



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS

PAULA GABRIELA ALVES DE SOUSA

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO *IN VIVO* DE DERIVADOS DE VITANOLÍDEOS SOBRE
A SENESCÊNCIA EM OVÁRIOS DE CAMUNDONGOS FÊMEAS**

FORTALEZA

2026

PAULA GABRIELA ALVES DE SOUSA

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO *IN VIVO* DE DERIVADOS DE VITANOLÍDEOS SOBRE A
SENESCÊNCIA EM OVÁRIOS DE CAMUNDONGOS FÊMEAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Morfofuncionais. Área de Concentração: Biologia da Reprodução.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Ribeiro Rodrigues.

Coorientadora: Profa. Dra. Ana Beatriz Graça Duarte.

FORTALEZA

2026

PAULA GABRIELA ALVES DE SOUSA

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO *IN VIVO* DE DERIVADOS DE VITANOLÍDEOS SOBRE A
SENESCÊNCIA EM OVÁRIOS DE CAMUNDONGOS FÊMEAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Morfofuncionais. Área de concentração: Biologia da Reprodução.

Aprovada em: 31/03/2026.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a. Ana Paula Ribeiro Rodrigues (Orientadora)

Universidade Estadual do Ceará – UECE

Prof.^a Dr.^a. Ana Beatriz Graça Duarte (Co-Orientadora)

Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Éverton Pimentel Ferreira Lopes

Universidade Estadual do Ceará – UECE

A Deus.

Ao meu esposo, Jonathan e nossa filha, Bianca.

Às minhas mães, Francilene e mainha (*in memoriam*).

Com todo o meu amor, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder força e sabedoria diariamente. À Nossa Senhora, minha intercessora do céu, por me dar o amparo necessário durante essa caminhada acadêmica.

Ao meu esposo, Jonathan. Por todo amor, por me incentivar a seguir meus sonhos e pela parceria, em casa e na pesquisa. Obrigada por tudo! Eu te amo.

À minha querida e amada filha, Bianca Maria. Que me acompanha nos estudos desde a graduação, quando tinha apenas 25 dias de vida. Essa conquista é para você, que é minha força e inspiração. Que você veja os estudos como uma ferramenta valiosa para a vida.

À minha mãe, Francilene, a mulher mais incrível que eu conheço nesse mundo. Obrigada por me apoiar sempre, me incentivar, me ouvir e ser colo quando preciso. Eu te amo demais!

À mainha, dona Benedita (*in memorian*), que sempre acreditou na educação e proporcionou aos filhos e netos a via dos estudos. Sei o quanto estás feliz aí no céu com mais essa conquista.

Aos meus sogros, Eliane e Heldenio; minha cunhada, Jennefer e seu esposo, Pedro, e meu amado sobrinho, Theo. Por acreditarem tanto em mim, até mesmo quando eu não achava ser possível. Sou muito abençoada em tê-los como família.

Aos amigos que a pós-graduação me presenteou: Júnior, Norma, Thamyres, Flávinny, Monique, Tayane, Aline, Lorrany, Aryan, meus mais sinceros agradecimentos por tornarem essa jornada mais leve.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pela concessão da bolsa e incentivo financeiro para a realização desta pesquisa.

À Universidade Federal do Ceará (UFC), Universidade Estadual do Ceará (UECE) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais (PPG/PCMF); aos professores e funcionários por terem contribuído com minha formação profissional e acadêmica.

À minha orientadora, Profa. Dra. Ana Paula Ribeiro Rodrigues, minha sincera gratidão pela oportunidade de ingressar na equipe e pelos ensinamentos que me foi dado ao longo desse período.

À minha Co-orientadora, Profa. Dra. Ana Beatriz Graça Duarte, por toda ajuda, pela paciência

e dedicação a este trabalho.

Ao laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovariano Pré-Antrais (LAMOFOPA-UECE) pelo suporte na realização deste trabalho; além da contribuição de cada membro (alunos de iniciação científica, mestrado, doutorado e pós-docs). Em especial, ao Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo, coordenador do laboratório, por ser exemplo enquanto profissional e como pessoa. Aos queridos, senhor João e senhor César, por tanto cuidado e por todos os cafezinhos.

Aos professores, Dr. Gildas Mbemya Tetaping e Dr Éverton Pimentel Ferreira Lopes, pelas contribuições valiosas e pela dedicação na correção deste trabalho.

RESUMO

A quimioterapia permanece como a principal estratégia terapêutica no tratamento do câncer, entretanto, seu uso está associado à indução de falência ovariana prematura, impactando severamente a qualidade de vida de mulheres em idade reprodutiva. Agentes antineoplásicos podem acelerar o envelhecimento ovariano através da indução de senescência celular, um estado de parada irreversível do ciclo celular associado a um fenótipo secretor inflamatório (SASP). Nesse contexto, busca-se identificar novos compostos com potencial antitumoral que apresentem menor gonadotoxicidade. Dentre esses candidatos, destacam-se os vitanolídeos, metabólitos secundários isolados da planta *Athenaea velutina*, que demonstraram propriedades antiproliferativas relevantes. Assim, este estudo avaliou, a longo prazo, os efeitos da exposição *in vivo* aos derivados de vitanolídeos na sobrevivência folicular, ativação e indução de senescência em ovários de camundongos. Para isso, foram utilizadas camundongos-fêmeas C57BL/6J, distribuídas em grupos controles jovem (6w) e idoso (1y) e tratadas com 2 mg/kg de Withaferina A (WTA), 27-desoxi-24,25-epoxiwithaferina A (WT1) e 27-desoxiwithaferina (WT2) por 14 dias alternados. Após um ano, realizou-se análise da morfologia, desenvolvimento e sobrevivência folicular (PAS); quantificação de lipofuscina (Sudan Black B); avaliação de fibrose estromal (Tricrômico de Masson); e detecção de fragmentação de DNA (TUNEL). Os resultados demonstraram que o envelhecimento natural (grupo 1y) reduziu o desenvolvimento folicular e aumentou significativamente a deposição de lipofuscina no tecido ovariano. O tratamento com WT1 preveniu o acúmulo desse pigmento e preservou a proporção de folículos em desenvolvimento em níveis semelhantes aos do controle jovem (6w); contudo, induziu elevada fragmentação do DNA e fibrose moderada, sugerindo um quadro de toxicidade celular e *burnout* folicular. Por outro lado, o WT2 exibiu um perfil citoprotetor sobre o estroma, mantendo a integridade tecidual com níveis basais de fibrose e de fragmentação de DNA equivalentes aos do grupo jovem. Em contraste, o WTA apresentou-se como o derivado mais gonadotóxico, desencadeando senescência precoce associada a um exacerbado acúmulo de lipofuscina e intensa deposição fibrótica no estroma. Esses achados indicam que os derivados de vitanolídeos exercem efeitos distintos sobre o ovário a longo prazo. Embora o WT1 evite o acúmulo de alguns marcadores de senescência, sua ação está associada à toxicidade apoptótica e ao *burnout* folicular. Em contrapartida, o WT2 destaca-se pela proteção da integridade do estroma induzindo quiescência celular. O estudo demonstra o potencial desses compostos na modulação da senescência ovariana, ressaltando o derivado WT2 como um candidato quimioterápico promissor, capaz de visar não apenas o combate ao tumor, mas também a redução dos danos tardios à reserva ovariana.

Palavras-chave: toxicidade; envelhecimento; foliculogênese; *Athenaea velutina*

ABSTRACT

Chemotherapy remains the main therapeutic strategy in cancer treatment; however, its use is associated with the induction of premature ovarian failure, severely impacting the quality of life of women of reproductive age. Antineoplastic agents can accelerate ovarian aging through the induction of cellular senescence, a state of irreversible cell cycle arrest associated with an inflammatory secretory phenotype (SASP). In this context, the aim is to identify new compounds with antitumor potential that exhibit lower gonadotoxicity. Among these candidates, withanolides stand out, which are secondary metabolites isolated from the plant *Athenaea velutina* that have demonstrated relevant antiproliferative properties. Thus, this study evaluated, in the long term, the effects of *in vivo* exposure to withanolide derivatives on follicular survival, activation, and induction of senescence in mouse ovaries. For this purpose, C57BL/6J female mice were used, distributed into week old (6w) and 1 year old (1y) control groups and treated with 2 mg/kg of Withaferin A (WTA), 27-deoxy-24,25-epoxywithaferin A (WT1), and 27-deoxywithaferin (WT2) on alternate days for 14 days. After one year, the analysis of morphology, follicular development and survival (PAS); quantification of lipofuscin (Sudan Black B); evaluation of stromal fibrosis (Masson's Trichrome); and detection of DNA fragmentation (TUNEL) were performed. The results demonstrated that natural aging (group 1y) reduced follicular development and significantly increased lipofuscin deposition in the ovarian tissue. Treatment with WT1 prevented the accumulation of this pigment and preserved the proportion of developing follicles at levels similar to those of the young control (6w); however, it induced high DNA fragmentation and moderate fibrosis, suggesting a condition of cellular toxicity and follicular *burnout*. On the other hand, WT2 exhibited a cytoprotective profile on the stroma, maintaining tissue integrity with basal levels of fibrosis and DNA fragmentation equivalent to those of the young group. In contrast, WTA presented itself as the most gonadotoxic derivative, triggering premature senescence associated with an exacerbated accumulation of lipofuscin and intense fibrotic deposition in the stroma. These findings indicate that withanolide derivatives exert distinct long-term effects on the ovary. Although WT1 avoids the accumulation of some senescence markers, its action is associated with apoptotic toxicity and follicular burnout. In contrast, WT2 stands out for the protection of stromal integrity by inducing cellular quiescence. The study demonstrates the potential of these compounds in the modulation of ovarian senescence, highlighting the derivative WT2 as a promising chemotherapeutic candidate capable of aiming not only at combating the tumor, but also at reducing late damage to the ovarian reserve.

Keywords: toxicity; aging; folliculogenesis; *Athenaea velutina*

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1 – Esquema representativo da foliculogênese 15

Figura 2 – Estrutura química dos Vitanolídeos (WTA, WT1, WT2) 21

ARTIGO TÉCNICO

Figura 1 – Representação esquemática do delineamento experimental. Camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6J foram distribuídos em grupos controle (6 semanas – 6w; e 1 ano – 1y) e grupos tratados que receberam administração intraperitoneal (i.p.) de derivados de vitanolídeos (2 mg/kg): Withaferina A (WTA), 27-desoxi-24,25-epoxiwithaferina A (WT1) e 27-desoxiwithaferina A (WT2) 29

Figura 2 – Avaliação da morfologia folicular em ovários de camundongos fêmeas dos grupos controle (6w e 1y) e tratados com 2 mg/kg dos derivados de vitanolídeos WTA, WT1 e WT2. (A) Porcentagem de folículos pré-antrais morfologicamente normais por categoria (primordiais, primários e secundários). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$). (B) Imagens representativas de folículos morfologicamente normais (a–c). As setas azul, amarela e vermelha indicam folículos primordial, primário e secundário, respectivamente 33

Figura 3 – Desenvolvimento folicular em ovários de camundongos dos grupos controle (6w e 1y) e tratados (WTA, WT1, WT2). Percentual de folículos em desenvolvimento (folículos primário e secundário morfologicamente normais). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$) 34

Figura 4 – Acúmulo de lipofuscina no tecido ovariano de camundongos dos grupos controle (6w e 1y) e tratados com vitanolídeos (WTA, WT1 e WT2). A) Percentagem média (\pm EPM) de células marcadas. B) Fotomicrografias representativas do tecido ovariano corado com Sudan Black B (20 \times), evidenciando grânulos de lipofuscina (a-e). Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$). As barras representam média \pm EPM 35

Figura 5 – Quantificação da fibrose estromal no tecido ovariano de camundongos dos grupos controle (6w e 1y) e tratados com vitanolídeos (WTA, WT1 e WT2). Os valores representam a porcentagem de área positiva para colágeno (%) detectada pela coloração de Tricrômico de Masson. As barras representam média \pm EPM. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) 36

Figura 6 – Fragmentação de DNA no tecido ovariano avaliada pelo ensaio de TUNEL em camundongos fêmeas dos grupos controle (6w e 1y) e tratados com derivados de vitanolídeos (WTA, WT1 e WT2). (A) Quantificação da densidade de células apoptóticas (TUNEL⁺/mm²). (B) Imagens representativas da imunofluorescência de TUNEL no tecido ovariano. As barras representam média \pm erro padrão da média (EPM). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$). Aumento: 400 \times ; barra de escala = 20 μ m 37

Figura 7 – Avaliação da proliferação celular no tecido ovariano por imunomarcação de PCNA. A) Análise quantitativa de células PCNA-positivas no estroma e nos folículos. B) Fotomicrografias da imunomarcação de PCNA em células estromais (a-e). Barras indicam média \pm EPM. Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$). Image magnification = 200 \times ; scale bars = 1000 μ m 38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumina de Soro Bovino)
CDKIs	<i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors</i> (Inibidores de Quinase Dependentes de Ciclina)
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CG	Células da Granulosa
CONCEA	Sistema Integrado de Bibliotecas
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMS	Diferença Mínima Significativa
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucléico)
FOPA	Folículos Pré-antrais
FSAS	Fenótipo Secretor Associado à Senescência
PAF	Paraformaldeído
PAS-H	Ácido Periódico de Schiff-Hematoxilina
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> (Solução Salina Tamponada com Fosfato)
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i> (Antígeno Nuclear de Proliferação Celular)
SASP	<i>Senescence-Associated Secretory Phenotype</i> (Fenótipo Secretor Associado à Senescência)
SBB	Sudan Black B
SIPS	Senescência Precoce Induzida por Estresse (<i>Stress-Induced Premature Senescence</i>)
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>
VT1	27-desoxi-24,25-epoxivitaferina A
VT2	27-desoxivitaferina A
VTA	Vitaferina A
WT1	27-desoxi-24,25-epoxiwithaferina A
WT2	27-desoxiwithaferina A
WTA	Withaferina A

