025.

SILVA, R. L. D. S. *et al.* Protective effect of gallic acid on doxorubicin-induced ovarian toxicity in mouse. **Reproductive Toxicology**, Oxford, v. 115, p. 147–156, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2022.12.008>. Acesso em: 1 mar. 2024.

SIMON, L. E. *et al.* In vitro ovarian follicle growth: a comprehensive analysis of key protocol variables. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 103, n. 3, p. 455–470, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa073>. Acesso em: 11 nov. 2024.

SPEARS, N. *et al.* Ovarian damage from chemotherapy and current approaches to its protection. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 25, n. 6, p. 673–693, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmz027>. Acesso em: 6 jul. 2024.

STEC, A. *et al.* Incorporation of doxorubicin into plant-derived nanovesicles: process monitoring and activity assessment. **Drug Delivery**, London, v. 32, n. 1, p. 2439272, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10717544.2024.2439272>. Acesso em: 16 dez. 2024.

STERN, C.; AGRESTA, F. Setting up a fertility preservation programme. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, London, v. 55, p. 67–78, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2018.07.007>. Acesso em: 19 abr. 2024.

SUN, Y. *et al.* Doxorubicin-induced cardiac remodeling: mechanisms and mitigation strategies. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, New York, p. ahead of print, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10557-025-07673-6>. Acesso em: 27 fev. 2025.

SYAHPUTRA, R. A. *et al.* The role of flavonoids as a cardioprotective strategy against doxorubicin-induced cardiotoxicity: a review. **Molecules**, Basel, v. 27, n. 4, p. 1320, 2022. Acesso em: 3 ago. 2024.

SZPONAR, J. *et al.* Natural products for preventing and managing anthracycline-induced cardiotoxicity: a comprehensive review. **Cells**, Basel, v. 13, n. 13, p. 1151, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells13131151>. Acesso em: 22 mar. 2025.

SZYMAŃSKA, K. J. *et al.* Unraveling the mechanisms of chemotherapy-induced damage to human primordial follicle reserve: road to developing therapeutics for fertility preservation and reversing ovarian aging. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v. 26, n. 8, p. 553–566, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/molehr/gaaa043>. Acesso em: 11 nov. 2024.

TALEBI, A. *et al.* The effect of alpha lipoic acid on the developmental competence of mouse isolated preantral follicles. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, New York, v. 29, n. 2, p. 175–183, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10815-011-9706-6>. Acesso em: 8 fev. 2024.

TANG, X. *et al.* Identification of necroptosis-related gene expression and the immune response in polycystic ovary syndrome. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, New York, v. 41, n. 12, p. 3517–3537, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10815-024-03286-4>. Acesso em: 4 jan. 2025.

TORKZADEH, T. *et al.* Optimisation of hormonal treatment to improve follicular development in one-day-old mice ovaries cultured under in vitro condition. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v. 35, n. 18, p. 733–749, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1071/RD23027>. Acesso em: 13 set. 2024.

UENO, E. *et al.* 17 β -estradiol and estrogen receptor alpha protect mouse ovarian follicle development by repressing atresia. **iScience**, Cambridge, v. 28, n. 2, p. 111846, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2025.111846>. Acesso em: 9 fev. 2025.

ÜSTÜNER, E. *et al.* Ultrasonographic and histopathological investigation of the effect of N-acetylcysteine on doxorubicin-induced ovarian and uterine toxicity in rats. **Journal of Ovarian Research**, London, v. 17, n. 1, p. 135, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13048-024-01459-4>. Acesso em: 28 jun. 2024.

VAN DER ZANDEN, S. Y. *et al.* New insights into the activities and toxicities of the old anticancer drug doxorubicin. **FEBS Journal**, Weinheim, v. 288, n. 21, p. 6095–6111, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/febs.15583>. Acesso em: 10 jul. 2024.

VIEYRA, E. *et al.* Pharmacologic blockade of nicotinic receptors in the suprachiasmatic nucleus increases ovarian atresia and inhibits follicular growth. **Journal of Neuroendocrinology**, Hoboken, v. 36, n. 9, p. e13421, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jne.13421>. Acesso em: 21 out. 2024.

VOGT, C.; MALHOTRA, N. R. Fertility preservation in children and adolescents: where we are and where we are going. **Current Urology Reports**, Philadelphia, v. 25, n. 7, p. 133–140, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11934-024-01204-w>. Acesso em: 17 dez. 2024.

