

MODELOS *IN VITRO* E *IN VIVO* NOS ESTUDOS DA FISIOLOGIA REPRODUTIVA E O EFEITO DE PRODUTOS NATURAIS COM POTENCIAL DE PROTEÇÃO À QUIMIOTERAPIA

Data de submissão: 16/02/2023

Data de aceite: 01/03/2023

Miguel Fernandes de Lima Neto

Universidade Federal do Ceará
Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia-PPGB UFC Campus de
Sobral
Núcleo de Pesquisa em Experimentação
Animal-NUPEX
Sobral – Ceará
<http://lattes.cnpq.br/7731529552123675>

Anderson Weiny Barbalho Silva

Universidade Federal do Ceará
Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia-PPGB UFC Campus de
Sobral
Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia
da Reprodução- LABIREP
Núcleo de Pesquisa em Experimentação
Animal-NUPEX
Sobral – Ceará
<http://lattes.cnpq.br/0128127271859252>

Ernando Igo Teixeira de Assis

Universidade Federal do Ceará
Rede Nordeste de Biotecnologia -
RENORBIO
Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia PPGB
Núcleo de Pesquisa em Experimentação
Animal-NUPEX
Sobral – Ceará
<http://lattes.cnpq.br/6413266548790564>

José Roberto Viana Silva

Universidade Federal do Ceará
Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia-PPGB UFC Campus de
Sobral
Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia
da Reprodução- LABIREP
Núcleo de Pesquisa em Experimentação
Animal-NUPEX
Sobral – Ceará
<http://lattes.cnpq.br/7013269523847698>

Alana Nogueira Godinho

Universidade Federal do Ceará
Curso de Medicina - Campus de Sobral
Núcleo de Pesquisa em Experimentação
Animal-NUPEX
Sobral – Ceará
<http://lattes.cnpq.br/3622760059922902>

Jordânia Marques de Oliveira Freire

Universidade Federal do Ceará
Curso de Medicina - Campus de Sobral
Núcleo de Pesquisa em Experimentação
Animal-NUPEX
Sobral – Ceará
<http://lattes.cnpq.br/9070055317899542>

RESUMO: Diante dos problemas de fertilidade causados pelo uso de quimioterápicos no tratamento contra o

câncer, a busca por biotécnicas reprodutivas que possibilitem a manutenção da fertilidade feminina está cada vez mais evidente. De modo geral, os antineoplásicos, a exemplo da doxorrubicina (DOX) são capazes de provocar prejuízos sobre o ovário, abrindo possibilidades de estudos de compostos que, potencialmente, apresentem um efeito protetivo no desenvolvimento folicular. Investigações sobre a capacidade de produtos naturais em amenizar os efeitos adversos causados por antineoplásicos na saúde reprodutiva, poderá contribuir para a identificação de uma nova abordagem terapêutica para a preservação da fertilidade frente aos tratamentos quimioterápicos.

PALAVRAS-CHAVE: Antioxidantes; Apoptose; Foliculogênese; Ovário.

IN VITRO AND IN VIVO MODELS IN REPRODUCTIVE PHYSIOLOGY STUDIES AND THE EFFECT OF NATURAL PRODUCTS WITH PROTECTIVE POTENTIAL TO CHEMOTHERAPY

ABSTRACT: In view of the fertility problems caused by chemotherapy drugs in the treatment of cancer, the search for reproductive biotechniques that allow the maintenance of female fertility is increasingly evident. In general, antineoplastic agents, such as doxorubicin (DOX), causing damage to the ovary, opening possibilities for studies of compounds that potentially have a protective effect on follicular development. Investigations on the ability of natural products to mitigate the adverse effects caused by antineoplastic agents on reproductive health, may contribute to the identification of a new therapeutic approach for the preservation of fertility in the face of chemotherapy treatments.

KEYWORDS: Antioxidants; Apoptosis; Folliculogenesis; Ovary.

