# ANTITUMORAIS VITANOLÍDEOS SÃO CAPAZES DE ALTERAR A MORFOLOGIA E A COMPOSIÇÃO TECIDUAL DO FÍGADO, RIM E PULMÃO DE ANIMAIS SAUDÁVEIS

Alesandro Silva Ferreira[1]

Maria Bianca de Almeida Silva[1]

Gaby Judith Quispe Palomino[2]

Ana Karine Rocha de Melo Leite[3]

Ana Caroline Rocha de Melo Leite[1]

Rebeca Magalhães Pedrosa Rocha[1]

José Ricardo de Figueiredo[2]

Ana Paula Ribeiro Rodrigues[2]

Juliana Jales de Hollanda Celestino[1]

## RESUMO

A quimioterapia é a principal intervenção terapêutica em pacientes com câncer. Entretanto, os mecanismos não seletivos dos medicamentos antitumorais podem levar a alterações morfoestruturais e funcionais em células saudáveis. Portanto, novas moléculas, especialmente de origem natural, com toxicidade atenuada estão sendo estudadas. Assim, esse estudo objetivou avaliar possíveis efeitos tóxicos de três vitanolídeos, em duas concentrações (5 ou 0 mg/ Kg) sobre a histomorfologia e a composição da matriz extracelular no fígado, rim e pulmão de camundongos. Para tanto, camundongos de linhagem C57BL/6, com 7 a 8 semanas de idade, foram divididos em grupos experimentais e receberam intraperitonealmente doses de solução salina (tratamento controle), DMSO como veículo de diluição das drogas (tratamento VEI), 27-desidroxi-24,25-epoxivitafina A – VT1, 27-desidroxivitafina A – VT2 e vitaferina A – VTA nas concentrações de 5 ou 10 mg/kg, originando os tratamentos: VT1 5, VT1 10, VT2 5, VT2 10, VTA 5 e VTA 10, respectivamente. As drogas foram administradas durante 15 dias, em dias alternados. Ao fim, os camundongos foram eutanasiados, os órgãos dissecados e imediatamente fixados para as análises histopatológicas. Os órgãos foram processados histologicamente para avaliação de alterações morfológicas, através da coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) e os achados foram descritos de forma semiquantitativa. Ainda, foram avaliadas alterações na composição da matriz extracelular, através do conteúdo de colágeno, pela coloração de Pricrosiriu Red. No fígado, os vitanolídeos em ambas as concentrações induziram a presença de sinais de morte celular, como picnose nuclear, e degeneração, como tumefação dos hepatócitos. Além disso, os vitanolídeos intensificaram a congestão vascular e os focos de hemorragia sinusoidal. No rim, observou-se que as alterações induzidas pelos vitanolídeos foram mais intensas quando administrados 5 mg/kg em comparação a 10 mg/kg. No pulmão, os vitanolídeos, independente da concentração, não induziram intensas alterações histopatológicas, não diferindo entre si os achados evidenciados

[1]Instituto de Ciências da Saúde, Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Redenção, CE, Brasil.
[2]Faculdade de Medicina Veterinária, Laboratório de manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-antrais (LAMOFOPA), Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.
[3]Universidade de Fortaleza (UNIFOR), Fortaleza, CE, Brasil.

na presença de vitanolídeos, nem mesmo deles em relação ao controle. Evidenciou-se que especialmente o VTA 10 foi capaz de aumentar e reduzir o conteúdo de colágeno no rim e no pulmão, respectivamente. Em suma, os vitanolídeos foram capazes de induzir sinais histopatológicos de inflamação e degeneração e influenciar na composição da matriz extracelular dos órgãos avaliados.
**Palavras-chave:** Histopatologia. Vitanolídeos. Toxicidade. Produtos naturais. Antineoplásicos.

## 1 INTRODUÇÃO

No contexto mundial, o câncer, cuja incidência e diversidade têm-se acentuado nos últimos anos, representa um importante problema de saúde pública em decorrência, dentre outros fatores, de sua elevada taxa de mortalidade (INCA, 2022, Siegel et al., 2024). De fato, em 2022, foram registrados aproximadamente 20 milhões de casos novos e cerca de 9,9 milhões de óbitos resultantes dessa neoplasia no âmbito global (Bray et al., 2024).

Frente a esse cenário, as principais estratégias terapêuticas têm-se concentrado, nos últimos anos, na utilização de quimioterápicos e/ou associação destes a procedimentos, como cirurgia, radioterapia e terapia alvo-dirigida (Castonguay et al., 2012). Em particular, no campo da quimioterapia, a descoberta e a bioprospecção de moléculas ou compostos com atividade antitumoral tem despertado o interesse de pesquisadores e da indústria farmacêutica. Essa realidade é especialmente constatada pelos quimioterápicos de origem natural, como vimblastina (Velban®,) vincristina (Oncovin®) e paclitaxel (Taxol®), os quais compreendem 60% desse tipo de fármaco disponibilizado atualmente no mercado (Marques et al., 2022).

Nesse sentido, a literatura menciona que os quimioterápicos de origem natural envolvem agentes alquilantes, antraciclinas, antimetabólitos, compostos de platina, taxanos ou agentes diversos (Chuai; Xu; Wang, 2012). Em grande parte, esses fármacos interagem com o ácido desoxirribonucleico (DNA), ocasionando a morte celular. Apesar da sua origem e da eficácia, esses quimioterápicos promovem efeitos adversos de diferentes intensidades e de forma imediata ou precoce (náuseas, vômitos, anafilaxia, artralgia, flebites, mielossupressão, mucosite, cistite hemorrágica e alopecia) ou tardia (gonadotoxicidade, cardiomiopatia, neurotoxicidade, hepatotoxicidade, nefropatia e pneumotoxicidade) (Bonassa, Gato e Rodrigues, 2022).

Mais especificamente, foi observado que diferentes quimioterápicos podem comprometer a estrutura renal, desencadeando quadro de lesão renal aguda (LRA) e síndrome nefrótica. Essas condições são advindas de lesões à microvasculatura renal, segmentos tubulares, glomérulo e interstício, isoladamente ou em combinação (Rosner; Perazella, 2017). Contudo, outras áreas do organismo podem também ser acometidas, como pulmão e fígado.

Quanto ao pulmão, apesar de pouco comum, alterações morfofuncionais em seus tecidos podem ser evidenciadas, como fibrose pulmonar, tosse, dispneia, astenia súbita ou progressiva e edema pulmonar. Complicações secundárias podem também ocorrer,

como atelectasias, derrame pleural e infecções (Vione et al., 2016). A nível hepático, os quimioterápicos são capazes de reduzir a capacidade de metabolismo e detoxificação do órgão, além de ocasionar indução e/ou inibição enzimática e icterícia (Vione et al., 2016).

Assim, mediante a ocorrência de toxicidade e efeitos adversos, aliado ainda ao fenômeno de quimio-resistência às drogas antitumorais disponíveis, é cada vez mais crescente a necessidade de busca por moléculas com maior espectro de atividade e toxicidade atenuada, principalmente de origem vegetal (Devabattula et al., 2024).

