

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
Faculdade de Nutrição  
Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos



Dissertação

**Metformina, fisetina e resveratrol: possíveis protetores da reserva ovariana de camundongas expostas à ciclofosfamida.**

**Maria Isabel Schiavon Cousen**

Pelotas, 2022

**Maria Isabel Schiavon Cousen**

**Metformina, fisetina e resveratrol: possíveis protetores da reserva ovariana de camundongas expostas à ciclofosfamida.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição

Orientador: Prof. Augusto Schneider

Co-orientador: Prof. Rafael Gianella Mondadori

Pelotas, 2022

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

C111m Cousen, Maria Isabel

Metformina, fisetina e resveratrol : possíveis protetores da reserva ovariana de camundongas expostas à ciclofosfamida / Maria Isabel Cousen ; Augusto Schneider, orientador ; Rafael Gianella Mondadori, coorientador. — Pelotas, 2022.

56 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2022.

1. Ciclofosfamida. 2. Envelhecimento ovariano. 3. Resveratrol. 4. Fisetina. 5. Fertilidade. I. Schneider, Augusto, orient. II. Mondadori, Rafael Gianella, coorient. III. Título.

CDD : 641.1

**Maria Isabel Schiavon Cousen**

**Metformina, fisetina e resveratrol: possíveis protetores da reserva ovariana de camundongas expostas à ciclofosfamida.**

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Nutrição e Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas.

Data de defesa: 14/04/2022

Banca examinadora:

Prof. Dr. Augusto Schneider (Orientador) Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

Dra. Tatiana Dandolini Saccon, Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

Prof. Dr. Rafael Gianella Mondadori, Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade de Brasília (UnB)

Pelotas, 2022

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, Paulo Cousen e Rosane Schiavon, me faltam palavras porque são para mim um exemplo de força, sempre me incentivando, apoiando minhas batalhas e me auxiliando a ser quem sou hoje. Aos meus irmãos queridos, Ana Paula, Emanuela, Paulo e Márcia, por terem me incentivado ao longo dos anos!

Ao meu orientador professor Augusto Schneider por desde 2017 me auxiliar na minha jornada acadêmica e por ser um orientador excepcional e paciente!

Ao meu namorado Adriano Hardtke, por apoiar minhas decisões, sempre incentivando meus sonhos e sendo o meu porto-seguro, melhor amigo e sorriso!

A minha amiga Érica Vasconcellos, por me fazer reconhecer que sou capaz. E que esteve presente me fortalecendo e incentivando!

Aos meus colegas de laboratório e pesquisa: Joao Rincón, Bianka Zanini, Driele Garcia, Jéssica Hense, José Isola, Gabriel Veiga, Olavo Porepp, Juliane Prosczec, assim como os demais por sempre estarem dispostos a auxiliarem e ensinarem o que sabem para ajudar, vocês são ótimos!

Ao Laboratório de Histologia do Instituto de Biologia e ao Laboratório de Nutrição Experimental da Faculdade de Nutrição – UFPel pelo espaço cedido para realização do meu trabalho. Aos técnicos de laboratório Luís Augusto e Luís Otávio por me acolherem e serem prestativos. Assim como a técnica Renata Ramirez!

Agradeço também a minha banca avaliadora, Rafael Mondadori, Tatiana Saccon e Augusto Schneider, profissionais exemplares nos quais me espelho e que muito me ensinam e ensinaram!

A Cnpq e a UFPel por todo apoio!

A todos, muito obrigada!

## Resumo

COUSEN, Maria Isabel Schiavon. Metformina, fisetina e resveratrol: possíveis protetores da reserva ovariana de camundongos expostas à ciclofosfamida. 2022. f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2022.

As células germinativas sofrem danos irreversíveis durante o tratamento com drogas citotóxicas, como a ciclofosfamida (CYP). A sua utilização reduz drasticamente a fertilidade feminina, visto que este fármaco induz a um maior recrutamento de folículos quiescentes, antecipando a menopausa. A CYP promove diversos danos celulares que favorecem a senescência celular. Este trabalho é o primeiro estudo que avalia estratégias para prevenir a senescência ovariana induzida pela CYP, através da administração de resveratrol (RES), fisetina (FIS) e metformina (MET). Também é o primeiro experimento a elucidar o efeito desses três compostos com o intuito de preservar a reserva ovariana em camundongos expostos a CYP. Foram utilizadas 60 fêmeas C57BL/6 com 60 dias de vida, divididas em seis grupos experimentais, sendo um controle (CTL) sem qualquer intervenção, além de cinco grupos recebendo CYP. Destes, um não recebeu nenhum tratamento adicional e os outros três grupos receberam tratamentos isolados com MET, FIS e RES enquanto o último grupo recebeu a combinação de FIS+RES. Esses animais foram eutanasiados após duas semanas e os ovários foram coletados para análises. A reserva de folículos primordiais no grupo CYP foi significativamente menor ( $p \leq 0.05$ ) que no grupo CTL. Não observamos diferença estatística em relação aos folículos totais. Embora a expressão gênica tenha refletido resultados inconclusivos, observamos redução significativa na expressão de p16 no grupo combinação (FIS+ RES+CYP;  $p \leq 0.05$ ). Houve maior marcação de lipofuscina no grupo CYP que nos demais grupos ( $p \leq 0.05$ ). Portanto, observamos que a CYP causou danos celulares que promoveram maior senescência nos ovários do grupo que recebeu somente CYP, demonstrando assim, que as intervenções propostas preveniram danos que resultariam na formação de células senescentes. A reserva ovariana foi afetada pela CYP, no entanto, os tratamentos apresentaram apenas efeito protetivo parcial.

Palavras-Chave: Ciclofosfamida; Envelhecimento ovariano; Resveratrol; Fisetina; Metformina; Fertilidade.

## Abstract

COUSEN, Maria Isabel Schiavon. Metformina, fisetina e resveratrol: possíveis protetores da reserva ovariana de camundongas expostas à ciclofosfamida. 2022. f. Dissertation (Master's in Nutrition and Food) - Graduate Program in Nutrition and Food, School of Nutrition, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2022.

Germ cells suffer irreversible damage during treatment with cytotoxic drugs such as cyclophosphamide (CYP). Its use drastically reduces female fertility, as this drug induces increased recruitment of quiescent follicles, anticipating menopause. CYP promotes various cellular damages that favor cellular senescence. This work is the first study evaluating strategies to prevent CYP-induced ovarian senescence through the administration of resveratrol (RES), fisetin (FIS) and metformin (MET). It is also the first experiment to elucidate the effect of these three compounds in order to preserve ovarian reserve in CYP-exposed mice. Sixty 60-day-old C57BL/6 females were used and divided into six experimental groups, one control (CTL) without any intervention, and five groups receiving CYP. Of these, one received no additional treatment and the other three groups received treatments with MET, FIS and RES alone while the last group received the combination of FIS+RES. These animals were euthanized after two weeks and the ovaries were collected for analysis. The primordial follicle reserve in the CYP group was significantly lower ( $p \leq 0.05$ ) than in the CTL group. We observed no statistical difference with respect to total follicles. Although gene expression reflected inconclusive results, we observed significant reduction in p16 expression in the combination group (FIS+RES+CYP;  $p \leq 0.05$ ). There was higher lipofuscin labeling in the CYP group than in the other groups ( $p \leq 0.05$ ). Therefore, we observed that CYP caused cellular damage that promoted greater senescence in the ovaries of the group that received CYP alone, thus demonstrating that the proposed interventions prevented damage that would result in the formation of senescent cells. Ovarian reserve was affected by CYP, however, the treatments showed only partial protective effect.

Keywords: Cyclophosphamide; Ovarian Aging; Resveratrol; Fisetin; Metformin; Fertility

## Lista de Figuras

Figura 1.	Imagens histológicas detalhadas de cada estágio folicular	<b>15</b>
Figura 2.	Vias de sinalização da ativação folicular	<b>17</b>
Figura 3.	Densidade folicular em diferentes estágios de crescimento	<b>35</b>
Figura 4.	Marcação de lipofuscina representada pelo % de senescência da área do tecido ovariano	<b>36</b>
Figura 5.	Análise da expressão gênica relativa aos genes ovarianos envolvidos com vias de senescência celular, resposta inflamatória e antioxidante	<b>37</b>
Figura 6.	Análise da expressão gênica relativa aos genes ovarianos envolvidos com vias de recrutamento e crescimento folicular	<b>37</b>

## Lista de Tabelas

Tabela 1.	Número amostral por grupo avaliado	<b>28</b>
Tabela 2.	Primers utilizados ( <i>foward e reverse</i> )	<b>32</b>

## Lista de abreviaturas

Akt: Proteína kinase B

AMH: hormônio antimülleriano

B2m: microglobulina beta 2

cDNA: ácido deoxiribonucleico complementar

CG: células da granulosa

CYP: ciclofosfamida

DNA: ácido deoxiribonucleico

df/df: ames dwarf

FIS: fisetina

FOXO3a: forkhead Box O 3<sup>a</sup>

G: gramas

GC: grupo controle

GH: hormônio do crescimento

IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina

KIT: tirosina quinase do receptor proto-oncogenese

KITL: tirosina quinase do receptor proto-oncogenese ligante

MET: metformina

mTOR: proteína alvo da rapamicina

mRNA: RNA mensageiro

PCR: reação em cadeia da polimerase

Pi3k: fosfoinositideo 3-quinase

Pten: homologia de fosfatase e tensina

RES: resveratrol

RNA: ácido ribonucleico

SIRT1: sirtuína tipo 1

SOD2: superóxido dismutase

UFPEL: Universidade Federal de Pelotas

U/kg: unidade por quilo de peso

## Sumário

1	INTRODUÇÃO .....	12
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	Reserva ovariana .....	16
2.2	Recrutamento folicular.....	16
2.3	Envelhecimento ovariano .....	19
2.4	Agente gonadotóxico.....	21
2.5	Tratamentos para prevenção de danos a reserva ovariana .....	23
2.5.1	Resveratrol .....	23
2.5.2	Metformina .....	24
2.5.3	Fisetina.....	25
3	OBJETIVO E HIPOTESE.....	27
3.1	Objetivo geral .....	27
3.2	Objetivo específico .....	27
3.3	Hipótese .....	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS .....	28
4.1	Manejo dos animais.....	28
4.2	Cálculo do tamanho amostral.....	29
4.3	Substâncias utilizadas e dosagens .....	30
4.3.1	Ciclofosfamida.....	30
4.3.2	Resveratrol .....	30
4.3.3	Metformina .....	30
4.3.4	Fisetina.....	30
4.3.5	Grupo combinado.....	31
4.4	Análises:.....	31
4.4.1	Contagem folicular .....	31

4.4.2	Expressão gênica.....	31
4.4.3	Sudan-black-b (SBB).....	33
4.5	Análises estatísticas.....	34
5	RESULTADOS.....	35
5.1	Contagem folicular .....	35
5.2	Marcação de lipofuscina.....	36
5.3	Expressão Gênica.....	37
6	DISCUSSÃO.....	39
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	45
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
9	ANEXO 1 .....	56

## 1 INTRODUÇÃO

A reserva ovariana é composta por folículos primordiais em um estado de quiescência, que em mulheres é formada durante o período intrauterino, e em camundongos após o nascimento (FADDY, 2000; TE VELDE et al., 1998). Uma vez ativada a reserva folicular, inevitavelmente, é depletada com o envelhecimento natural, conduzindo a menopausa que ocorre, normalmente, próximo aos 50 anos de idade em mulheres. A insuficiência ovariana prematura (IOP) é um processo precoce de esgotamento dos folículos ovarianos antes dos 40 anos de idade (WELT, 2008), tal pode decorrer de fatores como: uso de drogas citotóxicas, acúmulo de espécies reativas ao oxigênio, inflamação, radiação (LINDAHL; BARNES, 2000). Sabe-se que ambas as condições, IOP e menopausa, favorecem desfechos negativos à saúde feminina, entre eles: osteoporose, diabetes mellitus tipo 2, atrofia urogenital, doenças neurodegenerativas e o maior risco cardiovascular (MATTHEWS et al., 2009; PODFIGURNA-STOPA et al., 2016). Visto a tendência feminina de postergar a gestação para idades mais avançadas; estratégias que preservem e mantenham uma adequada função ovariana são fundamentais.

A ciclofosfamida (CYP) é um agente alquilante, normalmente utilizado para o tratamento de diversos tipos de câncer e doenças autoimunes. Os metabólitos desse fármaco atuam de forma a impedir a replicação do DNA, promovem: disfunção mitocondrial, aumento de espécies reativas ao oxigênio (ERO's) e redução da proteção contra danos oxidativos (ALFARHAN; JAFARI; NARAYANAN, 2020), facilitando assim a morte celular, sendo positivo ao tratamento de neoplasias (MADDEN; KEATING, 2014; ZHANG, JING et al., 2005). Esses fatores conduzem a danos nas estruturas foliculares, que além de promover o aumento de danos aos oócitos, também favorece envelhecimento ovariano através da senescência, esses fatores podem diminuir a fertilidade ocasionando abortos ou má formação embrionária. A CYP, inclusive, promove um ambiente deletério a sobrevivência das células da granulosa, as quais, em estágios foliculares de crescimento, são responsáveis pela produção do hormônio anti-mulleriano (AMH), o qual quando elevado, mantém o represamento da quiescência folicular, preservando a reserva ovariana. Além disso, estudos in-vivo e in-vitro em camundongos e humanos demonstram que a CYP pode induzir a IOP (ATHIRA et al., 2020; OKTEM; OKTAY, 2007;

XIONG et al., 2017). A CYP estimula a hiperativação das vias PI3K/AKT/mTOR, responsáveis pela sinalização de ativação do crescimento de folículos quiescentes (KALICH-PHILOSOPH et al., 2013; ZHOU et al., 2017). Conduzindo, portanto, a ativação global dos folículos primordiais, inclusive, seguido ao crescimento folicular ocorre a atresia, devido ao ambiente deletério proporcionado pelo fármaco (CHEN, X. Y. et al., 2016; KALICH-PHILOSOPH et al., 2013; ZHOU et al., 2017).