1 | OVÁRIO MAMÍFERO, FOLICULOGÊNESE E OOGÊNESE

O ovário é o principal órgão do sistema reprodutor feminino, apresentando função endócrina, caracterizada pela produção de hormônios e fatores de crescimento, e outra gametogênica, relacionada ao desenvolvimento de folículos e maturação dos oócitos (Figura 1). No microambiente ovariano, ocorrem dois processos biológicos importantes: a oogênese e a foliculogênese. A oogênese compreende o desenvolvimento e diferenciação das células germinativas primordiais (CGP) ainda na vida fetal até a formação do oócito fecundado durante a vida reprodutiva. A foliculogênese representa a formação as unidades morfológicas e funcionais da biologia reprodutiva em fêmeas: os folículos ovarianos. Os folículos ovarianos são importantes para auxiliar a oogênese e para a produção de hormônios sexuais femininos, como estrogênios e a progesterona, que são responsáveis pelas características sexuais secundárias femininas e o início da gestação (RIMON-DAHARI et al., 2016).

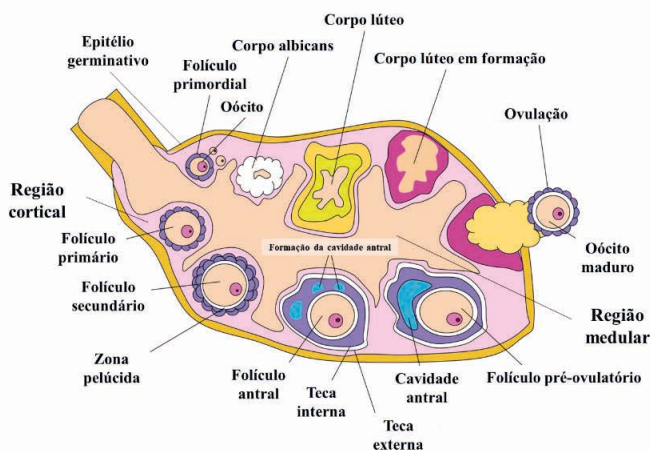


Figura 1: Esquema ilustrativo do ovário mamífero e suas principais estruturas. Fonte: Adaptado de Wikiand.com.

A população folicular que forma a reserva ovariana é variável entre as espécies e é estabelecida no início da vida. É a partir desse estoque que todos os folículos em crescimento e oócitos ovulados são derivados, diminuindo a reserva naturalmente com a idade, sendo selecionados para o crescimento e/ou levados à atresia folicular (FINDLAY et al., 2019). Mas, para que ocorra a seleção para o crescimento e desenvolvimento, os folículos primordiais precisam ser ativados.

2 | ATIVAÇÃO E ATRESIA FOLICULAR

A ativação dos folículos primordiais, etapa importante na foliculogênese inicial, é caracterizada no nível morfológico pelo crescimento do oócito e proliferação e diferenciação das células da granulosa circundantes (RIMON-DAHARI et al., 2016). A taxa de ativação dos folículos primordiais deve ser rigorosamente controlada para garantir que reservas suficientes permaneçam para sustentar a fertilidade ao longo da vida reprodutiva. Mesmo que todos os mecanismos moleculares que envolvem o processo de ativação e crescimento folicular não terem sido totalmente elucidados, um progresso significativo foi feito para caracterizar as vias moleculares que os governam. Acredita-se que os fatores de crescimento e hormônios produzidos no microambiente ovariano resultado da interação entre células foliculares e estroma sejam os principais reguladores da ativação folicular.

Quando o ovário é exposto a agentes quimioterápicos, a secreção de inibidores do folículo primordial diminui devido ao dano aos folículos em desenvolvimento, isso acelera o recrutamento dos folículos primordiais pelas vias de ativação e a redução da reserva ovariana resultando na entrada maciça de folículos na fase de crescimento, o chamado efeito

“*burnout*” (CHANG et al., 2015). Isso tem sido evidenciado por estudos com camundongos que mostraram diminuição no número de folículos primordiais e números aumentados de folículos em desenvolvimento precoce em grupos tratados com doxorubicina e cisplatina nos primeiros 4 e 5 dias, respectivamente (WANG et al., 2019; CHANG et al., 2015). No entanto, um estudo mais recente demonstrou que a exposição aguda (12h) a ciclofosfamida foi capaz de promover a diminuição da reserva de folículos primordiais humanos por vias pró-apoptóticas, mas sem ativação de crescimento do folículo primordial (TITUS et al., 2021). Através de análises transcriptômicas, foi observado que, em decorrência de danos ao DNA, a via de ativação foi suprimida enquanto a apoptose foi desencadeada mediada por proteínas anti e pró-apoptóticas.

