INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS IN VITRO DE CANDIDATOS A QUIMIOTERÁPICOS (DERIVADOS DE VITANOLÍDEOS) SOBRE A SOBREVIVÊNCIA DE CÉLULAS FOLICULARES DE CAMUNDONGOS

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

RESUMO

Apesar dos avanços no uso da quimioterapia contra o câncer, esse tratamento pode causar danos ovarianos. Diante disso, tem se pesquisado compostos naturais anticancerígenos menos gonadotóxicos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos *in vitro* da vitaferina A (VTA) em folículos ovarianos pré-antrais (FOPA) de camundongos. Para isso, ovários de camundongos-fêmeas foram não-cultivados (CNT) ou cultivados *in vitro* por 6 dias em α-MEM+ adicionado de DMSO, doxorrubicina (DXR) ou VTA (0,6 ou 6 µM). DXR e VTA foram acrescentadas apenas no dia 0 (1X) ou nos dias 0, 2 e 4 de cultivo (3X). Em seguida, foi avaliada a morfologia folicular e imunomarcação de γH2AX e caspase-3 clivada no tecido ovariano. Os resultados demonstraram que com apenas uma exposição, o tratamento VTA 6,0 diminuiu a sobrevivência folicular em comparação a VTA 0,6 e DXR. Ademais, a exposição única de VTA 6,0 aumentou a marcação de γH2AX em comparação a VTA 0,6 e DXR. Enquanto, com a exposição tripla, os grupos VTA 0,6 e 6,0 tiveram maior marcação comparado a DXR. Com a maior frequência de exposição a marcação para caspase-3 clivada no grupo VTA 0,6 foi superior ao tratamento com DXR. Diante disso, considerou-se que a VTA, em ambas as concentrações e frequências de exposição, pode contribuir na degeneração folicular e danos ao DNA, sendo agravada pelo aumento desses fatores.

Palavras-chave: quimioterápicos; folículos pré-antrais; vitaferina A.

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Ciências da Saúde, Discente, bianca.almeida1529@gmail.com[1]
Universidade Estadual do Ceará, Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-Antrais, Discente, gaby.unalm.z@gmail.com[2]
Universidade Estadual do Ceará, Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-Antrais, Docente, figueiredo.lamofopa@gmail.com[3]
Universidade Estadual do Ceará, Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-Antrais, Docente, anapaula.ribeirorodrigues@gmail.com[4]
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Ciências da Saúde, Docente, rebecarocha@unilab.edu.br[5]

ISSN: 2447-6161

INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços no diagnóstico precoce e tratamentos contra o câncer, com consequente aumento das taxas de sobrevivência, a quimioterapia pode causar danos ovarianos, podendo comprometer as funções reprodutivas e até culminar em infertilidade (CHO et al., 2020). Os principais efeitos da quimioterapia sobre a função ovariana estão relacionados a sua toxicidade, capaz de levar a perda da reserva folicular ovariana e causar insuficiência ovariana primária (POI) (ROSARIO et al., 2022).

Dessa forma, vários estudos têm sido desenvolvidos com a finalidade de identificar compostos com atividade anticancerígena, que sejam eficientes, econômicos, ecológicos, seguros e previnam a resistência medicamentosa. Os produtos naturais e seus derivados têm ganhado destaque na quimioterapia, imunoterapia, terapia adjuvante, terapia direcionada, imunoprevenção e quimiossensibilização. Isto ocorreu devido à sua diversidade química, baixa toxicidade, segurança e disponibilidade, e por apresentarem ação em múltiplas vias, incluindo morte celular por apoptose, proliferação celular, migração/invasão, angiogênese e metástase (NAEEM et al., 2022).

Dentre esses compostos destacam-se os vitanolídeos, que pertencem a um grupo de lactonas esteroidais de 28 carbonos que dão origem a diversos compostos isolados do extrato das folhas de Athenaea velutina (família Solanaceae). Algumas dessas substâncias apresentam atividade antitumoral, dentre elas: VTA (vitaferina A) (ZHANG et al., 2023). A VTA demonstrou em diferentes pesquisas eficiência, *in vitro* e in vivo, contra diversas linhagens de câncer, como: mama (MUNIRAJ et al., 2019; LIU et al., 2019), colorretal (ALNUQAYDAN et al., 2020; CHANDRASEKARAN et al., 2018), próstata (KUMAR et al., 2021; KIM et al., 2020) e pele (XU et al., 2019; Li et al., 2016).