Dentre os compostos vegetais, os vitanolídeos são uma classe de metabólitos secundários que vem ganhando grande destaque no campo científico. Em especial, a alta potencialidade farmacológica evidenciada em modelos *in vitro* e *in vivo*, principalmente a citotoxicidade contra diferentes linhagens de células cancerígenas, imunomodulação, atividade anti-inflamatória e prevenção contra neurodegeneração (White et al., 2016), tornaram esse grupo de moléculas alvo de grande interesse, particularmente no âmbito das neoplasias malignas (Xu et al., 2016; Dom et al., 2020).

Nesse sentido, a vitaferiana A (VTA) se sobressai dentre os vitanolídeos visto seu vasto potencial. Ainda, essa molécula é o único vitanolídeo em estudo clínico de fase I (Pires et al., 2020). Entretanto, mais recentemente, Rocha (2023) isolou e caracterizou novos vitanolídeos a partir das folhas de *Athenaea velutina (Sendtn.)*. Essa autora evidenciou que os compostos isolados 27-desidroxi-24,25-epoxivitafina A (VT1) e 27-desidroxivitafina A (VT2) apresentaram promissora atividade citotóxica frente a linhagens tumorais (leucemia humana – HL-60; cólon – HCT-116; próstata – PC-3; glioblastoma – SNB-19).

Assim, em virtude da alta potencialidade farmacoterapêutica evidenciada para essas novas moléculas, e tendo em vista que avaliação pré-clínica da segurança e toxicidade de novas substâncias é essencial para a bioprospecção de novos fármacos, elas tornaram-se alvos desse estudo. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos tóxicos em camundongos de vitanolídeos (VTA, VT1 e VT2) de *Athenaea velutina* (Sendtn.) D'arcy (Solanaceae).

## 2 METODOLOGIA

### 2. 1 Aspectos éticos

O protocolo experimental deste trabalho foi delineado de acordo com diretrizes internacionais para cuidados com animais, submetido e aprovado pelo Comitê de

Cuidados e Uso de Animais da Universidade de Fortaleza (CEUA-UNIFOR), sob protocolo n° 5418220621.

2.2 Reagentes

As drogas vitaferina A (VTA), 27-Desidroxi-24,25-Epoxivitafina A (VT1) e 27-Desidroxivitafina A (VT2) foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Análise Fitoquímica de Plantas Medicinais II (LAFIPLAM II) da Universidade Federal do Ceará (UFC), todos possuindo grau de pureza superior a 95%. Salvo indicação, todos os produtos químicos foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

2.3 Animais

Camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6J foram adquiridas no biotério central da UNIFOR e mantidas em caixas de polietileno em ciclo claro/escuro de 12 horas, com acesso à água e ração *ad libitum* durante todo o experimento.

2.4 Desenho experimental

Os animais (n = 39), 6-8 semanas de idade, foram aleatoriamente distribuídos em cinco grupos experimentais que receberam solução salina (controle; CNT), dimetilsulfóxido (DMSO – veículo - VEI), VT1, VT2 ou VTA ( 5 mg/kg ou 10 mg/kg) via intraperitoneal (i.p), respectivamente. As doses foram administradas em dias alternados durante 15 dias, totalizando 7 doses. Ao fim do período experimental, os animais foram eutanasiados por *overdose* de solução de cetamina/xilazina, seguido por deslocamento cervical. Logo após, os órgãos (rins, fígado e pulmão) foram dissecados, rapidamente lavados em solução salina e fixados em paraformaldeído 4% para avaliações histológicas. Os diferentes órgãos foram avaliados quanto à morfologia tecidual e ao conteúdo de fibras colágenas.

2.5 Processamento e avaliação histopatológica

Os órgãos dissecados foram fixados em paraformaldeído a 4% durante 4 horas em temperatura ambiente, posteriormente desidratados utilizando etanol em concentração crescente, clarificados em xilol, e por fim, embebidos em parafina líquida. Após resfriados, os órgãos emblocados em parafina foram seccionados em intervalos de 7 µm de espessura, corados com Hematoxilina e Eosina (HE) e examinados com auxílio de microscópio óptico (Nikon, Tokyo, Japan). A avaliação histopatológica foi realizada por um patologista especialista e as alterações observadas foram descritas de forma semi-

qualitativa (Girão-Carmona, Silva, Leite, 2021). Uma média de 30 secções/tratamento foram analisadas sob microscópio óptico (40X). O grau de extensão/intensidade dos achados histopatológicos foi subjetivamente comparado entre os tratamentos pelo patologista analista, e assim classificados em achados ausente (-), leve (+), moderado (++) e intenso (+++).

2.6 Avaliação do conteúdo de fibras colágenas

Para avaliar as fibras colágenas da matriz extracelular nos diferentes órgãos, foi realizada a coloração com Picrosirius Red, conforme Sousa et al. (2020). Resumidamente, secções de cada órgão (7 μm) foram desparafinizadas em xilol e incubadas em solução de Sirius Red (0,1% - #365548-5G, Sigma-Aldrich, Suíça) em solução saturada de ácido pícrico (1,2%) por 1 h, em temperatura ambiente. Em seguida, o excesso de corante foi removido com água acidificada (solução de ácido acético 0,5%) e as secções, então, desidratadas e submetidas à montagem de lâmina. As imagens foram obtidas utilizando microscopia de campo claro em microscópio Nikon ECLIPSE 80i com câmera acoplada (Nikon, Tokyo, Japan) e magnificação de 400×. Uma média de 15 cortes foram avaliados por tratamento. As imagens foram analisadas utilizando a medição do limiar RGB para obter as porcentagens da coloração/marcação em vermelho, expressas em pixels, utilizando o software Image J.

2.7 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o software Graphpad Prism 9.0 (Graphpad Software, Inc., San Diego, EUA). Os dados foram submetidos à avaliação da normalidade (teste de Shapiro-Wilk) inicialmente. Depois, o teste de Kruskal-Wallis, seguida de teste post-hoc de Dunn's, foi usado para detectar diferenças entre os tratamentos. Os dados foram expressos em mediana e a significância estatística definida em $P<0,05$.

## 3 RESULTADOS

Após avaliação histopatológica dos órgãos vitais fígado, rim e pulmão, observou-se que os vitanolídeos induziram alterações teciduais indicativas de toxicidade. Amostras microscópicas dos diferentes órgãos sob as diferentes condições experimentais são visualizadas na Figura 1. Os achados específicos em cada órgão estão descritos posteriormente.

3.1 Fígado

A Tabela 1 mostra a intensidade das alterações histopatológicas observadas no fígado de animais tratados com VT1, VT2 ou VTA (5 e 10 mg/kg). Observou-se que, nos animais submetidos apenas à administração de salina (CNT), a morfologia hepática permaneceu bem preservada, apresentando apenas focos leves de congestão vascular e hemorragia sinusoidal. Para os animais que receberam apenas DMSO (VEI), constatou-se, além desses achados, a presença de esteatose microvesicular e infiltrado inflamatório de grau leve. Nos tratamentos com vitanolídeos 5 mg/kg, além da presença de hepatócitos pcinóticos e tumefeitos, constatou-se uma hemorragia sinusoidal mais intensa entre os camundongos do grupo VT1 em relação aos demais, inclusive CTN e VEI. Fenômeno semelhante foi também registrado para a congestão, cujos animais tratados com VTA exibiram maior hiperemia do que os outros grupos. Ainda, à semelhança de VEI, os camundongos submetidos à VTA apresentaram esteatose microvesicular e infiltrado inflamatório leve.