Apenas um pequeno número dos folículos presentes no ovário ($\approx 1\%$) chegará ao ápice do seu desenvolvimento e culminar com a ovulação; a grande maioria é perdida através de um processo de morte programada chamado de atresia folicular (MATSUDA et al., 2012). A atresia faz parte da dinâmica folicular, sendo essencial na função e desenvolvimento ovariano, uma vez que esse processo é importante por auxiliar na homeostase, controlando a fecundidade, selecionando folículos para o recrutamento, um ‘controle de qualidade’ eliminando anomalias meióticas, além de garantir a remoção dos remanescentes foliculares pós-ovulatórios para preparar o ovário para o próximo ciclo (KUMAR; JOY, 2015; HUSSEIN, 2005). Apesar da atresia ser um processo natural e contínuo, ela pode ser acelerada devido a perturbações à fisiologia ovariana, como no uso de medicamentos para o tratamento de câncer (SPEARS et al., 2019).

A apoptose é a principal responsável pela perda da reserva ovariana (HUSSEIN, 2005; SPEARS et al., 2019) e muitas moléculas estão envolvidas no seu controle, seja promovendo sua ativação ou supressão. Dentre elas, estão proteínas antiapoptóticas (como Bcl-2) e pró-apoptóticas (como Bax), além de outros membros da família Bcl e proteínas Caspases. Além disso, a apoptose pode ser desencadeada por duas vias: a via extrínseca (ou via do receptor de morte) e via intrínseca (ou via mitocondrial) (NAGATA, 2018) (Figura 2).

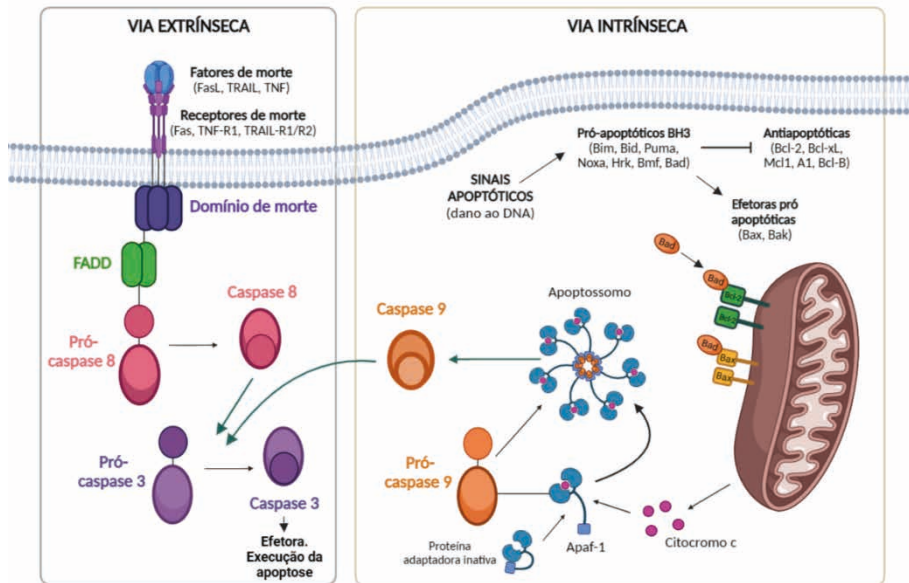


Figura 2: Mecanismo geral das vias apoptóticas na célula. A via extrínseca é ativada por fatores de morte. A ligação de um fator de morte ao seu receptor específico causa o processamento do domínio de morte e recrutamento de FADD, para ativar CASP 8 e 3. Na via extrínseca, proteínas pró apoptóticas são ativadas transcricionalmente e induzem direta ou indiretamente a ativação de efetoras apoptóticas que fazem a mitocôndria liberar citocromo c. O conjunto formado por Apaf-1 e o citocromo c formam um complexo para mediar a CASP9. A CASP 8 ativada na via extrínseca e a CASP 9 na via intrínseca clivam a procaspase 3 em CASP 3 ativa. Fonte: Elaborada pelos autores. Criada com biorender.com