Entretanto, a exposição diária a diversos produtos químicos ou naturais pode causar danos irreversíveis à saúde reprodutiva feminina, sendo necessário a utilização de testes para a avaliação da segurança e eficácia destas substâncias possivelmente tóxicas. Contudo, a maioria dos testes de toxicologia reprodutiva são realizados in vivo, gerando problemas éticos na comunidade científica. Diante disso, nos últimos anos, têm sido desenvolvidos vários métodos de cultura celular, visando a redução da utilização de animais em testes toxicológicos (GUERREIRO et al., 2019). Diante disso, o objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos *in vitro* da vitaferina A (VTA) em folículos ovarianos pré-antrais (FOPA) de camundongos.

METODOLOGIA

Coleta dos ovários

Os camundongos experimentais (n=40) foram anestesiados com cetamina (450 mg/kg) e xilazina (45 mg/kg), e sacrificados por deslocamento cervical. Imediatamente, ambos os ovários foram colhidos e os tecidos circundantes dissecados usando agulhas de calibre 26G ligadas a seringas de 1 mL, sob um estereomicroscópio. Após a dissecção, os ovários foram lavados uma vez em etanol a 70% e duas vezes em Meio Essencial Mínimo (MEM) tamponado com HEPES e suplementado com 100 µg/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina.

Cultivo *in vitro*

Os ovários inteiros foram cultivados individualmente em placas de 24 poços com 500 µL de α-MEM (pH 7,2-7,4) suplementado com 3 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), 1 mg/mL de fetuína bovina, 5 ng/mL de insulina, 5 ng/mL de transferrina, 5 ng/mL de selênio e 10 mUI/mL de hormônio folículo estimulante (FSH) recombinante humano. Os ovários foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais: (1) ovários não-cultivados (controle-CNT, n=10); (2) ovários cultivados em α-MEM suplementado adicionado de

ISSN: 2447-6161

1% de Dimetilsulfóxido (DMSO; n=10); (3) doxorrubicina (DOXO; 0,3 µg/mL; n=20); (4) VTA (0,6 µM; n=20); ou (5) VTA (6 µM; n=20). As drogas DOXO e VTA (0,6 µM e 6 µM) foram adicionadas ao meio de cultivo de duas formas: apenas no dia zero de cultivo (1X) ou nos dias zero, dois e quatro de cultivo (3X). O cultivo *in vitro* do ovário foi realizado a 37°C e 5% de CO2 por 6 dias, utilizando o modelo de cultivo *in vitro* bidimensional. A cada dois dias, houve substituição total do meio de cultivo, totalizando duas trocas (dia 2 e 4 de cultivo). Após o período de cultivo, um ovário foi processado para a histologia clássica e para avaliação por imunomarcação.

Análise da morfologia folicular

Os ovários foram fixados em paraformaldeído (PAF) 4% por 12 h em temperatura ambiente. Em seguida, foram processados em diferentes concentrações de álcool, xilol e parafina. Os tecidos foram incluídos em blocos de parafina e posteriormente seccionados a 5 µm para montagem das lâminas, que foram coradas com hematoxilina e eosina. As análises foliculares foram realizadas por microscopia de luz. Apenas os folículos cujos oócitos apresentavam núcleos claramente visíveis foram considerados para contagem. Os folículos foram classificados da seguinte forma: 1) folículo primordial (oócito circundado por uma camada de células pré-granulosas achatadas) ou 2) folículos em crescimento, divididos em transição (oócito circundado por uma camada de células pré-granulosas achatadas e cubóides), primário (oócito circundado por uma camada de células da granulosas cubóides) e secundário (oócito circundado por duas ou mais camadas de células da granulosas cubóides). Os folículos também foram classificados de acordo com a morfologia, em normal, quando o oócito apresenta núcleo íntegro e as células da granulosa estão organizadas e delimitadas por membrana basal, ou degenerado, caso apresente corpos picnóticos, retração citoplasmática do oócito e desorganização celular. Para a avaliação da ativação folicular, foi calculada a proporção de folículos primordiais e em crescimento (transição, primário e secundário) nos diferentes tratamentos.