Quando administrados na concentração de 10 mg/kg, os animais do grupo VT1, além da congestão e da presença de hepatócitos picnóticos e tumefeitos, achados também observados ente os demais vitanolídeos, exibiram hemorragia sunusoidal moderada semelhante à VT2 e esteatose microvesicular e infiltrado inflamatório leves. Quanto a VT2, foi mais evidente a existência de hepatócitos picnóticos quando comparado aos outros grupos, além da detecção de hepatócitos hipertrofiados. Relativo a VTA, a congestão moderada se destacou frente a VT1 e VT2, tida como leve.

Em relação ao conteúdo total de colágeno, esse não apresentou diferença significativa entre os diferentes grupos ($P > 0,05$) (Figura 2).

3.2 Rim

A Tabela 2 demonstra as alterações histopatológicas observadas no rim de animais tratados com 5 e 10 mg/kg de VT1, VT2 ou VTA. No grupo CNT, os achados observados, os quais envolveram morte celular nos túbulos renais, congestão glomerular, hemorragia e infiltrado inflamatório, foram leves, resultado semelhante ao grupo VEI. Esse apresentou ainda congestão intersticial. Ainda, os vitanolídeos, na concentração de 5 mg/kg, intensificaram essas alterações, exceto VT2, cuja morte celular tubular e infiltrado inflamatório foram similares a CNT e VEI, assim como VTA frente a esse infiltrado. Em VT1, houve uma maior morte celular nos túbulos renais e infiltrado inflamatório quando comparado a VT2 e VTA. Além do que, animais do grupo VT2 exibiram congestão

vascular e hemorragia mais intensas em relação aos demais grupos, inclusive CNT e VEI.

Na presença de 10 mg/kg de vitanolídeos, a intensidade das alterações foi similar a CNT e VEI, exceto hemorragia, cuja avaliação foi mais acentuada entre os camundongos vitanolídeos. Diferentemente do registrado em outros grupos, não houve morte celular tubular em VT2 e infiltrado inflamatório nos animais submetidos à administração de vitalonídeos 10 mg/kg.

Em relação ao conteúdo total de colágeno, não houve diferença estatística entre todos os camundongos dos grupos vitanolídeos 5 mg/kg e VT1 e VT2 10 mg/kg quando comparado ao CNT e VEI ($P>0,05$). Contudo, VTA 10 mg/kg apresentou maior conteúdo de colágeno comparado ao CNT e ao VEI ($P<0,05$). Ainda, VTA 10 mg/kg exibiu maior quantidade de colágeno quando comparado a VT1 5 mg/kg ($P<0,05$).

3.3 Pulmão

A Tabela 3 demonstra as alterações histopatológicas observadas no pulmão de animais tratados com 5 e 10 mg/kg de VT1, VT2 ou VTA. No grupo CNT, o achado observado compreendeu apenas a presença de infiltrado infamatório leve e, para o grupo VEI, ele envolveu congestão e edema nessa mesma intensidade. No que concerne aos dados da concentração de 5 mg/kg de vitalonídeos, constatou-se hemorragia alveolar/bronquiolar e infiltrado inflamatório leves entre os animais dos grupos VT1 VTA. Para VT2, além desses achados, foram registrados congestão e edema nessa mesma intensidade.

Quanto aos animais tratados com vitalonídeos 10 mgkg, todos os grupos apresentaram congestão leve, VT1 exibiu infiltrado inflamatório intenso, resultado superior a VT2, e VTA apresentou perda da integridade alveolar e infiltrado leve, dado semelhante a VT2.

Em relação ao conteúdo total de colágeno. não houve diferença estatística entre todos os camundongos dos grupos vitanolídeos 5 mg/kg e VT1 e VT2 10 mg/kg quando comparado ao CNT e VEI ($P> 0,05$). Contudo, VTA 10 mg/kg apresentou menor conteúdo de colágeno comparado ao CNT e ao VEI ($P<0,05$). Ainda, VTA 10 mg/kg exibiu menor quantidade de colágeno quando comparado a VT1 e VT2 5 mg/kg ($P<0,05$).

## 4 FIGURAS E TABELAS

**Tabela 1: Alterações histopatológicas observadas no fígado dos animais tratados**

**com vitanolídeos**

| | CNT | VEI | VT1 (5) | VT2 (5) | VTA (5) | VT1 (10) | VT2 (10) | VTA (10) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Hemorragia sinusoidal | + | + | ++ | + | + | ++ | ++ | + |
| Congestão | + | + | + | + | ++ | + | + | ++ |
| Esteatose microvesicular | - | + | - | - | + | + | - | - |
| Infiltrado inflamatório | - | + | - | - | + | + | - | - |
| Hepatócitos picnóticos | - | - | + | + | + | + | ++ | + |
| Hepatócitos em tumefação | - | - | + | + | + | + | + | + |
| Hepatócitos hipertrofiados | - | - | - | - | - | - | + | - |

CNT: Controle; VEI: Veículo (DMSO); VT1: 27-desidroxi-24,25-epoxivitafina A; VT2: 27-desidroxivitafina A (VT2); VTA: Vitaferina A. Ausência (-), Leve (+), Moderado (++) Intenso (+++).

**Tabela 2: Alterações histopatológicas observadas no rim de animais tratados com vitanolídeos.**

| | CNT | VEI | VT1 (5) | VT2 (5) | VTA (5) | VT1 (10) | VT2 (10) | VTA (10) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Morte celular nos túbulos | + | + | +++ | + | ++ | + | - | + |
| Congestão intersticial | - | + | ++ | ++ | ++ | + | + | + |
| Congestão glomerular | + | + | ++ | +++ | ++ | + | + | + |
| Hemorragia | + | + | ++ | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Infiltrado inflamatório | + | + | ++ | + | + | - | - | - |