3 | EFEITOS DOS ANTINEOPLÁSICOS NA FERTILIDADE FEMININA

Apesar dos avanços significativos nos tratamentos do câncer, a sobrevivência pode ter sua qualidade diminuída devido aos efeitos colaterais dos tratamentos e suas consequências em diversos campos, inclusive na saúde reprodutiva. Os efeitos tóxicos prejudicam a fertilidade por meio de danos ao útero, diminuição da função ovariana e danos aos folículos ovarianos por meio da apoptose, danos ao DNA, danos mitocondriais e à formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (SPEARS et al., 2019). Em um estudo com camundongos, o agente quimioterápico doxorrubicina (DOX) atingiu diretamente o útero e alterou a expressão gênica em resposta à síntese de estrogênio (ANDERSEN et al. 2019). O principal mecanismo de ação dos antineoplásicos é através do dano ao DNA, que consequentemente ativa as vias de apoptose. Além disso, há evidências de morte folicular indireta por dano vascular e estromal, além de diminuição do fluxo sanguíneo e diminuição dos ovários em mulheres (BEN-AHARON et al., 2012). Essa morte de células estromais, bem como os danos microvasculares, induzem hipóxia tecidual, o que pode contribuir para a perda indireta tardia de folículos ovarianos.

A DOX liga-se ao DNA e provoca a quebra das cadeias, interferindo nos processos de

replicação e transcrição (MOBARAKI et al., 2017). Seu efeito tóxico também está associado a produção de radicais livres e danos às membranas celulares e proteínas, gerando uma resposta para a apoptose celular. No entanto, devido a sua alta toxicidade, não apenas as células cancerosas são afetadas, mas também as células saudáveis do organismo, o que justifica os efeitos colaterais dos tratamentos contra o câncer, bem como a toxicidade ao sistema reprodutivo. Estudos recentes mostraram que o tecido ovariano criopreservado de mulheres jovens submetidas à quimioterapia, apresentou muitos folículos atresicos e após o cultivo *in vitro* desse mesmo tecido, observou-se uma diminuição na produção de estradiol e progesterona (PAMPANINI et al., 2019). O mecanismo geral de ação da DOX está representado na Figura 3.

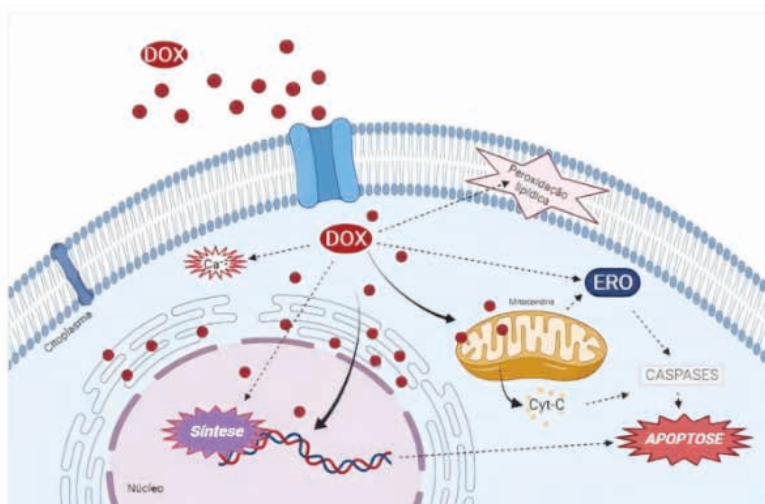


Figura 3: A DOX leva à formação de ERO, peroxidação lipídica, dano ao DNA e às mitocôndrias, desbalanço do cálcio e indução de vias apoptóticas. A concentração citoplasmática e mitocondrial de cálcio aumenta, levando a edema celular. Aumenta expressão de proteínas pró-apoptóticas; desencadeia o efluxo de Cyt-C e desencadeia a ativação de caspases. Além disso, os ROS gerados disparam a ativação de caspases e induz a apoptose. A DOX bloqueia a síntese de DNA. DOX: doxorubicina, ERO: espécies reativas de oxigênio, Cyt-C: citocromo c, Ca²⁺: íons cálcio citoplasmático. Fonte: Elaborada pelos autores. Criada com biorender.com

4 | PRODUTOS NATURAIS COM POTENCIAL DE PROTEÇÃO À QUIMIOTERAPIA

Produtos naturais estão sendo testados com o objetivo de proteger sistemicamente durante ou após o tratamento quimioterápico em machos e fêmeas. A exemplo de três produtos (1,8-cineol, óleo essencial de *Artemisia herba alba*; exopolissacarídeo, obtido de estreptomicetos marinhos e ácido elágico) que foram testados com o objetivo de analisar seus efeitos hepatoprotetores e cardioprotetores em ratos machos induzidos a quimioterapia com ciclofosfamida (ABDALLAH et al., 2019). O pré-tratamento desses animais com todas as substâncias melhorou as anormalidades de eletrocardiograma, diminuiu os marcadores

séricos de hepatotoxicidade e cardiotoxicidade, preveniu o estresse oxidativo e a apoptose celular.