Imunofluorescência (IF)

As secções previamente obtidas foram montadas em lâminas Superfrost Plus, desparafinizadas e reidratadas usando um etanol graduado para avaliação das enzimas de sinalização de danos ao DNA (γH2AX) e apoptose (Caspase-3 ativa). Inicialmente, foi realizada a recuperação antigênica incubando as lâminas em tampão de citrato de sódio 0,01 M (pH 6) a 95-100 °C por 5 min em uma panela de pressão. As lâminas foram incubadas em solução PBS contendo 1% (p/v) BSA para bloqueio inespecífico por 1 h em temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram incubadas durante a noite a 4 °C com anticorpo primário monoclonal anti-γH2AX de camundongo (fosfoS139) ou policlonal anti-Caspase-3 clivada de coelho. Após a incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram lavadas duas vezes em PBS a 1% e incubadas com anticorpos secundários anti-camundongos e anti-coelho conjugado com Alexa Fluor® 488. As lâminas foram montadas em meio de montagem com DAPI. A imunocoloração foi avaliada por um microscópio confocal de varredura a laser. O controle negativo foi estabelecido pela ausência de anticorpos primários. Os folículos foram considerados positivos para ambas as proteínas quando emitiram fluorescência verde. Foram capturados aleatoriamente cinco campos/lâmina, que tiveram a intensidade de fluorescência mensurada e expressa em pixels, usando o software ImageJ.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software SPSS (versão 23.0). O teste de Shapiro-Wilk e o teste de Levene foram utilizados para avaliar se os dados obtidos tinham distribuição normal. A morfologia ovariana teve a comparação das médias entre os tratamentos com mesma frequência de administração avaliada por ANOVA One-way seguida pelo teste LSD de Fisher. O teste t-student foi utilizado para comparar a frequência de administração de cada substância. A imunolocalização de γH2AX e Caspase-3 teve a comparação das médias entre os tratamentos com mesma frequência de administração avaliadas pelo teste H

ISSN: 2447-6161

de Kruskal-Wallis. O teste U de Mann-Whitney foi aplicado para comparar a frequência de administração de cada substância. Os dados foram apresentados como média ± erro padrão da média (EPM) e os resultados foram estatisticamente significativos quando o p-valor foi menor que 0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Morfologia e desenvolvimento folicular

A porcentagem de FOPA morfologicamente normais foi reduzida ($p<0,05$) em todos os tratamentos quando comparados ao grupo CNT. Em relação ao tratamento com DMSO, os grupos DXR (3X) e VTA 6,0 (duas frequências de exposição) demonstraram diminuição ($p<0,05$) do número de folículos com morfologia normal. Além disso, o cultivo com exposição tripla de DXR reduziu ($P<0,05$) o nível de folículos morfologicamente normais comparado à sua exposição única. Sendo que com apenas uma exposição, o tratamento com VTA 6,0 diminuiu ($P<0,05$) a sobrevivência folicular em comparação a VTA 0,6 e DXR. Da mesma forma, com três exposições, o grupo VTA 6,0 teve um menor ($P<0,05$) índice de FOPA com morfologia normal comparado a VTA 0,6.

A proporção de folículos primordiais foi reduzida ($P<0,05$) em todos os tratamentos em comparação ao CNT. O mesmo resultado foi obtido em relação ao grupo DMSO, exceto no tratamento VTA 0,6 (1X). Ademais, o cultivo com exposição tripla de VTA 0,6 reduziu ($P<0,05$) o número de folículos primordiais comparado à sua exposição única. Considerando que com apenas uma exposição, o tratamento com VTA 6,0 diminuiu ($P<0,05$) a reserva ovariana em comparação a VTA 0,6. Paralelo a isso, a porcentagem de folículos em desenvolvimento foi aumentada nos tratamentos DXR (1X) e VTA 0,6 (3X) em relação ao grupo CNT e DMSO. Além disso, com a exposição tripla, o grupo VTA 0,6 teve um maior ($P<0,05$) número de folículos em desenvolvimento comparado a VTA 6,0.