Atualmente durante tratamentos gonadotóxicos são utilizadas técnicas que preservam meios para a reprodução da mulher, como: a criopreservação dos oócitos, embrião ou do tecido ovariano (HOLZ et al., 2005; JHANWAR-UNIYAL et al., 2015). Técnicas essas que não impedem a infertilidade do indivíduo e que dependem da idade e status de saúde da paciente, bem como do risco oferecido pela dose administrada (MADDEN; KEATING, 2014; OKTAY et al., 2015). Além disso, não há garantias contra a reinserção de células cancerosas no transplante do tecido ovariano (BAI; JIANG, 2010). Sendo assim necessárias alternativas que preservem a atividade ovariana enquanto a mulher, independentemente da idade ou estado de saúde, estiver exposta a drogas gonadotóxicas como a CYP.

O resveratrol (RES), assim como a fisetina (FIS) são polifenóis reconhecidos por suas propriedades antioxidantes, quimio preventivas, antienvhecimento e anti-inflamatórias (BHATTACHARYA; DARJATMOKO; POLANS, 2011; KASHYAP et al., 2018; LIU, S. et al., 2018; NIE, Z. et al., 2020; YOUSEFZADEH et al., 2018). Estudos descrevem a capacidade do RES elevar o nível de Sirtuína-1 (Sirt-1), uma enzima responsável pela biogênese mitocondrial, proteção ao DNA e contra agentes oxidantes (LIU, S. et al., 2018; ORTEGA; DULEBA, 2015; WU et al., 2019). São escassos os estudos em relação ao uso de RES associado a CYP, no entanto, o relato mais recente in vivo com camundongos demonstra que a utilização de doses de 30 mg/kg induz maiores níveis de Sirt-1 e de AMH (WU et al., 2019), bem como melhor morfologia ovariana do que quando comparado aos animais que recebem CYP. No que tange a FIS, poucos estudos explanam seus efeitos na preservação da fertilidade. No entanto, recentemente um estudo demonstrou que camundongos expostos a CYP e tratados com FIS tiveram menor número de folículos atrésicos e maiores níveis de proteína de AMH que o grupo somente

com CYP (LIN, J. et al., 2020). Fatores estressores da integridade e saúde celular, como os antes mencionados proporcionados pelo uso de CYP, promovem um tipo celular disfuncional denominado célula senescente que apresenta como característica resistência à apoptose, aumento de ERO's e liberação de um fenótipo secretor associado a senescência (SASP) (YOUSEFZADEH et al., 2018). Nesse contexto a FIS vem sendo reconhecida como um flavonoide senolítico, pois possui propriedades capazes de atuar reduzindo danos oxidativos, induzindo o aumento da resposta antioxidante celular (GRYNKIEWICZ; DEMCHUK, 2019; YOUSEFZADEH et al., 2018) e em alguns estudos demonstra atuar reduzindo a sinalização na via mTOR (JUNG, C. H. et al., 2013; SYED et al., 2013). Sendo, portanto, interessante melhor elucidação desses compostos na preservação da função ovariana e proteção contra a senescência induzida por CYP.

Além do RES e FIS, estudos indicam a metformina, um fármaco hipoglicemiante, como uma droga capaz de atuar contra danos ao DNA, reduzindo o envelhecimento tecidual e capaz de favorecer a reserva ovariana de mulheres e camundongos com síndrome dos ovários policísticos (ANISIMOV et al., 2008; CHEN, Q. et al., 2017; NASERI; KHAZAEI; KHAZAEI, 2021; SAM; EHRMANN, 2017). Além disso, um estudo de revisão demonstra que a MET pôde inibir em diversos modelos animais a via mTOR e reduzir as vias PI3K e AKT (LU et al., 2021), o que pode promover preservação da reserva ovariana e redução da senescência.

Em nosso estudo utilizamos a técnica de marcação lipofuscina com sudan black para mensurar a senescência celular. A lipofuscina consiste basicamente em um agregado de proteínas oxidadas que se acumulam com o envelhecimento (GEORGAKOPOULOU et al., 2013; JUNG, T.; BADER; GRUNE, 2007). Essa técnica possui sensibilidade igual, senão superior a coloração com  $\beta$ -galactosidase, medidor clássico da senescência celular (GEORGAKOPOULOU et al., 2013; KURZ et al., 2000). Conforme ocorre o envelhecimento, é descrito que os animais aumentam a deposição de lipofuscina nos ovários, com os níveis de lipofuscina praticamente dobrando entre os 3 e 12 meses de idade em camundongos (ANSERE et al., 2021).

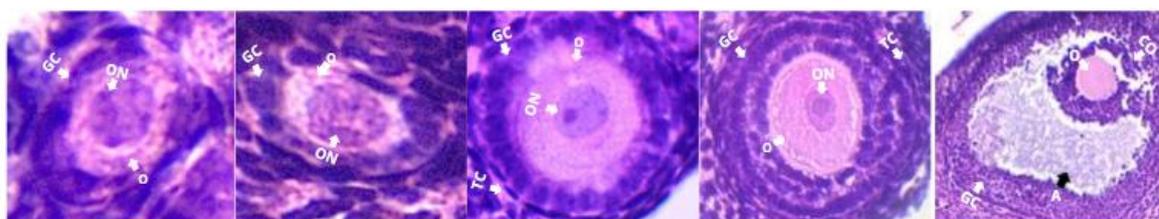
Portanto, o objetivo deste estudo é avaliar os efeitos da administração isolada e combinada de substâncias antioxidantes e reconhecidas como

bloqueadoras das vias de crescimento folicular PI3K/AKT/mTOR em camundongos fêmeas expostos a substância indutora da falha ovariana prematura (ciclofosfamida).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Reserva ovariana

A reserva ovariana, formada durante a vida intrauterina em mulheres (FADDY, 2000) e em camundongos após ao nascimento, é caracterizada por folículos primordiais (FP) em um estado de dormência (TE VELDE et al., 1998). Sob diferentes estímulos hormonais e outros ainda não totalmente estabelecidos, ocorre o recrutamento dos FP e o consequente desenvolvimento a folículos primários, secundários e antrais (ZHANG, D. et al., 2015), até que ocorra a ovulação. Os FP são oócitos circundados por células pré-granulosas as quais são achatadas (PETERS, 1969). Quanto aos folículos em transição, são oócitos circundados por células pavimentosas e cúbicas da granulosa, seu crescimento resulta nos folículos primários, aos quais caracterizados por um oócito e uma camada cuboide de células granulosas, o próximo estágio de crescimento é o de folículo secundário, que se configura como aquele circundado por mais de uma camada de células da granulosa cúbicas, sem o antro (cavidade) visível. O folículo terciário apresenta espaço antral que é definido e preenchido pelo líquido folicular, assim como, apresenta *cumulus oophorus* em torno do oócito, um agrupamento celular que forma uma estrutura semelhante um cálice (CHEN, Z. et al., 2015). A Figura 1 demonstra as características de cada folículo descritas acima.



**Folículo Primordial Folículo Transição Folículo Primário Folículo Secundário Folículo Terciário**

**Figura 1. Imagens histológicas de cada estágio folicular.** O - Oócito, ON - Núcleos de oócitos, GC - Células da granulosa, TC - Células da teca, A - Antro, CO- Cumulus oophorus. Fonte: Próprio autor.

### 2.2 Recrutamento folicular

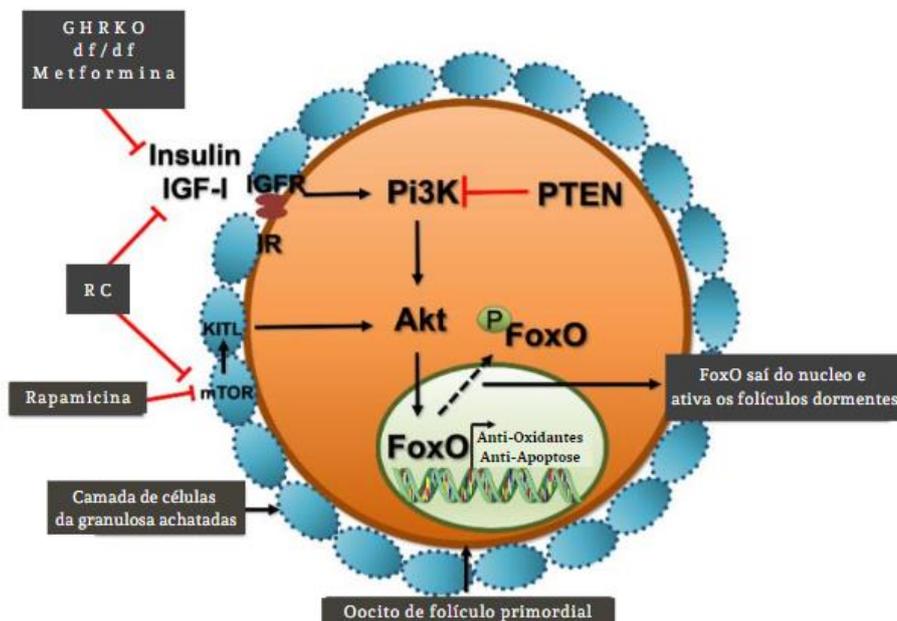
O processo de ativação folicular pode ser influenciado por diversas vias bioquímicas, representado objetivamente na Figura 2. Estudos apoiam a

participação de fatores de crescimento, como, o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I), a insulina e o hormônio do crescimento (GH), como fundamentais a função ovariana (CHANDRASHEKAR; ZACZEK; BARTKE, 2004). No oócito as vias da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K)/proteína quinase B (AKT) e o seu efetor o fator de transcrição Forkhead Box da classe O3a (FOXO3a) (KALICH-PHILOSOPH et al., 2013; LIU et al., 2006; SACCON et al., 2017) são reguladores da ativação dos FP e do tempo de vida reprodutiva das fêmeas (Figura 2). A hiperativação das vias PI3K/AKT culmina na hiper fosforilação da FOXO3a, fazendo com que a mesma seja transportada do núcleo para o citoplasma, havendo assim a inibição da sua função transcricional, culminando na hiperativação dos FP (CASTRILLON et al., 2003; PELOSI et al., 2013) processo que conduz ao esgotamento precoce da reserva ovariana (KALICH-PHILOSOPH et al., 2013; ZHENG et al., 2012).

A PI3K é uma fosfatase lipídica que converte fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) em fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) (CANTLEY, 2002). A conversão em PIP3 resulta na ativação da proteína quinase dependente de fosfoinosítido 1 (PDK1), que ativa a fosforilação da AKT, resultando na translocação de outras proteínas que estimulam o crescimento folicular (ADHIKARI; LIU, 2009; REDDY et al., 2009). A fosfatase homóloga a tensina (PTEN) é um regulador negativo da via PI3K (LEE et al., 2016) (Figura 2). Camundongos com deleção do gene PTEN demonstraram um aumento da atividade das vias PI3K/AKT, que culminou na ativação exacerbada de FP e esgotamento precoce da reserva folicular (REDDY et al., 2008). O mesmo ocorreu em camundongos deficientes em PDK1 (REDDY et al., 2009). Demonstrando assim, a relevância dessas vias na preservação da dormência e recrutamento do crescimento folicular. Ainda não é completamente estabelecido na literatura todos os fatores responsáveis pela quiescência e desenvolvimento folicular. Sabe-se que, no entanto, proteínas como o alvo mamífero da rapamicina (mTOR) apresenta atividade moduladora do processo de crescimento folicular e envelhecimento ovariano (Figura 2).

A mTOR atua no processo de ativação folicular e quando suprimida, na preservação da dormência oocitária (ADHIKARI et al., 2010). A atividade dessa proteína é modulada negativamente pelo complexo molecular proteico:

complexo 1 da esclerose tuberosa (TSC1 ou hamartina) e TSC2 (ou tuberina) (ADHIKARI et al., 2010).



**Figura 2. Vias de sinalização da ativação folicular.** Demonstra as vias conhecidas por desencadear o recrutamento de um folículo primordial, em laranja o núcleo, e em azul as células achatadas da granulosa. Animais nocaute para o hormônio do crescimento (GHRKO) e animais anões deficientes na produção do profeta da pituitária 1 (df/df); restrição calórica (CR); fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF-1); fosfoinositideo-3-quinase (Pi3k); proteína B quinase (Akt); fator de transcrição forkhead box (Foxo); alvo mecanicista da rapamicina (mTOR); receptor KIT e ligante KIT.

Modelos experimentais demonstram que o complexo 1 da mTOR é regulado negativamente pelo TSC1 (WULLSCHLEGER; LOEWITH; HALL, 2006), sendo fundamental para a diferenciação das células somáticas da granulosa, processo que conduz a ativação dos FP (LIU, J. et al., 2018; ZHANG, H. et al., 2014). Estudo comparativo entre camundongos com deleção do gene Rptor (proteína associada a regulação de MTOR, complexo 1) e normais, demonstram que esse processo mediado por mTORC1 eleva a expressão do ligante KIT (KITL) dentro das células granulosa, ao qual se liga ao KIT da superfície do oócito, resultando na ativação da cascata de sinalização de PI3K/AKT (ZHANG, H. et al., 2014). A literatura também indica que o complexo 2 da mTOR estaria mais relacionado ao desenvolvimento de oócitos que já estão em fase de crescimento folicular (CHEN, Z. et al., 2015). A mTORC1 ativa a p70 ribossomal S6 quinase (S6K1) e a proteína-1 de ligação

ao fator de iniciação eucariótica 4E (4E-BP1), responsáveis por sinalizar o crescimento, desenvolvimento e translocação de outras proteínas (HOLZ et al., 2005; JHANWAR-UNIYAL et al., 2015) enquanto a mTORC2 demonstra ativar a mTORC1 através da regulação da via AKT, fosforilando a mesma na serina 473 (BAI; JIANG, 2010).

A deleção do gene TSC1 nas células da granulosa de folículos primordiais (ZHANG, H. et al., 2014) bem como, em outros estágios foliculares mais avançados (ADHIKARI et al., 2010) resulta em exacerbação da mTORC1 e consequente ativação global dos FP, conduzindo a exaustão folicular já no início da idade adulta, ocasionando IOP (ADHIKARI et al., 2010). Por outra perspectiva, animais nocautes para mTORC2 apresentam IOP, devido ao aumento do processo apoptótico que decorre da diminuição da p-FOXO3a, p-AKT e consequente aumento da fosforilação de proteínas apoptóticas (CHEN, Z. et al., 2015). Portanto, embasado na literatura disponível observa-se que ambos complexos da mTOR são determinantes para a quiescência, desenvolvimento e sobrevivência dos folículos ovarianos.