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
<	Menor que
>	Maior que
°C	Graus Celsius
µm	Micrômetro
®	Marca Registrada
'	Aspas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 Morfologia da gônada feminina.....	17
2.2 Oogênese e foliculogênese.....	17
2.3 Morte celular e senescência ovariana.....	19
2.4 Marcadores de senescência celular no ovário.....	20
2.4.1 Marcadores de dano ao DNA e apoptose.....	21
2.4.2 Marcadores de proliferação celular e reguladores do ciclo celular.....	21
2.4.3 Acúmulo de lipofuscina.....	21
2.5 Toxicidade dos antineoplásicos no ovário.....	22
2.6 Busca por novos compostos naturais anticancerígenos.....	23
2.6.1 Vitanolídeos.....	24
3 JUSTIFICATIVA.....	25
4 HIPÓTESE CIENTÍFICA.....	26
5 OBJETIVOS.....	26
5.1 Geral.....	26
5.2 Específicos.....	26
6 ARTIGO TÉCNICO.....	27
7 CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS.....	35

1 INTRODUÇÃO

Para meninas e mulheres em idade reprodutiva, a gonadotoxicidade decorrente do uso de antineoplásicos após tratamento quimioterápico, representa um grande impacto na fertilidade, pois podem culminar na depleção acelerada da reserva folicular e na indução da Falência Ovariana Prematura (FOP) (Yavari et al., 2025; Wu et al., 2024). O dano induzido por agentes quimioterápicos ao ovário, não ocorre exclusivamente pela indução da morte celular programada (apoptose) dos oócitos e células foliculares, mas também por perturbação no microambiente ovariano. Diversas classes de antineoplásicos, a exemplo da doxorrubicina, cisplatina e ciclofosfamida, têm sido reportadas indutores da senescência celular precoce no estroma ovariano (Xu et al., 2023; Du et al., 2022; Gao et al., 2023).

A senescência caracteriza-se por uma parada irreversível do ciclo celular, associada a danos persistentes ao DNA e resistência à apoptose. As células senescentes acumulam no tecido e expressam o Fenótipo Secretor Associado à Senescência (SASP), liberando de forma contínua citocinas pró-inflamatórias, deposição anormal de fibras de colágeno, acúmulo de lipofuscina e danos ao DNA, levando à exaustão e fibrose do tecido ovariano adjacente (Guo et al., 2024). Para mitigar a gonadotoxicidade severa induzida pelas terapias convencionais, busca-se identificar compostos antitumorais que preservem a integridade do sistema reprodutor. Nesse cenário, produtos de origem natural representam uma fonte relevante de novas moléculas terapêuticas. Dentre elas, destacam-se os vitanolídeos, lactonas esteroidais extraídas de plantas da família *Solanaceae*, como a *Athenaea velutina*, espécie endêmica brasileira amplamente investigada por seu potencial biológico (Rodrigues; Knapp; Stehmann, 2019).

Estudos prévios corroboram as potentes propriedades antiproliferativas e pró-apoptóticas de derivados específicos de vitanolídeos, como a Withaferina A (WTA), a 27-desoxi-24,25-epoxiwithaferina A (WT1) e a 27-desoxiwithaferina (WT2). Estes compostos demonstraram expressiva citotoxicidade contra diversas linhagens de células cancerígenas humanas, incluindo tumores do sistema nervoso central (SNB-19), próstata (PC-3), cólon (HCT-116) e leucemia (HL-60), em baixas concentrações inibitórias que variaram entre 0,19 e 8,96 µg/mL (Kumar, 2023; Dantas Rocha et al., 2025). No entanto, a investigação de seus impactos no sistema reprodutor é indispensável. Nesse contexto, avaliando a toxicidade ovariana, Guerreiro et al. (2019) evidenciaram que a exposição *in vitro* ao vitanolídeo D promoveu toxicidade sobre o desenvolvimento de folículos pré-antrais caprinos, exibindo um perfil de degeneração semelhante ao induzido pelo quimioterápico paclitaxel. Por outro lado, recentemente, um estudo *in vivo* desenvolvido por Palomino et al. (2024) demonstrou que a

administração sistêmica desses mesmos derivados (WTA, WT1 e WT2) exibiu baixa toxicidade sobre o desenvolvimento de folículos pré-antrais murinos na concentração de 2 mg/kg, sugerindo uma seletividade favorável às células de alta divisão metabólica sem comprometer imediatamente a fertilidade.

Diante do exposto e para um melhor entendimento do presente estudo, a revisão de literatura a seguir abordará tópicos essenciais sobre a morfologia ovariana, a oogênese, a foliculogênese e a morte celular associada à senescência ovariana. Serão abordados também os marcadores de senescência celular no ovário, a toxicidade dos agentes antineoplásicos no tecido ovariano e a busca por novos compostos naturais anticancerígenos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Morfologia da gônada feminina

O ovário mamífero atua como a gônada feminina, sendo fundamental para a perpetuação da espécie por meio da produção e armazenamento das células germinativas (oócitos). Além disso, também funciona como uma glândula endócrina, controlando a fisiologia, o desenvolvimento e as características sexuais secundárias através da produção hormonal (Edson *et al.*, 2009). Anatomicamente, este órgão é composto por duas regiões: a medular e a cortical. A medula é a porção interna, rica em vasos sanguíneos, nervos e tecido conjuntivo, sendo responsável por fornecer suporte estrutural e nutrição ao órgão. A região cortical, por sua vez, abriga os oócitos e a maioria dos folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento. É também no córtex onde se encontra a reserva ovariana, formada por milhares de folículos primordiais que compõem o estoque de gametas femininos (Neto *et al.*, 2024).

O microambiente ovariano é o local de ocorrência de dois processos biológicos fundamentais: a oogênese e a foliculogênese. Esses eventos, coordenados por uma cascata de sinalização e eventos sequenciais, promovem alterações estruturais e funcionais no oócito e nas células foliculares. Essa complexa coordenação é essencial para a diferenciação celular, o desenvolvimento folicular e a maturação oocitária subsequente (Bonnet *et al.*, 2013). O folículo ovariano é a unidade morfológica e funcional básica do ovário mamífero. Seu papel fundamental é abrigar o oócito, estabelecendo um ambiente protetor ideal e propício para que seu crescimento, desenvolvimento e maturação ocorram de maneira satisfatória (Gomes *et al.*, 2021).

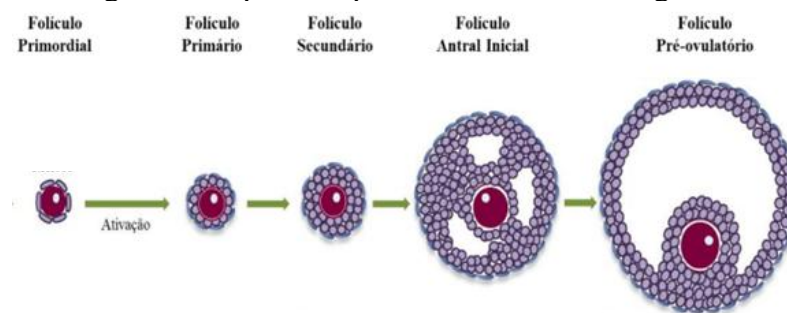
2.2 Oogênese e foliculogênese

A oogênese inicia-se no desenvolvimento fetal, quando as células germinativas primordiais (CGPs) migram do epiblasto para o saco vitelino e, subsequentemente, para gônada primitiva (Mclaren, 2000). Nesta gônada, as CGPs realizam mitose e se diferenciam até a formação de oogônias, que evoluem para oócitos primários. Estes oócitos interrompem sua divisão celular e entram em um estado de dormência na Prófase I da primeira meiose, onde permanecem até serem ativados para prosseguir com o processo meiótico (Arhin *et al.*, 2018). Paralelamente ocorre a foliculogênese, processo responsável pela formação, crescimento e desenvolvimento dos folículos ovarianos (Silva *et al.*, 2017). O folículo é reconhecido como a

unidade morfofuncional do ovário dos mamíferos, podendo ser classificado de acordo com seu estágio de desenvolvimento em *pré-antrais* (primordial, primário e secundário) e *antrais* (terciário e pré-ovulatório). Esta classificação é caracterizada pela ausência ou presença de uma cavidade repleta de líquido, denominada antro (Figueiredo *et al.*, 2011).

Aproximadamente 90 a 95% da população folicular é constituída por folículos pré-antrais, os quais são diferenciados pelo tamanho, forma e número de camadas de células da granulosa (CG) circundante ao oócito (Santos *et al.*, 2018). Os folículos primordiais são constituídos por uma única camada de células somáticas pavimentosas (pré-granulosa) (Grossman; Shalgi, 2016). A ativação do folículo primordial culmina no aumento do volume citoplasmático e na alteração da morfologia das células da granulosa, que adquirem formato cúbico, caracterizando o folículo primário (Basso; Esper, 2002; Fair *et al.*, 1997). O folículo secundário, por sua vez, é definido pela multiplicação das células da granulosa em duas ou mais camadas completas. A partir desse estágio, as células da teca começam a se organizar na periferia. Por fim, os folículos terciários (antrais) são caracterizados pela presença de uma cavidade antral (Hyttel *et al.*, 1997). No entanto, devido a um processo fisiológico que pode ocorrer por diferentes vias apoptóticas ou degenerativas, denominado atresia, a grande maioria desses folículos não alcança o estágio de folículos pré-ovulatórios (Figueiredo *et al.*, 2008).

Figura 1: Esquema representativo da foliculogênese.



Fonte: Adaptado de Sá *et al.*, 2019

A quantidade de folículos totais na população feminina após o nascimento é de aproximadamente 2.000.000 (Baker, 1963). No entanto, esses folículos sofrem redução contínua ao longo da vida reprodutiva, podendo essa redução iniciar entre os 20 anos e intensificar aos 30 anos de idade (Eijkemans *et al.*, 2014; Mneimneh *et al.*, 2013). A redução do número de folículos é acompanhada pela diminuição da qualidade oocitária com o avançar da idade da fêmea (Secomandi *et al.*, 2022), caracterizando o processo contínuo de depleção da reserva folicular. Com o tempo, essa redução progressiva da fertilidade é uma das principais

características do envelhecimento ovariano em mamíferos, também conhecido por senescência ovariana (Du *et al.*, 2022).

2.3 Morte celular e senescência ovariana

A drástica redução da reserva folicular que ocorre ao longo da vida reprodutiva da fêmea é atribuída a dois fenômenos fisiológicos principais: a ovulação e a atresia folicular (Shaw *et al.*, 2000). Nos ovários de mamíferos, a eficiência reprodutiva é drasticamente limitada pela atresia folicular, um processo que leva à degeneração de 99% dos folículos; apenas 1% completa a maturação e a ovulação. Este fenômeno de perda celular é estritamente regulado por um mecanismo crucial, a morte celular programada, ou apoptose, que desempenha papel central tanto na seleção folicular quanto na manutenção da homeostase ovariana (Xi *et al.*, 2024).

A apoptose é um processo celular altamente regulado, essencial para a manutenção da homeostase tecidual. Uma de suas características fundamentais é a natureza não inflamatória da morte celular, protegendo o tecido das consequências danosas de uma resposta inflamatória (Salminen *et al.*, 2011). Enquanto a senescência celular, representa um destino celular distinto, no qual a célula interrompe permanentemente seu ciclo proliferativo, mantendo-se metabolicamente ativa, com consequências teciduais importantes, especialmente com o avançar da idade (Victorelli *et al.*, 2024). No contexto ovariano, a apoptose é o mecanismo que governa a atresia e sua detecção pode ser realizada pela identificação de enzimas-chave, como a caspase-3 ativada, e pela fragmentação do DNA nuclear em células somáticas e oócitos, utilizando técnicas como o TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) (Liu *et al.*, 2023) (Liu *et al.*, 2023). Ainda que fisiológica, a atresia pode ser antecipada e/ou acelerada precocemente em mulheres jovens após a exposição a agentes tóxicos, como os agentes quimioterápicos, resultando em falência ovariana precoce (Guerreiro *et al.*, 2015).

Em contraste, a senescência celular é um processo pelo qual as células sofrem uma parada permanente no ciclo celular em resposta a diferentes estímulos de estresse (Du *et al.*, 2022). Existem dois principais tipos de senescência celular: 1) induzida por estresse, que ocorre em resposta à eventos moleculares, como danos ao DNA; e 2) replicativa, resultando do encurtamento dos telômeros (Teixeira & Guariento, 2010). O fenótipo senescente caracteriza-se morfológicamente pela presença de células com citoplasma expandido e achatado, além de núcleos hipertróficos (Xiao *et al.*, 2023). Molecularmente, o bloqueio do ciclo celular é orquestrado pela superexpressão de inibidores de quinase dependentes de ciclina (CDKIs), notavelmente p16 e p21. A expressão desses marcadores, em conjunto com a ausência do

marcador de proliferação PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), é fundamental para identificar células senescentes (Saito; Yamamoto; Chikenji, 2024).

