AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA DE DERIVADOS DOS VITANOLÍDEOS SOBRE A FUNÇÃO OVARIANA DE CAMUNDONGOS

Maria Bianca De Almeida Silva[1]
Gaby Judith Quispe Palomino[2]
Ana Paula Ribeiro Rodrigues[3]
José Ricardo De Figueiredo[4]
Rebeca Magalhães Pedrosa Rocha[5]

RESUMO

Os tratamentos quimioterápicos causam efeitos tóxicos que reduzem drasticamente a reserva folicular ovariana. Diante disso, pesquisa-se substâncias com ação anti-neoplásica com menos consequências indesejadas. Portanto, o objetivo desse trabalho é avaliar os efeitos *in vivo* dos compostos vitaferina A (VTA), 27-desoxi-24,25-epoxivitaferina A (VT1) e 27-desoxivitaferina A (VT2), isolados a partir do extrato das folhas da Athenaea velutina, em folículos ovarianos pré-antrais (FOPA) de camundongos. Para isso, foram administrados intraperitonealmente por 15 dias 7 doses de VTA, VT1, VT2; solução salina (controle) ou DMSO (veículo da droga). Após esse período, parte dos animais foi eutanasiada, os ovários coletados para avaliação do número de FOPA e folículos antrais (FOA), bem como análise da morfologia e sobrevivência folicular. Além disso, a outra parte dos animais seguiu para acasalamento para avaliação da taxa de prenhez e do nascimento de crias vivas. Após os 15 dias de tratamento, não foram observadas diferenças na contagem de folículos pré-antrais, antrais e degenerados nos diferentes tratamentos ($P > 0,05$). Da mesma forma, a taxa média de prenhez e nascimento de crias vivas foi semelhante entre os grupos. Em conclusão, os compostos VTA, VT1 e VT2 não apresentaram efeitos tóxicos sobre o tecido ovariano e a fertilidade de camundongos-fêmeas.

Palavras-chave: quimioterapia; toxicidade; infertilidade.

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Ciências da Saúde-ICS, Discente, bianca.almeida1529@gmail.com[1]
Universidade Estadual do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Discente, gaby.unalm.z@gmail.com[2]
Universidade Estadual do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Docente, anapaula.ribeirorodrigues@gmail.com[3]
Universidade Estadual do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Docente, figueiredo.lamofopa@gmail.com[4]
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Ciências da Saúde-ICS, Docente, rebecarocha@unilab.edu.br[5]

ISSN: 2447-6161

INTRODUÇÃO

As drogas anticancerígenas induzem diretamente quebras na fita dupla do DNA, as quais podem ocasionar a apoptose e/ou autofagia, ou podem causar indiretamente depleção de folículos primordiais devido a lesões microvasculares e estromais ocasionadas por isquemia, necrose ou inflamação. Um outro efeito destas drogas é o estímulo à ativação dos folículos primordiais através da via PI3K/AKT/FOXO3a, a qual leva à uma perda maciça da reserva ovariana e, consequentemente, à falência ovariana prematura e à infertilidade (CHO, 2020).

Tais problemáticas estão estimulando a busca por novas substâncias anticâncer, que não apresentem, ou apresentem de forma mínima, efeitos sobre estruturas ovarianas. Nesse sentido, o estudo de compostos de origem natural, em especial compostos advindos de vegetais, têm destaque, uma vez que uma gama de produtos foram, e estão sendo desenvolvidos, a partir destes. Os metabólitos extraídos a partir de plantas sempre chamaram a atenção de pesquisadores, uma vez que possuem um amplo campo de potenciais aplicações (SINGH; KAUR; SILAKARI, 2014).