Os produtos naturais possuem uma ampla variedade de antioxidantes e outros compostos bioativos, como ácidos fenólicos, lignanas, estilbenos, taninos e flavonoides (AMAROWICZ; PEGG, 2019). Lins et al., (2020) avaliaram os efeitos do pré-tratamento com o antioxidante rutina e sua influência após indução da quimioterapia com cisplatina em camundongos fêmeas. Os resultados promissores demonstraram que a substância foi capaz de aumentar o número de folículos morfologicamente normais e diminuir as taxas de apoptose. Além disso, a administração de antioxidantes presentes na polpa de açaí (*Euterpe oleracea*) diminuiu as vias pró-inflamatórias e sinalização apoptótica em ovários de camundongos fêmeas em idade mais avançada (KATZ-JAFFE et al. 2020).

Um estudo realizado com a *Foeniculum vulgare* (erva-doce) conclui que o extrato vegetal foi capaz de proteger o ovário dos efeitos colaterais da ciclofosfamida, apresentando um aumento nos níveis séricos de hormônios e evidenciou o seu efeito protetor contra os efeitos do antineoplásico no ovário de camundongos (AZAM et al., 2017). Os resultados mostraram que o peso, volume e diâmetro ovariano reduziu significativamente nos grupos tratados com ciclofosfamida, mas aumentou após o tratamento dos camundongos com extrato de erva-doce. Além disso, o extrato auxiliou no aumento do número de folículos normais. Recentemente, demonstrou-se que o extrato de *Nasturtium officinale* (agrião) teve efeitos protetores em ovários de ratas tratadas por 21 dias e induzidas à quimioterapia com DOX. O extrato auxiliou na função ovariana por meio da regulação hormonal e proliferação celular, além de ter mostrado efeitos protetores na peroxidação lipídica (RAD et al., 2021). Um estudo em ratas induzidas a quimioterapia com DOX e tratadas com quercetina ou vitamina E mostrou melhoras nos parâmetros morfológicos e hormonais nos (SAMARE-NAJAF; ZAL; SAFARI, 2020). Houve diminuição de alterações patológicas (erupção cutânea, atrofia, hemorragia e ascite) além disso quercetina e vitamina E foram capazes de promover o ganho de peso nos animais enquanto DOX diminuiu, assim como a diminuição no número de folículos atresicos. Outro estudo analisou o potencial antiinflamatório e antiapoptótico do zingerone, uma substância encontrada no gengibre, em ovários e úteros de ratas induzidas a quimioterapia com cisplatina (KAYGUSUZOGLU et al., 2018). Os resultados mostraram que a substância manteve a arquitetura e integridade histológica ovariana e uterina e reduziu os níveis de marcadores inflamatórios, também inibiu a apoptose e reduziu os marcadores de dano oxidativo ao DNA.

Dentre os compostos naturais com potencial de aplicação na fisiologia reprodutiva pode-se destacar a planta *Actea racemosa* (L.). O extrato dessa planta já demonstrou possuir ação terapêutica em mulheres e experimentações *in vitro* e *in vivo*. Através de um estudo randomizado com mulheres saudáveis que estavam na pós-menopausa, constatou-se que o uso diário de *A. racemosa* por 28 dias influenciou beneficemente a função endotelial, promovendo elasticidade vascular (FERNANDES et al., 2019).