Conhecidamente, os quimioterápicos podem esgotar a reserva ovariana através da super ativação de folículos primordiais, consequentemente aumentando o número de folículos em desenvolvimento, ou pela morte apoptótica mediada por dano direto ao DNA de folículos em crescimento (RONESS et al., 2016). Entretanto, os medicamentos anticancerígenos também podem afetar o microambiente ovariano, que é responsável por fornecer suporte nutricional e transportar sinais necessários para o crescimento e desenvolvimento folicular, ovulação e formação do corpo lúteo. A quimioterapia pode induzir a deposição de matriz extracelular e fibrose estromal, distúrbios vasculares e na angiogênese, desordens imunológicas, desequilíbrios de estresse oxidativo, exaustão de células-tronco ovarianas e senescência celular, reduzindo assim a quantidade e a qualidade dos folículos ovarianos (GUO et al., 2024).

Imunolocalização de γH2AX

A marcação nos FOPA de γH2AX, foi maior ($P < 0,05$) no tratamento cultivado com VTA nas duas concentrações e frequências de exposição, em relação ao controle. O grupo VTA 0,6 3X e 6,0 em ambos os tipos de exposição, apresentaram uma elevada ($P<0,05$) marcação em comparação ao grupo DMSO. Além disso, o cultivo com exposição tripla de VTA 0,6 aumentou ($P<0,05$) o nível de células foliculares marcadas quando comparado à sua exposição única. Sendo que com apenas uma exposição, o tratamento com VTA 6,0 aumentou ($P<0,05$) a marcação de γH2AX em comparação a VTA 0,6 e DXR. Enquanto, com três exposições, os grupos VTA 0,6 e 6,0 tiveram maior ($P<0,05$) marcação comparado a DXR.

Semelhantemente, aos resultados encontrados neste trabalho, foi demonstrado que em células de câncer oral Ca9-22 cultivadas por 24 horas com VTA (1-3 μM) houve dano ao DNA baseado na mensuração de γH2AX (CHANG et al., 2017). Sabe-se que as quebras de fita dupla geradas pelo dano ao DNA, resultantes de fatores endógenos (distúrbios de envelhecimento normal e acelerado) ou exógenos (drogas quimioterápicas, radiação

ISSN: 2447-6161

ionizante e agentes genotóxicos), leva a fosforilação da histona H2AX (denominada γH2AX). A H2AX fosforilada aciona vias de sinalização que controlam os pontos de verificação do ciclo celular e reparo ou morte das células (KUO e YANG, 2008). No caso onde o dano ao DNA não consegue ser reparado, podem ocorrer mutações genéticas que contribuem para o início e a progressão do câncer (PRABHU et al., 2024).

Imunolocalização de Caspase-3 clivada

A marcação de caspase-3 clivada no folículo foi aumentada ($P < 0,05$) em todos os tratamentos em comparação ao controle não-cultivado. A exposição tripla de DXR reduziu ($P<0,05$), enquanto a de VTA 0,6 aumentou ($P<0,05$) a marcação folicular, comparado à exposição única das substâncias. Sendo que, com a maior frequência de exposição a marcação positiva no grupo VTA 0,6 foi superior ($P<0,05$) ao tratamento com DXR e similar ao VTA 6,0.

De forma semelhante, em células A2780 de câncer de ovário tratadas por 24 horas com 1,5 e 2 µM de VTA mostraram um aumento no nível de caspase-3 clivada, sendo que a combinação com 200 nM de DXR potencializou essa morte celular (FONG et al., 2012). Em outro estudo, células A549 de câncer de pulmão tratadas com concentrações maiores que 5 µmol·L-1 de VTA por 48 horas também apresentaram maior detecção de caspase-3 clivada (CAI et al., 2014).

Um dos mecanismos pelo qual a VTA exerce seu efeito antitumoral é pela indução da apoptose intrínseca e extrínseca (XING et al., 2023). Esse composto natural induz a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células cancerígenas, levando ao aumento da expressão de Bak e Bax, que por sua vez induz a apoptose mitocondrial. Além disso, desencadeia a ativação da proteína Bak e Bax reduzindo a expressão dos genes da laminina e da integrina (HAHM et al., 2011). Paralelo a isso, a VTA aumenta a apoptose induzida por ligante indutor de apoptose relacionada a TNFα (TRAIL) ao diminuir a expressão de c-FLIPL e c-FLIPs (proteína inibitória celular semelhante a FLICE), que são reguladores negativos da apoptose (KRUEGER et al., 2001; ZHANG et al., 2007). Curiosamente, embora o tratamento VTA 6,0 (3X) tenha reduzido a porcentagem de folículos morfologicamente normais, não houve aumento do marcador de apoptose. Isso sugere que a VTA pode agir por meio de outros mecanismos de morte celular, como a autofagia e ferroptose (XING et al., 2023), aumentando a degeneração folicular.