Desse modo, atualmente algumas moléculas anticâncer estão sendo utilizadas a nível experimental, como é o caso da vitaferina A (VTA), 27-desoxi-24,25-epoxivitaferina A (VT1) e 27-desoxivitaferina A (VT2), isoladas a partir do extrato das folhas da Athenaea velutina (família Solanaceae), a qual merece atenção quanto aos seus efeitos sobre a função ovariana. Esses compostos apresentaram uma atividade antitumoral significativa frente a linhagens HL-60 (leucemia), HCT-116 (cólon), PC-3 (próstata), SNB-19 (glioblastoma) e a linhagem celular murina não tumoral L929 (fibroblasto de murino) (ROCHA *et a*l., dados não publicados). Apesar dos efeitos de VT1 terem sido até o momento relatados apenas por Rocha *et al.* (dados não publicados), Kakar *et al*. (2014; 2016) evidenciaram atividade *in vivo* de VTA sobre tumor ovariano, e Yoneyama *et al*. (2015) observaram a atividade de VT2 sobre outras linhagens tumorais *in vitro*. No entanto, apesar destes estudos já terem demonstrado sua eficiência contra diferentes linhagens tumorais, ainda é pouco conhecido o efeito dessa substância sobre o desenvolvimento de folículos ovarianos e como ela age sobre a função reprodutiva *in vivo*. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos *in vivo* da VTA, VT1 e VT2 em FOPA de camundongos.

METODOLOGIA

Todos os protocolos experimentais foram submetidos e aprovados à Comissão de Ética para o Uso de Animais (nº processo 03248567/2021). Camundongos-fêmeas da linhagem C57BL/6J (n = 60) de 5 a 6 semanas de idade foram divididas aleatoriamente em três grupos (n = 12 por grupo): 1) grupo controle (GC), sendo administrada solução salina; 2) grupo veículo (GV), sendo administrados 10% DMSO (veículo da droga); 3) grupo VTA (2 mg/kg); 4) grupo VT1 (2 mg/kg); ou grupo VT2 (2 mg/kg). Foram administradas 7 doses das substâncias, nos respectivos tratamentos, por via intraperitoneal (i.p.) em dias alternados durante um período total de 15 dias.

Ao fim dos tratamentos, os animais foram eutanasiados mediante anestesia com uma dose excessiva de solução de cetamina (450 mg/kg) e xilazina (45 mg/kg). Imediatamente após, ambos os ovários foram coletados e os tecidos circundantes dissecados, usando agulhas de calibre 26G, ligadas a seringas de 1 mL, sob um estéreomicroscópio (SMZ 645 Nikon, Tóquio, Japão). Os pares de ovários foram coletados e fixados em 4% paraformaldeído (PAF) por 12 h em temperatura ambiente e, em seguida, processados e corados pelo método de ácido periódico de Schiff-hematoxilina (PAS-H). As análises foliculares foram realizadas por microscopia de luz (Nikon, Tóquio, Japão), quanto à classificação do estágio de desenvolvimento folicular e

ISSN: 2447-6161

degeneração morfológica. Além disso, a outra parte dos animais seguiu para acasalamento para avaliação da taxa de prenhez e do nascimento de crias vivas.

Os dados estatísticos foram analisados usando Sigma Plot. Os dados foram apresentados como média (± SEM) e a significância estatística foi estabelecida em $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os tecidos ovarianos das camundongos-fêmeas do grupo controle, veículo, VTA, VT1 e VT2, revelaram uma arquitetura histológica normal, contendo todas as categorias foliculares (primordial, transição, primário, secundário e antral) e corpos lúteos, com um número semelhante de folículos degenerados em todos os tratamentos, exceto no veículo onde nenhum folículo degenerado foi observado. Ao final do experimento, foram contabilizados um total de 788 FOPA, sendo 340 primordiais, 210 transição, 152 primários e 170 secundários, e 98 FOA, não havendo diferença significativa no número de folículos por categoria entre os diferentes tratamentos.

A vitaferina A (VTA) demonstrou em diversas pesquisas eficiência contra diferentes linhagens de células ovarianas tumorais in vivo na concentração de 2 mg/kg (KAKAR *et al*., 2014; KAKAR et al., 2016), bem como em células de glioblastoma (SHAH *et al*., 2009), neuroblastoma e mieloma múltiplo (YCO *et al*., 2014). Além disso, recentemente foi demonstrado seu efeito antitumoral sobre linhagem celular de osteossarcoma em humanos (PIRES *et al*., 2020). Já os outros fármacos, 27-desoxi-24,25-epoxivitaferina A (VT1) e 27-desoxivitaferina A (VT2), apresentaram citotoxicidade em quatro linhagens celulares de câncer humano: glioblastoma (SNB-19), próstata (PC-3), cólon (HCT-116), leucemia (HL-60) (ROCHA *et al*., dados não publicados).