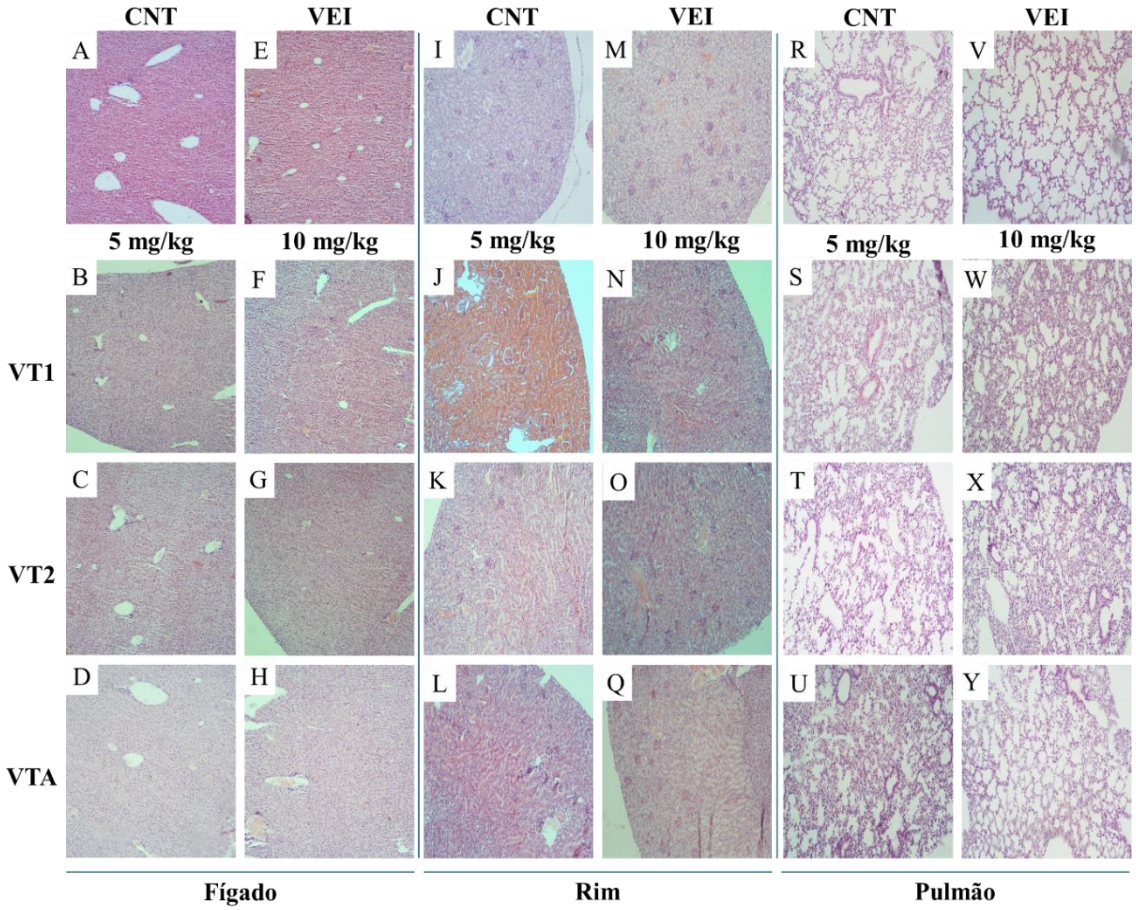
CNT: Controle; VEI: Veículo (DMSO); VT1: 27-desidroxi-24,25-epoxivitafina A; VT2: 27-desidroxivitafina A (VT2); VTA: Vitaferina A. Ausência (-), Leve (+), Moderado (++) Intenso (+++).

**Tabela 3: Alterações histopatológicas observadas no pulmão de animais tratados com vitanolídeos.**

| | CNT | VEI | VT1 (5) | VT2 (5) | VTA (5) | VT1 (10) | VT2 (10) | VTA (10) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Perca da integridade alveolar | - | - | - | - | - | - | - | + |
| Congestão | - | + | - | + | - | + | + | + |
| Edema | - | + | - | + | - | - | - | - |
| Hemorragia alveolar/bronquiolar | - | - | + | + | + | - | - | - |
| Infiltrado inflamatório | + | - | + | + | + | +++ | + | + |

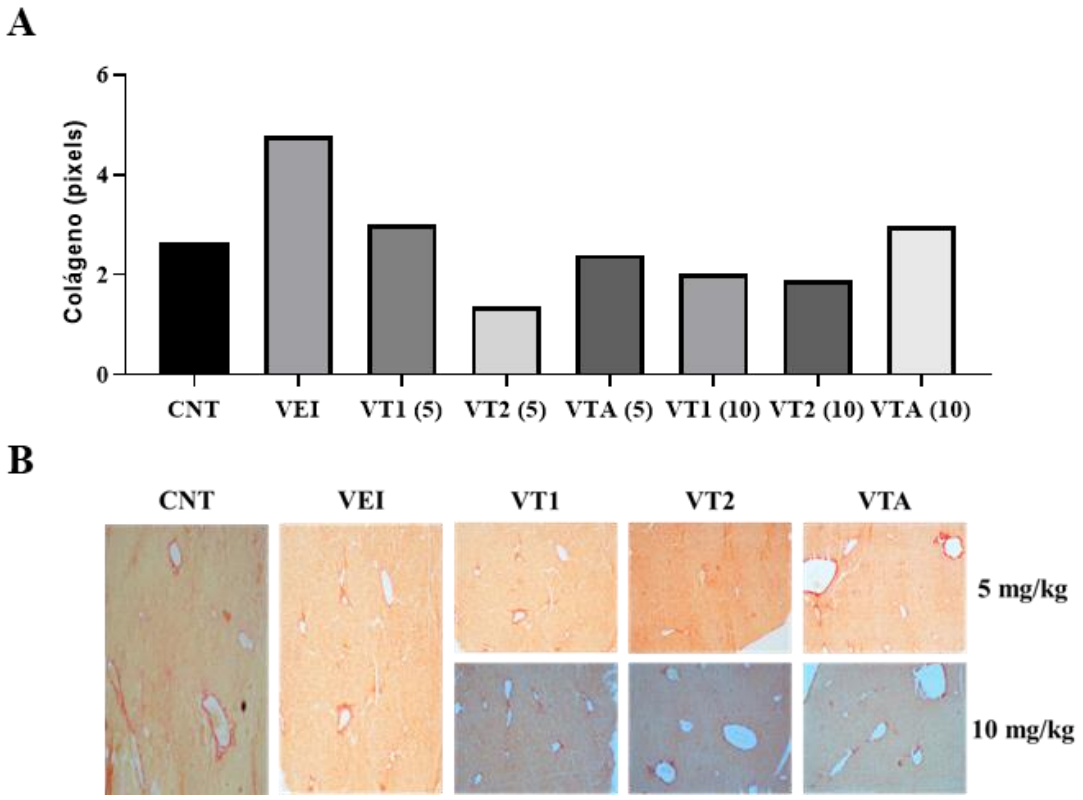
CNT: Controle; VEI: Veículo (DMSO); VT1: 27-desidroxi-24,25-epoxivitafina A; VT2: 27-desidroxivitafina A (VT2); VTA: Vitaferina A. Ausência (-), Leve (+), Moderado (++) Intenso (+++).

**Figura 1.** Imagens microscópicas de fígado (A-H), rim (I-Q) e pulmão (R-Y) de camundongos tratados com solução salina (CNT), DMSO (VEI) ou vitanolídeos (VT1, VT2, VTA) (5 ou 10 mg/kg) coradas com HE (20X).