WALTERS, K. *et al.* Identification of FSH-regulated and estrous stage-specific transcriptional networks in mouse ovaries. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 122, n. 7, p. e2411977122, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.2411977122>. Acesso em: 7 fev. 2025.

WANG, F. *et al.* BNC1 deficiency-triggered ferroptosis through the NF2-YAP pathway induces primary ovarian insufficiency. **Nature Communications**, London, v. 13, n. 1, p. 5871, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33323-8>. Acesso em: 25 nov. 2024.

WANG, F. *et al.* Hollow mesoporous Prussian blue nanozymes alleviate doxorubicin-induced cardiotoxicity by restraining oxidative stress associated with Nrf2 signaling. **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, v. 686, p. 1074–1088, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2025.02.033>. Acesso em: 10 mar. 2025.

WANG, L. *et al.* Perspectives and clinical practices on fertility preservation for young hematologic patients: a qualitative study of healthcare providers across multiple hospitals in China. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, New York, ahead of print, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10815-024-03380-7>. Acesso em: 9 mar. 2025.

WANG, M. *et al.* A novel model based on necroptosis to assess progression for polycystic ovary syndrome and identification of potential therapeutic drugs. **Frontiers in Endocrinology**, Lausanne, v. 14, p. 1193992, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1193992>. Acesso em: 15 out. 2024.

WANG, Q. *et al.* Polyethylene microplastic exposure adversely affects oocyte quality in human and mouse. **Environment International**, Oxford, v. 195, p. 109236, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2024.109236>. Acesso em: 11 jan. 2025.

WANG, T. H. *et al.* Recent advances in the mechanisms of cell death and dysfunction in doxorubicin cardiotoxicity. **Review of Cardiovascular Medicine**, New York, v. 24, n. 11, p. 336, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.31083/j.rcm2411336>. Acesso em: 2 ago. 2024.

WANG, X. *et al.* [Mechanism of programmed cell death in follicular atresia]. **Sheng Li Xue Bao**, Beijing, v. 75, n. 1, p. 82–90, 2023.

WANG, X. *et al.* The optimized research of the in vitro culture of preantral follicles in mice. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, Hoboken, v. 34, n. 11, p. e23498, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcla.23498>. Acesso em: 22 mai. 2024.

WANG, Y. *et al.* In vivo promotion of primordial follicle activation by stem cell factor treatment in mice with premature ovarian insufficiency and advanced age. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v. 29, n. 1, p. gaac041, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/molehr/gaac041>. Acesso em: 9 set. 2024.

WANG, H.; YANG, L. Ovarian mechanobiology: understanding the interplay between mechanics and follicular development. **Cells**, Basel, v. 14, p. 355, 2025. Acesso em: 5 fev. 2025.

WANG, Y. *et al.* Doxorubicin obliterates mouse ovarian reserve through both primordial follicle atresia and overactivation. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 381, p. 114714, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.114714>. Acesso em: 14 fev. 2025.

WEI, X. *et al.* Effect of AMH on primordial follicle populations in mouse ovaries and human pre-pubertal ovarian xenografts during doxorubicin treatment. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, Lausanne, v. 12, p. 1449156, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcell.2024.1449156>. Acesso em: 4 nov. 2024.

WERAWATGANON, D. *et al.* Aloe vera attenuated liver injury in mice with acetaminophen-induced hepatitis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 14, p. 229, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-229>. Acesso em: 18 mar. 2025.

WIDJAJA, S. S. *et al.* Potential benefits of Aloe vera and Raphanus sativus var. longipinnatus gel for prevention of radiation-induced dermatitis in head and neck cancer patients. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, Tehran, v. 21, n. 1, p. e132213, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.5812/ijpr-132213>. Acesso em: 6 jun. 2024.

WU, H. *et al.* The assembly and activation of the PANoptosome promote porcine granulosa cell programmed cell death during follicular atresia. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, London, v. 15, n. 1, p. 147, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40104-024-01107-3>. Acesso em: 2 dez. 2024.

WU, Q. *et al.* Paeoniflorin alleviates cisplatin-induced diminished ovarian reserve by restoring the function of ovarian granulosa cells via activating FSHR/cAMP/PKA/CREB signaling pathway. **Molecules**, Basel, v. 28, n. 24, p. 8123, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules28248123>. Acesso em: 1 jul. 2024.

WU, S. *et al.* Copper mediated follicular atresia: implications for granulosa cell death. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 477, p. 135391, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.135391>. Acesso em: 12 out. 2024.