Além disso, a VTA demonstrou que, ao ser combinada a outros agentes terapêuticos como Sorafenib, Doxorrubicina, Cisplatina ou Oxaliplatina, melhorou a eficácia e diminuiu a resistência quimioterápica (HASSANNIA, 2020). A ação de VTA depende, aparentemente, da concentração aplicada, do contexto e composição genética do alvo celular, agindo diretamente sobre a estrutura do citoesqueleto e do sistema proteassômico, regulando a atividade de proteínas de choque térmico e chaperonas, causando citotoxicidade mediada por espécies reativas de oxigênio (EROS). Além disso, pode induzir a senescência de células-tronco cancerígenas, a morte celular e a imunidade antitumoral, inibindo a glicólise e metabolismo tricarboxílico, revertendo marcas epigenéticas do câncer, inibindo o ciclo celular, o fator nuclear kappa B (NF-κB) e vias oncogênicas (HASSANNIA, 2020).

Ao avaliarem os efeitos do vitanolídeo D, um dos derivados vitanolídeos, sobre tecido ovariano caprino, Guerreiro *et al*. (2019) e Palomino *et al*. (2021) observaram que essa substância levou a um aumento na taxa de folículos ovarianos caprinos degenerados por estimular a apoptose celular. Da mesma forma, outras drogas antineoplásicas disponíveis no mercado, tais como Antraciclinas, Cisplatina, Ciclofosfamida, Gemcitabina, Mitomicina C e Taxanos, também possuem efeitos semelhantes nessa mesma espécie (GUERREIRO *et al*., 2019). Contudo, sob as condições experimentais deste estudo, as substâncias testadas, apesar da sua potencial ação anticâncer, não apresentaram impacto sobre a contagem total de folículos ovarianos pré-antrais e antrais ou ainda sobre o número de folículos degenerados nos diferentes tratamentos.

Um total de 30 animais foi destinado ao acasalamento, após 15 dias de tratamento com solução salina (controle), DMSO (veículo), VTA, VT1 ou VT2, para mensuração das taxas de prenhez e contagem de crias nascidas vivas. Depois do acasalamento, foi constatado que todas as fêmeas estavam prenhes. Ao fim do período gestacional, foi obtida uma média de 8 nascimentos de crias vivas por fêmea, totalizando cerca de 48 filhotes por tratamento.

ISSN: 2447-6161

Terapias antineoplásicas, apesar de terem eficiência sobre o tratamento de vários tipos de câncer, atualmente ainda são uma grande causa de problemas reprodutivos. É apontado na literatura que drogas anticâncer tem alto potencial em causar efeitos teratogênicos e redução de taxas de natalidade (MILUNSKY *et al*.,1968; WALLACE *et al*., 2005). Diferentemente, nos dados encontrados no presente trabalho, as taxas de prenhez e natalidade não diferiram entre os grupos controle e tratados com drogas quimioterápicas (VTA, VT1 e VT2), lançando uma luz para o uso de novos compostos advindos de plantas no tratamento contra o câncer sem efeitos sobre a fertilidade feminina. No entanto, estudos complementares devem ser realizados a fim de averiguar e constatar a seguridade do uso dos fármacos aqui testados.

CONCLUSÕES

Dessa forma, conclui-se que, a VTA, VT1 e VT2 na concentração de 2 mg/kg são potenciais agentes antineoplásicos sem efeitos tóxicos sobre o tecido ovariano, sendo necessárias mais investigações, principalmente moleculares, para a sua futura utilização para tratamentos anti-câncer.

AGRADECIMENTOS

A Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afrobrasileira (UNILAB) por proporcionar subsídios para a realização com consentimento da bolsa. À Universidade Estadual do Ceará (UECE) e ao Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-Antrais (LAMOFOPA) pelo apoio no desenvolvimento dos experimentos desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

CHO, H.W.; LEE, S.; MIN, K.J.; HONG, J.H.; SONG, J.Y.; LEE, J.K.; LEE, N.W.; KIM, T. Advances in the treatment and prevention of chemotherapy-induced ovarian toxicity. International Journal of Molecular Sciences, v. 21, n. 20, p. 7792, 2020.