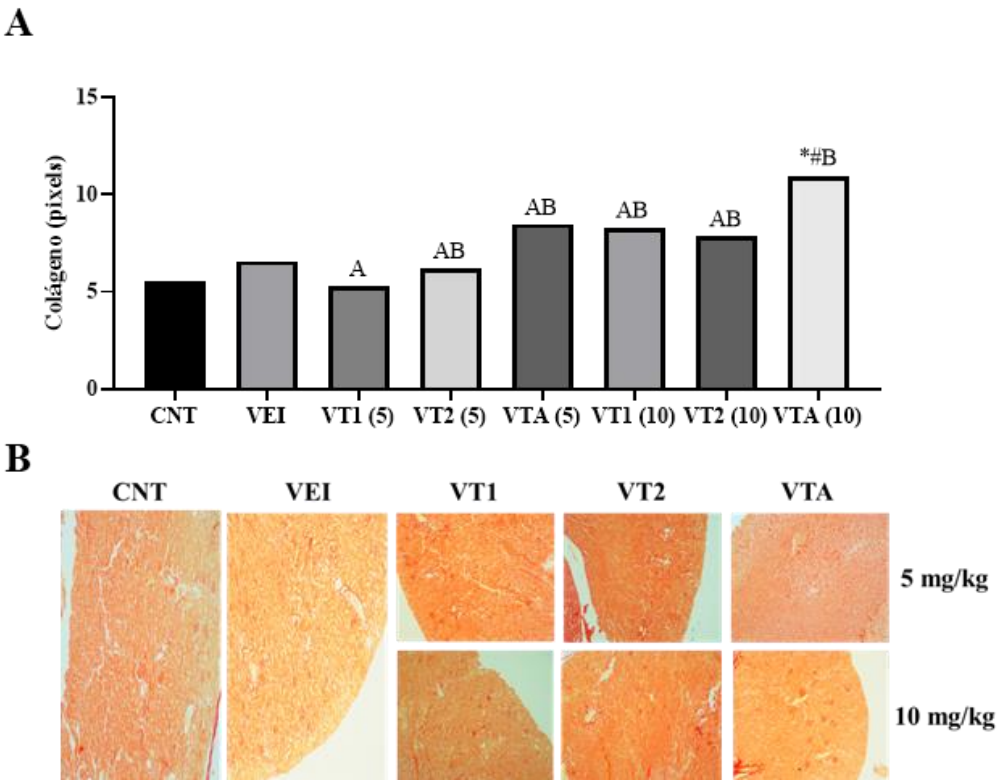

CNT: controle; VEI: Veículo (DMSO); VT1: 27-desidroxi-24,25-epoxivitafina A; VT2: 27-desidroxivitafina A (VT2); VTA: Vitaferina A.

**Figura 2.** Conteúdo de colágeno total no fígado. (A) níveis de colágeno (pixels) no fígado nos diferentes tratamentos. (B) imagens representativas da marcação de colágeno hepático pela coloração de Picrosirius Red (20X)



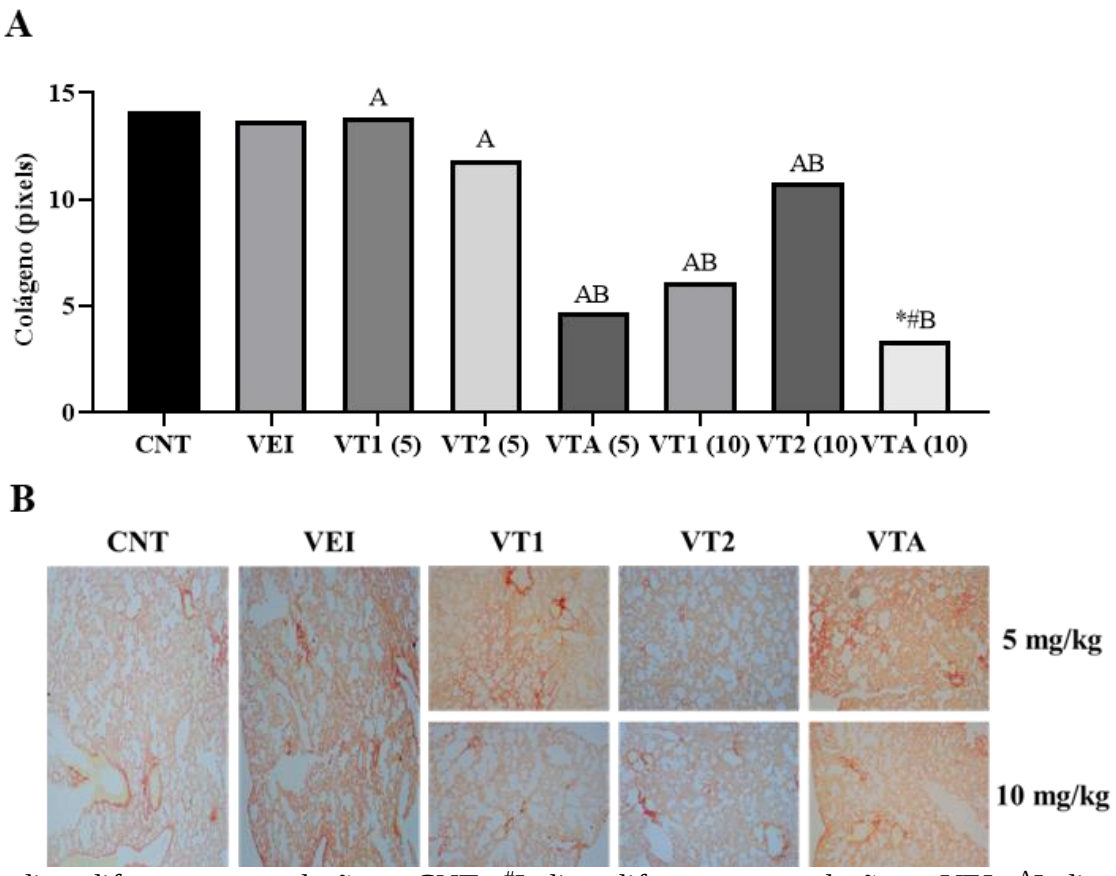

CNT: controle; VEI: Veículo (DMSO); VT1: 27-desidroxi-24,25-epoxivitafina A; VT2: 27-desidroxivitafina A (VT2); VTA: Vitaferina A.

**Figura 3.** Conteúdo de colágeno total no rim. (A) níveis de colágeno (pixels) no rim nos diferentes tratamentos. (B) imagens representativas da marcação de colágeno renal pela coloração de Picrosirius Red (20X).




*Indica diferença em relação a CNT. #Indica diferença em relação a VEI. AIndica diferença entre os tratamentos com vitanolídeos. CNT: controle; VEI: Veículo (DMSO); VT1: 27-desidroxi-24,25-epoxivitafina A; VT2: 27-desidroxivitafina A (VT2); VTA: Vitaferina A.

**Figura 4.** Conteúdo de colágeno total no pulmão. (A) níveis de colágeno (pixels) no pulmão nos diferentes tratamentos. (B) Imagens representativas da marcação de colágeno pulmonar pela coloração de Picrosirius Red (20X).




*Indica diferença em relação a CNT. #Indica diferença em relação a VEI. AIndica diferença entre os tratamentos com vitanolídeos. CNT: controle; VEI: Veículo (DMSO); VT1: 27-desidroxi-24,25-epoxivitafina A; VT2: 27-desidroxivitafina A (VT2); VTA: Vitaferina A.