### **2.3 Envelhecimento ovariano**

A maioria dos folículos recrutados sofrem atresia, pois haverá um folículo (monoovulatório) ou mais (poliovulatório) dominante a cada ciclo que irá ovular a depender da espécie (ZHANG, D. et al., 2015). A depleção da reserva ovariana ocorre conforme o avanço do envelhecimento resultando o começo da menopausa, que ocorre de maneira fisiológica em torno dos 50 anos de idade nas mulheres, enquanto que em camundongos o envelhecimento apenas conduz a redução progressiva da reserva folicular sem uma transição clara para a menopausa na maioria das linhagens (FADDY et al., 1992). Tanto a menopausa, quanto a IOP são fatores de risco para osteoporose, atrofia urogenital, doenças neurodegenerativas e o maior risco cardiovascular (MATTHEWS et al., 2009; PODFIGURNA-STOPA et al., 2016). Fatores ambientais como drogas citotóxicas, radiação (KERR et al., 2012) e endógenos como ERO's e inflamação (KERR et al., 2012), são condições que precipitam o envelhecimento ovariano (LOPEZ; LUDERER, 2004; OKTAY et al., 2015). Danos endógenos e exógenos impostos ao organismo ao longo da vida reprodutiva expõem os oócitos e células da granulosa a danos de DNA e

reduzem a atuação de mecanismos capazes de recuperá-los (CHEN, X. Y. et al., 2016; HANNA et al., 2012; OKTAY et al., 2014; TITUS et al., 2013). O envelhecimento natural também está associado com a redução do potencial de corrigir danos de DNA, ficando os oócitos sujeitos ao acúmulo desses danos (WINSHIP et al., 2018).

Sabe-se que o estado das células da granulosa está intimamente relacionado com o adequado crescimento, desenvolvimento folicular e competência oocitária (OKTAY et al., 2014; WINSHIP et al., 2018). Metabolicamente as células da granulosa apresentam elevado grau de divisões mitóticas (OKTAY et al., 2014) o que gera um ambiente rico em ERO's (PANDEY et al., 2010; PRASAD et al., 2016), que são neutralizadas por mecanismos de defesa (DEVINE; PERREAULT; LUDERER, 2012). As ERO's são produzidas principalmente pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial a partir da redução molecular incompleta do oxigênio, o que gera os radicais livres: superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $OH^\bullet$ ) (KHAN, S. N. et al., 2016). A produção desregulada desses radicais promove seu acúmulo (HOSNI; BASTU, 2012), que quando não neutralizados, contribuem para a progressão do envelhecimento ovariano (WU et al., 2019) e redução do maquinário antioxidante (GOUD et al., 2014). As ERO's propiciam instabilidade genômica por ocasionar perturbação mitocondrial e danos ao DNA, como trocas de pares de base (pb), bem como quebras de dupla fita (DSB's) (HOSNI; BASTU, 2012). Essas alterações resultam em atresia folicular e disfunção ovariana (GOUD et al., 2014; WU et al., 2019). O processo de atresia folicular decorre tanto por danos não recuperados nas células da granulosa, quanto nos oócitos (CHEN, X. Y. et al., 2016; ELKADY et al., 2019). O estresse oxidativo também reduz a qualidade oocitária por induzir destruição das estruturas de emparelhamento do fuso meiótico (JEELANI et al., 2017), favorecer o envelhecimento precoce do oócito (CHEN, X. Y. et al., 2016), também sendo observado alterações no alinhamento cromossomal (KHAN, S. N. et al., 2016). *In vitro*, a maior presença de ERO's no líquido folicular foi associada a menores taxas de fertilização oocitária e menor qualidade dos embriões em humanos (AGARWAL; GUPTA; SHARMA, 2005; DAS et al., 2006) também descrito em camundongos (SHI et al., 2016). Tais achados demonstram que o estresse oxidativo, assim como

outros agentes endógenos e/ou exógenos podem comprometer a fertilidade feminina.

Os danos promovidos a integridade celular e do DNA ao longo da vida, favorecem a formação de células senescentes (KIRKLAND; TCHKONIA, 2020). Esse tipo celular, embora defeituoso, é resistente a apoptose e apresenta mecanismos de autodefesa que as protegem contra seu fenótipo secretor associado a senescência inflamatória (SASP) (KIRKLAND; TCHKONIA, 2020; TCHKONIA et al., 2007), processo que afeta as células vizinhas, gerando disfunção celular, desordem metabólica, processos que de modo geral aceleram o envelhecimento celular (KIRKLAND; TCHKONIA, 2020; TRAYSSAC; HANNUN; OBEID, 2018). O SASP estimula um quadro inflamatório pelo aumento de interleucinas e citocinas pró-inflamatórias (TCHKONIA et al., 2007; TRAYSSAC et al., 2018; XU et al., 2015). Sabe-se que o aumento da inflamação no ovário, conduz a ativação dos folículos primordiais (BROMFIELD; SHELDON, 2013). Antioxidantes, potencialmente senolíticos, como o RES e a FIS apresentam efeito protetor ao organismo por atuarem inibindo os mecanismos de bloqueio da apoptose dessas células senescentes (LIU, S. et al., 2018; RUSSO et al., 2020; YOUSEFZADEH et al., 2018). Tais dados nos demonstram a relevância de melhor elucidação dessas substâncias para a fertilidade e a importância de investigar a formação de células senescentes no ovário e sua relação com aspectos quantitativos e qualitativos da reserva ovariana e tratamentos com CYP.

#### **2.4 Agente gonadotóxico**

A CYP é um agente alquilante, comumente utilizado no tratamento de cânceres de mama, ovário, câncer ósseo, câncer infantil, linfomas Hodgkins e não Hodgkins, leucemia crônica, em doenças autoimunes e como um agente imunossupressor no transplante de órgãos (EMADI; JONES; BRODSKY, 2009; MOORE, 1991; SPEARS et al., 2019). Ela é metabolicamente inativa na sua forma intacta, não apresentando desta maneira citotoxicidade (BOYD et al., 1986). O processo de metabolização e ativação da CYP ocorre principalmente no fígado pelo citocromo P-450 (MOORE, 1991). Dentro das células hepáticas a forma ativa 4-hidroxíciclofosfamida e seu tautômero, aldofosfamida coexistem em equilíbrio, sendo facilmente difundidos pela circulação (BOYD et al., 1986;

MOORE, 1991). Nos ensaios dificilmente é possível distingui-los, por esse motivo trata-se das duas formas com a denominação 4-hidroxíciclofosfamida (4-HC). Ambos compostos circulam até serem captados pelas células alvo, por transporte passivo ou ativo por meio das glicoproteínas-P (GE et al., 2013). Por ser um composto instável, a 4-hidroxíciclofosfamida sofre transformação espontânea no citosol das células quando internalizada através do procedimento de  $\beta$ -eliminação, produzindo os metabólitos acroleína e fosforamida mostarda (LUDEMAN, 1999). Ambos metabólitos atuam de forma a impedir a replicação do DNA (ZHANG, J. et al., 2005) e promover disfunção mitocondrial (O'TOOLE et al., 2009), facilitando o processo de morte celular (ZHANG, JING et al., 2005), o que é favorável ao tratamento de neoplasias (MADDEN; KEATING, 2014; SPEARS et al., 2019).

A acroleína, também presente na fumaça do cigarro e na gordura queimada, é considerada o metabólito mais tóxico da CYP (JEELANI et al., 2017; MOORE, 1991). Essa apresenta a capacidade de gerar ERO's (ALFARHAN et al., 2020), diferentemente da fosforamida mostarda (PATEL; BLOCK; HOOD, 1984). É descrito, inclusive, que a acroleína se conjuga com a glutatona induzindo-a ser eliminada na urina (ALARCON, 1976; MOGHE et al., 2015). A glutatona é uma enzima, responsável por inúmeras funções, tais como oxidação-redução, sinalização de vias apoptóticas e inativação de radicais livres (DEVINE et al., 2012; KHAN, S. N. et al., 2016), regulando também a reparação do DNA (HOSNI; BASTU, 2012). Modelos experimentais expostos a CYP demonstram redução significativa dos níveis de glutatona (ALFARHAN et al., 2020; MOGHE et al., 2015). Sendo assim, depreende-se que a menor disponibilidade da glutatona no organismo resultaria em menor reparo de danos oxidativos.

Agentes alquilantes são gonadotóxicos, proporcionam o aumento da produção de ERO's, bem como promovem DSB's, trocas de fragmentos de DNA (*crosslinks*), que podem acarretar em apoptose, conduzindo a um estado severo de depleção da reserva folicular ovariana (CHEN, X. Y. et al., 2016; CROOK; SOUHAMI; MCLEAN, 1986; JEELANI et al., 2017; KALICH-PHILOSOPH et al., 2013; OKTEM; OKTAY, 2007). A CYP foi um dos primeiros fármacos, majoritariamente quimioterápico, a ser associado com um estado de amenorreia, IOP e disfunção ovariana, de modo geral (ADHIKARI et al., 2009;

ADHIKARI; LIU, 2009; REDDY et al., 2008). Uma única dose de CYP é capaz de reduzir o potencial antioxidante, elevando o estresse oxidativo nos ovários pela maior geração de ERO's e malondialdeído (MDA) (ATHIRA et al., 2020; MOGHE et al., 2015), gerando um ambiente desfavorável a qualidade e sobrevivência folicular.

Estudos em camundongos indicam que um dos mecanismos que tornam a CYP deletéria a fertilidade decorre do estímulo de hiperativação nas vias PI3K/AKT/mTOR (CHEN, X. Y. et al., 2016; KALICH-PHILOSOPH et al., 2013; ZHOU et al., 2017), conduzindo a ativação global dos FP e consequente crescimento e atresia folicular. Por apresentarem elevado grau de divisão celular durante o crescimento folicular, as células da granulosa acabam sendo alvo de ação da CYP (NIE, Z. et al., 2020) e sofrendo apoptose (CHEN, X. Y. et al., 2016; DEVINE et al., 2012). Tal quadro poderia justificar a maior apoptose observada nos folículos em desenvolvimento (CHEN, X. Y. et al., 2016). A morte das células da granulosa reduz a produção do hormônio antimuleriano (AMH) que, quando elevado, inibe fatores de crescimento foliculares mantendo-os em quiescência (LIU, J. et al., 2018; REDDY et al., 2009). Não obstante, após a administração de CYP houve redução de 50% na incidência de gestações em camundongos (KALICH-PHILOSOPH et al., 2013), indicando o potencial lesivo da droga para a fertilidade em longo prazo.

## **2.5 Tratamentos para prevenção de danos a reserva ovariana**

### **2.5.1 Resveratrol**

O resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) (RES) é um polifenol com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antienvelhecimento e quimio preventivas (BHATTACHARYA et al., 2011; KUNDU; SURH, 2004; WANG et al., 2014). Estudos demonstram o potencial deste na modulação de vias inflamatórias, controlando os efeitos indesejados do estresse oxidativo (RAHMAN; BISWAS; KIRKHAM, 2006), que se encontra aumentado com a administração de CYP (JEELANI et al., 2017). Além disso, o RES é considerado um mimético da restrição calórica (LUDEMAN, 1999). Em determinados modelos animais aumenta a longevidade (HUANG, C.-C. et al., 2021; LUDEMAN, 1999; NIE, ZHAOYAN et al., 2021), possivelmente por

favorecer a inibição da via PI3K/ AKT (CHEN, J. H. et al., 2004; LUDEMAN, 1999), assim como, atuar em vias envolvidas com a biogênese mitocondrial (SECOMANDI et al., 2022) e estabilidade do DNA (HANNA et al., 2012). Sabe-se que esse polifenol estimula a ativação da Sirt-1 (HANNA et al., 2012; WU et al., 2019), que é uma das proteínas que desempenha importante papel na resposta ao estresse oxidativo (WU et al., 2019), reparo ao DNA (MOUCHIROUD et al., 2010) e regulação do crescimento e desenvolvimento folicular (KONG et al., 2011; WU et al., 2019). Estudo anterior em ratos demonstra que o mRNA de Sirt-1 é expresso nas células da granulosa (MORITA et al., 2012), sendo a Sirt-1 descrita como protetora dos oócitos contra o envelhecimento (KARNEWAR et al., 2018).

O tratamento com 30 mg/kg de RES durante 2 semanas em camundongos submetidos a dois agentes alquilantes (120mg/kg CYP+ 30mg/kg Bussulfano) promoveu recuperação da morfologia do ovário e melhorou a capacidade de renovação das células tronco oogonais (WU et al., 2019). *In vitro*, a administração de RES duas horas antes da exposição ao 4-HC, molécula ativa da CYP, foi capaz de reduzir a apoptose, elevando a expressão de Sirt-1 e melhorando a morfologia das células da granulosa (OKTAY et al., 2014). Estudo recente indica que ao associar RES com CYP há maiores níveis de AMH, conseqüentemente represamento da ativação dos folículos primordiais (TITUS et al., 2013). Baseado nesses relatos, observa-se que o RES poderia ser utilizado como uma estratégia de preservação da fertilidade.

### **2.5.2 Metformina**

Efeitos semelhantes aos observados com o RES no que tange extensão de vida e preservação da reserva ovariana, também são descritos com a metformina (MET) (GOUD et al., 2014; KURZ et al., 2000; MOGHE et al., 2015), um fármaco da classe das biguanidas utilizado para o tratamento de diabetes mellitus tipo II (SHI et al., 2016). Por reduzir a sinalização de IGF-1 e níveis de insulina (ANSERE et al., 2021), se demonstra favorável a fertilidade de pacientes com síndrome dos ovários policísticos (SOP) (LIN, X. et al., 2020). A MET é segura e bem tolerada pelo organismo (WELT, 2008). Sendo descrito, inclusive, que a mesma pode melhorar a eficácia de tratamentos quimioterápicos por aumentar o efeito antitumoral da terapia (OKTEM; OKTAY,

2007; WELT, 2008). Este fato pode ser associado ao potencial antiproliferativo da MET (ANSERE et al., 2021), visto que a mesma promove a inibição da via mTOR (KALENDER et al., 2010; LUDEMAN, 1999). Regulando mecanismos de autofagia celular relacionando-se com a inibição da PI3K e mTOR (LU et al., 2021). É descrito que a MET é capaz de inibir o estresse oxidativo, por reduzir a sinalização de vias inflamatórias (MOGHE et al., 2015), assim como, por elevar a expressão de Sirt-1 (MYERS et al., 2004). Desta maneira, atuando contra danos ao DNA (YOUSEFZADEH et al., 2018) e envelhecimento celular (GRYNKIEWICZ; DEMCHUK, 2019; LU et al., 2021).