Os mecanismos de ação do extrato de *A. racemosa* são controversos e inconclusivos, uma vez que seu extrato bruto possui uma grande quantidade de compostos com atividades diferentes. Assim, supõe-se que as ações terapêuticas atribuídas a esta planta advêm da interação sinérgica entre compostos, mas ainda há necessidade de produção científica que aborde dados que comprovem os mecanismos de ação dos seus constituintes. Estudos *in vitro* mostraram que o 23-epi-26-desoxiacteína, um dos glicosídeos triterpênicos mais abundantes na *A. racemosa*, promoveu a biogênese mitocondrial em células β -pancreáticas, prevenindo danos celulares oxidativos induzidos por metilglioxal (espécie reativa de dicarbonil, relacionada a complicações diabéticas) (SUH et al., 2017) e protegeu os osteoblastos contra danos celulares induzidos por antimicina A (um inibidor do transporte de elétrons mitocondrial) (CHOI, 2013). Em modelos experimentais de estresse e úlcera gástrica em camundongos e ratos, autores descobriram os efeitos positivos de *A. racemosa* (NADAOKA et al., 2012). Uma única administração oral em camundongos, atenuou significativamente os níveis plasmáticos de corticosterona e aspartato aminotransferase (o estresse causa aumento nos níveis plasmáticos desse hormônio e enzima, respectivamente); além de prevenir o desenvolvimento de úlceras da mucosa gástrica de ratos, independente da dose de extrato utilizada (200, 500 e 1000 mg/kg). Também foi demonstrado a *A. racemosa* (3 e 6 $\mu\text{g/mL}$), em particular o ácido isoferúlico que pode ser encontrado dentre os componentes do extrato, inibiram a produção de citocinas inflamatórias no sangue de voluntários após estimulação inflamatória (SCHMID et al., 2009). Além disso, estudos *in vitro* com células neurais e hepáticas cultivadas na presença do extrato de *A. racemosa*, preservou a integridade mitocondrial e os níveis de ATP e impediu a formação de ERO e morte celular (RABENAU et al., 2019).

Estudos clínicos têm sido conduzidos com administração de fitoterápicos a mulheres em tratamento de câncer e os coloca como uma opção terapêutica não hormonal segura para sobreviventes dessa doença (RUAN et al., 2019). Em um estudo clínico testando os efeitos da *A. racemosa* na síndrome da menopausa causada por análogo do hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH-a) no câncer de mama, indicou que o grupo que recebeu LHRH-a associado a *A. racemosa* teve um índice menor de menopausa em relação ao grupo que recebeu apenas o LHRH-a, no entanto não houve diferença entre os grupos em relação aos níveis hormonais e outras complicações ginecológicas (WANG et al., 2019). Ademais, um estudo *in vitro* e *in vivo* identificou atividade antitumoral sinérgica entre *Cimicifuga dahurica*, outra espécie do mesmo gênero, em combinação com a cisplatina. Houve aumento da expressão de marcadores apoptóticos e redução do volume tumoral em ratos (ZHANG et al., 2016) e inibiu o crescimento *in vitro* de células de câncer de mama (EINBOND et al., 2004). Isto indica que espécies do gênero *Cimicifuga* ou *Actaea* podem não só possuir mecanismos protetivos, mas também ação antitumoral em alguns casos. Porém, os mecanismos controladores dos seus potenciais protetores e antitumorais ainda não estão elucidados.

Foi investigado os efeitos, segurança e alvos do extrato de *A. racemosa* (7,14 mg/kg) associado ou não a vitamina C em ratas induzidas a SOP por hiperandrogenismo e tratadas por 28 dias (AZOUZ et al., 2021). Efeitos benéficos foram exercidos pela *A. racemosa* no status antioxidante, perfil hormonal, perfil lipídico, nível de glicose, funções hepáticas e a expressão de Ki-67 (um marcador de proliferação celular) nas células da granulosa, células da teca e células estromais. Notavelmente, a combinação de *A. racemosa* com vitamina C não foi apenas mais eficaz na reversão dos níveis desregulados de testosterona, LH e expressão positiva do gene da aromatase (*Cyp19a1*), enzima chave na biossíntese de esteroides. Além disso, o efeito do extrato da *A. racemosa* (60 mg/kg) foi avaliado por 28 dias em ratas induzidas a perimenopausa com GnRH-a (agonista do hormônio liberador de gonadotropina), um inibidor de estrogênio (CHEN et al., 2021). A deficiência de estrogênio também é capaz de acarretar outros distúrbios reprodutivos, como a endometriose que é uma doença dependente desse hormônio; porém o uso prolongado de hormônios para o tratamento pode causar a recorrência da doença bem como danos à função hepática, embolia venosa e câncer de mama. Assim, nesse estudo, a intervenção com a *A. racemosa* aliviou os sintomas da perimenopausa induzida, diminuindo a necessidade do tratamento hormonal convencional.