Embora a senescência desempenhe funções fisiológicas cruciais no desenvolvimento normal e na manutenção da homeostase tecidual, com sua regulação sendo influenciada pelo nível e duração da exposição ao indutor inicial da senescência e pelo tipo de célula (Roger; Tomas; Gire *et al.*, 2021). À medida que as células entram em um estado senescente, elas secretam uma variedade de citocinas, fatores de crescimento, mediadores inflamatórios e proteínases, coletivamente chamados de fenótipo secretor associado à senescência (SASP) (Guo *et al.*, 2024). A remoção adequada de células senescentes é crucial para eliminar SASP e restaurar a função tecidual de forma eficiente (Ritschka *et al.*, 2017).

Nesse sentido, o acúmulo de células senescentes afeta negativamente a capacidade regenerativa dos tecidos, sendo um dos principais mecanismos subjacentes ao envelhecimento ovariano e à falha ovariana prematura (Secomandi *et al.*, 2022). Portanto, a identificação de células senescentes no tecido ovariano é fundamental para o entendimento das alterações funcionais que ocorrem com o envelhecimento ou em resposta a agentes lesivos, como os quimioterápicos.

2.4 Marcadores de senescência celular no ovário

A identificação de células senescentes no ovário requer a combinação de múltiplos biomarcadores devido a não existência de um marcador único e universal (Gorgoulis *et al.*, 2019). Assim, para confirmar a senescência celular faz-se necessária a combinação de indicadores como: a presença de dano ao DNA (TUNEL), ausência de proliferação celular (PCNA), acúmulo de grânulos de lipofuscina e expressão de um fenótipo secretor pró-inflamatório (SASP) (Gao *et al.*, 2023). Essa estratégia combinada de avaliações tem sido amplamente adotada em estudos recentes sobre senescência tecidual e envelhecimento ovariano (Kudlova; De Sanctis; Hajduch, 2022; Yan *et al.*, 2024).

No ovário, o acúmulo de células senescentes tem sido relacionado ao envelhecimento fisiológico, mas também à disfunção induzida por tratamentos antineoplásicos. Embora a senescência celular possa atuar como mecanismo protetor contra proliferação descontrolada (ex.: câncer, fibrose), o acúmulo persistente dessas células contribui para processos degenerativos e inflamatórios (McHugh, Durán & Gil, 2025). Portanto, a identificação precoce desses marcadores é essencial para a avaliação do impacto de quimioterápicos sobre a reserva

folicular e para o desenvolvimento de estratégias de preservação da fertilidade.

2.4.1 Marcadores de dano ao DNA e apoptose

O ensaio TUNEL identifica quebras no DNA, evento característico da apoptose e estado celular associado a danos genotóxicos relevantes. A técnica utiliza a enzima terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT), que catalisa a incorporação de nucleotídeos marcados nas extremidades 3'-OH livres geradas durante a fragmentação do DNA. Esses nucleotídeos são posteriormente detectados por anticorpos conjugados a fluoróchromos, permitindo a visualização e quantificação das células com elevado grau de dano ao DNA (Darzynkiewicz; Galkowski; Zhao, 2008). No tecido ovariano, a marcação por TUNEL deve ser interpretada em associação com marcadores de apoptose e senescência, permitindo a correta distinção entre morte celular programada e respostas celulares adaptativas ao estresse genotóxico induzido por quimioterápicos.

2.4.2 Marcadores de proliferação celular

A avaliação de marcadores de proliferação celular como o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) é amplamente utilizada para identificar células em atividade proliferativa. Essa técnica baseia-se na detecção nuclear do PCNA por meio de anticorpos específicos, permitindo a visualização e a quantificação de células proliferativas em cortes histológicos (Tan; Fleming, 2004; Liu et al., 2020). No contexto da senescência ovariana, a redução da marcação por PCNA constitui um indicador funcional de parada proliferativa celular, devendo ser interpretada em associação com marcadores de danos ao DNA e apoptose, para diferenciar senescência de quiescência ou morte celular programada.

2.4.3 Acúmulo de lipofuscina

Classicamente denominada como "pigmento do envelhecimento", a lipofuscina é constituída por agregados altamente oxidados e reticulados de proteínas, lipídeos e metais de transição (Brunk; Terman, 2002). O acúmulo intracelular desse composto é uma das características morfológicas mais consistentes do envelhecimento tecidual. Estes polímeros insolúveis depositam-se progressivamente no compartimento lisossomal de células pós-mitóticas e senescentes, num processo decorrente do declínio funcional dos sistemas de

degradação celular, notadamente a via ubiquitina-proteassoma e os mecanismos de autofagia (Höhn; Grune, 2013).

No microambiente ovariano, o estresse oxidativo e os danos ao DNA induzidos por agentes genotóxicos, a exemplo dos compostos antineoplásicos, aceleram significativamente a formação e a deposição desse pigmento. O acúmulo de lipofuscina nas células do estroma reflete o dano oxidativo cumulativo, correlacionando-se fortemente com a exaustão fisiológica do órgão, a disfunção orgânica e o estabelecimento SASP (Gao et al., 2023; Hense et al., 2024). Dessa forma, a identificação *in situ* deste pigmento atua como um parâmetro robusto para a avaliação do envelhecimento reprodutivo fisiológico e patológico.

Para o diagnóstico da senescência ovariana e distinção entre células metabolicamente saudáveis e senescentes, a coloração com *Sudan Black B* (SBB) consolida-se como uma ferramenta metodológica indispensável (Evangelou et al., 2017). O SBB é um corante diazo lipofílico que apresenta elevada afinidade pelos componentes lipídicos oxidados e não extraíveis que estruturam os grânulos de lipofuscina (Georgakopoulou et al., 2013).

2.5 Toxicidade dos antineoplásicos no ovário

A quimioterapia permanece sendo o tratamento mais prevalente para o câncer, e os avanços terapêuticos têm elevado significativamente as taxas de cura e sobrevivência dos pacientes (De et al., 2022; Sung et al., 2021). Entretanto, os quimioterápicos atuam de forma inespecífica, afetando células normais que compartilham características com as tumorais, como alta taxa de proliferação e intensa atividade mitótica. Entre os tecidos mais vulneráveis, destaca-se o ovário, cuja função reprodutiva pode ser comprometida (Morgan et al., 2012). Os principais efeitos colaterais do uso de quimioterápicos destaca-se a gonadotoxicidade, podendo resultar na falência ovariana prematura, devido à drástica redução dos folículos ovarianos, culminando em infertilidade (Du et al., 2022; Bedoschi et al., 2016). Em nível celular, o dano induzido pela quimioterapia leva ao acúmulo de células senescentes no microambiente ovariano. Estas, por sua vez, secretam um conjunto de mediadores pró-inflamatórios conhecido como SASP, contribuindo diretamente para o envelhecimento ovariano acelerado (Hense et al., 2022). Os principais mecanismos envolvidos na gonadotoxicidade causada pelos quimioterápicos são multifatoriais, incluindo a depleção de folículos primordiais e indução de apoptose; e o grau de dano causado depende de fatores como o tipo de medicamento, dosagem e protocolo estabelecido (Bedoschi et al., 2016).

No entanto, a disfunção celular é uma consequência direta da genotoxicidade dos agentes antineoplásicos, que induzem danos extensos ao DNA, predominantemente na forma

de quebras de fita dupla (Zhang et al., 2023). Diante desse insulto genotóxico, as células ovarianas podem ativar vias de resposta distintas, como 1) a apoptose, que é desencadeada quando o dano se torna irreparável, culminando na eliminação do folículo por morte programada, ou 2) a Senescência Precoce Induzida por Estresse (SIPS), uma parada proliferativa permanente, como tentativa de prevenir a progressão de mutações (Muthamil et al., 2024). Quando ativada, a via apoptótica, mediada pela cascata de caspases, atua como um importante marcador de morte celular, sendo possível detectar a fragmentação do DNA através do ensaio de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*). Por outro lado, a diminuição ou ausência de proliferação, utilizando o marcador PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) (Saito; Yamamoto; Chikenji, 2024). Dessa forma, diversos estudos têm sido realizados na busca por compostos naturais que atuem como anticancerígenos reduzindo os efeitos colaterais, como a gonadotoxicidade, principalmente na função reprodutiva.

2.6 Busca por novos compostos naturais anticancerígenos

Considerando a severa gonadotoxicidade associada aos quimioterápicos convencionais, há um esforço contínuo na busca por novos agentes antineoplásicos que apresentam alta eficácia antitumoral associada a menores impactos negativos sobre a reserva ovariana. Os produtos de origem natural despontam como excelentes fontes de moléculas bioativas, sendo historicamente utilizados como protótipos para o desenvolvimento de fármacos oncológicos mais seguros (Newman; Cragg, 2020; Ju et al., 2024). Nesse sentido, os vitanolídeos surgem como uma classe de compostos naturais promissora.

Embora a espécie botânica *Withania somnifera* seja historicamente reconhecida como a fonte primária do vitanolídeo clássico, a Withaferina A (WTA) (Lavie et al., 1965), investigações da biodiversidade neotropical revelaram que gêneros endêmicos brasileiros são fontes proeminentes destas lactonas esteroidais. A espécie *Athenaea velutina* destaca-se como um arbusto com importante centro de distribuição no estado do Ceará (Rodrigues; Knapp; Stehmann, 2019). O estudo fitoquímico das folhas dessa espécie nativa permitiu não apenas o isolamento da WTA, mas também a elucidação de derivados estruturais inéditos, como a 27-desoxi-24,25-epoxiwithaferina A (WT1) e a 27-desoxiwithaferina (WT2) (Dantas Rocha et al., 2025).

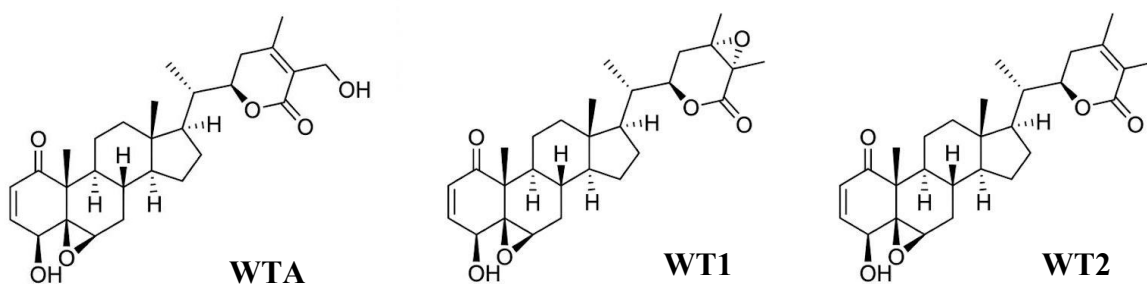
2.6.1 Vitanolídeos

Os vitanolídeos constituem uma importante classe de metabólitos secundários, caracterizados quimicamente como lactonas esteroidais derivadas do esqueleto ergostano C28. A notável bioatividade e a capacidade citotóxica destes compostos contra células tumorais estão intimamente relacionadas à sua conformação estrutural, com destaque para a presença de um sistema α,β -conjugado, um grupo hidroxila e um anel epóxido (Dantas Rocha et al., 2025; Guerreiro et al., 2019).

Embora a espécie *Withania somnifera* seja historicamente reconhecida como a fonte primária do vitanolídeo clássico, a Withaferina A (WTA) (Lavie et al., 1965), investigações da biodiversidade neotropical revelaram que a *Athenaea velutina* é um arbusto com importante centro de distribuição no estado do Ceará, é uma fonte proeminente destas lactonas esteroidais (Rodrigues; Knapp; Stehmann, 2019). O estudo fitoquímico dessa espécie endêmica permitiu o isolamento da WTA e de derivados estruturais como a 27-desoxi-24,25-epoxiwithaferina A (WT1) e a 27-desoxiwithaferina A (WT2) (Dantas Rocha et al., 2025).

No âmbito oncológico, esses compostos demonstram expressiva capacidade antiproliferativa ao induzir cascatas apoptóticas e danos severos ao DNA em diversas linhagens neoplásicas (Guerreiro et al., 2019). Contudo, a avaliação de sua toxicidade em tecidos saudáveis é um pressuposto fundamental para a viabilidade terapêutica. Investigações recentes *in vivo* demonstraram que a administração intraperitoneal de WTA, WT1 e WT2 na dose de 2 mg/kg apresentou reduzida toxicidade aguda sobre a reserva folicular ovariana em camundongos. Por outro lado, concentrações mais elevadas (5 e 10 mg/kg) desencadearam super ativação folicular compensatória, acúmulo de biomarcadores de senescência precoce e apoptose (Palomino et al., 2024).

Figura 2: Estrutura dos derivados de vitanolídeos (WTA, WT1 e WT2).



Fonte: Adaptado de Palomino et al., 2024

3 JUSTIFICATIVA

Os efeitos adversos da quimioterapia a longo prazo, como a exaustão irreversível da reserva folicular, são impulsionados pela senescência celular, uma parada proliferativa permanente que degrada o microambiente ovariano através do fenótipo secretor associado à senescência (SASP) (Guo et al., 2024). O acúmulo crônico dessas células senescentes no parênquima ovariano decorre do avanço da idade ou quando induzido precocemente através da exposição a agentes genotóxicos, como os antineoplásicos, e desencadeiam respostas inflamatórias locais severas (Hense et al., 2024). Consequentemente, a integridade do estroma e a viabilidade dos folículos pré-antrais são diretamente comprometidas, predispondo o órgão a danos estruturais que culminam na falência ovariana prematura e na infertilidade (Xu et al., 2023; Prasanna et al., 2021).