A maioria dos estudos avaliando a relação da MET com a fertilidade se limitam a SOP (CUNHA; PÓVOA, 2021; NASERI et al., 2021) sendo escassos na literatura relatos com uso isolado de MET (QIN, X. et al., 2019) principalmente, em associação com a CYP (HUANG, C.-C. et al., 2021) Foi observado em camundongos expostos durante seis meses a MET menor fosforilação de proteína ribossomal fosforilada S6 (p-rpS6), componente da via mTOR na sinalização do crescimento folicular. Este fato foi associado a maior presença de folículos primordiais e primários nesse grupo (QIN, X. et al., 2019). Recentemente foi demonstrado que o tratamento concomitante de MET e CYP, promoveu atenuação dos efeitos gonadotóxicos da CYP, reduziu apoptose das células da granulosa, elevando os níveis de AMH, e o número de folículos primordiais (HUANG, C.-C. et al., 2021). Tais dados apontam para um potencial método de prevenir os danos a fertilidade feminina durante um tratamento gonadotóxico, sendo necessário melhor elucidação.

### **2.5.3 Fisetina**

O flavonoide fisetina (FIS) (3,30,40,7-tetrahydroxyflavone) possui propriedades quimio preventivas, antiproliferativas, antioxidantes e antienvhecimento (DAS et al., 2008; KHAN, N. et al., 2013; LIN, J. et al., 2020; QIN, X. et al., 2019). Naturalmente encontrada em diversas frutas e vegetais (MORITA et al., 2012), a FIS apresenta a capacidade de inibir as vias PI3K/AKT/mTOR (MARTIN-MONTALVO et al., 2013; NA et al., 2013), agindo predominantemente na mTORC2 (MARTIN-MONTALVO et al., 2013), embora alguns estudos demonstrem efeitos inibitórios da mesma na mTORC1 (ATHAR et al., 2007). Os efeitos desse flavonoide na preservação da fertilidade ainda são pouco descritos na literatura. Em camundongos saudáveis a FIS não

promoveu vantagem na preservação da reserva ovariana e níveis de AMH, quando comparada a outros inibidores de mTOR (NA et al., 2013). Porém em camundongos expostos a CYP, o grupo tratado com a FIS demonstrou maior proteção contra atresia folicular, bem como, maior expressão de AMH (LIN, J. et al., 2020). Havendo, portanto, a necessidade de maior elucidação dos efeitos deste composto na fertilidade durante a utilização de CYP.

### **3 OBJETIVO E HIPOTESE**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar o efeito da fisetina, resveratrol e a metformina na manutenção da reserva ovariana e na proteção das células ovarianas da senescência, em camundongos expostos a um quimioterápico alquilante, ciclofosfamida.

#### **3.2 Objetivo específico**

- Quantificar os folículos nos diferentes grupos;
- Avaliar a expressão gênica de vias relacionadas com a senescência e ativação do crescimento folicular;
- Avaliar a marcação de lipofuscina, estimando a ocorrência de senescência ovariana.

#### **3.3 Hipótese**

O resveratrol, fisetina e metformina, tanto isolados, quanto combinados protegerão as células ovarianas de camundongos expostos a ciclofosfamida.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado no Comitê de Ética em Experimentação Animal, sob o parecer número 031404-2020 (Anexo 1). Os animais foram fornecidos pelo Biotério da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) e mantidos no Laboratório Experimental da Faculdade de Nutrição da UFPel. Foram utilizadas 60 fêmeas da linhagem C57BL/6, mantidas em caixas com as seguintes características: medidas 65x25x15 cm, feita de prolipropileno com tampa em arame galvanizado, com bebedouro em prolipropileno com capacidade de 700 mL, rolha cônica de borracha e bico de aço inoxidável reto. O assoalho foi coberto por maravalha. Foram alojadas quatro fêmeas por caixa. O ambiente tinha temperatura e umidade controladas em 22-24°C e 40-60%, respectivamente, e ciclo de claro/escuro de 12 horas. Todos os animais receberam ração e água *ad-libitum*.

### 4.1 Manejo dos animais

Aos 60 dias de idade os animais foram divididos em 6 grupos, sendo dois grupos controle (positivo e negativo). O grupo CTL (n=10) recebeu somente substância placebo, 60% Phosal 50 PG:30%PEG400:10% etanol via gavagem, e água Milli-Q® via i.p. O grupo CTL-CYP (n=10) recebeu ciclofosfamida (75 mg/kg/i.p) e 60% Phosal 50 PG:30%PEG400:10% etanol via gavagem. Os grupos tratamento receberam, 7 dias antes da única dose de ciclofosfamida, a metformina, fisetina, resveratrol ou o composto de fisetina com resveratrol, diariamente via gastrogavagem, e o tratamento foi continuado por mais 7 dias após a ciclofosfamida, totalizando 14 dias de intervenção. O grupo MET (n=10) recebeu ciclofosfamida i.p. (75mg/kg) + metformina (100mg/kg), o grupo FIS (n=10) recebeu ciclofosfamida i.p.+ fisetina (100 mg/kg), o grupo RES (n=10) recebeu ciclofosfamida i.p.+ resveratrol (30mg/kg). O grupo COMB(n=10) recebeu ciclofosfamida i.p. (75mg/kg) + uma combinação de fisetina (100 mg/kg) + resveratrol (30mg/kg), esses compostos apresentam baixa solubilidade em meio aquoso, diferentemente da metformina(DAS et al., 2008; KASHYAP et al., 2018).

Ao término dos 14 dias, todos os animais foram eutanasiados após jejum de 4 horas, anestesiados por via inalatória com isoflurano, para que após

fosse realizada a exsanguinação por punção cardíaca, seguida de deslocamento cervical. O procedimento foi realizado em uma sala específica e isolada, localizada anexa ao local onde os animais foram mantidos. Os camundongos foram dissecados e os ovários coletados e estocados: um ovário a  $-80^{\circ}\text{C}$  e outro em solução de paraformaldeído a 4% para análises histológicas.

Devido a óbitos ocorridos durante o período experimental, os grupos ficaram com os seguintes quantitativos: CTL (n=7), CYP (n=7), FIS (n=9), RES (n=8), MET (n=9) e COMB (n=9). Considerando perdas e exclusões de valores aberrantes dentro do mesmo grupo, foram utilizados nas análises de densidade folicular, marcação de lipofuscina e expressão gênica os valores representados na tabela abaixo:

**Tabela 1.** Número amostral por grupo avaliado:

Análise	Número amostral por grupo avaliado					
	CTL	CYP	FIS	RES	MET	COMB
Densidade folicular*	6	6	6	7	6	6
Expressão gênica**	6	5	7	6	7	7
Lipofuscina*	6	5	7	7	7	6

\* Considerando perdas na técnica histológica

\*\* Exclusões por valores aberrantes em comparação com animais do mesmo grupo.

## 4.2 Cálculo do tamanho amostral

Para o cálculo do tamanho amostral foi usado como base a referência de (WU et al., 2019) onde o resveratrol reduziu de maneira significativa a ação da ciclofosfamida na ativação precoce de folículos primordiais. Assim considerando que o tratamento com resveratrol apresente um efeito significativo e isso permita que possamos avaliar de maneira satisfatória a combinação dos diferentes tratamentos e seu efeito sobre a reserva ovariana em camundongos. Este cálculo nos indica a necessidade de 9 animais por grupo, considerando que alguma perda possa ocorrer devido a terapia com ciclofosfamida consideramos um aumento de 10%, e, portanto, 10 animais por grupo experimental. Estudos anteriores de nosso grupo usando animais sem receber ciclofosfamida, mas com restrição calórica e rapamicina, que atuam nas mesmas vias que a metformina e fisetina, obtiveram resultados significativos utilizando 8 animais por grupo quando avaliado a reserva

ovariana (GARCIA et al., 2019). Portanto este número amostral foi seguro para comprovar ou rejeitar a hipótese experimental.

### **4.3 Substâncias utilizadas e dosagens**

#### **4.3.1 Ciclofosfamida**

Foi administrada em uma única dose 75mg/kg via intraperitoneal de ciclofosfamida hidratada (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA) previamente dissolvida em água Milli-Q®, foi administrado aos grupos intervenção e controle CYP, seguindo o protocolo descrito por (MEIROW et al., 1999) que observou com essa dosagem em camundongos uma redução de aproximadamente 54% da reserva ovariana.

#### **4.3.2 Resveratrol**

Conforme protocolo aplicado por (WU et al., 2019), a dose que utilizamos nos grupos CYP+RES e Comb., foi de 30 mg/kg de trans resveratrol (98%, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA). O RES foi previamente diluído em 60% Phosal 50 PG:30%PEG400:10% etanol, conforme adaptação que fizemos no protocolo. O tratamento foi diário via gastrogavagem e teve duração de 14 dias.

#### **4.3.3 Metformina**

O grupo CYP+ MET, recebeu diariamente 100 mg/kg via gastrogavagem de cloridrato de metformina (98%, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA), diluído previamente em PBS 1x pH7.2, conforme adaptação que fizemos no protocolo original de (QIN, X. et al., 2019). A terapia com MET teve duração de 14 dias.

#### **4.3.4 Fisetina**

Os animais dos grupos CYP+FIS e COMB., receberam diariamente via gastrogavagem a dosagem de 100mg/kg de fisetina 98% (Sigma Aldrich, EUA) dissolvida previamente em 60% Phosal 50 PG:30%PEG400:10% etanol, conforme o protocolo que observou que essa dosagem em camundongos havia efeito senolítico (YOUSEFZADEH et al., 2018). A terapia com fisetina em nosso estudo também se manteve por 14 dias.

#### **4.3.5 Grupo combinado**

Neste grupo foi realizada a administração combinada dos compostos (FIS+ RES) propostos para o estudo, os quais apresentam, segundo a literatura, efeito senolítico e antioxidante, sendo administrados ao longo dos 14 dias via gavagem conforme descrição anterior.

#### **4.4 Análises:**

##### **4.4.1 Contagem folicular**

Os ovários foram removidos do formol tamponado 10%, submetendo-os a desidratação em álcool, clareamento em xilol, para após serem incluídos em parafina. Os ovários emblocados em paraplast foram cortados sequencialmente a uma espessura de 5µm no micrótomo semi-automático (Modelo RM2245, Leica Biosystems Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne, UK). Foram selecionados 9 cortes por animal, sendo das regiões iniciais, intermediárias e finais do ovário, colocando-os em lâminas histológicas. A coloração utilizada foi hematoxilina e eosina. As imagens dos cortes ovarianos foram capturadas por uma câmera digital (Moticam 5.0, Motic®, Hong Kong, China) acoplada ao microscópio (Nikon Eclipse E200, Nikon Corporation, Japan), utilizando as objetivas de 4, 10 e 40X. Essas imagens foram utilizadas para a quantificação e identificação folicular em folículos primordiais, transição, primários, secundários, terciários. (MYERS et al., 2004). O número de folículos para cada uma das nove seções ovarianas foi então dividido pela área da seção, fornecendo a densidade de folículos (número de folículos por mm<sup>2</sup>). A média das nove densidades de seções foi usado como um representante da densidade folicular para cada animal (ANSERE et al., 2021).

##### **4.4.2 Expressão gênica**

O RNA total das amostras de ovário foi extraído usando reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), conforme as recomendações do fabricante. A concentração do RNA foi mensurada através de espectrofotômetro (Nanodrop Lite, Thermo Fischer Scientific Inc.®, Waltham, MA, EUA. A razão A260/A280 foi utilizada como indicativo de qualidade. Foi sintetizado o DNA complementar

(cDNA) a partir de 1 µg de RNA total utilizando kit comercial (iScript cDNA Synthesis Kit, Biorad, Hercules, CA, USA), seguindo as recomendações do fabricante. Após, foi realizada a PCR em tempo real (RTq-PCR) que foi conduzida usando GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA) no equipamento StepOne 7500 RT-PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para cada ensaio foram realizados 45 ciclos (95°C durante 15s e 60 °C durante 60s) e uma curva de dissociação incluída no final da reação para verificar a amplificação de um único produto de PCR. Os genes β-2-microglobulina (β2M), β Actina (βACT) e Ciclofilina A (PPIA) foram utilizados como controles endógenos. Foi utilizado o gene β2M como controle endógeno por ser mais estável que os demais.

A expressão relativa foi calculada a partir da equação  $2^{A-B} / 2^{C-D}$  (em que A é o valor limiar do ciclo [Ct] para o gene de interesse na primeira amostra do controle; B, o valor de Ct para o gene de interesse na amostra analisada; C, a média geométrica dos valores de Ct para os genes β2m e βact na primeira amostra do controle e D, a média do Ct para os genes β2m e βact na amostra analisada)(MASTERNAK et al., 2005).

Os genes alvo avaliados são os relacionados à reserva ovariana o hormônio anti-mulleriano (AMH); genes relacionados à ativação de folículos primordiais: alvo de sinalização mamífero da rapamicina (*mTOR*), Fator de Transcrição Forkhead Box da classe O3a (*Foxo3a*). Genes relacionados com os mecanismos de defesa antioxidante: Sirtuina 1 (*SIRT1*). Genes relacionados a senescência celular e apoptose: inibidor de quinase dependente de ciclina 2A (p16 INK4A /CDKN2), Inibidor de quinase dependente de ciclina 1A (P21/CDKN1A), Interleucina 1 alfa (IL-1α), Tumor de proteína p53 (TrpP53), Metalopeptidase de matriz 12 (Mmp12). Ciclofilina A (PPIA). A Tabela 2 apresenta a sequência dos primers utilizados.

