



IV ENCONTRO INTERNACIONAL DE BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE HUMANA E ANIMAL:

AVANÇOS E TENDÊNCIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA SAÚDE HUMANA E ANIMAL

EFEITOS DE VITANOLÍDEOS (VTA, VT1 E VT2) SOBRE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIIS DE CAMUNDONGOS

Gaby Judith Quispe Palomino¹; Alesandro Silva Ferreira²; Naiza Arcângela Ribeiro de Sá³
Ana Paula Ribeiro Rodrigues⁴

¹Doutoranda em Ciências veterinárias pela Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza-Ce; ²Graduando em Farmácia na Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Redenção-CE; ³Pós-doutoranda pelo Rede Nordeste de Biotecnologia, Fortaleza-CE ⁴Docente da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza-ce.

gaby.palomino@aluno.uece.br

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de vitaféris (VTA, VT1 e VT2) sobre os ovários saudáveis de camundongos. Para isso, o experimento foi dividido em duas fases em que camundongos fêmeas foram injetadas i.p. durante 15 dias. Na fase 1, as camundongas receberam injeções de salina (controle) ou 2 mg/kg das vitaféris em dias alternados. Após isso, parte das fêmeas foram eutanasiadas, e os ovários coletados para histologia clássica a fim de se avaliar a morfologia e desenvolvimento folicular, e as demais fêmeas foram submetidas ao acasalamento para avaliação da fertilidade. Na fase II, os filhotes fêmeas advindos do acasalamento foram divididos em seus respectivos tratamentos e receberam injeções i.p das vitaféris (5 ou 10 mg/Kg) em dias alternados. Ao fim da fase II, os animais foram eutanasiados e os ovários coletados para avaliação da morfologia, desenvolvimento e integridade do DNA de folículos pré-antrais. Quanto aos resultados na fase 1, observou-se que não houve diferenças entre os tratamentos com vitaféris em comparação ao grupo controle ($P > 0,05$) em nenhum dos parâmetros avaliados. Já na fase 2, observou-se que a concentração de 10 mg/Kg das diferentes vitaféris causou redução de folículos normais e aumento da fragmentação do DNA quando comparada ao controle ($P < 0,05$). Em conclusão, as vitaféris nas concentrações de 2 ou 5 mg/Kg não causaram toxicidade significativa em folículos pré-antrais de camundongos.

PALAVRAS-CHAVES: Vitaféris, ovário, fertilidade, folículos pré-antrais.

1 INTRODUÇÃO

Os avanços na terapia anticâncer com agentes quimioterápicos estão aumentando as taxas de sobrevivências dos pacientes oncológicos. No entanto, surge a preocupação em reduzir ou evitar os efeitos colaterais dos quimioterápicos, como a toxicidade ovariana que pode causar infertilidade (OKTAY et al., 2018, PALOMINO et al., 2021).

Os quimioterápicos possuem diferentes mecanismos de toxicidade nos ovários. Embora a maioria atue induzindo dano no DNA dos folículos, especificamente, os quimioterápicos interferem

nas diversas vias do ciclo celular, como replicação e transcrição do DNA, formação e função dos fusos e microtúbulos, o que inibe a mitose de células em rápida proliferação, levando ao dano celular e finalizando com a apoptose. Desse modo, os quimioterápicos podem atuar tanto nos folículos em desenvolvimento ao danificar as células da granulosa (BEDOSCHI, 2016), como sobre os folículos que estão quiescentes (WENNERS et al., 2017). Diante disso, atualmente busca-se novos quimioterápicos, principalmente de origem vegetal, que sejam menos tóxicos para os ovários.

Athenaea velutina é uma planta do nordeste que dentre seus metabólitos contém as vitaferinas, que possuem propriedades anti-inflamatórias, antifúngicas e anticancerígenas, cabendo destacar a 27-desoxi-24,25-epoxivitaferina A (VT1); 27-desoxivitaferina A (VT2) e vitaferina A (VTA). Apesar do que já se está elucidado sobre estes metabólitos, ainda não se sabe sobre o alvo ou efeitos dessas drogas sobre folículos ovarianos.

2 OBJETIVO

Avaliar os efeitos das vitaferinas (VTA, VT1 e VT2) sobre a morfologia, desenvolvimento, fragmentação do DNA em folículos ovarianos e sobre a fertilidade em camundongos.

3 MATERIAIS E MÉTODO

Este estudo investigou, em duas fases, os efeitos *in vivo* de VT1, VT2 e VTA em diferentes concentrações sobre a sobrevivência e desenvolvimento de folículos ovarianos pré-antrais de camundongos jovens.