CONCLUSÕES

Diante disso, considerou-se que a VTA, em ambas as concentrações e frequências de exposição, podem contribuir na degeneração folicular e danos ao DNA, sendo agravada pelo aumento desses fatores. No entanto, são necessários mais estudos sobre as vias de sinalização relacionadas aos efeitos negativos causados por VTA.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Rebeca Magalhães Pedrosa Rocha pela troca de conhecimentos, a toda equipe do Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-antrais (LAMOFOPA) por todo auxílio fornecido e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

ISSN: 2447-6161

ALNUQAYDAN, A.; RAH, B.; ALMUTARY, A. G.; CHAUHAN, S. S. Synergistic antitumor effect of 5-fluorouracil and withaferin-A induces endoplasmic reticulum stress-mediated autophagy and apoptosis in colorectal cancer cells. American Journal of Cancer Research, v. 10, n. 3, p. 799, 2020.

CAI, Y.; SHENG, Z. Y.; CHEN, Y.; BAI, C. Effect of Withaferin A on A549 cellular proliferation and apoptosis in non-small cell lung cancer. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, v. 15, n. 4, p. 1711-1714, 2014.

CHANDRASEKARAN, B.; PAL, D.; KOLLURU, V.; TYAGI, A.; BABY, B.; DAHIYA, N. R.; YOUSSEF, K.; ALATASSI, H.; ANKEM, M. K.; SHARMA, A. K.; DAMODARAN, C. The chemopreventive effect of withaferin A on spontaneous and inflammation-associated colon carcinogenesis models. Carcinogenesis, v. 39, n. 12, p. 1537-1547, 2018.

CHANG, H. W.; LI, R. N.; WANG, H. R.; LIU, J. R.; TANG, J. Y.; HUANG, H. W.; CHAN, Y. H.; YEN, C. Y. Withaferin A induces oxidative stress-mediated apoptosis and DNA damage in oral cancer cells. Frontiers in physiology, v. 8, p. 634, 2017.

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.

FONG, M. Y.; JIN, S.; RANE, M.; SINGH, R. K.; GUPTA, R.; KAKAR, S. S. Withaferin A synergizes the therapeutic effect of doxorubicin through ROS-mediated autophagy in ovarian cancer. PLoS one, v. 7, n. 7, p. e42265, 2012.

GUERREIRO, D. D.; MBEMYA, G. T.; BRUNO, J. B.; FAUSTINO, L. R.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. *In vitro* culture systems as an alternative for female reproductive toxicology studies. Zygote, v. 27, n. 2, p. 55-63, 2019.

GUO, Y.; XUE, L.; TANG, W.; XIONG, J.; CHEN, D.; DAI, Y.; WU, C.; WEI, S.; DAI, J.; WU, M.; WANG, S. Ovarian microenvironment: challenges and opportunities in protecting against chemotherapy-associated ovarian damage. Human Reproduction Update, p. dmae020, 2024.

HAHM, E. R.; MOURA, M. B.; KELLEY, E. E.; HOUTEN, B. V.; SHIVA, S.; SINGH, S. V. Withaferin A-induced apoptosis in human breast cancer cells is mediated by reactive oxygen species. PloS one, v. 6, n. 8, p. e23354, 2011.

KIM, S. H.; HAHM, E. R.; SINGH, K. B.; SHIVA, S.; STEWART-ORNSTEIN, J.; SINGH, S. V. RNA-seq reveals novel mechanistic targets of withaferin A in prostate cancer cells. Carcinogenesis, v. 41, n. 6, p. 778-789, 2020.

KRUEGER, A.; SCHMITZ, I.; BAUMANN, S.; KRAMMER, P. H.; KIRCHHOFF, S. Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. Journal of Biological Chemistry, v. 276, n. 23, p. 20633-20640, 2001.