XI, H. *et al.* Role of programmed cell death in mammalian ovarian follicular atresia. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 247, p. 106667, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2024.106667>. Acesso em: 20 fev. 2025.

XIAO, C.; LAI, D. Impact of oxidative stress induced by heavy metals on ovarian function. **Journal of Applied Toxicology**, Hoboken, v. 45, n. 1, p. 107–116, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jat.4664>. Acesso em: 24 jan. 2025.

XIAO, C. *et al.* Iodoacetamide triggers ovarian dysfunction in mice through TGF- β signaling pathway and apoptosis. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 406, p. 9–19, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2025.02.005>. Acesso em: 3 mar. 2025.

XIAO, S. *et al.* Doxorubicin has dose-dependent toxicity on mouse ovarian follicle development, hormone secretion, and oocyte maturation. **Toxicological Sciences**, Oxford, v. 157, n. 2, p. 1–10, 2017. Acesso em: 18 nov. 2024.

XIE, Q. *et al.* The dominant mechanism of cyclophosphamide-induced damage to ovarian reserve: premature activation or apoptosis of primordial follicles? **Reproductive Sciences**, Thousand Oaks, v. 31, n. 1, p. 30–44, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s43032-023-01294-w>. Acesso em: 9 maio 2024.

XIE, Q. E. *et al.* Melatonin protects against excessive autophagy-induced mitochondrial and ovarian reserve function deficiency through ERK signaling pathway in Chinese hamster ovary (CHO) cells. **Mitochondrion**, Amsterdam, v. 61, p. 44–53, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mito.2021.09.009>. Acesso em: 28 ago. 2024.

YANG, C. *et al.* Follicular atresia in buffalo: cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) and the underlying mechanisms. **Animals**, Basel, v. 14, n. 15, p. 2138, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ani14152138>. Acesso em: 22 ago. 2024.

YANG, M. *et al.* Concentrated ambient fine particles exposure affects ovarian follicle development in mice. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 231, p. 113178, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113178>. Acesso em: 15 set. 2024.

YANG, X. *et al.* Ameliorative effect of itaconic acid/IRG1 against endoplasmic reticulum stress-induced necroptosis in granulosa cells via PERK-ATF4-AChE pathway in bovine. **Cells**, Basel, v. 14, n. 6, p. 419, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells14060419>. Acesso em: 12 mar. 2025.

YE, Z. *et al.* GPX4 deficiency-induced ferroptosis drives endometrial epithelial fibrosis in polycystic ovary syndrome. **Redox Biology**, Amsterdam, v. 83, p. 103615, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2025.103615>. Acesso em: 6 fev. 2025.

YI, X. *et al.* Ferroptosis: a novel therapeutic target of natural products against doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Paris, v. 178, p. 117217, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.117217>. Acesso em: 9 nov. 2024.

YING, W. *et al.* Follicular fluid HD-SEVs-miR-128-3p is a key molecule in regulating bovine granulosa cells autophagy. **Theriogenology**, New York, v. 226, p. 263–276, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.06.022>. Acesso em: 2 out. 2024.

ZHANG, F. *et al.* Chaihu Shugan San and Zuogui Yin synergistically improve premature ovarian failure in a rat model via the PI3K/Akt/mTOR pathway. **Translational Oncology**, Houston, v. 53, p. 102298, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2025.102298>. Acesso em: 13 mar. 2025.

ZHANG, J. *et al.* Participation of preovulatory follicles in the activation of primordial follicles in mouse ovaries. **International Journal of Biological Sciences**, Nanjing, v. 20, n. 10, p. 3863–3880, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.7150/ijbs.95020>. Acesso em: 10 jul. 2024.

ZHANG, Y. *et al.* A novel way of regression of pregnant corpus luteum during parturition in mice: the ferroptosis associated with NCOA4-mediated ferritinophagy. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 236, p. 116910, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2025.116910>. Acesso em: 28 jan. 2025.

ZHOU, S. *et al.* Low WIP1 expression accelerates ovarian aging by promoting follicular atresia and primordial follicle activation. **Cells**, Basel, v. 11, n. 23, p. 3920, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells11233920>. Acesso em: 14 fev. 2025.

ZHU, Z. *et al.* Nicotinamide riboside supplementation ameliorates ovarian dysfunction in a PCOS mouse model. **Journal of Ovarian Research**, London, v. 18, n. 1, p. 9, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13048-025-01596-4>. Acesso em: 22 jan. 2025.