Diante do impacto destrutivo das terapias convencionais sobre a fertilidade mediado primordialmente pela indução da senescência ovariana precoce, a bioprospecção de compostos de origem natural, como os vitanolídeos, vem despertando grande interesse devido às suas propriedades antiproliferativas e pró-apoptóticas promissoras para a oncologia (Dantas et al., 2022). Apesar da promissora perspectiva, estudos recentes, conduzidos por Palomino et al. (2024) demonstraram que os derivados Withaferina A (WTA), 27-desoxi-24,25-epoxiwithaferina A (WT1) e 27-desoxiwithaferina (WT2) apresentam notável atividade citotóxica *in vivo* no ovário de camundongos. Embora a citotoxicidade aguda dessas substâncias tenha sido reportada, os seus efeitos específicos na indução da senescência ovariana e, as consequências funcionais a longo prazo após a administração sistêmica ainda são desconhecidas.

Dessa forma, o presente estudo justifica-se por investigar os efeitos gonadais dos vitanolídeos a curto e longo prazo. Para tal, serão utilizadas camundongos-fêmeas da linhagem C57BL/6J, modelo consolidado para o estudo do envelhecimento ovariano (Dai et al., 2023). O estudo também irá comparar os animais em diferentes estágios de vida: jovens (6 semanas) e adultas (1 ano). Esta abordagem comparativa permitirá identificar se a sensibilidade aos vitanolídeos varia conforme a idade e o estado basal da reserva ovariana. A aplicação de análises histológicas para grânulos de lipofuscina (marcador de senescência) e o ensaio TUNEL (marcador de apoptose) possibilitará uma caracterização detalhada dos danos celulares e teciduais. Com isso, espera-se consolidar os conhecimentos sobre a toxicidade reprodutiva de novos agentes antitumorais, trazendo importantes aportes para o desenvolvimento de protocolos oncológicos que priorizem a manutenção da reserva folicular e a preservação da fertilidade feminina.

4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

A exposição *in vivo* a derivados de vitanolídeos (WTA, WT1 e WT2) induz a senescência celular e alterações morfofuncionais em ovários de camundongos fêmeas a longo prazo, resultando no comprometimento da qualidade e na redução quantitativa da reserva folicular pré-antral.

5 OBJETIVOS

5.1 Geral:

Avaliar, a longo prazo, os efeitos da exposição *in vivo* aos derivados de vitanolídeos (WTA, WT1 e WT2) sobre a sobrevivência, desenvolvimento, morte folicular ou senescência em ovários de camundongos fêmeas.

5.2 Específicos:

Avaliar o impacto da administração de 2mg/kg dos derivados de vitanolídeos no tecido ovariano murino na:

- Sobrevivência, ativação, crescimento de folículos ovarianos pré-antrais pela coloração de Ácido Periódico-Schiff (PAS);
- Acumulação de grânulos de lipofuscina no tecido ovariano utilizando a coloração Sudan Black B (SBB);
- Quantificação de fibras colágenas do estroma ovariano por meio da coloração de Tricrômico de Masson;
- Fragmentação do DNA no tecido ovariano pela técnica de TUNEL, por imunofluorescência;
- Quantificação da proliferação celular em folículos ovarianos e células estromais por meio da expressão da proteína PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), por imunohistoquímica;

6 CAPÍTULO

Effects of *in vivo* exposure to vitanolide derivatives on senescence in female mouse ovaries

Efeitos da exposição *in vivo* de derivados de vitanolídeos sobre a senescência em ovários de camundongos fêmeas

**Artigo submetido no periódico:
Acta Veterinária Brasília
Março/2026
Qualis: B1**

Effects of in vivo exposure to vitanolide derivatives on senescence in female mouse ovaries

Paula Gabriela Alves de Sousa¹, Gaby Judith Quispe Palomino¹, Gildas Mbemya Tetaping^{1,2}, Carmen Patricia Huayhua Llacho¹, Ana Beatriz Graça Duarte³, Ana Paula Ribeiro Rodrigues^{1*}

¹*Laboratory of Manipulation of Oocyte and Ovarian Preantral Follicles, State University of Ceará, Fortaleza, Brazil*

²*Complex of Multiuser Equipment and Advanced Microscopy Laboratories, State University of Ceará, Fortaleza, Brazil*

³*Department of Morphology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil*

Corresponding author: Ana Paula Ribeiro Rodrigues (Ph.D), Laboratory of Manipulation of Oocyte and Ovarian Preantral Follicles, State University of Ceará, Av. Dr. Silas Munguba, 1700, Campus Itaperi. Fortaleza-CE- 60.714-903. Phone: + 55 8531019852 Fax: + 55 8531019840.

E-mail address: aprrdriguespapers@gmail.com

ABSTRACT

A quimioterapia é uma das principais estratégias terapêuticas no tratamento do câncer, mas frequentemente induz insuficiência ovariana prematura e senescência celular, comprometendo a fertilidade feminina. Nesse contexto, investigar compostos antitumorais com menor gonadotoxicidade, como os vitanolídeos (isolados de *Athenaea velutina*), torna-se relevante. Este estudo avaliou a longo prazo os efeitos *in vivo* de derivados de vitanolídeos sobre a morfologia folicular e marcadores de senescência ovariana em camundongos. Fêmeas C57BL/6J foram distribuídas em grupos controle jovem (6 semanas) e controle idoso (1 ano), além de grupos tratados com 2 mg/kg de Withaferina A (WTA), 27-desoxi-24,25-epoxiwithaferina A (WT1) e 27-desoxiwithaferina A (WT2), administrados em dias alternados por 14 dias. Os ovários foram avaliados quanto à morfologia, lipofuscina (Sudan Black B), fibrose (Tricrômico de Masson), fragmentação de DNA (TUNEL) e proliferação celular (PCNA). Os resultados mostraram que o WT1 preveniu o acúmulo de lipofuscina e manteve folículos em desenvolvimento, mas induziu apoptose e fibrose, sugerindo *burnout* folicular. Já o WTA demonstrou elevada gonadotoxicidade, induzindo senescência precoce, com intenso acúmulo de lipofuscina e fibrose. Em contraste, o WT2 manteve a integridade estromal com níveis basais de fibrose e apoptose, induzindo um estado de quiescência celular evidenciado pela menor taxa proliferativa entre os grupos. Conclui-se que os derivados exercem efeitos distintos, destacando-se o WT2 como candidato antitumoral promissor por seu menor impacto na reserva ovariana.

Keywords: Senescência ovariana, vitanolídeos, foliculogênese, toxicidade, camundongos, *Athenaea velutina*

1. Introdução

A quimioterapia é amplamente empregada no tratamento do câncer devido à sua eficácia na redução tumoral e na eliminação de células malignas (Liern et al., 2021). Contudo, os efeitos colaterais relacionados à sua toxicidade, como menopausa precoce (Gao et al., 2023), insuficiência ovariana prematura (Xu et al., 2023) e aumento da senescência ovariana (Guo et al., 2024), podem resultar em infertilidade, afetando de maneira significativa a saúde reprodutiva de mulheres em idade fértil. Diante disso, cresce o interesse por compostos naturais com propriedades antitumorais que apresentem menor impacto sobre tecidos saudáveis, especialmente os do sistema reprodutor feminino (Marques et al., 2022). Por outro lado, recentemente, um estudo *in vivo* desenvolvido por Palomino *et al.* (2025) demonstrou que a administração sistêmica desses mesmos derivados (WTA, WT1 e WT2) exibiu baixa toxicidade sobre o desenvolvimento de folículos pré-antrais murinos na concentração de 2 mg/kg, sugerindo uma seletividade favorável às células de alta divisão metabólica sem comprometer imediatamente a fertilidade.

Apesar de esses achados indicarem um potencial farmacológico relevante, os efeitos desses compostos sobre processos celulares específicos no tecido ovariano, como a senescência celular, permanecem pouco compreendidos, o que limita o entendimento de como esses compostos poderiam contribuir para a preservação ou para o comprometimento da fertilidade feminina. A senescência celular é caracterizada pela interrupção irreversível do ciclo celular em resposta a diferentes tipos de estresse. Seu acúmulo no ovário está associado à redução da reserva folicular e à diminuição da fertilidade ao longo do tempo (Zhang et al. 2023). O conceito foi apresentado por Leonard Hayflick e Paul Moorhead em 1961, relacionando a senescência celular e envelhecimento do corpo (Hayflick, Moorhead, 1961). Além disso, células senescentes secretam fatores do fenótipo secretor associado à senescência (SASP), que influenciam as células vizinhas (Han et al., 2024). O SASP é uma característica marcante da senescência celular, envolvendo a secreção de fatores pró-inflamatórios e moduladores do microambiente tecidual (Khavinson et al., 2022). Esses incluem mediadores de dano ao DNA, moléculas associadas à fibrose e redução de marcadores de proliferação celular (Gao et al., 2023). Dessa forma, a avaliação desses marcadores de senescência celular pode auxiliar na compreensão dos efeitos dos vitanolídeos sobre a senescência ovariana.

Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos a longo prazo da administração *in vivo* dos derivados de vitanolídeos WTA, WT1 e WT2 sobre a senescência ovariana em camundongos fêmeas, por meio da análise do acúmulo de lipofuscina, fibrose, danos ao DNA e proliferação celular.

2. Materiais e métodos

2.1 Aprovação ética, animais e suplementação nutricional

O protocolo experimental deste estudo foi aprovado e conduzido de acordo com as recomendações do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o processo nº 03248567/2021 da Universidade de Fortaleza (UNIFOR).

Camundongos fêmeas C57BL6J (7 semanas de idade; peso 20 - 25 g) foram obtidos do Núcleo de Biologia Experimental (NUBEX) da UNIFOR. Os animais foram alojados em caixas de polietileno, com livre acesso à ração e água, e mantidos sob ciclo claro-escuro de 12h.

2.2 Produtos químicos

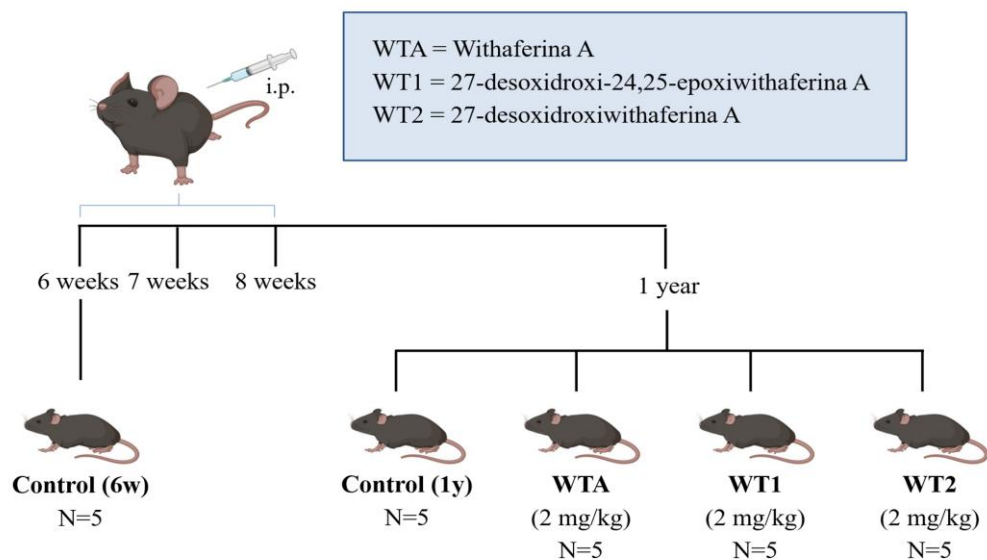
Unless otherwise mentioned, the reagents and chemicals used in the present study were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Os compostos WTA, WT1 e WT2 foram fornecidos pelo Laboratório de análises fitofarmacêuticas II da Universidade Federal do Ceará (UFC).

2.3 Desenho experimental

Foram utilizadas 25 camundongos fêmeas C57BL6J, provenientes do biotério do Centro de Biologia Experimental da Universidade de Fortaleza (UNIFOR), distribuídas aleatoriamente em cinco grupos experimentais principais (n=5 por grupo). Dois grupos controle não receberam qualquer intervenção farmacológica: controle jovem (6 semanas - 6w), cujos animais foram eutanasiados com seis semanas de idade, e controle idoso (1 ano - 1y), eutanasiado ao completar um ano de idade. Os demais animais iniciaram o experimento com seis semanas de idade e foram distribuídos em três grupos tratados de acordo com o derivado de vitanolídeo administrado (2 mg/kg): WTA (Withaferina A), WT1 (27-desoxi-24,25-epoxiwithaferina A) e WT2 (27-desoxiwithaferina A). Os compostos foram administrados por via intraperitoneal (i.p.), em dias alternados, durante um período de 14 dias. Após o término do tratamento as fêmeas foram mantidas em acompanhamento longitudinal, sem novas intervenções, até completarem um ano de idade, quando então foram eutanasiadas para a coleta dos ovários. Os ovários foram então fixados e submetidos às análises histológicas e moleculares, incluindo histologia clássica, coloração por Sudan Black B, Tricrômico de Masson, ensaio de imunofluorescência para detecção de fragmentação de DNA (TUNEL) e imunohistoquímica para avaliação da proliferação celular (PCNA).

Figura 1 – Representação esquemática do delineamento experimental. Camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6J foram distribuídos em grupos controle (6 semanas – 6w; e 1 ano – 1y) e grupos tratados que receberam administração intraperitoneal (i.p.) de derivados de vitanolídeos (2 mg/kg): Withaferina A (WTA), 27-desoxi-24,25-epoxiwithaferina A (WT1) e 27-desoxiwithaferina A (WT2).