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

5 | CONCLUSÃO

É importante enfatizar o potencial papel tóxico de muitos desses produtos na fisiologia reprodutiva. Em geral, há uma baixa frequência de reações adversas, mas é importante a investigação acerca da segurança do uso deste medicamento sobre a fertilidade feminina quando administrado no período reprodutivo, pois isso coloca em questão discussões acerca da segurança e toxicidade da utilização de extratos vegetais na saúde. Portanto, é importante a investigação que visem entender o perfil farmacológico de plantas medicinais, o que só vem a endossar a necessidade de estudos que fundamentem cientificamente essa prática.

REFERÊNCIAS

ABDALLAH, Heba MI et al. **Protective effect of some natural products against chemotherapy-induced toxicity in rats.** *Heliyon*, v. 5, n. 5, p. e01590, 2019.

ANDERSEN, Christian Lee et al. **Chemotherapeutic agent doxorubicin alters uterine gene expression in response to estrogen in ovariectomized CD-1 adult mice.** *Biology of reproduction*, v. 100, n. 4, p. 869-871, 2019.

AZOUZ, Asmaa A. et al. **Modulation of steroidogenesis by *Actaea racemosa* and vitamin C combination, in letrozole induced polycystic ovarian syndrome rat model: promising activity without the risk of hepatic adverse effect.** *Chinese Medicine*, v. 16, n. 1, p. 36, 2021.

BEN-AHARON, Irit et al. **Chemotherapy-induced ovarian failure as a prototype for acute vascular toxicity.** *The oncologist*, v. 17, n. 11, p. 1386-1393, 2012.

CAGLAYAN, Cuneyt et al. **Zingerone ameliorates cisplatin-induced ovarian and uterine toxicity via suppression of sex hormone imbalances, oxidative stress, inflammation and apoptosis in female wistar rats.** *Biomedicine & pharmacotherapy*, v. 102, p. 517-530, 2018.

CHANG, Eun Mi et al. **Cisplatin induces overactivation of the dormant primordial follicle through PTEN/AKT/FOXO3a pathway which leads to loss of ovarian reserve in mice.** *PLoS One*, v. 10, n. 12, p. e0144245, 2015.

CHEN, Jiming et al. **GnRH-a-Induced Perimenopausal Rat Modeling and Black Cohosh Preparations' Effect on Rat's Reproductive Endocrine.** *Frontiers in Endocrinology*, v. 12, p. 683552, 2021.

CHOI, Eun Mi. **Deoxyactein Isolated from *Cimicifuga racemosa* protects osteoblastic MC3T3-E1 cells against antimycin A-induced cytotoxicity.** *Journal of Applied Toxicology*, v. 33, n. 6, p. 488-494, 2013.

DE ASSIS, Ernando IT et al. **Protective Effect of *Cimicifuga racemosa* (L.) Nutt Extract on Oocyte and Follicle Toxicity Induced by Doxorubicin during In Vitro Culture of Mice Ovaries.** *Animals*, v. 13, n. 1, p. 18, 2022.

EINBOND, Linda Saxe et al. **Growth inhibitory activity of extracts and purified components of black cohosh on human breast cancer cells.** *Breast cancer research and treatment*, v. 83, p. 221-231, 2004.

FERNANDES, E. S. et al. **Effectiveness of the short-term use of *Cimicifuga racemosa* in the endothelial function of postmenopausal women: a double-blind, randomized, controlled trial.** *Climacteric*, v. 23, n. 3, p. 245-251, 2020.

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

HASSANPOUR, Azam et al. **Ovarian protection in cyclophosphamide-treated mice by fennel.** *Toxicology Reports*, v. 4, p. 160-164, 2017.

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

KATZ-JAFFE, Mandy G. et al. **Antioxidant intervention attenuates aging-related changes in the murine ovary and oocyte.** Life, v. 10, n. 11, p. 250, 2020.

KIM, Chang Deok et al. **Inhibition of mast cell-dependent allergy reaction by extract of black cohosh (*Cimicifuga racemosa*).** Immunopharmacology and immunotoxicology, v. 26, n. 2, p. 299-308, 2004.