KUMAR, R.; NAYAK, D.; SOMASEKHARAN, S. P. SILAC-based quantitative MS approach reveals Withaferin A regulated proteins in prostate cancer. Journal of Proteomics, v. 247, p. 104334, 2021.

KUO, L. J.; YANG, L. X. γ-H2AX-a novel biomarker for DNA double-strand breaks. In vivo, v. 22, n. 3, p. 305-309, 2008.

LI, W.; ZHANG, C.; DU, H.; HUANG, V.; SUN, B.; HARRIS, J. P.; RICHARDSON, Q.; SHEN, X.; JIN, R.; LI, G.; KEVIL, C. G.; GU, X.; SHI, R.; ZHAO, Y. Withaferin A suppresses the up-regulation of acetyl-coA carboxylase 1 and skin tumor formation in a skin carcinogenesis mouse model. Molecular Carcinogenesis, v. 55, n. 11, p. 1739-1746, 2016.

LIU, Y.; YANG, S.; WANG, K.; LU, J.; BAO, X.; WANG, R.; QIU, Y.; WANG, T.; YU, H. Cellular senescence and cancer: Focusing on traditional Chinese medicine and natural products. Cell proliferation, v. 53, n. 10, p. e12894, 2020.

ISSN: 2447-6161

MUNIRAJ, N.; SIDDHARTH, S.; NAGALINGAM, A.; WALKER, A.; WOO, J.; GYORFFY, B.; GABRIELSON, E.; SAXENA, N. K.; SHARMA, D. Withaferin A inhibits lysosomal activity to block autophagic flux and induces apoptosis via energetic impairment in breast cancer cells. Carcinogenesis, v. 40, n. 9, p. 1110-1120, 2019.

NAEEM, A.; HU, P.; YANG, M.; ZHANG, J.; LIU, Y.; ZHU, W.; ZHENG, Q. Natural products as anticancer agents: Current status and future perspectives. Molecules, v. 27, n. 23, p. 8367, 2022.

PRABHU, K. S.; KUTTIKRISHNAN, S.; AHMAD, N.; HABEEBA, U.; MARIYAM, Z.; SULEMAN, M.; BHAT, A. A.; UDDIN, S. H2AX: A key player in DNA damage response and a promising target for cancer therapy. Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 175, p. 116663, 2024.

RONESS, H.; KASHI, O.; MEIROW, D. Prevention of chemotherapy-induced ovarian damage. Fertility and sterility, v. 105, n. 1, p. 20-29, 2016.

ROSARIO, R.; CUI, W.; ANDERSON, R. A. Potential ovarian toxicity and infertility risk following targeted anti-cancer therapies. Reproduction and Fertility, v. 3, n. 3, p. R147-R162, 2022.

XING, Z.; SU, A.; MI, L.; ZHANG, Y.; HE, T.; QIU, Y.; WEI, T.; LI, Z.; ZHU, J.; WU, W. Withaferin A: a dietary supplement with promising potential as an anti-tumor therapeutic for cancer treatment-pharmacology and mechanisms. Drug Design, Development and Therapy, p. 2909-2929, 2023.

XU, K.; ZHANG, C.; LI, Y.; XI, X.; ZHENG, L.; MENG, M.; LIU, T.; ZHAO, Y.; LI, W. Withaferin A suppresses skin tumor promotion by inhibiting proteasome-dependent isocitrate dehydrogenase 1 degradation. Translational Cancer Research, v. 8, n. 6, p. 2449, 2019.

ZHANG, X.; ZHANG, L.; YANG, H.; HUANG, X.; OTU, H.; LIBERMANN, T. A.; DEWOLF, W. C.; KHOSRAVI-FAR, R.; OLUMI, A. F. c-Fos as a proapoptotic agent in TRAIL-induced apoptosis in prostate cancer cells. Cancer research, v. 67, n. 19, p. 9425-9434, 2007.

ZHANG, Z.; YANG, Y.; XU, Y.; LIU, Y.; LI, H.; CHEN, L. Molecular targets and mechanisms of anti-cancer effects of withanolides. Chemico-Biological Interactions, p. 110698, 2023.

ISSN: 2447-6161