2.4 Morfologia e desenvolvimento folicular

Para a análise histológica, os ovários foram fixados em solução de Davidson (22.2% formalin, 33.4% álcool, 11% glacial acetic acid, and distilled water) por 12 horas à temperatura ambiente, e posteriormente processados, iniciando-se pela desidratação em concentrações crescentes de etanol, seguida de clarificação em xileno e inclusão em parafina. Em seguida, os blocos de tecido foram seccionados à espessura de 7 μm e corados pelo método do ácido periódico de Schiff-hematoxilina (PAS) para as análises foliculares, realizadas por microscopia de luz (Nikon, Tóquio, Japão).

Foram considerados os folículos pré-antrais cujos oócitos apresentavam núcleos claramente visíveis, sendo então, classificados em: *primordiais* (uma camada de células da granulosa achatadas ou achatadas e cuboides); *primários* (uma camada completa de células da granulosa cuboides circundando o oócito), e *secundários* (duas ou mais camadas de células da granulosa cuboides, sem sinal de formação de antro). Na avaliação morfológica, os folículos foram categorizados em *normais*, quando isentos de sinais degenerativos, ou *degenerados*. A degeneração folicular foi caracterizada pela presença de pelo menos uma das seguintes

alterações: retração oocitária, núcleo picnótico, inchaço celular ou desorganização e despreendimento das células da granulosa da membrana basal (Palomino et al., 2024). Para evitar dupla contagem, o folículo foi considerado apenas quando, na primeira secção, era visualizado o núcleo central do oócito. Todas as contagens foram realizadas às cegas por um único avaliador.

2.5 Coloração de Sudan Black B e Tricrômico de Masson

Para análise dos grânulos de lipofuscina, foi realizada a coloração com Sudan Black B. Para isso, fragmentos de tecido ovariano foram fixados com paraformaldeído 4% (pH 7,2) por 4 h, incluídos em blocos de parafina e seccionados na espessura de 5 μm . Em seguida, as lâminas foram desparafinizadas com xileno, reidratadas em gradiente de álcoois e coradas com Sudan Black B (Dinâmica, Santa Catarina, Brasil) por 3 min, seguidas de imersão em álcool etílico a 50 % por 2 min. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água destilada por 2 min, contracoradas com eosina por 2 min e montadas com glicerol a 40%. Para avaliação, quatro campos aleatórios ($2.500 \mu\text{m}^2$) de cada secção por lâmina (3 por grupo) foram examinados em microscópio óptico (Nikon v.4.50) com ampliação de 400x, e quantificada pela área de lipofuscina positiva no software Image J versão 1.47 (NIH, Bethesda, MD, USA).

Para análise das áreas fibróticas, o tecido ovariano foi fixado, processado e cortado nas mesmas condições mencionadas anteriormente e corado com kit Tricrômico de Masson (Histokit EasyPath; Erviegas groups, Indaiatuba, SP, Brasil). Em seguida, as lâminas foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool e, finalmente, montada com Bálsamo do Canadá. Para a avaliação, quatro campos de cada seção ($2.500 \mu\text{m}^2$) por lâmina (3 por grupo) foram examinados usando microscopia de luz (Nikon v.4.50) com ampliação de 400x. As microfotografias foram capturadas no padrão RGB e, em seguida, analisadas no software Fiji/Image J (Wayne Rasband, NIH, USA).

2.6 Imunofluorescência (IF)

A análise TUNEL foi realizada utilizando um kit comercial (*In Situ Cell Death Detection, POD*, Roche, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. As etapas de fixação e recuperação antigênica foram realizadas conforme o protocolo de imunofluorescência. Para a recuperação antigênica, as lâminas foram incubadas em tampão de recuperação por 10 minutos em banho térmico pressurizado. Após o resfriamento dos cortes, estes foram lavados em PBS e as lâminas incubadas com H_2O_2 a 3% (v/v) de em

metanol. Em seguida, os cortes foram lavados novamente em PBS e bloqueados por 1 hora à temperatura ambiente, utilizando PBS contendo 1% (p/v) de BSA. Após duas lavagens em PBS, de 5 minutos cada, as lâminas foram incubadas com a reação TUNEL (50 µL) por 1 hora a 37 °C, com exceção do controle positivo, que foi previamente incubado com DNase por 10 minutos. Posteriormente, todas as lâminas foram lavadas três vezes em PBS, por 5 minutos cada. Por fim, as secções foram contra coradas e montadas utilizando o meio de montagem Fluoroshield™ com DAPI (Abcam, ab104139). Para a análise, as imagens foram capturadas em um microscópio confocal (Nikon, Tóquio, Japão) com ampliação de 400×. Para cada lâmina, foram examinados quatro campos aleatórios utilizando os filtros DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol; 359/457 nm excitação/emissão) e FITC (isotiocianato de fluoresceína; 495–519 nm excitação/emissão). O índice de células positivas (apoptóticas) foi então quantificado pela intensidade de fluorescência utilizando o software Image J versão 1.47 (NIH, Bethesda, MD, USA).

2.7 Análise imunohistoquímica (IHQ)

Os folículos de todos os grupos experimentais foram fixados em paraformaldeído a 4%, desidratados em uma série crescente de etanol, clarificados em xileno incluídos em parafina e seccionados em série com espessura de 5 µm. As secções foram montadas em lâminas carregadas positivamente e processadas para imunolocalização do Antígeno Nuclear de Células em Proliferação (PCNA) durante 5 minutos a 98°C. A recuperação antigênica foi realizada pela incubação das lâminas em tampão de recuperação de proteínas com pH específico da proteína (Dako, Santa Clara, CA, EUA). Para bloquear a atividade da peroxidase endógena, foi usado peróxido de hidrogênio a 10% em metanol. Subsequentemente, as lâminas foram incubadas por 30 minutos com anticorpo primário policlonal de coelho anti-pcna (1:500; Abcam Inc., Cambridge, Reino Unido). Em seguida, as lâminas foram incubadas por 30 minutos com anticorpo secundário anti-IgG de coelho de cabra (1: 200; Abcam Inc.) e, posteriormente, por mais 30 minutos com o complexo enzimático avidina-biotina (ABC; Vector laboratorys, 465 Burlingame, CA, EUA) para reação com cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB; Scytek, Utah, EUA). As lâminas foram posteriormente contra coradas com hematoxilina, seguida de amônia a 5%. Fragmentos de intestino de camundongo foram usados como controle positivo. A avaliação do PCNA foi realizada como descrito anteriormente por Ñaupás et al., (2026), sendo analisados 4 campos aleatórios por secção (2500 µm² cada), utilizando o software Nikon NIS-Elements AR v.4.50. A porcentagem de células PCNA-positivas foi calculada com base

no número de células do estroma em proliferação utilizando o software Image J versão 1.47 (NIH, Bethesda, MD, USA).

2.8 Análise estatística

Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM) ou percentual, utilizando software Statistical Package for Social Science (SPSS - version 27.0). A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-wilk. Os dados de morfologia foram analisados pelo Teste Exato de Fisher, enquanto os dados do TUNEL foram analisados por ANOVA seguida do teste da Diferença Mínima Significativa (DMS). Em ambas as análises, as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1 Morfologia e desenvolvimento folicular

Um total de 803 folículos pré-antrais (primordiais, primários e secundários) foi analisado no presente estudo, dos quais 70,9% (570/803) foram classificados como morfológicamente normais (Figura 2). A análise da morfologia folicular (Figura 2A) revelou variações influenciadas tanto pela idade quanto pela exposição aos vitanolídeos. Observou-se que o percentual de folículos primordiais normais no grupo de 6 semanas (6w) apresentou uma redução ($P < 0,05$) quando comparado ao grupo controle de 1 ano (1y); porém foi semelhante ao observado nos grupos WT1 e WT2. Por outro lado, o grupo 1y apresentou comportamento semelhante ao grupo tratado com WTA em todas as categorias foliculares avaliadas. Notavelmente, o tratamento WT1 foi o único que apresentou porcentagem de folículos secundários semelhantes às do grupo jovem (6w), além de resultados comparáveis nas demais classes foliculares. As características morfológicas dos folículos considerados normais estão ilustradas na Figura 2B.

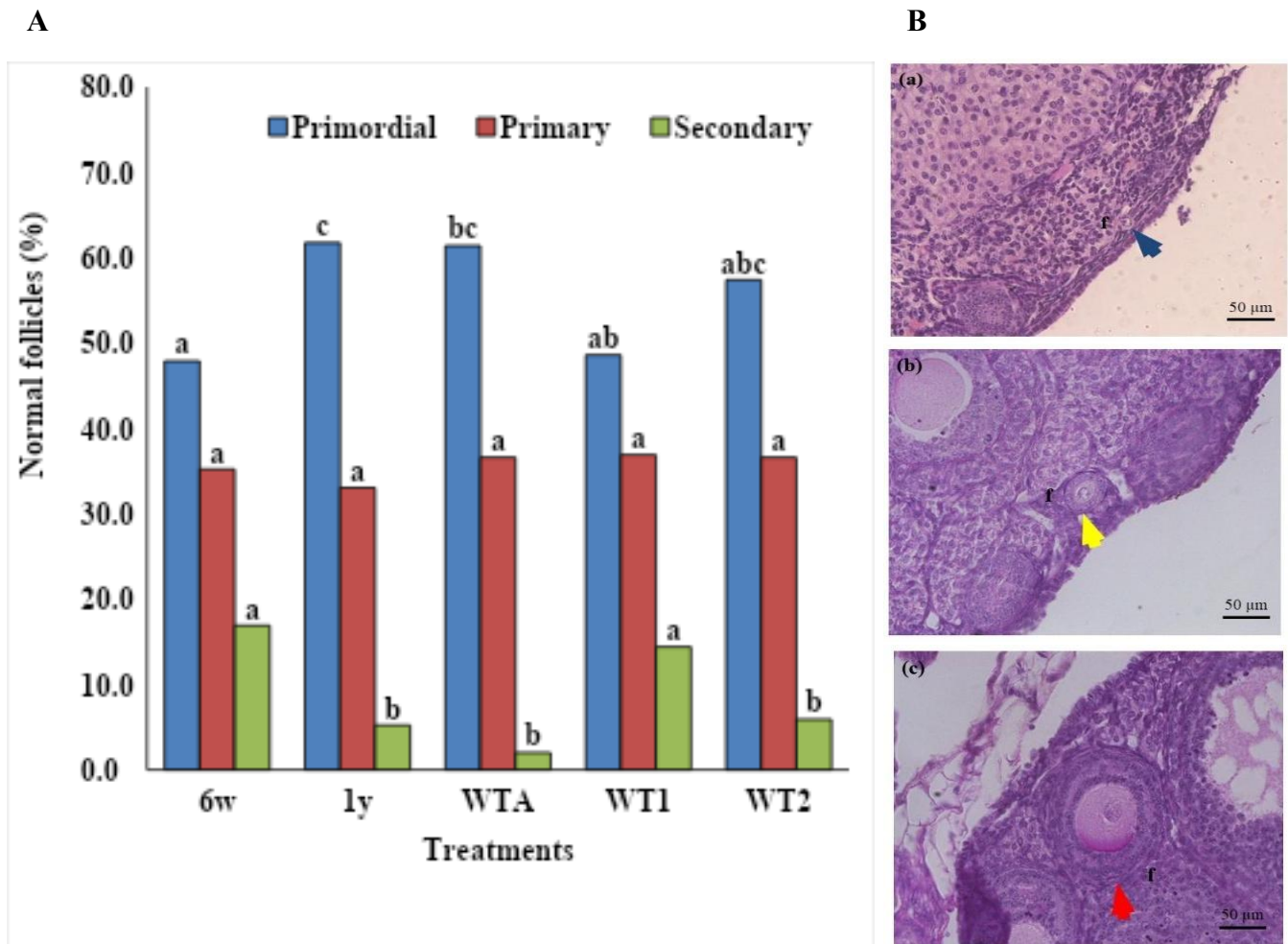


Figura 2. Avaliação da morfologia folicular em ovários de camundongos fêmeas dos grupos controle (6w e 1y) e tratados com 2 mg/kg dos derivados de vitanolídeos WTA, WT1 e WT2. (A) Porcentagem de folículos pré-antrais morfologicamente normais por categoria (primordiais, primários e secundários). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$). (B) Imagens representativas de folículos morfologicamente normais (a–c). As setas azul, amarela e vermelha indicam folículos primordial, primário e secundário, respectivamente.

Os dados referentes ao desenvolvimento folicular após os tratamentos estão apresentados na Figura 3. Observou-se que o grupo 1y apresentou menor percentual de folículos em desenvolvimento (primários e secundários morfologicamente normais) quando comparado ao grupo 6w ($P < 0,05$). Por outro lado, os grupos WT1 e WT2 apresentaram valores semelhantes aos observados no grupo 6w. No entanto, o grupo tratado com WTA apresentou percentual em desenvolvimento foi diferente do 6w ($P < 0,05$).