**Tabela 2.** Primers utilizados (*forward* e *reverse*):

Gene	Sequência 5' → 3'
Actb	F: GAGACCTTCAACACCCCAGC R: ATGTCACGCACGATTTCCC
B2m	F: AAGTATACTCACGCCACCCA R: CAGGCGTATGTATCAGTCTC
Mtor	F: CGGCAACTTGACCATCCTCT R: TGCTGGAAGGCGTCAATCTT
Foxo3a	F: CGGCTCACTTTGTCCCAGAT R: GCCGGATGGAGTTCTTCCA
Sirt-1	F: GCAACAGCATCTTGCCTGAT R: GTGCTACTGGTCTCACTT
Amh	F: TCCTACATCTGGCTGAAGTGATATG R: CAGGTGGAGGCTCTTGGAACT
TrpP53	F: CCCCTGTCATCTTTTGTCCCT R: AGCTGGCAGAATAGCTTATTGAG
CDKN2A / P16	F: CCAACGCCCCGAACT R: GCAGAAGAGCTGCTACGTGAA
IL1-A	F: GAGTCGGCAAAGAAATCAAGATG R: CAATGGCAGAACTGTAGTCTTCGT
Mmp12	F: GAGTCCAGCCACCAACATTAC R: GCGAAGTGGGTCAAAGACAG
CDKN1A / P21	F: AAGTGTGCCGTTGTCTCTTC R: AGTCAAAGTTCCACCGTTCTC
PPIA	F: GAGCTGTTTGCAGACAAAGTTC R: CCCTGGCACATGAATCCTGG

#### 4.4.3 Sudan-black-b (SBB)

SBB é uma técnica descrita por detectar a lipofuscina, um marcador do envelhecimento celular (BRUNK; TERMAN, 2002), embora não considerado marcador absoluto de senescência. O protocolo a ser utilizado foi descrito previamente (EVANGELOU; GORGOULIS, 2017). Para realizar a coloração SBB nas lâminas histológicas com tecido ovariano, foram desparafinizadas e inseridas em um gradiente decrescente de álcool e reidratadas em água. Depois, foi diluído o SBB em álcool etílico 70%, para evitar sua precipitação foi utilizada uma seringa de 10 ml com filtro para o gotejamento do SBB em uma

lâmina comum limpa e após, a lâmina contendo os cortes foi invertida sobre o SBB por aproximadamente 2 minutos. Depois, foram separadas as lâminas e a que contiver os cortes foi lavada em álcool etílico 50% e em água destilada. As lâminas foram montadas em glicerol e observadas no microscópio de luz nas objetivas de 4 e 10X. Para avaliar a quantidade de pixels (coloração azul) nas imagens foi utilizado o software Image J.

#### **4.5 Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. O teste-t foi utilizado para análise de contagem folicular. O teste estatístico One Way ANOVA foi utilizado para analisar Sudan black e a Expressão gênica. Foram considerados resultados significativos aqueles em que o valor de  $p < 0,05$ .

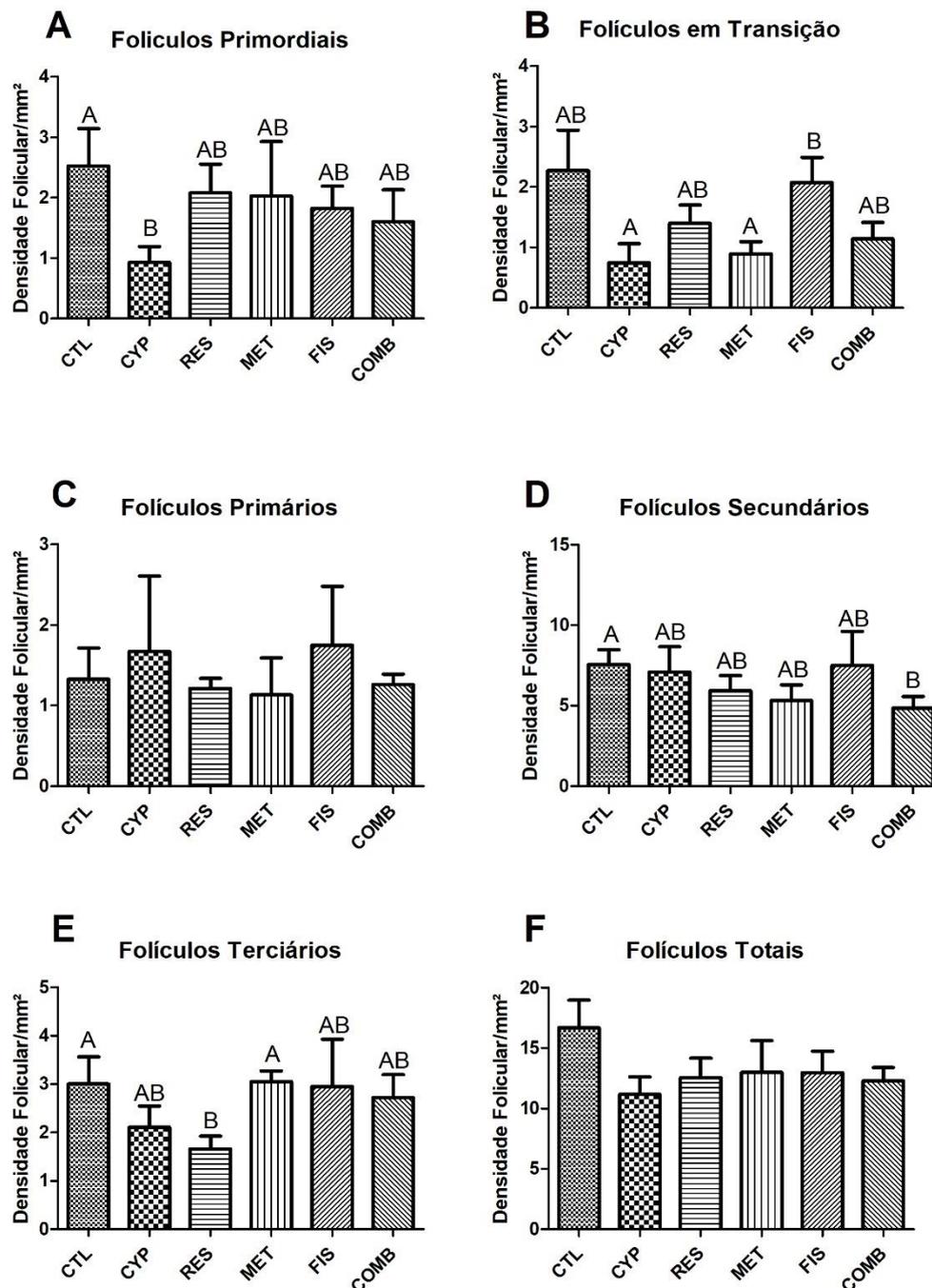
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Densidade folicular

A caracterização da reserva folicular ovariana dos animais após 2 semanas de experimentação, aos 74 dias de vida está representada na Figura 3. A terapia com CYP reduziu a densidade de folículos primordiais ( $p=0,05$ ), não havendo alteração entre os demais grupos avaliados (Figura 3A). Conseguimos observar que o valor de  $p$  em relação a CYP de FIS e RES foi menor do que 10% ( $p=0,08$ ) havendo necessidade de maior elucidação sobre o efeito desses flavonoides a longo prazo em relação a preservação da fertilidade durante e após a utilização de CYP, através da repetição desse experimento com adaptações na metodologia, tais como, maior tempo de intervenção.

Em relação aos folículos em transição conseguimos observar que o grupo FIS possuía uma densidade maior que os grupos CYP ( $p=0,03$ ) e MET ( $p=0,03$ ). Não foi possível observar alterações a entre os demais grupos avaliados (Figura 3B). No entanto, os grupos CYP e MET apresentaram em relação ao grupo CTL valores menores que 10%, respectivamente ( $p=0,08$  e  $p=0,07$ ), havendo assim, a necessidade de maior compreensão a longo prazo desses fármacos sob os folículos em transição.

Não foi possível observar qualquer alteração entre os grupos avaliados no que tange folículos primários (Figura 3C) e totais (Figura 3F). Quanto aos folículos secundários (Figura 3D) houve diferença entre o grupo CTL e COMB ( $p=0,04$ ), não sendo observado nos demais grupos avaliados. A avaliação dos folículos terciários (Figura 3E) demonstrou que existe diferença entre os grupos: CTL e MET comparados ao RES ( $p=0,04$  e  $p\leq 0,01$ ). Não foi possível observar alterações entre os demais grupos avaliados, em folículos terciários, porém valores de  $p$  abaixo de 10% novamente foram observados, entre CYP e MET ( $p=0,07$ ) e entre RES e Combinação ( $p=0,06$ ). Havendo assim necessidade de estudos sobre estes compostos e seus efeitos na reserva ovariana a longo prazo.

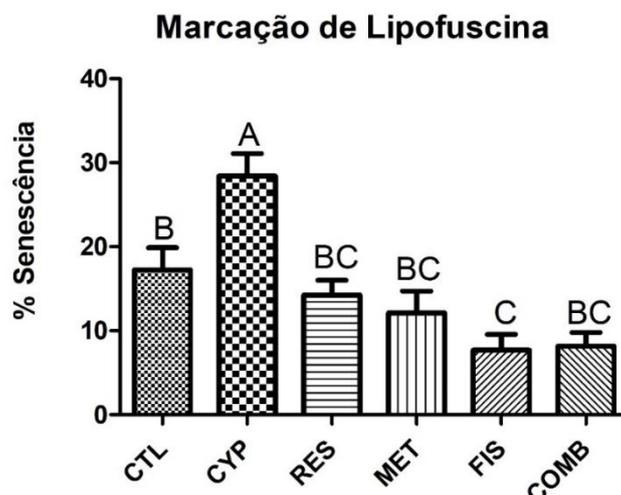


**Figura 3. Densidade folicular em diferentes estágios de crescimento.** Grupos: Controle (CTL), Ciclofosfamida (CYP), Resveratrol (RES), Metformina (MET), Fisetina (FIS), Combinação (COMB). Letras diferentes representam diferença estatística. Valores  $P \leq 0,05$  foram considerados significativos. Para essa análise foram utilizados: CYP (n=6), FIS (n=6), RES (n=7), MET (n=6), CTL (n=7) e COMB (n=6).

## 5.2 Marcação de lipofuscina

Através da técnica de Sudan-Black foi possível avaliar a marcação de lipofuscina e mensurar o percentual de senescência no ovário entre os diferentes grupos do experimento. Observamos que nos animais do grupo

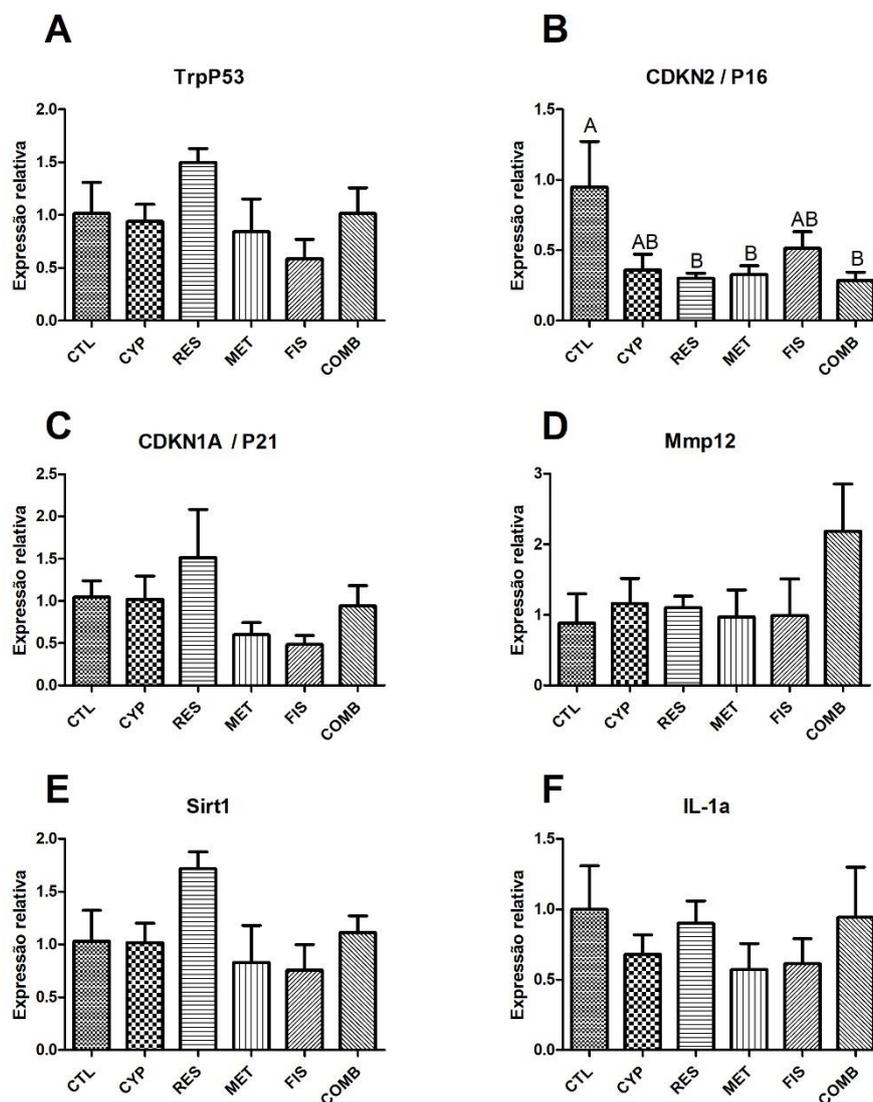
CYP houve maior marcação de lipofuscina que os grupos COMB, MET e FIS ( $p \leq 0,001$ ), RES ( $p \leq 0,01$ ) e CTL ( $p \leq 0,05$ ). Em relação ao grupo CTL apenas os grupos CYP e FIS demonstraram diferença ( $p \leq 0,05$ ).



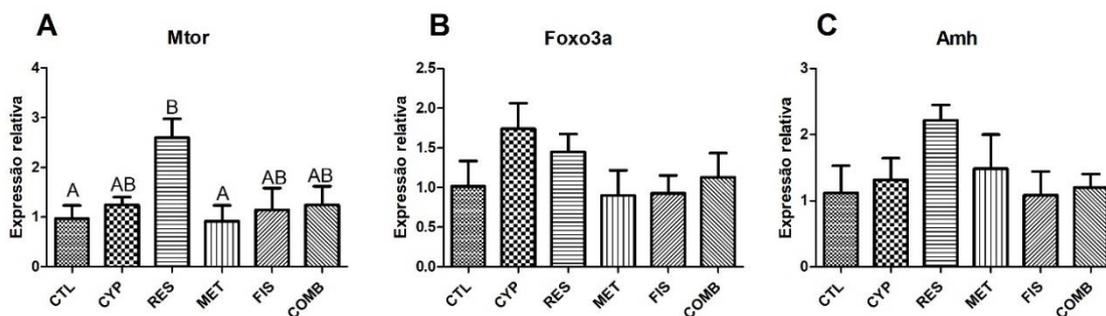
**Figura 4. Marcação de lipofuscina representada pelo % de senescência da área de tecido ovariano.** Grupos: Controle (CTL), Ciclofosfamida (CYP), Resveratrol (RES), Metformina (MET), Fisetina (FIS), Combinação (COMB). Letras diferentes representam diferença estatística. Valores  $P \leq 0,05$  foram considerados significativos. Para essa análise foram utilizados a seguinte quantidade de animais: CYP (n= 5), FIS (n=7), RES (n=7), MET (n=7), CTL (n=6) e COMB (n=6).