## 5 DISCUSSÃO

Apesar do aumento na expectativa de vida de pacientes oncológicos em razão do tratamento antineoplásico, os efeitos colaterais tóxicos de medicamentos quimioterápicos podem ser uma grande limitação ao seu uso, além de afetar a qualidade de vida dos pacientes (Nair et al., 2011).

Grande parte dos medicamentos antineoplásicos atualmente disponíveis para o tratamento de diversos tipos de câncer são de origem vegetal (Marques et al, 2022). De forma geral, esses medicamentos originados de metabólitos desempenham suas funções antitumorais interagindo diretamente com o DNA, causando quebras em fita única ou dupla, ou inibindo processos metabólicos essenciais à viabilidade celular, tais como estabilidade do citoesqueleto e mecanismo de síntese e reparo do DNA (Brandão et al., 2010). No geral, esses mecanismos desencadeiam uma série de eventos celulares, podendo resultar dentre eles, em apoptose. Apesar disso, esses mecanismos de ação não

apresentam seletividade às células tumorais, podendo atuar sistemicamente em células saudáveis, originando efeitos adversos, colaterais, toxicidade e complicações secundárias.

É relatado na literatura que os medicamentos quimioterápicos podem induzir consideráveis alterações morfofuncionais em órgãos de suma importância. No fígado, modificações morfofuncionais podem levar à hepatite, cirrose e, eventualmente, à insuficiência hepática (Sharma et al., 2014; Vione et al., 2016; Zeien et al., 2022). No rim, os quimioterápicos podem afetar diferentes compartimentos (glomérulo, interstício e túbulos renais) podendo causar perda celular e funcional no órgão, resultando em lesão renal aguda, necrose tubular aguda tóxica, nefropatia por cristais, proteinúria/síndrome nefrótica e doença renal crônica (Małyszko et al., 2017; Rosner; Perazella, 2017; Zeien et al., 2022). Ainda, alterações pulmonares decorrentes do tratamento quimioterápico podem ocasionar pneumonite intersticial não específica, pneumonite de hipersensibilidade, fibrose pulmonar intersticial, hemorragia alveolar, doença veno-oclusiva, bronquiolite obliterante, dano alveolar difuso e/ou síndrome do desconforto respiratório agudo, derrame pleural e eventos tromboembólicos (Dimopolou et al., 2006). Sendo assim, fica evidente a importância das investigações acerca da toxicidade e segurança de novas moléculas antitumorais.

Nesse estudo, avaliou-se a toxicidade de 27-desidroxi-24,25-epoxivitafina A (VT1), 27-desidroxivitafina A (VT2) e vitaferina A por meio do estudo histopatológico e de composição da matriz extracelular nos órgãos fígado, rim e pulmão. Os vitanolídeos são uma classe de metabólitos secundários que vêm tendo grande destaque nos últimos anos em decorrência do alto potencial citotóxico desse grupo de moléculas frente a linhagens celulares tumorais, dentre outras atividades farmacológicas potenciais (White et al., 2016).

Observou-se que os vitanolídeos estudados (VT1, VT2 e VTA) induziram o aparecimento e/ou intensificação de sinais ligados a eventos inflamatórios e degenerativos, além de morte celular, em todos os órgãos avaliados. No fígado de animais tratados, especialmente na concentração de 10 mg/kg de vitanolídeos, houve presença de picnose e tumefação dos hepatócitos, bem como a presença de infiltrado inflamatório e congestão. Em relação ao rim, na concentração de 5 mg/kg, os indícios de inflamação (infiltrado inflamatório e congestão) e morte celular foram de grau moderado ou intenso, enquanto de grau leve no CNT. No pulmão, notou-se que as alterações induzidas pelos vitanolídeos foram mais discretas que nos demais órgãos. De modo geral, VT2 ocasionou as maiores alterações dentre os vitanolídeos estudados.

Em razão de serem vitanolídeos recentemente isolados e caracterizados pela primeira vez, VT1 e VT2 não possuem estudos na literatura acerca da toxicidade ou qualquer outra atividade biológica. Rocha (2023), que os isolou e caracterizou, evidenciou que a atividade citotóxica apresentada por esses vitanolideos foi não seletiva, afetando tanto linhagens de células tumorais quanto não tumorais, sendo inclusive o $IC_{50}$ de VT2 (0,24) consideravelmente maior que de VT1 (>20) e VTA (1,89) (Rocha, 2023). Referente às características de estrutura-atividade, a literatura aponta que modificações no esqueleto básico dos vitanolideos estão relacionados à potência de suas atividades, tanto farmacológicas, quanto tóxicas. Relata-se que a presença de lactona insaturada na cadeia lateral, especificamente no C24 e C25 e a desoxigenação da lactona, como observada em VT2, mas não em VT1 e VTA, pode estar relacionada a maior potência da atividade biológica (Freitas Misakyan et al., 2021; Singh et al., 2022), podendo justificar os nossos achados quanto à toxicidade dessa molécula.

Em discordância com nossos achados, diversos estudos demonstram que a administração via oral de vitaferina A não induziu alterações histopatológicas no fígado (Vedi e Sabina, 2016; Patel, Hao e Hingorani, 2016; Gupta et al., 2022), rim (Vedi e Sabina, 2016; Gupta et al., 2020) e pulmão (Gupta et al., 2020) em murinos tratados. Sugere-se que as diferenças observadas na literatura em relação aos achados neste estudo, se dão em razão da via de administração utilizada. Em razão da metabolização de fármacos que ocorre quando são administrados via oral, a biodisponibilidade é substancialmente reduzida, enquanto que quando administrada por via intraperitoneal, ou outras vias parenterais, a sua biodisponibilidade é quase próxima de 100% (Pestieau, Stuart, Sugarbaker, 2000; Dai et al., 2019). Achados apontam que a biodisponibilidade de vitaferina A administrada via oral em ratos foi de aproximadamente 33% (Dai et al., 2019), enquanto em camundongos, espécie do nosso estudo, foi aproximadamente 9% (Patil et al., 2014).

Palomino et al. (2024) evidenciaram que a administração intraperitoneal dos mesmos vitanolídeos utilizados em nosso estudo resultou em redução da normalidade de folículos ovarianos, e altas taxas de morte celular, evidenciada através do ensaio TUNEL, especialmente na concentração de 10 mg/kg. Apesar dos extensos relatos na literatura acerca do efeito protetores e benéficos dos vitanolídeos, especialmente da vitaferina A (Berghe et al., 2012; Dutta et al., 2019; Hassania et al., 2020), em nosso estudo, possivelmente a injeção via intraperitoneal dos vitanolídeos, com consequente ausência de efeito de primeira passagem e elevada biodisponibilidade das drogas, ocasionou

indução dos achados inflamatórios e degenerativos observados na histopatologia. Notadamente, em nosso estudo, as manifestações histopatológicas foram mais intensas no rim, possivelmente por esse órgão apresentar alta atividade metabólica, receber um alto aporte de volume sanguíneo, como em razão da via de administração, e ter recebido então uma maior concentração das drogas não metabolizadas.