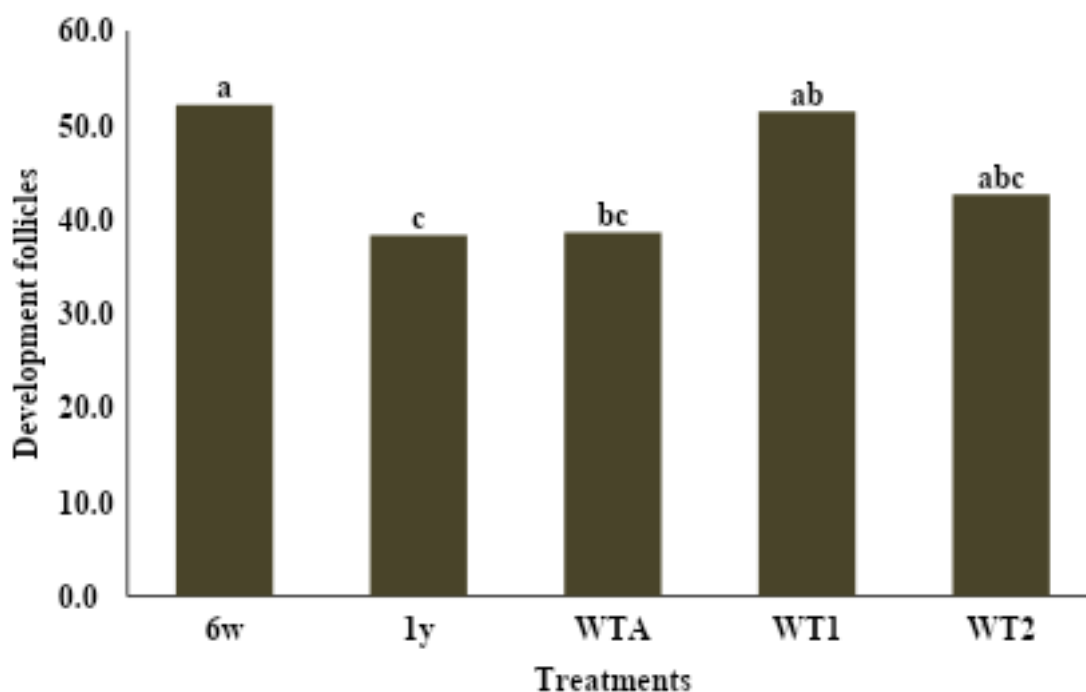


Figura 3. Desenvolvimento folicular em ovários de camundongos dos grupos controle (6w e 1y) e tratados (WTA, WT1, WT2). Percentual de folículos em desenvolvimento (folículos primário e secundário morfologicamente normais). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$).

3.2 Quantificação de lipofuscina no tecido ovariano

A Figura 4 apresenta a avaliação do acúmulo de lipofuscina no tecido ovariano dos diferentes grupos experimentais. As fotomicrografias representadas na Figura 4B (a-e) evidenciam a presença de grânulos de lipofuscina detectados pela coloração de Sudan Black B.

A análise quantitativa da área de marcação (Figura 4A) demonstrou que tanto o avanço da idade quanto os tratamentos influenciaram o acúmulo desse pigmento no tecido ovariano. Observou-se um aumento significativo na área de marcação de lipofuscina nos ovários do grupo WTA quando comparado ao grupo 6w, WT1 e WT2, apresentando similaridade estatística apenas com o grupo controle de 1 ano (1y) ($P > 0,05$). Em contraste, os animais tratados com WT1 apresentaram menor percentual de marcação após um ano, mantendo níveis de deposição de lipofuscina semelhantes aos observados no grupo controle jovem (6w) ($P < 0,05$). Por sua vez, o grupo tratado com WT2 apresentou acúmulo de lipofuscina semelhante ao observado no grupo 1y ($P > 0,05$), porém significativamente inferior ao observado no grupo WTA ($P < 0,05$).

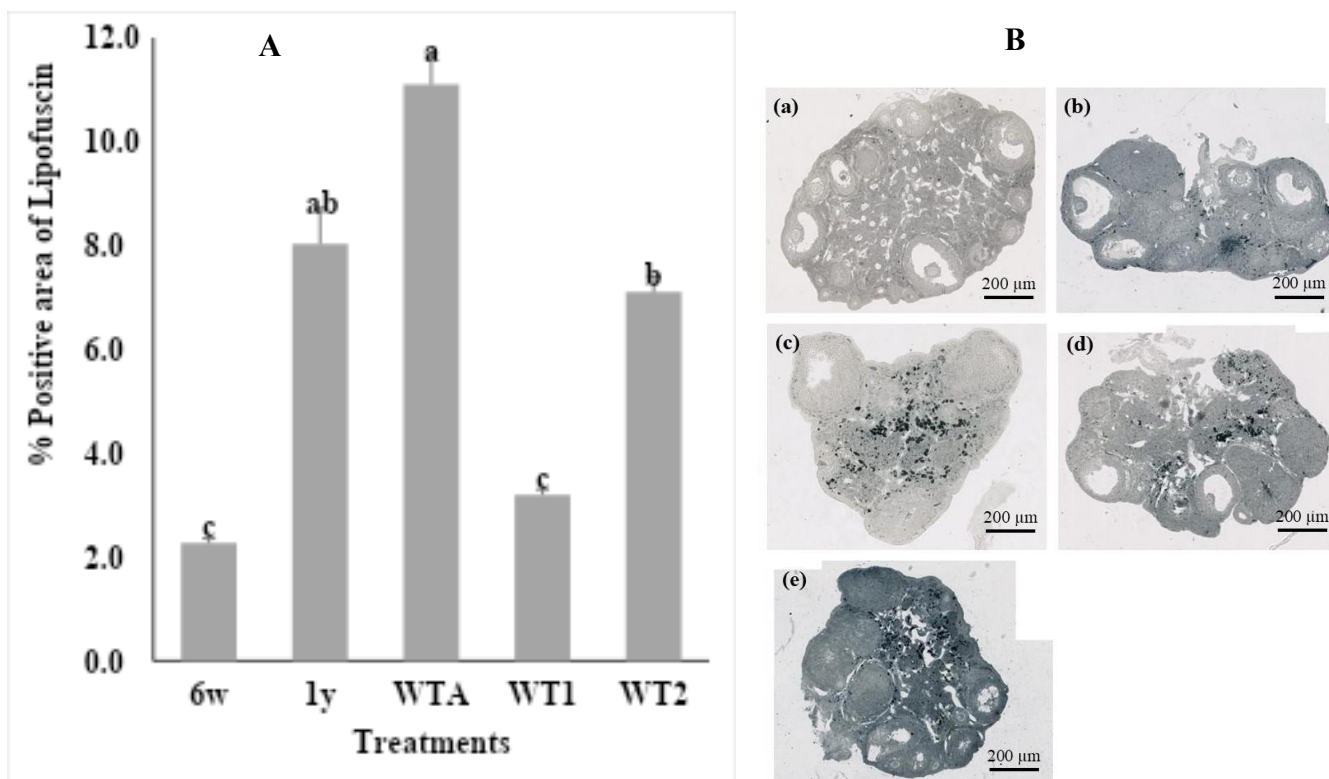


Figura 4. Acúmulo de lipofuscina no tecido ovariano de camundongos dos grupos controle (6w e 1y) e tratados com vitanolídeos (WTA, WT1 e WT2). A) Percentagem média (\pm EPM) de células marcadas. B) Fotomicrografias representativas do tecido ovariano corado com Sudan Black B (20 \times), evidenciando grânulos de lipofuscina (a-e). Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$). As barras representam média \pm EPM.

3.3 Fibrose no tecido ovariano

A coloração por Tricrômico de Masson revelou diferenças significativas na porcentagem de colágeno entre os grupos avaliados (Figura 5). Os grupos controles de 6 semanas (6w) e 1 ano (1y) apresentaram percentuais de colágeno semelhantes aos observados no grupo WT2, não havendo diferença estatística entre eles. Em contraste, o grupo WT1 apresentou aumento significativo na deposição de colágeno quando comparado aos grupos 6w, 1y e WT2 ($P > 0,05$). O grupo WTA apresentou a maior porcentagem de área positiva para colágeno, diferindo estatisticamente de todos os demais grupos experimentais ($P < 0,05$).

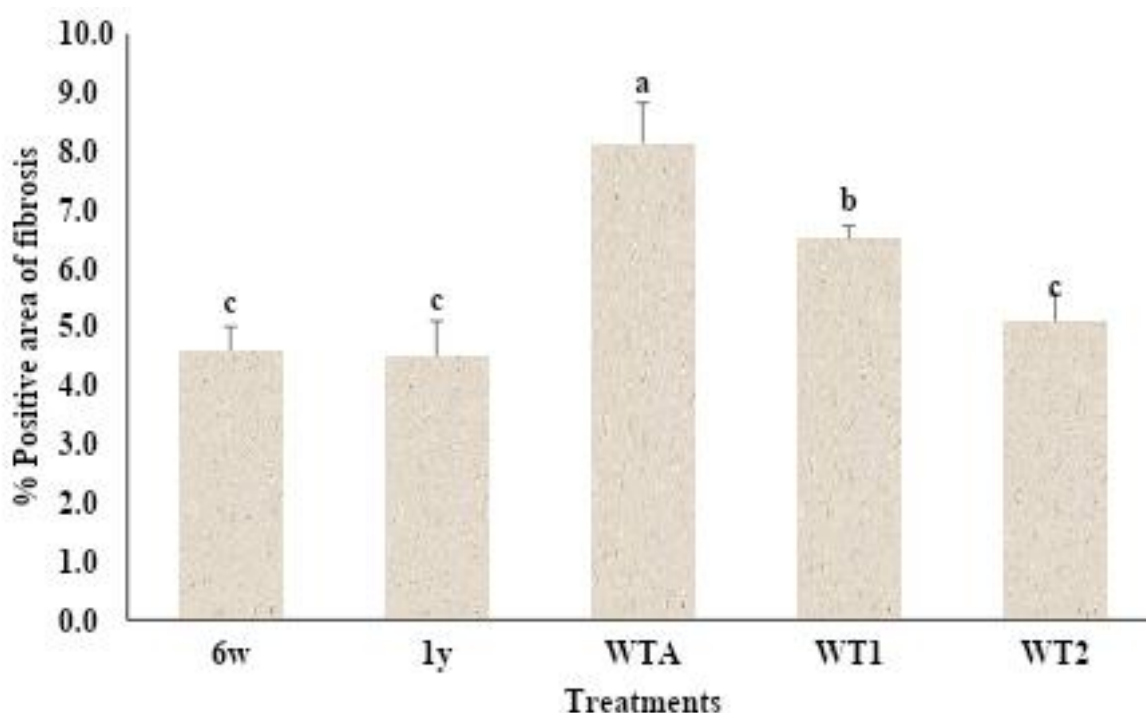


Figura 5. Quantificação da fibrose estromal no tecido ovariano de camundongos dos grupos controle (6w e 1y) e tratados com vitanolídeos (WTA, WT1 e WT2). Os valores representam a porcentagem de área positiva para colágeno (%) detectada pela coloração de Tricrômico de Masson. As barras representam média \pm EPM. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

3.4 Detecção da fragmentação do DNA pelo ensaio de TUNEL

O ensaio de TUNEL revelou diferenças significativas na fragmentação do DNA entre os grupos avaliados (Figura 6). O grupo WT1 apresentou aumento significativo na

fragmentação do DNA em relação aos demais grupos ($P < 0,05$). De forma semelhante, o grupo WTA exibiu elevados níveis de fragmentação do DNA, diferindo significativamente dos grupos 6w e WT2 ($P < 0,05$), porém, sem diferença estatística em relação ao grupo 1y.

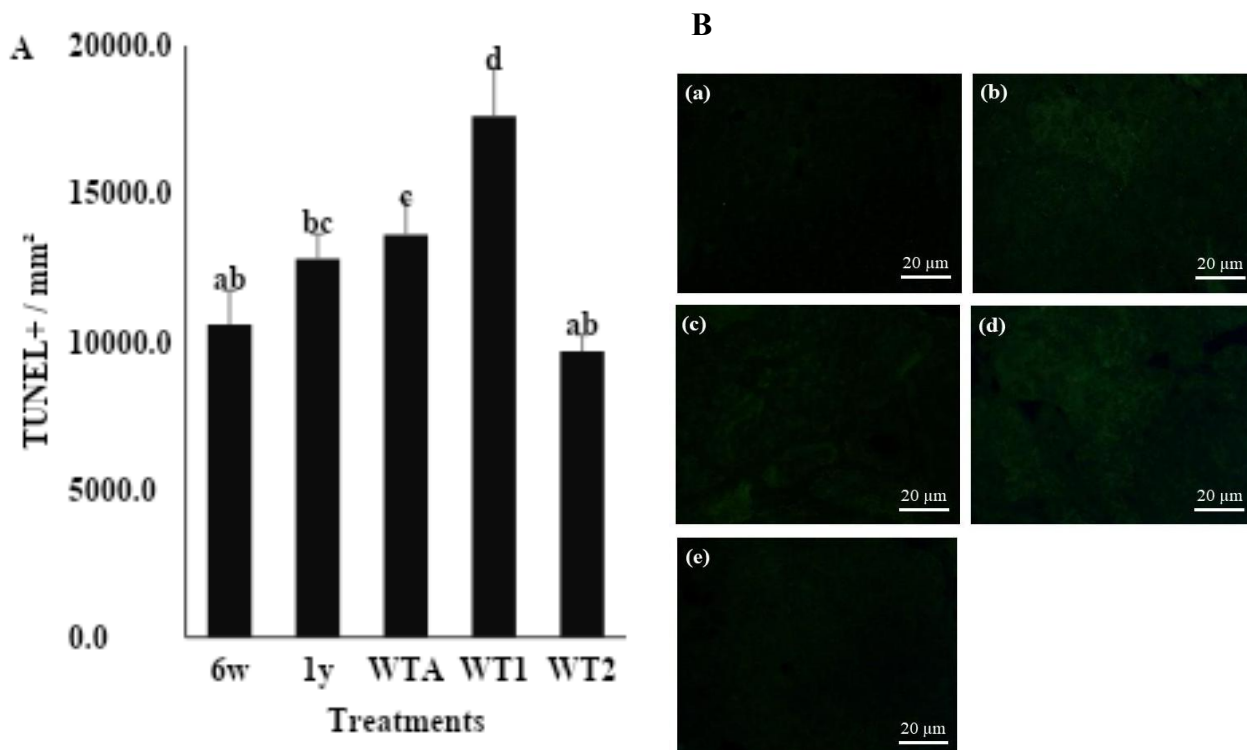


Figura 6. Fragmentação de DNA no tecido ovariano avaliada pelo ensaio de TUNEL em camundongos fêmeas dos grupos controle (6w e 1y) e tratados com derivados de vitanolídeos (WTA, WT1 e WT2). (A) Quantificação da densidade de células apoptóticas (TUNEL⁺/mm²). (B) Imagens representativas da imunofluorescência de TUNEL no tecido ovariano. As barras representam média \pm erro padrão da média (EPM). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$). Aumento: 400 \times ; barra de escala = 20 μ m.