Na fase I, camundongos fêmeas (n = 50) foram aleatoriamente distribuídas em cinco grupos que receberam injeção intraperitoneal (I.P.) de solução salina (controle; CTR), e dos fármacos VT1, VT2 ou VTA na concentração de 2 mg/Kg. Foram administradas 7 doses em dias alternados durante 15 dias. Após 17 dias da primeira administração, metade dos camundongos (n = 25) dos diferentes grupos foram sacrificados e os pares de ovários foram colhidos e encaminhados para análises morfológicas, através de histologia clássica. A outra parte dos animais (n = 25) foi realocada em gaiolas com dois ou três camundongos fêmeas e um macho, por um período de 14 dias, a fim de realizar o acasalamento para avaliação da fertilidade. As fêmeas nascidas a partir do acasalamento da fase I (n = 40), em seus respectivos grupos, foram destinados para a fase II, na qual receberam injeção I.P. de solução salina (controle; CTR), e os fármacos VT1, VT2 e VTA em duas diferentes doses: 5 ou 10 mg/Kg. Após a fase II, os animais foram eutanasiados e o ovários coletados para as seguintes análises: morfologia e desenvolvimento folicular por histologia e fragmentação do DNA por TUNEL.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao avaliarmos a morfologia folicular na *fase I*, não foram observadas diferenças entre os grupos ($P > 0,05$). Contudo, observou-se uma redução ($P < 0,05$) do percentual de primordiais e aumento ($P < 0,05$) dos folículos em desenvolvimento no grupo VT2 quando comparado ao CTR (Fig. 1).

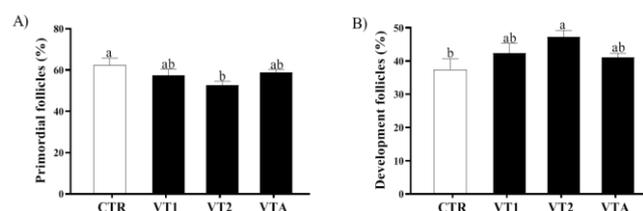


Figura 1: Porcentagens médias (\pm e.p.m.) de folículos morfologicamente normais classificados como: A) primordiais e em B) desenvolvimento em tecido ovariano de camundongo analisado por histologia. ^{a,b,c} Indicam diferenças significativas entre os tratamentos.

Na *fase II*, VT2 e VTA na concentração de 5 mg/Kg causaram redução ($P < 0,05$) no percentual de folículos morfologicamente normais quando comparado ao CTR (Fig. 3). No entanto, na concentração de 10 mg/Kg, todos os vitanoleídos reduziram ($P < 0,05$) o percentual de folículos normais comparado ao CTR ($P < 0,05$). Além disso, foi observada uma redução ($P < 0,05$) do percentual de folículos primordiais e aumento ($P < 0,05$) de folículos em desenvolvimento nos grupos VT1, VT2 e VTA, em ambas as concentrações, comparado ao CTR (Fig. 4).

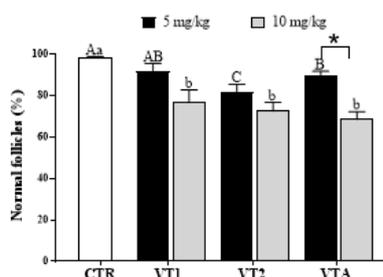


Figura 3: Porcentagens médias (\pm e.p.m.) de folículos morfologicamente normais. A,B,C Indica diferenças na comparação entre CTR com os diferentes vitanoleídos a 5mg/kg; ^{a,b,c} Indica diferenças entre CTR com os diferentes vitanoleídos a 10mg/kg. * Indica diferenças entre 5mg e 10mg/kg do mesmo vitanoleído analisado.

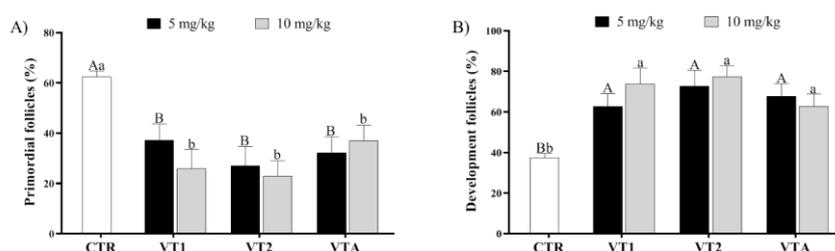


Figura 4: Porcentagens médias (\pm e.p.m.) de folículos classificados como: A) primordiais e B) desenvolvimento. A,B,C indicam diferenças na comparação entre CTR com os diferentes vitanoleídos a 5mg/kg; ^{a,b,c} Indica diferenças entre CTR com os diferentes vitanoleídos a 10mg/kg.