Yu e Kim (2013) evidenciaram que a vitaferina A induziu o aumento de espécies reativas de oxigênio (EROS) em condrócitos cultivados *in vitro*. A capacidade de induzir a formação de EROs pela VTA também foi evidenciada em outros tipos celulares (Liu et al., 2017). Sabe-se que o estresse oxidativo ocasionado pela superprodução de espécies reativas de oxigênio compõe um dos mecanismos secundários de dano celular de agentes antineoplásicos. Além disso, as EROs são importantes mediadores de processos inflamatórios e de morte celular. O excesso de EROs conhecidamente ocasiona desbalanço intracelular entre fatores pró e anti-apoptóticos (Redza-Dutordoir, Averill-Bates, 2016). Nesse aspecto, Liu et al. (2017) observaram que a ativação da caspase 3, em decorrência do desbalanço entre os níveis de *BAX/BCL-2*, foram responsáveis por induzir a apoptose.

Os vitanolídeos induziram diferentes padrões de conteúdo total de colágeno nos órgãos avaliados. Observou-se que no fígado, não houve quaisquer diferenças. Apesar disso, no rim e pulmão, os níveis de colágeno em VTA 10 mg/kg foram significativamente superiores e inferiores, respectivamente, aos tratamentos controle e veículo. O colágeno é o principal componente da matriz extracelular (MEC), desempenhando um papel de suma relevância na manutenção da morfologia celular, migração, diferenciação e interações celulares (Kadler et al., 2007; Sun, 2021). Disfunções na biorregulação no conteúdo de colágeno na MEC, originadas por fatores fisiológicos (ex: envelhecimento), patológicos (ex: infecções, inflamação) ou estressores exógenos (ex: medicamentos antitumorais), como os vitanolídeos, podem levar a quebra da homeostase e, consequentemente, resultar em comprometimento da estrutura e função de tecidos e órgãos (Kadler et al., 2007; Theocharis et al., 2016; Sun, 2021).

A excessiva deposição renal de colágeno estimulada por VTA 10 mg/kg caracteriza fibrose tecidual. A fribrogênese se dá a partir da transformação dos fibroblastos teciduais em miofibroblastos, que além de alterar sua morfologia e o padrão de secreção de fatores pró-fibróticos, passam a secretar excessivamente componentes da MEC (Theocharis et al., 2016; Sun, 2021). Notadamente, diversos fatores podem desencadear a transformação dos miofibroblastos, dentre eles a inflamação e as EROs

(Peddakkulappagari et al., 2019). Percebeu-se que nenhum dos vitanolídeos, independente da concentração, induziu a presença de extenso infiltrado inflamatório no rim, o que poderia estar diretamente relacionado à fibrose observada. Palomino et al. (2024) observaram que apesar do dano tecidual, os vitanolídeos não induziram aumento na quantidade de células inflamatórias presentes no ovário e, na verdade de modo contrário, o VT1 10 mg/kg ocasionou foi redução. Em vista disso, a excessiva produção de EROs promovida por VTA (Yu e Kim, 2013) pode ter envolvimento na fibrose renal observada neste estudo, ainda que sem uma evidente visualização de processo inflamatório. Curiosamente, VTA 10 mg/kg ocasionou redução no conteúdo de colágeno total no pulmão. Yu e Kim (2013) notaram que em cultura primária de condrócitos, a vitaferina A foi capaz de induzir perda de componentes da MEC, como de colágeno tipo II, proteoglicanos e glicosaminoglicanos, possivelmente através dos efeitos deletérios do excesso de EROs induzido por VTA. Apesar disso, em nosso estudo, os mecanismos que induziram a redução no conteúdo de colágeno no pulmão parecem incertos.

## 6 CONCLUSÃO

Os três vitanolídeos estudados induziram, em diferentes intensidades, alterações histopatológicas relacionadas à inflamação, degeneração e morte celular em fígado, rim e pulmão. De modo geral, a 27-desoxivitaferia A (VT2) ocasionou maiores alterações histopatológicas nos órgãos estudados, sendo o rim o órgão mais afetado. Além disso, a vitaferina (A) 10 mg/kg foi capaz de alterar o conteúdo de colágeno no rim e pulmão. Ressalta-se a necessidade de estudos posteriores acerca da toxicidade dos vitanolídeos, especialmente uma investigação mais aprofundada acerca dos mecanismos moleculares intracelulares desencadeados pelos vitanolideos, as modificações induzidas na matriz extracelular e como as diferentes concentrações destes possam vir a repercutir sobre a morfologia e a funcionalidade de órgãos saudáveis. Espera-se com isso, contribuir para os conhecimentos disponíveis acerca da utilização de vitanolideos para fins terapêuticos.

ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---|---|
| BAX | BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator |
| BCL-2 | B-cell leukemia/lymphoma 2 |
| CEUA | Comitê de Ética de Uso de Animais |
| CNT | Controle |

| | |
|---|---|
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA | Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico) |
| EPM | Erro padrão da média |
| EROs | Espécies reativas de oxigênio |
| HCT-116 | Linhagem celular de leucemia humana |
| HE | Hematoxilina/Eosina |
| HL-60 | Linhagem celular de câncer de cólon |
| INCA | Instituto Nacional do Câncer |
| i.p | Intraperitoneal |
| LAFIPLAM II | Laboratório de Análises Fitoquímicas de Plantas Medicinais II |
| LRA | Lesão renal aguda |
| MEC | Matriz extracelular |
| mg/Kg | Miligrama/quilograma |
| PC3 | Linhagem celular de câncer de próstata |
| RGB | Red, green, blue (vermelho, verde, azul) |
| SNB-19 | Linhagem celular de glioblastoma |
| VEI | Veículo |
| VTA | Vitaferina A |
| VT1 | 27-desidroxi-24,25-epoxivitaferina A |
| VT2 | 27-desidroxivitaferina A |

## REFERÊNCIAS


BRANDÃO, Hugo N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química nova**, v. 33, p. 1359-1369, 2010.

BRAY, Freddie et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 74, n. 3, p. 229-263, 2024.

BERGHE, Wim Vanden et al. Molecular insight in the multifunctional activities of Withaferin A. **Biochemical pharmacology**, v. 84, n. 10, p. 1282-1291, 2012.

BONASSA, Edva Moreno Aguilar; GATO, Maria Inês Rodrigues. Terapêutica

oncológica para enfermeiros e farmacêuticos. In: **Terapêutica oncológica para enfermeiros e farmacêuticos**. 2012. p. 644-644.

CASTONGUAY, Annie et al. New ruthenium (II)–letrozole complexes as anticancer therapeutics. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 20, p. 8799-8806, 2012.

CHUAI, Yunhai; XU, Xiaobin; WANG, Aiming. Preservation of fertility in females treated for cancer. **International journal of biological sciences**, v. 8, n. 7, p. 1005, 2012.

DAI, Tianming et al. Studies on oral bioavailability and first-pass metabolism of withaferin A in rats using LC–MS/MS and Q-TRAP. **Biomedical Chromatography**, v. 33, n. 9, p. e4573, 2019.

DANTZER, Robert; MEAGHER, Mary W.; CLEELAND, Charles S. Translational approaches to treatment-induced symptoms in cancer patients. **Nature reviews Clinical oncology**, v. 9, n. 7, p. 414-426, 2012.