GUERREIRO, D.D., LIMA, L.F., SÁ, N.A.R., TETAPING, G.M., ALVES, B.G., LOBO, C.H., LOIOLA, O.D., SMITZ, J., FIGUEIREDO, J.R., RODRIGUES, A.P.R. *In vitro* study of Withanolide D toxicity on goat preantral follicles and its effects on the cell cycle. Reproductive Toxicology, v. 84, p. 18-25, 2019.

HASSANNIA, B.; LOGIE, E.; VANDENABEELE, P.; VANDEN BERGHE, T.;, VANDEN BERGHE, W. Withaferin A: From ayurvedic folk medicine to preclinical anti-cancer drug. Biochemical Pharmacology, v. 173, p. 113602, 2020.

KAKAR, S.S.; RATAJCZAK, M. Z.; POWELL, K. S.; MOGHADAMFALAHI, M.; MILLER, D. M.; BATRA, S. K.; SINGH, S. K. Withaferin a alone and in combination with cisplatin suppresses growth and metastasis of ovarian cancer by targeting putative cancer stem cells. PloS one, v. 9, n. 9, p. e107596, 2014.

KAKAR, S.S., WORTH, C.A., WANG, Z., CARTER, K., RATAJCZAK, M., GUNJAL, P. DOXIL when combined with Withaferin A (WFA) targets ALDH1 positive cancer stem cells in ovarian cancer. Journal of cancer stem cell research, v. 4, 2016.

MILUNSKY, A., GRAEF, J.H., GAYNOR JR., M.F. Methotrexate-induced congenital malformations: with a review of the literature. The Journal of pediatrics, v. 72, n. 6, p. 790-795, 1968.

PALOMINO, G.J.Q.; SÁ, N.A.R.; GUERREIRO, D.D.; GOMES, F.D.R.; DA SILVA, R.F.; LOPES, E.P.F.; PAES, V.M.; GATAÍ, P.H.S.; ALVES, B.G.; PESSOA, O.D.L.; FIGUEIREDO, J.R.; ROCHA, R.M.P.; RODRIGUES, A.P.R.

ISSN: 2447-6161

Induced-damages on preantral follicles by withanolide D, a potent chemotherapy candidate are not attenuated by melatonin. Reproductive Toxicology, v. 104, p. 125-133, 2021.

PIRES, N.; GOTA, V.; GULIA, A.; HINGORANI, L.; AGARWAL, M.; PURI, A. Safety and pharmacokinetics of Withaferin-A in advanced stage high grade osteosarcoma: A phase I trial. Journal of Ayurveda and Integrative Medicine, v. 11, n. 1, p. 68-72, 2020.

ROCHA, K.A.D. Lactona esteroidais (vitanolídeos) com atividade anticâncer isolados de Athenaea velutina Sendtn - Solanaceae. 2021. 95 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

SHAH, N.; KATARIA, H.; KAUL, S.C.; ISHII, T.; KAUR, G.; WADHWA, R. Effect of the alcoholic extract of Ashwagandha leaves and its components on proliferation, migration, and differentiation of glioblastoma cells: combinational approach for enhanced differentiation. Cancer science, v. 100, n. 9, p. 1740-1747, 2009.

SINGH, M., KAUR, M., SILAKARI, O. Flavones: An important scaffold for medicinal chemistry. European journal of medicinal chemistry, v. 84, p. 206-239, 2014.

WALLACE, W.H.B., ANDERSON, R.A., IRVINE, D.S. Fertility preservation for young patients with cancer: who is at risk and what can be offered?. The lancet oncology, v. 6, n. 4, p. 209-218, 2005.

YCO, L.P., MOCZ, G., OPOKU-ANSAH, J., BACHMANN, A.S. Withaferin A inhibits STAT3 and induces tumor cell death in neuroblastoma and multiple myeloma. Biochemistry insights, v. 7, p. BCI. S18863, 2014.

YONEYAMA, T.; ARAI, M.A.; SADHU, S.K.; AHMED, F.; ISHIBASHI, M. Hedgehog inhibitors from Withania somnifera. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v. 25, n. 17, p. 3541-3544, 2015.

ISSN: 2447-6161