Quanto à análise de TUNEL, observamos que na dose de 10 mg/kg as vitaferinas (VTA, VT1 e VT2) causaram elevação ($P < 0,05$) nos níveis de fragmentação do DNA quando comparadas ao CRT ou a suas respectivas concentrações de 5mg/kg.

Diferentes fatores causam depleção da reserva ovariana, dentre elas a quimioterapia. Esse achado corrobora com a literatura na qual estudos mostram a depleção dos folículos pré-antrais em

camundongos tratados com ciclofosfamida (MEIROW et al., 1999). Os dados aqui apresentados indicam que esses fármacos foram capazes de recrutar os folículos quiescentes ativando-os massivamente, fato também observado em camundongos tratados com paclitaxel (GUCER et al., 2001) e ciclofosfamida (KASHI et al., 2023).

Nossos achados relacionados ao TUNEL estão de acordo com a literatura onde, potenciais quimioterápicos de origem vegetal, como oncocalyxona A (LEIVA-REVILLA et al., 2017) e quinoxalina (GUERREIRO et al., 2020), elevam a fragmentação do DNA em folículos ovarianos. Apesar disso, estudos ainda são necessários para discernir o mecanismo de ação de ambas as drogas.

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho, em baixas concentrações, as vitaferinas não causaram efeitos tóxicos aos folículos ovarianos. Estes achados são animadores na busca por novas drogas para tratamento do câncer em mulheres.

REFERÊNCIAS

- BEDOSCHI, G.; NAVARRO, P. A.; OKTAY, K. Chemotherapy-induced damage to ovary: mechanisms and clinical impact. *Future oncology*, v. 12, n. 19, p. 2333-2344, 2016.
- GUCER, F.; BALKANLI-KAPLAN, P.; DOGANAY, L.; YUCE, M. A.; DEMIRALAY, E.; SAYIN, N. C.; YARDIM, T. Effect of paclitaxel on primordial follicular reserve in mice. *Fertil Steril*; v. 76, p. 628–629, 2001.
- GUERREIRO, D. D.; LIMA, L. F.; SÁ, N. R. A.; MBEMYA, G. T.; FERREIRA, A. C. A.; ALVES, B. G.; MARANHÃO, S. S.; PESSOA, C. O.; PINHEIRO, A. C.; NOGUEIRA, T. C. M.; SOUZA, M. V. N.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Response of preantral follicles exposed to quinoxaline: A new compound with anticancer potential. *Research in veterinary science*, v. 128, p. 261-268, 2020.
- KASHI, O.; RONESS, H.; SPECTOR, I.; DERECH-HAIM, S.; MEIROW, D. Dual suppression of follicle activation pathways completely prevents the cyclophosphamide-induced loss of ovarian reserve. *Human reproduction* v. 38(6), p. 1086–1098, 2023.
- LEIVA-REVILLA, J.; CADENAS, J.; VIEIRA, L. A.; CAMPELLO, C. C.; CELESTINO, J. J. H.; PESSOA, O. D. L.; APGAR, G. A.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R.; MASIDE, C. Toxicity effect of Auxemma oncocalyx fraction and its active principle oncocalyxone A on in vitro culture of caprine secondary follicles and in vitro oocyte maturation. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 38, n. 3, p. 1361-1373, 2017.
- MEIROW, D.; LEWIS, H.; NUGET, D.; EPSTEIN, M. 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.
- OKTAY, K.; HARVEY, B. E.; PARTRIDGE, A. H.; QUINN, G. P.; REINECKE, J.; TAYLOR, H. S.; WALLACE, W. H.; WANG, E. T.; LOREN, A. W. Fertility preservation in patients with cancer: ASCO clinical practice guideline update. *Journal of Clinical Oncology*, v. 36, n. 19, p. 1994-2001, 2018.
- PALOMINO, G. J. Q.; SÁ, N. A. R.; GUERREIRO, D. D.; GOMES, F. D. R.; SILVA, R. F.; LOPES, F. E. F.; PAES, V. M.; GATÍ, P. H. S.; ALVES, B. G.; PESSOA, O. D. L.; FIGUEIREDO, J. R.; ROCHA, R. M. P.; RODRIGUES, A. P. R. 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.
- WENNERS, A.; GRAMBACH, J.; KOSS, J.; MAASS, N.; JONAT, V.; SCHMUTZLER, A.; MUNDHENKE, C. Reduced ovarian reserve in young early breast cancer patients: preliminary data from a prospective cohort trial. *BMC Câncer*. v. 17, p. 1-9, 2017.