KUMAR, Ravi; JOY, Keerikkattil P. **Melanins as biomarkers of ovarian follicular atresia in the catfish *Heteropneustes fossilis*: biochemical and histochemical characterization, seasonal variation and hormone effects.** Fish physiology and biochemistry, v. 41, p. 761-772, 2015.

LINS, Thae Lanne BG et al. **Rutin prevents cisplatin-induced ovarian damage via antioxidant activity and regulation of PTEN and FOXO3a phosphorylation in mouse model.** Reproductive Toxicology, v. 98, p. 209-217, 2020.

MATSUDA, Fuko et al. **Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells.** Journal of Reproduction and Development, v. 58, n. 1, p. 44-50, 2012.

MOBARAKI, M. et al. **Molecular mechanisms of cardiotoxicity: a review on major side-effect of doxorubicin.** Indian journal of pharmaceutical sciences, v. 79, n. 3, p. 335-344, 2017.

MORELLI, Vincent; NAQUIN, Christopher. **Alternative therapies for traditional disease states: menopause.** American family physician, v. 66, n. 1, p. 129, 2002.

NADAOKA, Isao et al. **Oral administration of *Cimicifuga racemosa* extract attenuates immobilization stress-induced reactions.** Natural Product Communications, v. 7, n. 1, p. 1934578X1200700107, 2012.

NAGATA, Shigekazu. **Apoptosis and clearance of apoptotic cells.** Annual review of immunology, v. 36, p. 489-517, 2018.

Pampanini, V. et al. **Impact of first-line cancer treatment on the follicle quality in cryopreserved ovarian samples from girls and young women.** Human Reproduction, v. 34, n. 9, p. 1674–1685, 2019.

RABENAU, Malena et al. **Metabolic switch induced by *Cimicifuga racemosa* extract prevents mitochondrial damage and oxidative cell death.** Phytomedicine, v. 52, p. 107-116, 2019.

RAD, Parastou et al. **Preserved Ovarian Function Following Toxicity With Doxorubicin in Rats: Protective Effect of *Nasturtium Officinale* Extract.** Iranian Journal of Toxicology, v. 15, n. 1, p. 57-64, 2021.

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

RUAN, X. et al. **Benefit–risk profile of black cohosh (isopropanolic *Cimicifuga racemosa* extract) with and without St John’s wort in breast cancer patients.** Climacteric, v. 22, n. 4, p. 339-347, 2019.

SAMARE-NAJAF, Mohammad; ZAL, Fatemeh; SAFARI, Solmaz. **Primary and secondary markers of doxorubicin-induced female infertility and the alleviative properties of quercetin and vitamin E in a rat model.** *Reproductive Toxicology*, v. 96, p. 316-326, 2020.

SCHMID, Diethart et al. **Aqueous extracts of *Cimicifuga racemosa* and phenolcarboxylic constituents inhibit production of proinflammatory cytokines in LPS-stimulated human whole blood.** *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 87, n. 11, p. 963-972, 2009.

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

SUH, Kwang Sik et al. **Deoxyactein protects pancreatic β -cells against methylglyoxal-induced oxidative cell damage by the upregulation of mitochondrial biogenesis.** *International journal of molecular medicine*, v. 40, n. 2, p. 539-548, 2017.

TITUS, S. et al. **Individual-oocyte transcriptomic analysis shows that genotoxic chemotherapy depletes human primordial follicle reserve in vivo by triggering proapoptotic pathways without growth activation.** *Scientific reports*, v. 11, n. 1, p. 407, 2021.

WANG, Chen et al. **Effect of *cimicifuga racemosa* on menopausal syndrome caused by LHRH-a in breast cancer.** *Journal of ethnopharmacology*, v. 238, p. 111840, 2019.

WANG, Yingzheng et al. **Doxorubicin obliterates mouse ovarian reserve through both primordial follicle atresia and overactivation.** *Toxicology and applied pharmacology*, v. 381, p. 114714, 2019.

ZHANG, Lei-lei et al. **Synergistic anti-tumor activity and mechanisms of total glycosides from *Cimicifuga dahurica* in combination with cisplatin.** *Chinese Journal of Integrative Medicine*, p. 1-9, 2016.