3.5 Proliferação celular por PCNA

A atividade proliferativa no tecido ovariano foi avaliada por meio da imunomarcção para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). A Figura 7 apresenta as fotomicrografias representativas evidenciando núcleos positivamente marcados em células estromais (Figura 8A) nos diferentes grupos experimentais.

A análise quantitativa demonstrou efeito da idade sobre as taxas de proliferação celular. Além disso, os grupos tratados com WTA e WT1 apresentaram percentual de células

PCNA-positivas semelhantes ao grupo controle de 1 ano (1y) ($P < 0,05$). Por sua vez, o grupo WT2 apresentou a menor taxa proliferativa entre os grupos avaliados.

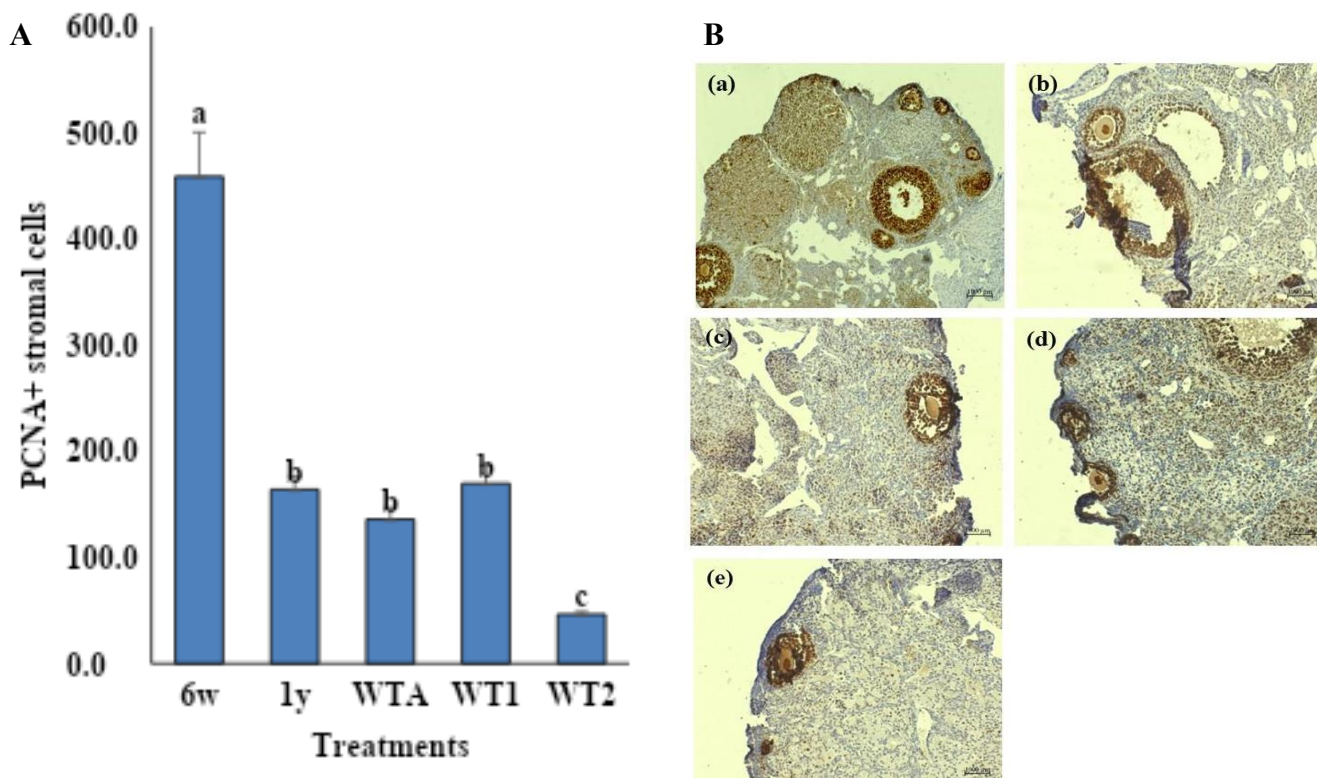


Figura 7. Avaliação da proliferação celular no tecido ovariano por imunomarcagem de PCNA. A) Análise quantitativa de células PCNA-positivas no estroma e nos folículos. B) Fotomicrografias da imunomarcagem de PCNA em células estromais (a-e). Barras indicam média \pm EPM. Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$). Image magnification = 200x; scale bars = 1000 μ m.

4. Discussão

A avaliação da morfologia folicular e da dinâmica de desenvolvimento constitui um dos primeiros parâmetros para compreender o impacto toxicológico de agentes antineoplásicos sobre a reserva ovariana. Em nosso estudo, a análise morfológica quantitativa revelou que, a longo prazo (1 ano), a taxa de folículos pré-antrais morfologicamente normais não diferiu significativamente entre os grupos controles e os tratados com os derivados de vitanolídeos. Esse resultado indica que a exposição sistêmica à dose de 2 mg/kg não induziu um efeito deletério agudo ou persistente capaz de comprometer morfológicamente as células da granulosa

e o oócito dos folículos remanescentes. Este achado está em concordância com resultados prévios do nosso grupo, que demonstraram que a administração *in vivo* de WTA, WT1 e WT2 na mesma concentração, não promove efeitos tóxicos agudos sobre a viabilidade morfológica de folículos pré-antrais murinos (Palomino et al., 2024). Em conjunto, esses dados indicam que, nessa dose, os derivados de vitanolídeos apresentam baixa toxicidade estrutural para o tecido ovariano. Entretanto, a preservação da morfologia folicular não necessariamente reflete a ausência de alterações celulares ou moleculares no tecido ovariano, uma vez que processos como apoptose, senescência celular e remodelamento estromal podem ocorrer antes de alterações morfológicas evidentes (Tilly e Sinclair, 2013; Mandelbaum, 2017;). Nesse contexto, a avaliação de marcadores adicionais, como fragmentação de DNA e alterações estromais, torna-se essencial para uma compreensão mais abrangente dos efeitos desses compostos sobre o envelhecimento ovariano.

Apesar da manutenção da integridade estrutural geral, a exposição aos vitanolídeos promoveu alterações distintas no desenvolvimento das classes foliculares. Notavelmente, os animais tratados com o derivado WT1 apresentaram um padrão de desenvolvimento folicular semelhante ao observado no grupo controle jovem (6w). Embora a preservação de uma reserva folicular com características juvenis possa, à primeira vista, sugerir um possível efeito protetor, este achado provavelmente reflete uma consequência da toxicidade do composto. Nesse contexto, é possível que o WT1 tenha induzido atresia acelerada dos folículos que iniciaram o processo de ativação, fenômeno descrito como *burnout* folicular, resultando na predominância de folículos quiescentes no parênquima ovariano (Xu et al., 2023; Kalich-Philosoph et al., 2013). A literatura reporta que danos induzidos por quimioterápicos podem promover depleção aguda do pool de folículos em crescimento, mascarando a real capacidade funcional do ovário (Spears et al., 2019). Em contraste, os grupos tratados com WTA e WT2 apresentaram um padrão de desenvolvimento folicular semelhante ao observado no grupo controle idoso (1y), sugerindo que essas moléculas podem mimetizar ou antecipar mecanismos associados ao envelhecimento ovariano natural. Uma possível explicação para esse efeito envolve a indução de senescência precoce induzida por estresse (*stress-induced premature senescence*, SIPS) no estroma ovariano, levando à parada proliferativa e à liberação de fatores do fenótipo secretor associado a senescência (SASP). A deterioração precoce do microambiente ovariano pode comprometer o suporte às unidades foliculares, contribuindo para a redução progressiva da reserva ovariana de maneira semelhante ao processo de envelhecimento fisiológico (Du et al., 2022; Gao et al., 2023).

Para investigar o fenótipo de envelhecimento sugerido pelo desenvolvimento folicular do WTA e do WT2, avaliou-se o acúmulo intracelular de lipofuscina através da coloração de *Sudan Black B*. Inicialmente, o grupo controle idoso (1y) apresentou marcação superior ao grupo controle jovem (6w), evidenciando um acúmulo progressivo e significativo desse pigmento no estroma ovariano ao longo do envelhecimento fisiológico (Ansere et al., 2020; Hense et al., 2024). Em relação aos tratamentos, o derivado WTA induziu um acúmulo acentuado de grânulos de lipofuscina, semelhante ao observado no ovário do grupo controle idoso (1y). Esse aumento exacerbado sugere que a Withaferina A pode atuar como um potente indutor de estresse oxidativo, acelerando o tecido a um estado de senescência precoce induzida por estresse, fenômeno amplamente descrito após a exposição a agentes quimioterápicos, tais como cisplatina, ciclofosfamida e doxorrubicina (Du et al., 2022; Xu et al., 2023; Gao et al., 2023). Por outro lado, a exposição ao WT1 preveniu o acúmulo de lipofuscina, mantendo níveis semelhantes aos observados em animais jovens (6w). Já o tratamento com WT2 apresentou marcação de lipofuscina inferior à observada no grupo WTA, equiparando-se dos níveis observados no envelhecimento fisiológico (1y). Por outro, considerando que o acúmulo de células senescentes observado de forma intensa no grupo WTA pode afetar negativamente o tecido por meio do SASP, a deposição de fibras de colágeno foi quantificada por meio da coloração com Tricrômico de Masson. Nossos achados revelaram que os tratamentos com WTA e WT1 induziram um aumento na porcentagem de colágeno no estroma ovariano. O grupo WTA apresentou os níveis mais elevados de deposição fibrótica, o que corrobora sua alta taxa de senescência, evidenciada pelo acúmulo de lipofuscina. De fato, citocinas pro-inflamatórias, fatores de crescimento e proteinases liberadas pelo SASP podem promover a deposição anormal de colágeno, contribuindo para a desestruturação do estroma ovariano (Guo et al., 2024). Esse processo de remodelamento estromal e deposição de colágeno tem sido associado à rigidez do microambiente ovariano e à progressiva perda da função folicular durante o envelhecimento (Briley et al., 2016; Amargant et al., 2020). O grupo tratado com WT1 apresentou níveis intermediários de fibrose, sugerindo um efeito moderado sobre o remodelamento estromal. Em contraste, o tratamento com WT2 não induziu resposta fibrótica significativa, mantendo a proporção de colágeno em níveis basais, semelhantes aos observados nos grupos controle (6w e 1y).

Para elucidar de forma mais precisa as divergências estruturais e os possíveis mecanismos de dano associados a cada derivado, avaliou-se a extensão do dano genotóxico por meio do ensaio TUNEL. Nossos resultados demonstraram que os tratamentos com WTA e WT1 induziram um aumento significativo na fragmentação do DNA, indicativa de apoptose, um

padrão semelhante ao observado na toxicidade classicamente descrita para agentes antineoplásicos convencionais (Zhang et al. 2023; Wu et al., 2025). O alto índice de TUNEL observado no grupo WT1 fornece uma possível explicação para o paradoxo previamente descrito em relação à preservação aparente da população de folículos primordiais. Nesse contexto, o dano genotóxico agudo induzido por esse derivado parece desencadear predominantemente a ativação de vias apoptóticas, levando à eliminação precoce das células do tecido antes que ocorra o acúmulo de lipofuscina. Esse mecanismo sugere que a apoptose pode atuar como uma via predominante de remoção celular em resposta ao estresse induzido pelo WT1, impedindo a progressão para um estado de senescência celular estabelecida. Em contraste, o tratamento com WT2 manteve a densidade de células apoptóticas em níveis comparáveis aos observados no grupo controle jovem (6w) sugerindo um perfil citotóxico mais brando e menor indução de dano genômico no tecido ovariano.