### 5.3 Expressão Gênica

A análise da expressão gênica está expressa nas figuras 5 e 6. Para os seguintes marcadores não houve alteração na expressão gênica: TrpP53 ( $p=0,37$ ), CDKN1A ( $p=0,14$ ), Mmp12 ( $p=0,32$ ), IL-1a ( $p=0,71$ ), Sirt1( $p=0,32$ ), (Figura 5 A, C, D, E, F, respectivamente). Assim como, não houve diferença estatística entre os alvos da ativação e crescimento folicular Amh ( $p=0,57$ ), Foxo3a ( $p=0,36$ ) (Figura 6 A, B, respectivamente). No entanto, foi observada alteração na expressão de CDKN2 ( $p=0,02$ ) no grupo controle em relação aos grupos COMB, MET e RES (Figura 5 B) e em Mtor ( $p=0,02$ ) no grupo CTL e MET em relação ao RES (Figura 6 C).



**Figura 5. Análise da Expressão gênica relativa aos genes ovarianos envolvidos com vias de senescência celular, resposta inflamatória e antioxidante.** (A) Tumor de proteína p53 (TrpP53); (B) inibidor de cinase dependente de ciclina 2A (p16INK4A/CDKN2), (C) Inibidor de quinase dependente de ciclina 1A (P21/CDKN1A), (D) Metalopeptidase de matriz 12 (Mmp12), (E) Interleucina 1 alfa (IL-1a), (F) Sirtuína1 (Sirt1). Letras diferentes representam diferença estatística. Valores de  $P \leq 0,05$  foram considerados significativos. Para ambas análises de



expressão utilizamos CTL(n=6), CYP(n=5), RES(n=6), FIS(n=7), MET (n=7) e COMB(n=7).

**Figura 6. Análise da Expressão gênica relativa aos genes ovarianos envolvidos com vias de recrutamento e crescimento folicular.** (A) Alvo mamífero da Rapamicina (Mtor), (B) Fator de transcrição Forkhead Box da classe O3a (Foxo3a), (C) Hormônio anti-mulleriano (Amh). Letras diferentes representam diferença estatística. Valores de  $P \leq 0,05$  foram

considerados significativos. Para ambas análises de expressão utilizamos CTL(n=6), CYP(n=5), RES(n=6), FIS(n=7), MET (n=7) e COMB(n=7).

## **6 DISCUSSÃO**

Nossos achados demonstram que uma única dose de CYP reduziu a reserva folicular, indicando, conforme já descrito na literatura, o potencial deletério desse fármaco para a fertilidade (CHEN, X. Y. et al., 2016; JEELANI et al., 2017). As terapias ofertadas aos animais expostos a CYP demonstraram efeito protetivo parcial, visto que a densidade de folículos primordiais foi semelhante tanto ao controle quanto ao grupo CYP. Folículos em transição representam o processo de diferenciação de folículos primordiais a primários, portanto embora recebam classificação de estágio distinta, podem ser considerados primários, uma vez que estão ativados.

Nossos resultados comprovam que a MET apresenta um efeito protetivo parcial na reserva ovariana. Pouco se sabe sobre o efeito da metformina preservando a fertilidade conjuntamente a tratamentos gonadotóxicos. No entanto, uma pesquisa com duração de 4 semanas em camundongos expostos a 75 mg/kg de CYP, semanalmente durante 3 semanas, demonstrou que 50 mg/kg de MET atenuou a toxicidade da CYP nos ovários, havendo mais folículos primordiais no grupo MET que no CYP isoladamente (HUANG, C. C. et al., 2021). Os mesmos autores observaram uma tendência do tratamento de CYP+MET aumentarem folículos terciários, a qual também pudemos observar. Isoladamente, 100mg/kg de MET administrada em camundongos durante 6 meses demonstrou preservar mais folículos primordiais e primários que o controle (QIN, XIAN et al., 2019). Estes dados sugerem que com maior tempo de exposição, talvez, essa terapia fosse mais efetiva em proteger a reserva ovariana de camundongos expostos a CYP.

Com relação a terapia com RES também observamos proteção parcial da reserva ovariana. Embora pouco se saiba sobre o efeito desse polifenol na preservação da fertilidade em animais expostos a CYP, alguns autores puderam observar efeitos positivos para fertilidade. Por exemplo, um estudo que administrou 120 mg/kg de CYP + 30 mg/kg de Bussulfano em camundongos utilizando a mesma dosagem de RES que foi utilizada em nosso experimento, durante 4 semanas, demonstrou que houve alívio do estresse oxidativo nos ovários e maiores níveis de AMH e Sirt1 no grupo tratado (WU et al., 2019), fatores esses sabidamente associados a proteção a danos

oxidativos e ao represamento folicular no estágio de folículo primordial. Outro experimento em ratos induzidos a IOP com 5 mg/kg de cisplatina, verificou que durante duas semanas 5 mg/kg de RES via intraperitoneal preservou folículos primordiais em relação ao grupo que recebeu somente com cisplatina (ATLI et al., 2017).

O grupo FIS+CYP também protegeu parcialmente a reserva ovariana. Este é o primeiro experimento que avalia o efeito dessa terapia em camundongos expostos a uma única dose de CYP, descrevendo o efeito da mesma em cada estágio do crescimento folicular. Recentemente o primeiro estudo com modelos animais para IOP com CYP + FIS, buscou avaliar camundongos e também *C. elegans*, durante o experimento foi utilizado 100 ng/kg de FIS para camundongos e 70 mg/kg CYP seguido de aplicações a cada dois dias de 20 mg/kg de CYP durante 4 semanas, nessa pesquisa o autor expõe dados de folículos atrésicos e totais, além de outros marcadores. Esse estudo demonstrou menos folículos atrésicos e maiores níveis de AMH em camundongos tratados com FIS+CYP, do que no grupo controle, enquanto em *C. elegans* houve menor atividade ovariana e prevenção de senescência celular (LIN, J. et al., 2020). Apesar dos efeitos parcialmente positivos individuais de RES e FIS, sua combinação não resultou em aumento da proteção da reserva ovariana.

Acreditamos que nossas terapias poderiam ter demonstrado resultados significativos se tivéssemos prolongado o tempo de intervenção do estudo para mais que duas semanas, e, aumentado a dosagem e frequência de administração de CYP. Por se tratar de um n amostral reduzido que sofreu perdas durante o período experimental, deduzimos que isso possa ter exercido um possível viés em nossos achados. Visto que o efeito deletério da CYP a fertilidade está proporcionalmente relacionado a dose e frequência administrada (ATHIRA et al., 2020; MEIROW et al., 1999). Estudo semelhante com RES+CYP isolados e conjuntamente, demonstram mais folículos primordiais e menor apoptose folicular com 21 dias de intervenção em ratos (NIE, ZHAOYAN et al., 2021) e com 28 dias de experimentação camundongos expostos a dois agentes quimioterápicos e ao RES também demonstraram maiores níveis de AMH, melhor morfologia e redução de danos oxidativos nos ovários (WU et al., 2019). Quanto a FIS, um estudo que avaliou a interação da

microbiota intestinal de camundongos induzidos a IOP com CYP avaliou entre outros marcadores os folículos atrésicos e totais e obteve em 4 semanas de intervenção com FIS menos folículos atrésicos e maior quantidade de folículos totais (LIN, J. et al., 2020). O primeiro estudo, recentemente publicado, visando preservar a reserva ovariana com MET em camundongos expostos a CYP, utilizou 50 mg/kg de MET durante 4 semanas em camundongos expostos a 75 mg/kg de CYP semanalmente por 3 semanas, demonstrou preservação da reserva folicular no grupo MET+CYP (HUANG, C.-C. et al., 2021). Embora em nosso estudo tenhamos utilizado o dobro de MET e a mesma dose de CYP, acreditamos que mais aplicações do quimioterápico podem favorecer o efeito protetor da MET. Visto que durante seis meses uma pesquisa avaliou o efeito a nível ovariano em camundongos com 100 mg/kg de MET, no grupo tratamento houve maior reserva ovariana que o controle (QIN, XIAN et al., 2019). Portanto, é necessário maior investigação do tema em futuros experimentos.

O RES, FIS e MET são descritos como moléculas que poderiam desacelerar o envelhecimento, regulando a senescência celular, através de diversos mecanismos. O envelhecimento ovariano é um processo natural que pode ser induzido precocemente pela quimioterapia com fármacos, como a CYP. Danos promovidos ao DNA, assim como, o estresse oxidativo promovem a formação de células senescentes (CHEN, J. H. et al., 2004; LIN et al., 2022; SECOMANDI et al., 2022). A CYP promove danos oxidativos e reduz o maquinário antioxidante (ALFARHAN et al., 2020; MOGHE et al., 2015). Ainda, induz a danos ao DNA das células da granulosa (CHEN, X. Y. et al., 2016) também promove disfunção mitocondrial (O'TOOLE et al., 2009). O estresse oxidativo nas células do cumulus, se em excesso, promove senescência celular e está associado a infertilidade em quadros de endometriose (LIN, X. et al., 2020). Em nosso estudo com as terapias propostas observamos um efeito protetivo dos compostos RES, FIS e MET com relação a senescência ovariana de camundongos expostos a CYP. Como estas terapias foram aplicadas tanto antes como após a administração de CYP inferimos que seus efeitos poderiam ser preventivos na formação de células senescentes, ou mesmo, atuando como senolíticos na remoção das células senescentes induzidas pela CYP. No entanto, tal teoria ainda precisa ser melhor avaliada através da repetição desse

estudo com n experimental maior, mais marcadores bioquímicos, como os de danos oxidativos, ao DNA e de senescência, além de avaliar as terapias propostas isoladamente e em conjunto a CYP.

Em nosso estudo conseguimos observar através da marcação de lipofuscina que o grupo CYP obteve maior presença de células senescentes em relação aos grupos tratados e ao CTL. Nossos resultados com marcação de lipofuscina são semelhantes ao observado em um estudo *in vitro* com células da granulosa através da marcação por  $\beta$ -galactosidase de camundongos induzidos a IOP com CYP (XIONG et al., 2017). Estudo *in vitro* com células da granulosa de mulheres com IOP, relatou que após aplicar CYP houve elevação das ERO's e na marcação de células senescentes (LIN et al., 2022). Esses dados nos indicam que a CYP promove danos que induzem um aumento de células senescentes no ovário. Em paralelo, todos os grupos, exceto o que recebeu somente CYP, foram eficazes na preservação de danos que conduziriam a maior marcação de lipofuscina. O grupo FIS+CYP destacou-se por também diminuir a marcação a níveis inferiores ao grupo CTL, indicando que pode ter efeito protetivo mesmo na ausência de agressões externas como a CYP.

Nossos resultados indicam efeito protetor da terapia com FIS contra danos que resultariam na senescência ovariana. Isto é semelhantemente ao descrito anteriormente em uma pesquisa comparativa entre diversos flavonoides e diferentes tipos celulares de camundongos velhos e progeróides. Nessa análise é descrito que a FIS apresentou maior efeito senolítico reduzindo marcadores de senescência (YOUSEFZADEH et al., 2018). Por se tratar de uma área ainda em desenvolvimento, a combinação de FIS+RES em camundongos expostos ou não a CYP, até o presente momento, nunca foi antes avaliada para efeito comparativo de nossos achados, a nível ovariano, no entanto, observamos que conferiu proteção às células ovarianas da senescência. No entanto, esta proteção não diferiu dos tratamentos com RES e FIS isolados.

Visto que a CYP promove um ambiente deletério que induz a formação de células senescentes por diversos mecanismos de ofensa celular, conseguimos observar não somente com animais tratados com FIS um efeito protetor, mas também com as terapias de RES e MET. A MET parece exercer

influência na redução de danos ao DNA (LEE et al., 2016; NA et al., 2013) e diminuição da produção de ERO's (MARTIN-MONTALVO et al., 2013), também estando relacionada ao aumento de AMPK, fator esse que estimula a biogênese mitocondrial (KARNEWAR et al., 2018). Enquanto o RES, um potente antioxidante, anti-inflamatório e com propriedades quimioterápicas (ATHAR et al., 2007; MOUCHIROUD et al., 2010; RAHMAN et al., 2006), eleva níveis de Sirt1 (DAS; DAS, 2007; NIE, Z. et al., 2020). A Sirt1 também é descrita como uma das proteínas reguladora do processo de morte celular, a mesma confere proteção contra danos ao DNA (HANNA et al., 2012; MOUCHIROUD et al., 2010) e está presente nas células da granulosa (MORITA et al., 2012). Portanto, acreditamos que estes tratamentos podem proteger as células ovarianas da toxicidade gerada em resposta a administração de CYP, o qual resulta na formação de células senescentes. Este trabalho é o primeiro estudo que avalia estratégias para prevenir a senescência ovariana induzida pela CYP, através da administração de RES, FIS, MET e a combinação de RES+FIS em camundongos C57BL/6. Acreditamos que novos estudos podem avaliar, detalhadamente, mais marcadores celulares para senescência em diferentes órgãos de animais expostos a terapias citotóxicas, com as terapias que utilizamos.

Complementarmente, a expressão relativa dos genes envolvidos com a senescência celular e resposta inflamatória não demonstrou alterações passíveis de inferências. Porém houve menor expressão relativa do gene CDKN2/p16 nos grupos RES+CYP, MET+CYP e COMB+CYP que no CTL, no entanto, esperávamos um aumento de expressão relativa de p16 no grupo tratado somente com CYP, visto a influência desse fármaco nas vias inflamatórias e de senescência celular (XIONG et al., 2017). Para a análise de expressão gênica a utilização do ovário inteiro pode ser um viés, visto a presença de diferentes tipos celulares e folículos em diversos estágios do crescimento. Outro fator é que esse tipo de análise prediz o quanto de um determinado gene está sendo expresso, mas não indica quanto de proteína é produzido. Um indicador mais fidedigno seria avaliação dos níveis de proteína, através de análises como a de imunofluorescência ou western blotting. Além disso, usamos ovários inteiros que apresentam diferentes tipos celular, classes

de folículos em diferentes quantidades, o que pode mascarar alguma diferença significativa.