DEVABATTULA, Geetanjali et al. The potential pharmacological effects of natural product withaferin A in cancer: opportunities and challenges for clinical translation. **Planta Medica**, 2024.

DIMOPOULOU, I. et al. Pulmonary toxicity from novel antineoplastic agents. **Annals of oncology**, v. 17, n. 3, p. 372-379, 2006.

DOM, Martin; BERGHE, Wim Vanden; VAN OSTADE, Xaveer. Broad-spectrum antitumor properties of Withaferin A: A proteomic perspective. **RSC medicinal chemistry**, v. 11, n. 1, p. 30-50, 2020.

DUTTA, Rinku et al. Withania somnifera (Ashwagandha) and withaferin A: Potential in integrative oncology. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 21, p. 5310, 2019.

FREITAS MISAKYAN, Micaela F. et al. Structure–activity relationships of withanolides as antiproliferative agents for multiple myeloma: comparison of activity in 2D models and a 3D coculture model. **Journal of Natural Products**, v. 84, n. 8, p. 2321-2335, 2021.

GIRÃO-CARMONA, Virgínia Cláudia Carneiro; SILVA, Andréa Soares Rocha da; LEITE, Ana Caroline Rocha de Melo. Histologia interativa: roteiros de pesquisa. 2021.

GUPTA, Saurabh Kumar et al. Safety, toxicity and pharmacokinetic assessment of oral Withaferin-A in mice. **Toxicology Reports**, v. 9, p. 1204-1212, 2022

HASSANNIA, Behrouz et al. Withaferin A: From ayurvedic folk medicine to preclinical anti-cancer drug. **Biochemical Pharmacology**, v. 173, p. 113602, 2020.

INCA. Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: INCA, 2022.

KADLER, Karl E. et al. Collagens at a glance. **Journal of cell science**, v. 120, n. 12, p. 1955-1958, 2007.

LIU, Xi et al. Withaferin A induces mitochondrial-dependent apoptosis in non-small cell lung cancer cells via generation of reactive oxygen species. **J. BUON**, v. 22, n. 1, p. 244-250, 2017.

MAŁYSZKO, Jolanta et al. Nephrotoxicity of anticancer treatment. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 32, n. 6, p. 924-936, 2017.

MARQUES, Lana Grasiela Alves et al. O impacto da bioprospecção para o descobrimento de novas moléculas terapêuticas. 2022.

NAIR K, Lekha et al. Biological evaluation of 5-fluorouracil nanoparticles for cancer chemotherapy and its dependence on the carrier, PLGA. **International journal of nanomedicine**, p. 1685-1697, 2011.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of natural products**, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020.

PALOMINO, Gaby Judith Quispe et al. Withanolide derivatives: natural compounds with anticancer potential offer low toxicity to fertility and ovarian follicles in mice. **Animal Reproduction**, v. 21, n. 4, p. e20240027, 2024.

PATIL, Dada et al. Determination of withaferin A and withanolide A in mice plasma using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to pharmacokinetics after oral administration of Withania somnifera aqueous extract. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 80, p. 203-212, 2013.

PEDDAKKULAPPAGARI, Chandra S. et al. Withaferin A ameliorates renal injury due to its potent effect on inflammatory signaling. **Biofactors**, v. 45, n. 5, p. 750-762, 2019.

PESTIEAU, S. R.; STUART, O. A.; SUGARBAKER, P. H. Multi-targeted antifolate (MTA): pharmacokinetics of intraperitoneal administration in a rat model. **European Journal of Surgical Oncology (EJSO)**, v. 26, n. 7, p. 696-700, 2000.

PIRES, Nichelle et al. Safety and pharmacokinetics of Withaferin-A in advanced stage high grade osteosarcoma: A phase I trial. **Journal of Ayurveda and integrative medicine**, v. 11, n. 1, p. 68-72, 2020.

REDZA-DUTORDOIR, Maureen; AVERILL-BATES, Diana A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 12, p. 2977-2992, 2016.

ROCHA, Késya Amanda Dantas. Vitanolídeos antiproliferativos e anti-inflamatórios isolados das folhas de Athenaea velutina (Sendtn.) D'Arcy–Solanaceae. **Tese (doutorado)** – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2023.

ROSNER, Mitchell H.; PERAZELLA, Mark A. Acute kidney injury in patients with cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 18, p. 1770-1781, 2017.

SANTOS, Marceli de Oliveira et al. Estimativa de incidência de câncer no Brasil, 2023-

2025. **Revista Brasileira de Cancerologia,** v. 69, n. 1, 2023.

SHARMA, Ankush et al. Chemotherapy induced liver abnormalities: an imaging perspective. **Clinical and molecular hepatology**, v. 20, n. 3, p. 317, 2014.

SIEGEL, R. L.; GIAQUINTO, A. N.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2024. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 74, n. 1, 2024.

SINGH, Amandeep et al. Recent advances in the chemistry and therapeutic evaluation of naturally occurring and synthetic withanolides. **Molecules**, v. 27, n. 3, p. 886, 2022.

SKIRYCZ, Aleksandra et al. Medicinal bioprospecting of the Amazon rainforest: a modern Eldorado?. **Trends in biotechnology**, v. 34, n. 10, p. 781-790, 2016.

SUN, Bo. The mechanics of fibrillar collagen extracellular matrix. **Cell Reports Physical Science**, v. 2, n. 8, 2021.

THEOCHARIS, Achilleas D. et al. Extracellular matrix structure. **Advanced drug delivery reviews**, v. 97, p. 4-27, 2016.

VEDI, Mahima; SABINA, Evan Prince. Assessment of hepatoprotective and nephroprotective potential of withaferin A on bromobenzene-induced injury in Swiss albino mice: possible involvement of mitochondrial dysfunction and inflammation. **Cell biology and toxicology**, v. 32, p. 373-390, 2016.

VIONE, Caroline et al. Avaliação da função pulmonar em pacientes com câncer submetidos à quimioterapia. **Revista De Epidemiologia E Controle De Infecção**, *1*(1), 84-95. 2016.

WHITE, Peter T. et al. Natural withanolides in the treatment of chronic diseases. **Anti-inflammatory nutraceuticals and chronic diseases**, p. 329-373, 2016.

XIA, Yangliu et al. Withaferin A in the treatment of liver diseases: progress and pharmacokinetic insights. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 50, n. 5, p. 685-693, 2022.

XU, Ya-ming et al. 17β-Hydroxy-18-acetoxywithanolides from aeroponically grown Physalis crassifolia and their potent and selective cytotoxicity for prostate cancer cells. **Journal of natural products**, v. 79, n. 4, p. 821-830, 2016.

YU, Seon-Mi; KIM, Song-Ja. Production of reactive oxygen species by withaferin A causes loss of type collagen expression and COX-2 expression through the PI3K/Akt, p38, and JNK pathways in rabbit articular chondrocytes. **Experimental Cell Research**, v. 319, n. 18, p. 2822-2834, 2013.

ZEIEN, Justin et al. Clinical implications of chemotherapeutic agent organ toxicity on perioperative care. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 146, p. 112503, 2022.