Por fim, para aprofundar a compreensão sobre o perfil de sobrevivência e o efeito proteção do WT2 em comparação aos demais vitanolídeos, a atividade proliferativa foi avaliada por meio da expressão da proteína PCNA. O grupo controle idoso (1y) apresentou evidente redução na marcação de PCNA em relação ao jovem (6w), confirmando o impacto fisiológico do envelhecimento sobre a atividade proliferativa ovariana, o que corrobora com a literatura atual (Saito; Yamamoto; Chikenji, 2024; Hense et al., 2024). Os tratamentos com WTA e WT1 promoveram redução acentuada da proliferação em relação ao grupo jovem, apresentando níveis de marcação semelhantes aos observados no grupo 1y. Essa redução na expressão de PCNA, associada aos elevados índices de apoptose (TUNEL) e à maior deposição fibrótica observada nesses grupos, sugere a ocorrência de parada celular irreversível em resposta a danos severos ao DNA, acompanhada de comprometimento do microambiente estromal. Por outro lado, o WT2, apresentou uma depleção quase total da taxa proliferativa. Ao correlacionar a ausência de proliferação induzida por esse derivado com os baixos níveis de morte celular (TUNEL) e a ausência de fibrose observados nesse grupo (Tricrômico de Masson), fortaleceu-se a hipótese de que o WT2 atua induzindo um estado profundo de quiescência estromal. Esse estado de "dormência" celular pode representar um mecanismo adaptativo de preservação tecidual, no qual a paralisação do ciclo celular reduz a suscetibilidade do microambiente ovariano à incorporação de erros replicativos e à ocorrência de quebras no DNA (Van den Boogaard et al. 2022; Kashi; Meirov, 2023). Além disso, a indução de quiescência celular pode atuar como uma estratégia de manutenção da integridade tecidual em condições de estresse, permitindo a preservação do nicho ovariano e potencialmente retardando processos degenerativos associados

ao envelhecimento do tecido.

Em síntese, os derivados de vitanolídeos modulam o microambiente ovariano a longo prazo de maneiras distintas. O WT1 atua predominantemente por meio de toxicidade apoptótica aguda, possivelmente associada ao fenômeno de *burnout* folicular. Por sua vez, o WTA promove comprometimento estromal por meio da indução de senescência precoce induzida por estresse, acompanhada de remodelamento fibrótico do tecido ovariano. Em contraste, o WT2 destaca-se como um candidato promissor, ao suprimir de forma acentuada a atividade proliferativa e induzir um estado de quiescência celular. Essa estratégia pode reduzir a suscetibilidade do tecido à ocorrência de danos ao DNA e, conseqüentemente, contribuir para a preservação da integridade estrutural do ovário a longo prazo.

5. Conclusão

Este estudo demonstra que a administração sistêmica de derivados de vitanolídeos (2 mg/kg) modula o microambiente ovariano por mecanismos distintos. Entre os compostos avaliados, o WT2 destacou-se como um candidato promissor, sendo capaz de induzir um estado de quiescência estromal associado à prevenção de apoptose, acúmulo de lipofuscina e deposição fibrótica. Em contraste, os derivados WTA e WT1 apresentaram perfis de toxicidade mais pronunciados, caracterizados pela indução de senescência precoce induzida por estresse e pelo fenômeno de *burnout* folicular. Assim, a indução de um estado de dormência celular pelo WT2 pode representar um mecanismo importante para preservar a integridade estrutural do ovário, contribuindo potencialmente para a manutenção da reserva folicular e da fertilidade feminina.

Agradecimentos

Os autores agradecem às seguintes agências de fomento pelo apoio financeiro: a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP; processos PS1-0186-00024.01.00/21 e 09564624/2022) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Os autores também agradecem ao Complexo de Equipamentos Multiusuários e Laboratórios de Microscopia Avançada (CELMMA), da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, pela aquisição e análise de imagens. Paula Gabriela Alves de Sousa Oliveira é bolsista da FUNCAP, e Ana Paula Ribeiro Rodrigues é bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Conflitos de interesse

Os autores declaram nenhum conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

DU, D. et al. Senotherapy Protects against Cisplatin-Induced Ovarian Injury by Removing Senescent Cells and Alleviating DNA Damage, **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2022, n. 1, p. 9144644, 2022.

GAO, Y. et al. Increased cellular senescence in doxorubicin-induced murine ovarian injury: effect of senolytics, **GeroScience**, v. 45, n. 3, p. 1775–1790, 2023.

GUERREIRO, D. D. et al. In vitro study of Withanolide D toxicity on goat preantral follicles and its effects on the cell cycle. **Reproductive Toxicology**, [s.l.], v. 84, p. 18-25, 2019.

GUO, Y. et al. Ovarian microenvironment: challenges and opportunities in protecting against chemotherapy-associated ovarian damage, **Human Reproduction Update**, v. 30, n. 5, p. 614–647, 2024.

HAN, Z. et al. Cross-talk of inflammation and cellular senescence: a new insight into the occurrence and progression of osteoarthritis, **Bone Research**, v. 12, n. 1, p. 69, 2024.

HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. **Experimental Cell Research**, [s.l.], v. 25, n. 3, p. 585-621, 1961.

KASHI, Oren; MEIROW, Dror, Overactivation or Apoptosis: Which Mechanisms Affect Chemotherapy-Induced Ovarian Reserve Depletion?, **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 22, p. 16291, 2023.

KHAVINSON, V. et al. Senescence-Associated Secretory Phenotype of Cardiovascular System Cells and Inflammaging: Perspectives of Peptide **Regulation, Cells**, v. 12, n. 1, p. 106, 2022.

LIERN, M. Chemotherapy-associated nephrotoxicity: a persistent clinical challenge. **Arch Argent Pediatr**, [s.l.], v. 123, n. 6, p. e202510666, 2025

MARQUES, C. et al. Chemotherapy-free treatment of recurrent advanced ovarian cancer: myth or reality?, **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 33, n. 4, p. 607–618, 509 2023.

ÑAUPAS, L. V. S. et al. Wharton’s jelly–derived mesenchymal stem cells promote the survival and early development of pre-antral follicles, **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, 2026.

- PALOMINO, G. J. Q. *et al.*** Investigations on the effects of in vitro exposure of mouse ovaries to withaferin A, a new candidate for chemotherapy, **Reproductive Toxicology**, v. 132, p. 108844, 2025.
- ROCHA, K. A. D. *et al.*** Anti-inflammatory withajardins from the leaves of *Athenaea velutina*. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 203, p. 113338, 2022.
- SAITO, Y.; YAMAMOTO, S.; CHIKENJI, T. S.** Role of cellular senescence in inflammation and regeneration, **Inflammation and Regeneration**, [s.l.], v. 44, n. 1, p. 28, 2024.
- TANG, W. *et al.*** Exploration of the mechanism and therapy of ovarian aging by targeting cellular senescence, **Life Medicine**, [s.l.], v. 4, n. 1, p. Inaf004, 2025. **VAN DEN BOOGAARD, W. M. C.; KOMNINOS, D. S. J.; VERMEIJ, W. P.** Chemotherapy Side-Effects: Not All DNA Damage Is Equal, **Cancers**, [s.l.], v. 14, n. 3, p. 627, 2022.
- WU, J. *et al.*** Mechanisms of cell senescence and apoptosis in cyclophosphamide-induced premature ovarian failure in rats, **Journal of Ovarian Research**, v. 18, n. 1, p. 172, 2025.
- XU, Z. *et al.*** The Role of Cellular Senescence in Cyclophosphamide-Induced Primary Ovarian Insufficiency, **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 24, p. 17193, 2023.
- ZHANG, S. *et al.*** Chemotherapy impairs ovarian function through excessive ROS-induced ferroptosis, **Cell Death & Disease**, v. 14, n. 5, p. 340, 2023.

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos nesse estudo, pudemos concluir que:

- A) Vitanolídeos administrados sistemicamente (2 mg/kg) afetam o microambiente ovariano de maneiras distintas;
- B) O WT2 mostrou maior potencial terapêutico ao promover um estado de quiescência estromal, associado à redução de apoptose, acúmulo de lipofuscina e fibrose.
- C) Os vitanolídeos WTA e WT1 apresentaram maior toxicidade, estimulando senescência precoce e esgotamento folicular.

REFERÊNCIAS

1. AI, G. et al. Adipose-derived stem cells promote the repair of chemotherapy-induced premature ovarian failure by inhibiting granulosa cells apoptosis and senescence. **Stem Cell Res Ther**, v. 14, n. 1, p. 75, abr. 2023.
2. ANAND, U. et al. Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics. **Genes Dis**, v. 10, n. 4, p. 1367-1401, mar. 2022.
3. BABAYEV, E. et al. Cumulus expansion is impaired with advanced reproductive age due to loss of matrix integrity and reduced hyaluronan. **Aging Cell**, v. 22, n. 11, p. e14004, nov. 2023.
4. DI MICCO, R. et al. Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 22, n. 2, p. 75-95, fev. 2021.
5. DU, D. et al. Senotherapy Protects against Cisplatin-Induced Ovarian Injury by Removing Senescent Cells and Alleviating DNA Damage. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2022, p. 9144644, jun. 2022.
6. FAN, H. et al. Tetramethyl bisphenol F exposure induces human ovarian granulosa cell senescence and mouse ovarian damage by regulating ESRRB signalling. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 292, p. 117940, 2025.
7. GAO, Y. et al. Increased cellular senescence in doxorubicin-induced murine ovarian injury: effect of senolytics. **Geroscience**, v. 45, n. 3, p. 1775-1790, jun. 2023.
8. GUERREIRO, D. D. et al. Impact of antineoplastic agents on the ovarian follicles and importance of reproductive biotechnologies in the preservation of human fertility. **Reprodução & Climatério**, v. 30, n. 2, p. 90-99, 2015.
9. GUERREIRO, D. D. et al. In vitro study of Withanolide D toxicity on goat preantral follicles and its effects on the cell cycle. **Reprod Toxicol**, v. 84, p. 18-25, mar. 2019.

10. GUO, Y. et al. Ovarian microenvironment: challenges and opportunities in protecting against chemotherapy-associated ovarian damage. **Hum Reprod Update**, v. 30, n. 5, p. 614-647, out. 2024.
11. KHALIL, R.; DIAB-ASSAF, M.; LEMAITRE, J. M. Emerging Therapeutic Approaches to Target the Dark Side of Senescent Cells: New Hopes to Treat Aging as a Disease and to Delay Age-Related Pathologies. **Cells**, v. 12, n. 6, p. 915, mar. 2023.
12. KUMAR, A.; THIRUMURUGAN, K. Understanding cellular senescence: pathways involved, therapeutics and longevity aiding. **Cell Cycle**, v. 22, n. 20, p. 2324-2345, out. 2023.
13. KUMARI, R.; JAT, P. Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. **Front Cell Dev Biol**, v. 9, p. 645593, mar. 2021.
14. LIU, Y. L. et al. Clinical significance of high expression of proliferating cell nuclear antigen in non-small cell lung cancer. **Medicine**, v. 99, n. 20, p. e20128, 2020.
15. LU, X. et al. Senolytic drugs as a strategy to prevent chemotherapy-induced ovarian damage. **British Journal of Pharmacology**, v. 182, 2024.
16. MCHUGH, D.; DURÁN, I.; GIL, J. Senescence as a therapeutic target in cancer and age-related diseases. **Nat Rev Drug Discov**, v. 24, n. 1, p. 57-71, jan. 2025.
17. MUTHAMIL, S. et al. Biomarkers of Cellular Senescence and Aging: Current State-of-the-Art, Challenges and Future Perspectives. **Adv Biol (Weinh)**, v. 8, n. 9, p. e2400079, set. 2024.
18. PARDELLA, E. et al. Therapy-Induced Stromal Senescence Promoting Aggressiveness of Prostate and Ovarian Cancer. **Cells**, v. 11, n. 24, p. 4026, dez. 2022.
19. ROSSI, M.; ABDELMOHSEN, K. The emergence of senescent surface biomarkers as senotherapeutic targets. **Cells**, v. 10, p. 1740, 2021.

20. SAITO, Y.; YAMAMOTO, S.; CHIKENJI, T. S. Role of cellular senescence in inflammation and regeneration. **Inflamm Regen**, v. 44, n. 1, p. 28, jun. 2024.
21. SALMINEN, A.; OJALA, J.; KAARNIRANTA, K. Apoptosis and aging: increased resistance to apoptosis enhances the aging process. **Cell Mol Life Sci**, v. 68, n. 6, p. 1021-1031, mar. 2011.
22. SUTANTO, H. et al. A narrative review of therapy-induced senescence in cancer: mechanisms, immune interplay, and therapeutic opportunities. **J Egypt Natl Canc Inst**, v. 37, n. 1, p. 78, dez. 2025.
23. VAN DEN BOOGAARD, W. M. C.; KOMNINOS, D. S. J.; VERMEIJ, W. P. Chemotherapy Side-Effects: Not All DNA Damage Is Equal. **Cancers (Basel)**, v. 14, n. 3, p. 627, jan. 2022.
24. WU, H. et al. Oocyte-specific EXOC5 expression is required for mouse oogenesis and folliculogenesis. **Mol Hum Reprod**, v. 30, n. 8, p. gaae026, ago. 2024.
25. WU, J. et al. Mechanisms of cell senescence and apoptosis in cyclophosphamide-induced premature ovarian failure in rats. **J Ovarian Res**, v. 18, n. 1, p. 172, jul. 2025.
26. XIAO, S. et al. Cellular senescence: a double-edged sword in cancer therapy. **Front Oncol**, v. 13, p. 1189015, set. 2023.
27. XU, Z. et al. The Role of Cellular Senescence in Cyclophosphamide-Induced Primary Ovarian Insufficiency. **Int J Mol Sci**, v. 24, n. 24, p. 17193, dez. 2023.
28. YAMAUCHI, S.; TAKAHASHI, A. Cellular senescence: mechanisms and relevance to cancer and aging. **J Biochem**, v. 177, n. 3, p. 163-169, mar. 2025.
29. YAVARI, N. et al. Establishment of an optimized chemotherapy-induced mouse model for premature ovarian failure: protocol and findings. **Aging (Albany NY)**, v. 17, n. 10, p. 2637-2649, out. 2025.
30. ZHANG, S. et al. Chemotherapy impairs ovarian function through excessive ROS-induced ferroptosis. **Cell Death Dis**, v. 14, n. 5, p. 340, mai. 2023.