Observamos que os níveis de Sirt-1 tiveram uma tendência de estarem mais elevados no grupo que recebeu RES, porém não houve diferença em relação aos demais grupos deste estudo. É bem estabelecido o efeito do RES elevando SIRT1 (DAS; DAS, 2007; LIU, S. et al., 2018; ORTEGA; DULEBA, 2015). Ademais, com relação a expressão gênica relativa das vias de recrutamento folicular, não foi possível observar efeito das terapias. No entanto, a expressão relativa de Mtor estava aumentada no grupo RES+CYP em relação aos grupos MET+CYP e CTL. Conforme a literatura disponível é esperado que a MET promova uma inibição da via MTOR devido a menor sinalização a insulina e IGF-1 (HUANG, C. C. et al., 2021; KALENDER et al., 2010; SAM; EHRMANN, 2017). O efeito terapêutico do RES inibindo a proliferação de células da granulosa e folículos através da via MTOR parece estar relacionado com a dose administrada (KONG et al., 2011; ORTEGA; DULEBA, 2015). Outro ponto interessante a refletir sobre o presente estudo é a idade prematura das camundongas, que iniciaram aos 60 dias de vida, talvez este fator possa ter exercido influência sob a resposta ao quimioterápico de forma a prevenir o que se esperava conforme a literatura, sobre os efeitos deletérios exacerbados da droga em relação a reserva ovariana.

## **7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS**

Um dos principais achados deste estudo é a capacidade demonstrada pelas terapias com RES, MET e FIS na proteção contra danos que resultariam no aumento de células senescentes a nível ovariano de camundongos expostos a CYP. Além disso observamos que os tratamentos ofereceram uma proteção parcial contra a redução de folículos primordiais observada no grupo CYP. Acreditamos que futuros estudos com o mesmo objetivo que o nosso poderiam explorar mais profundamente marcadores de defesa antioxidante, como a expressão de glutathiona peroxidase (GSH), superóxido dismutase (SOD-2), 4-Hydroxynonenal (4-HNE) para avaliar danos oxidativos, bem como, explorar danos ao DNA através da técnica de imunofluorescência com os seguintes marcadores: histona 2aX (H2AX) e marcação TUNEL a nível de células granulosas. Também destacamos o potencial deletério para a fertilidade da CYP, mesmo em camundongos jovens expostos uma única dose, considerada baixa para esse fármaco. A FIS se demonstrou promissora na proteção contra formação de células senescentes e potencialmente preservar a fertilidade durante tratamentos citotóxicos. Ficando, portanto, margem a novas pesquisas elucidarem o efeito das terapias avaliadas na preservação da fertilidade e combate a senescência celular em camundongos expostos a CYP. Portanto, novas alternativas de preservação da fertilidade que sejam mais seguras e menos invasivas durante o tratamento com agentes gonadotóxicos, como a CYP, devem seguir sendo estudadas.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADHIKARI, D. et al. Disruption of Tsc2 in oocytes leads to overactivation of the entire pool of primordial follicles. **Mol Hum Reprod**, v. 15, n. 12, p. 765-70, Dec 2009.

ADHIKARI, D.; LIU, K. Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. **Endocr Rev**, v. 30, n. 5, p. 438-64, Aug 2009.

ADHIKARI, D. et al. Tsc/mTORC1 signaling in oocytes governs the quiescence and activation of primordial follicles. **Hum Mol Genet**, v. 19, n. 3, p. 397-410, Feb 1 2010.

AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R. Oxidative stress and its implications in female infertility - a clinician's perspective. **Reprod Biomed Online**, v. 11, n. 5, p. 641-50, Nov 2005.

ALARCON, R. A. Studies on the in vivo formation of acrolein: 3-hydroxy-propylmercapturic acid as an index of cyclophosphamide (NSC-26271) activation. **Cancer Treat Rep**, v. 60, n. 4, p. 327-35, Apr 1976.

ALFARHAN, M.; JAFARI, E.; NARAYANAN, S. P. Acrolein: A Potential Mediator of Oxidative Damage in Diabetic Retinopathy. **Biomolecules**, v. 10, n. 11, Nov 20 2020.

ANISIMOV, V. N. et al. Metformin slows down aging and extends life span of female SHR mice. **Cell Cycle**, v. 7, n. 17, p. 2769-73, Sep 1 2008.

ANSERE, V. A. et al. Cellular hallmarks of aging emerge in the ovary prior to primordial follicle depletion. **Mech Ageing Dev**, v. 194, p. 111425, Mar 2021.

ATHAR, M. et al. Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 224, n. 3, p. 274-83, Nov 1 2007.

ATHIRA, V. R. et al. Multiple dose treatment reduces cyclophosphamide-induced ovarian follicular loss in mice. **Birth Defects Res**, v. 112, n. 1, p. 71-80, Jan 1 2020.

ATLI, M. et al. Dose dependent effect of resveratrol in preventing cisplatin-induced ovarian damage in rats: An experimental study. **Reprod Biol**, v. 17, n. 3, p. 274-280, Sep 2017.

BAI, X.; JIANG, Y. Key factors in mTOR regulation. **Cell Mol Life Sci**, v. 67, n. 2, p. 239-53, Jan 2010.

BHATTACHARYA, S.; DARJATMOKO, S. R.; POLANS, A. S. Resveratrol modulates the malignant properties of cutaneous melanoma through changes in the activation and attenuation of the antiapoptotic protooncogenic protein Akt/PKB. **Melanoma Res**, v. 21, n. 3, p. 180-7, Jun 2011.

BOYD, V. L. et al.  $^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance spectroscopic observation of the intracellular transformations of oncostatic cyclophosphamide metabolites. **J Med Chem**, v. 29, n. 7, p. 1206-10, Jul 1986.

BROMFIELD, J. J.; SHELDON, I. M. Lipopolysaccharide reduces the primordial follicle pool in the bovine ovarian cortex ex vivo and in the murine ovary in vivo. **Biol Reprod**, v. 88, n. 4, p. 98, Apr 2013.

BRUNK, U. T.; TERMAN, A. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. **Free Radic Biol Med**, v. 33, n. 5, p. 611-9, Sep 1 2002.

CANTLEY, L. C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. **Science**, v. 296, n. 5573, p. 1655-7, May 31 2002.

CASTRILLON, D. H. et al. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. **Science**, v. 301, n. 5630, p. 215-8, Jul 11 2003.

CHANDRASHEKAR, V.; ZACZEK, D.; BARTKE, A. The consequences of altered somatotropic system on reproduction. **Biol Reprod**, v. 71, n. 1, p. 17-27, Jul 2004.

CHEN, J. H. et al. Loss of proliferative capacity and induction of senescence in oxidatively stressed human fibroblasts. **J Biol Chem**, v. 279, n. 47, p. 49439-46, Nov 19 2004.

CHEN, Q. et al. Metformin impairs systemic bile acid homeostasis through regulating SIRT1 protein levels. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1864, n. 1, p. 101-112, 2017/01/01/ 2017.

CHEN, X. Y. et al. Follicle Loss and Apoptosis in Cyclophosphamide-Treated Mice: What's the Matter? **Int J Mol Sci**, v. 17, n. 6, May 30 2016.

CHEN, Z. et al. Rictor/mTORC2 Pathway in Oocytes Regulates Folliculogenesis, and Its Inactivation Causes Premature Ovarian Failure \*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 10, p. 6387-6396, 2015.

CROOK, T. R.; SOUHAMI, R. L.; MCLEAN, A. E. Cytotoxicity, DNA cross-linking, and single strand breaks induced by activated cyclophosphamide and acrolein in human leukemia cells. **Cancer Res**, v. 46, n. 10, p. 5029-34, Oct 1986.

CUNHA, A.; PÓVOA, A. M. Infertility management in women with polycystic ovary syndrome: a review. **Porto Biomed J**, v. 6, n. 1, p. e116, Jan-Feb 2021.

DAS, S. et al. Reactive oxygen species level in follicular fluid—embryo quality marker in IVF? **Human Reproduction**, v. 21, n. 9, p. 2403-2407, 2006.

DAS, S.; DAS, D. K. Anti-inflammatory responses of resveratrol. **Inflamm Allergy Drug Targets**, v. 6, n. 3, p. 168-73, Sep 2007.

DAS, S. et al. The impact of aqueous solubility and dose on the pharmacokinetic profiles of resveratrol. **Pharm Res**, v. 25, n. 11, p. 2593-600, Nov 2008.

DEVINE, P. J.; PERREAULT, S. D.; LUDERER, U. Roles of reactive oxygen species and antioxidants in ovarian toxicity. **Biol Reprod**, v. 86, n. 2, p. 27, Feb 2012.

ELKADY, M. A. et al. Effects of quercetin and rosuvastatin each alone or in combination on cyclophosphamide-induced premature ovarian failure in female albino mice. **Hum Exp Toxicol**, v. 38, n. 11, p. 1283-1295, Nov 2019.

EMADI, A.; JONES, R. J.; BRODSKY, R. A. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 6, n. 11, p. 638-647, 2009/11/01 2009.

EVANGELOU, K.; GORGOULIS, V. G. Sudan Black B, The Specific Histochemical Stain for Lipofuscin: A Novel Method to Detect Senescent Cells. **Methods Mol Biol**, v. 1534, p. 111-119, 2017.

FADDY, M. J. Follicle dynamics during ovarian ageing. **Mol Cell Endocrinol**, v. 163, n. 1-2, p. 43-8, May 25 2000.

FADDY, M. J. et al. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. **Hum Reprod**, v. 7, n. 10, p. 1342-6, Nov 1992.

GARCIA, D. N. et al. Effect of caloric restriction and rapamycin on ovarian aging in mice. **Geroscience**, v. 41, n. 4, p. 395-408, Aug 2019.

GE, J. et al. The GSTP1 105Val Allele Increases Breast Cancer Risk and Aggressiveness but Enhances Response to Cyclophosphamide Chemotherapy in North China. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e67589, 2013.

GEORGAKOPOULOU, E. A. et al. Specific lipofuscin staining as a novel biomarker to detect replicative and stress-induced senescence. A method applicable in cryo-preserved and archival tissues. **Aging (Albany NY)**, v. 5, n. 1, p. 37-50, Jan 2013.

GOUD, P. T. et al. Dynamics of nitric oxide, altered follicular microenvironment, and oocyte quality in women with endometriosis. **Fertil Steril**, v. 102, n. 1, p. 151-159 e5, Jul 2014.

GRYNKIEWICZ, G.; DEMCHUK, O. M. New Perspectives for Fisetin. **Front Chem**, v. 7, p. 697, 2019.

HANNA, C. W. et al. DNA methylation changes in whole blood is associated with exposure to the environmental contaminants, mercury, lead, cadmium and

bisphenol A, in women undergoing ovarian stimulation for IVF. **Human Reproduction**, v. 27, n. 5, p. 1401-1410, 2012.

HOLZ, M. K. et al. mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. **Cell**, v. 123, n. 4, p. 569-80, Nov 18 2005.

HOSNI, W.; BASTU, E. Ovarian stem cells and aging. **Climacteric**, v. 15, n. 2, p. 125-132, 2012/04/01 2012.

HUANG, C.-C. et al. Metformin: a novel promising option for fertility preservation during cyclophosphamide-based chemotherapy. **Molecular Human Reproduction**, v. 27, n. 1, 2021.

HUANG, C. C. et al. Metformin: a novel promising option for fertility preservation during cyclophosphamide-based chemotherapy. **Mol Hum Reprod**, v. 27, n. 1, Jan 22 2021.

JEELANI, R. et al. Cyclophosphamide and acrolein induced oxidative stress leading to deterioration of metaphase II mouse oocyte quality. **Free Radic Biol Med**, v. 110, p. 11-18, Sep 2017.

JHANWAR-UNIYAL, M. et al. Distinct signaling mechanisms of mTORC1 and mTORC2 in glioblastoma multiforme: A tale of two complexes. **Advances in Biological Regulation**, v. 57, p. 64-74, 2015/01/01/ 2015.

JUNG, C. H. et al. Fisetin regulates obesity by targeting mTORC1 signaling. **J Nutr Biochem**, v. 24, n. 8, p. 1547-54, Aug 2013.

JUNG, T.; BADER, N.; GRUNE, T. Lipofuscin: formation, distribution, and metabolic consequences. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1119, p. 97-111, Nov 2007.

KALENDER, A. et al. Metformin, independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a rag GTPase-dependent manner. **Cell Metab**, v. 11, n. 5, p. 390-401, May 5 2010.

KALICH-PHILOSOPH, L. et al. Cyclophosphamide triggers follicle activation and "burnout"; AS101 prevents follicle loss and preserves fertility. **Science translational medicine**, v. 5, n. 185, p. 185ra62, 2013/05// 2013.

KARNEWAR, S. et al. Metformin regulates mitochondrial biogenesis and senescence through AMPK mediated H3K79 methylation: Relevance in age-associated vascular dysfunction. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis**, v. 1864, n. 4 Pt A, p. 1115-1128, Apr 2018.

KASHYAP, D. et al. Fisetin: A bioactive phytochemical with potential for cancer prevention and pharmacotherapy. **Life Sci**, v. 194, p. 75-87, Feb 1 2018.

KERR, J. B. et al. DNA damage-induced primordial follicle oocyte apoptosis and loss of fertility require TAp63-mediated induction of Puma and Noxa. **Molecular cell**, v. 48, n. 3, p. 343-352, 2012/11// 2012.

KHAN, N. et al. Fisetin: a dietary antioxidant for health promotion. **Antioxid Redox Signal**, v. 19, n. 2, p. 151-62, Jul 10 2013.

KHAN, S. N. et al. Peroxynitrite deteriorates oocyte quality through disassembly of microtubule organizing centers. **Free Radic Biol Med**, v. 91, p. 275-80, Feb 2016.

KIRKLAND, J. L.; TCHKONIA, T. Senolytic drugs: from discovery to translation. **Journal of Internal Medicine**, v. 288, n. 5, p. 518-536, 2020.

KONG, X. X. et al. Resveratrol, an effective regulator of ovarian development and oocyte apoptosis. **J Endocrinol Invest**, v. 34, n. 11, p. e374-81, Dec 2011.

KUNDU, J. K.; SURH, Y. J. Molecular basis of chemoprevention by resveratrol: NF-kappaB and AP-1 as potential targets. **Mutat Res**, v. 555, n. 1-2, p. 65-80, Nov 2 2004.

KURZ, D. J. et al. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. **J Cell Sci**, v. 113 ( Pt 20), p. 3613-22, Oct 2000.

LEE, Y. S. et al. Combined metformin and resveratrol confers protection against UVC-induced DNA damage in A549 lung cancer cells via modulation of cell cycle checkpoints and DNA repair. **Oncol Rep**, v. 35, n. 6, p. 3735-41, Jun 2016.

LIN, J. et al. Fisetin regulates gut microbiota to decrease CCR9(+)/CXCR3(+)/CD4(+) T-lymphocyte count and IL-12 secretion to alleviate premature ovarian failure in mice. **Am J Transl Res**, v. 12, n. 1, p. 203-247, 2020.

LIN, L. et al. Reactive oxygen species-induced SIAH1 promotes granulosa cells' senescence in premature ovarian failure. **J Cell Mol Med**, Mar 9 2022.

LIN, X. et al. Excessive oxidative stress in cumulus granulosa cells induced cell senescence contributes to endometriosis-associated infertility. **Redox Biol**, v. 30, p. 101431, Feb 2020.

LINDAHL, T.; BARNES, D. E. Repair of endogenous DNA damage. **Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology**, v. 65, p. 127-133, 2000 2000.

LIU, J. et al. The role of mTOR in ovarian Neoplasms, polycystic ovary syndrome, and ovarian aging. **Clin Anat**, v. 31, n. 6, p. 891-898, Sep 2018.

LIU, K. et al. Control of mammalian oocyte growth and early follicular development by the oocyte PI3 kinase pathway: new roles for an old timer. **Dev Biol**, v. 299, n. 1, p. 1-11, Nov 1 2006.

LIU, S. et al. Resveratrol reduces senescence-associated secretory phenotype by SIRT1/NF- $\kappa$ B pathway in gut of the annual fish *Nothobranchius guentheri*. **Fish Shellfish Immunol**, v. 80, p. 473-479, Sep 2018.

LOPEZ, S. G.; LUDERER, U. Effects of cyclophosphamide and buthionine sulfoximine on ovarian glutathione and apoptosis. **Free Radic Biol Med**, v. 36, n. 11, p. 1366-77, Jun 1 2004.

LU, G. et al. The effects of metformin on autophagy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 137, p. 111286, 2021/05/01/ 2021.

LUDEMAN, S. M. The chemistry of the metabolites of cyclophosphamide. **Curr Pharm Des**, v. 5, n. 8, p. 627-43, Aug 1999.

MADDEN, J. A.; KEATING, A. F. Ovarian xenobiotic biotransformation enzymes are altered during phosphoramidate mustard-induced ovotoxicity. **Toxicol Sci**, v. 141, n. 2, p. 441-52, Oct 2014.

MARTIN-MONTALVO, A. et al. Metformin improves healthspan and lifespan in mice. **Nat Commun**, v. 4, p. 2192, 2013.

MASTERNAK, M. M. et al. Caloric restriction results in decreased expression of peroxisome proliferator-activated receptor superfamily in muscle of normal and long-lived growth hormone receptor/binding protein knockout mice. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 60, n. 10, p. 1238-45, Oct 2005.

MATTHEWS, K. A. et al. Are changes in cardiovascular disease risk factors in midlife women due to chronological aging or to the menopausal transition? **J Am Coll Cardiol**, v. 54, n. 25, p. 2366-73, Dec 15 2009.

MEIROW, D. et al. Subclinical depletion of primordial follicular reserve in mice treated with cyclophosphamide: clinical importance and proposed accurate investigative tool. **Human Reproduction**, v. 14, n. 7, p. 1903-1907, 1999.

MOGHE, A. et al. Molecular mechanisms of acrolein toxicity: relevance to human disease. **Toxicol Sci**, v. 143, n. 2, p. 242-55, Feb 2015.

MOORE, M. J. Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide. **Clin Pharmacokinet**, v. 20, n. 3, p. 194-208, Mar 1991.

MORITA, Y. et al. Resveratrol promotes expression of SIRT1 and StAR in rat ovarian granulosa cells: an implicative role of SIRT1 in the ovary. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 10, p. 14, Feb 23 2012.

MOUCHIROUD, L. et al. Life span extension by resveratrol, rapamycin, and metformin: The promise of dietary restriction mimetics for an healthy aging. **Biofactors**, v. 36, n. 5, p. 377-82, Sep-Oct 2010.

MYERS, M. et al. Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. **Reproduction**, v. 127, n. 5, p. 569-80, May 2004.

NA, H. J. et al. Mechanism of metformin: inhibition of DNA damage and proliferative activity in Drosophila midgut stem cell. **Mech Ageing Dev**, v. 134, n. 9, p. 381-90, Sep 2013.

NASERI, L.; KHAZAEI, M. R.; KHAZAEI, M. Synergic effect of bee pollen and metformin on proliferation and apoptosis of granulosa cells: Rat model of polycystic ovary syndrome. **J Food Biochem**, p. e13635, Feb 8 2021.

NIE, Z. et al. The protective effects of pretreatment with resveratrol in cyclophosphamide-induced rat ovarian granulosa cell injury: In vitro study. **Reprod Toxicol**, v. 95, p. 66-74, Aug 2020.

NIE, Z. et al. The protective effects of resveratrol pretreatment in cyclophosphamide-induced rat ovarian injury: an vivo study. **Gynecological Endocrinology**, v. 37, n. 10, p. 914-919, 2021/10/03 2021.

O'TOOLE, T. E. et al. Acrolein activates matrix metalloproteinases by increasing reactive oxygen species in macrophages. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 236, n. 2, p. 194-201, Apr 15 2009.

OKTAY, K. et al. Age-related decline in DNA repair function explains diminished ovarian reserve, earlier menopause, and possible oocyte vulnerability to chemotherapy in women with BRCA mutations. **J Clin Oncol**, v. 32, n. 10, p. 1093-4, Apr 1 2014.

OKTAY, K. et al. BRCA Mutations, DNA Repair Deficiency, and Ovarian Aging. **Biol Reprod**, v. 93, n. 3, p. 67, Sep 2015.

OKTEM, O.; OKTAY, K. A novel ovarian xenografting model to characterize the impact of chemotherapy agents on human primordial follicle reserve. **Cancer Res**, v. 67, n. 21, p. 10159-62, Nov 1 2007.

ORTEGA, I.; DULEBA, A. J. Ovarian actions of resveratrol. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1348, n. 1, p. 86-96, Aug 2015.

PANDEY, A. N. et al. Reactive oxygen and nitrogen species during meiotic resumption from diplotene arrest in mammalian oocytes. **J Cell Biochem**, v. 111, n. 3, p. 521-8, Oct 15 2010.

PATEL, J. M.; BLOCK, E. R.; HOOD, C. I. Biochemical indices of cyclophosphamide-induced lung toxicity. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 76, n. 1, p. 128-38, Oct 1984.

PELOSI, E. et al. Constitutively active Foxo3 in oocytes preserves ovarian reserve in mice. **Nat Commun**, v. 4, p. 1843, 2013.

PETERS, H. The development of the mouse ovary from birth to maturity. **Acta Endocrinol (Copenh)**, v. 62, n. 1, p. 98-116, Sep 1969.

PODFIGURNA-STOPA, A. et al. Premature ovarian insufficiency: the context of long-term effects. **J Endocrinol Invest**, v. 39, n. 9, p. 983-90, Sep 2016.

PRASAD, S. et al. Impact of stress on oocyte quality and reproductive outcome. **J Biomed Sci**, v. 23, p. 36, Mar 29 2016.

QIN, X. et al. Metformin prevents murine ovarian aging. **Aging (Albany NY)**, v. 11, n. 11, p. 3785-3794, Jun 10 2019.

QIN, X. et al. Metformin prevents murine ovarian aging. **Aging**, v. 11, n. 11, p. 3785-3794, 2019.

RAHMAN, I.; BISWAS, S. K.; KIRKHAM, P. A. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. **Biochem Pharmacol**, v. 72, n. 11, p. 1439-52, Nov 30 2006.

REDDY, P. et al. PDK1 signaling in oocytes controls reproductive aging and lifespan by manipulating the survival of primordial follicles. **Hum Mol Genet**, v. 18, n. 15, p. 2813-24, Aug 1 2009.

REDDY, P. et al. Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. **Science**, v. 319, n. 5863, p. 611-3, Feb 1 2008.

RUSSO, G. L. et al. Mechanisms of aging and potential role of selected polyphenols in extending healthspan. **Biochem Pharmacol**, v. 173, p. 113719, Mar 2020.

SACCON, T. D. et al. Ovarian aging and the activation of the primordial follicle reserve in the long-lived Ames dwarf and the short-lived bGH transgenic mice. **Mol Cell Endocrinol**, v. 455, p. 23-32, Nov 5 2017.

SAM, S.; EHRMANN, D. A. Metformin therapy for the reproductive and metabolic consequences of polycystic ovary syndrome. **Diabetologia**, v. 60, n. 9, p. 1656-1661, Sep 2017.

SECOMANDI, L. et al. The role of cellular senescence in female reproductive aging and the potential for senotherapeutic interventions. **Hum Reprod Update**, v. 28, n. 2, p. 172-189, Feb 28 2022.

SHI, L. et al. Long-Term Moderate Oxidative Stress Decreased Ovarian Reproductive Function by Reducing Follicle Quality and Progesterone Production. **PLoS One**, v. 11, n. 9, p. e0162194, 2016.

SPEARS, N. et al. Ovarian damage from chemotherapy and current approaches to its protection. **Hum Reprod Update**, v. 25, n. 6, p. 673-693, Nov 5 2019.

SYED, D. N. et al. Inhibition of Akt/mTOR signaling by the dietary flavonoid fisetin. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 13, n. 7, p. 995-1001, Sep 2013.

TCHKONIA, T. et al. Increased TNF $\alpha$  and CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein with aging predispose preadipocytes to resist adipogenesis. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 293, n. 6, p. E1810-E1819, 2007.

TE VELDE, E. R. et al. Developmental and endocrine aspects of normal ovarian aging. **Mol Cell Endocrinol**, v. 145, n. 1-2, p. 67-73, Oct 25 1998.

TITUS, S. et al. Impairment of BRCA1-related DNA double-strand break repair leads to ovarian aging in mice and humans. **Science translational medicine**, v. 5, n. 172, p. 172ra21, Feb 13 2013.

TRAYSSAC, M.; HANNUN, Y. A.; OBEID, L. M. Role of sphingolipids in senescence: implication in aging and age-related diseases. **J Clin Invest**, v. 128, n. 7, p. 2702-2712, Jul 2 2018.

WANG, M. et al. Resveratrol triggers protective autophagy through the ceramide/Akt/mTOR pathway in melanoma B16 cells. **Nutr Cancer**, v. 66, n. 3, p. 435-40, 2014.

WELT, C. K. Primary ovarian insufficiency: a more accurate term for premature ovarian failure. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 68, n. 4, p. 499-509, Apr 2008.

WINSHIP, A. L. et al. The importance of DNA repair for maintaining oocyte quality in response to anti-cancer treatments, environmental toxins and maternal ageing. **Hum Reprod Update**, v. 24, n. 2, p. 119-134, Mar 1 2018.

WU, M. et al. Resveratrol alleviates chemotherapy-induced oogonial stem cell apoptosis and ovarian aging in mice. **Aging (Albany NY)**, v. 11, n. 3, p. 1030-1044, Feb 14 2019.

WULLSCHLEGER, S.; LOEWITH, R.; HALL, M. N. TOR signaling in growth and metabolism. **Cell**, v. 124, n. 3, p. 471-84, Feb 10 2006.

XIONG, Y. et al. Cyclophosphamide promotes the proliferation inhibition of mouse ovarian granulosa cells and premature ovarian failure by activating the lncRNA-Meg3-p53-p66Shc pathway. **Gene**, v. 596, p. 1-8, Jan 5 2017.

XU, M. et al. Targeting senescent cells enhances adipogenesis and metabolic function in old age. **Elife**, v. 4, p. e12997, Dec 19 2015.

YOUSEFZADEH, M. J. et al. Fisetin is a senotherapeutic that extends health and lifespan. **EBioMedicine**, v. 36, p. 18-28, Oct 2018.

ZHANG, D. et al. Increased DNA damage and repair deficiency in granulosa cells are associated with ovarian aging in rhesus monkey. **J Assist Reprod Genet**, v. 32, n. 7, p. 1069-78, Jul 2015.

ZHANG, H. et al. Somatic cells initiate primordial follicle activation and govern the development of dormant oocytes in mice. **Curr Biol**, v. 24, n. 21, p. 2501-8, Nov 3 2014.

ZHANG, J. et al. Metabolism and Transport of Oxazaphosphorines and the Clinical Implications. **Drug Metabolism Reviews**, v. 37, n. 4, p. 611-703, 2005/01/01 2005.

ZHANG, J. et al. Metabolism and transport of oxazaphosphorines and the clinical implications. **Drug Metab Rev**, v. 37, n. 4, p. 611-703, 2005.

ZHENG, W. et al. Functional roles of the phosphatidylinositol 3-kinases (PI3Ks) signaling in the mammalian ovary. **Mol Cell Endocrinol**, v. 356, n. 1-2, p. 24-30, Jun 5 2012.

ZHOU, L. et al. Rapamycin Prevents cyclophosphamide-induced Over-activation of Primordial Follicle pool through PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway in vivo. **Journal of Ovarian Research**, v. 10, n. 1, p. 56, 2017/08/16 2017.

## 9 ANEXO 1

SEI/UFPEL - 1152511 - Parecer

12/11/20, 12:12



**PARECER Nº**  
**PROCESSO Nº**

**150/2020/CEEA/REITORIA**  
**23110.031404/2020-55**

## Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “Efeitos da metformina, fisetina e do resveratrol sobre o envelhecimento ovariano em camundongos expostos à ciclofosfamida”, registrada com o nº 23110.031404/2020-55, sob a responsabilidade de Augusto Schneider - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer FAVORÁVEL a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 08 de dezembro de 2020.

Finalidade	( x ) Pesquisa      ( ) Ensino
Vigência da autorização	01/01/2021 a 31/12/2022
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> /C57BL/6
Nº de animais	60
Idade	30 dias
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central - UFPel