



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
INSTITUTO DE PESQUISA EM FÁRMACOS E MEDICAMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS  
E SINTÉTICOS BIOATIVOS



LARISSE VIRGOLINO DA SILVA PONTES

**Investigação do potencial senoterapêutico das N-  
benzoiltiraminas de *Aniba riparia* em modelo de  
senescência endotelial induzida por D-galactose e por  
abordagens *in silico***

ORIENTADOR: PROF. DR. ISAC ALMEIDA DE MEDEIROS

Joao Pessoa

2024

**LARISSE VIRGOLINO DA SILVA PONTES**

**Investigação do potencial senoterapêutico das N-benzoiltiraminas de *Aniba riparia* em modelo de senescência endotelial induzida por D-galactose e por abordagens *in silico***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em produtos naturais e sintéticos bioativos.

Área de concentração: Farmacologia.

**Orientador: Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros**

**João Pessoa**

**2024**

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

P814i Pontes, Larisse Virgolino da Silva.

Investigação do potencial senoterapêutico das N-benzoiltiraminas de Aniba riparia em modelo de senescência endotelial induzida por D-galactose e por abordagens in sílico / Larisse Virgolino da Silva Pontes. - João Pessoa, 2024.

123 f. : il.

Orientação: Isac Almeida de Medeiros.  
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Senescência - Susceptibilidade à doenças. 2. Endotélio - Vasos sanguíneos. 3. Riparinas - Efeitos. 4. Envelhecimento - Doenças cardiovasculares. I. Medeiros, Isac Almeida de. II. Título.

UFPB/BC

CDU 616-053.9(043)

**LARISSE VIRGOLINO DA SILVA PONTES**

**Investigação do potencial senoterapêutico das N-benzoiltiraminas de  
*Aniba riparia* em modelo de senescência endotelial induzida por D-  
galactose e por abordagens *in sílico***

**Aprovada em 28/02/2024.**

**Banca examinadora**



---

**Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros**  
Presidente da Banca



---

**Fabiana de Andrade Cavalcante Oliveira**  
Examinadora interna



---

**Profa. Dra. Maria do Socorro de França Falcão**  
Examinadora externa

*Dedicatória*

Ao meu esposo, **Arthur José Pontes Oliveira de Almeida**, por todo o apoio e amor dedicado; aos meus pais, **Severino Virgolino de Sousa** e **Maria Lúcia de Sousa** pelos valores repassados e por terem me inspirado a trilhar o caminho da educação; e a minha irmã, **Laise Virgolino da Silva** pela amizade e companheirismo ao longo da vida.

*Agradecimientos*

Agradeço inicialmente à **Deus** por ser um porto seguro em minha vida, por me proteger, fortalecer e me conduzir sempre ao caminho do bem.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros**, por ter me aceitado como membro do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular (LabCardio), por todos os ensinamentos transmitidos e apoio acadêmico.

Aos meus amigos e companheiros de vivência científica: **Mathania Silva e Javanyr Junior** por todos os conhecimentos compartilhados, ajuda durante os experimentos e apoio emocional.

Aos alunos de Iniciação Científica do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular, em especial **Adhonias Correia e Eyllen Myllena** por toda ajuda durante e no preparo para os experimentos.

Aos demais membros do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular: Tays Amanda, Viviane Lima, Julio Oliveira, Carol Menezes, Danilo Duarte, Rayane Maria, Eraldo Farias, Guilherme Marques, Itamar Lúcio, Maria Eduarda, Hayaly Felinto, Ricardo Cartaxo, Gabriel Felipe e Camilly Cristinne. Em especial, aos professores integrantes do laboratório: Islânia Giselia, Robson Veras e Maria do Socorro.

Aos **professores** do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (**PPgPNSB**) por todo o conhecimento compartilhado, direcionamentos e por auxiliarem na construção do saber e rigor científico.

À **Universidade Federal da Paraíba**, minha segunda casa por tanto tempo desde a graduação, pelo apoio institucional.

As professoras-membro da banca, **Profa. Dra. Maria do Socorro de França Falcão, Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante Oliveira, Profa. Dra. Islania Giselia Albuquerque Gonçalves e Profa. Dra. Marcia Regina Piuvezam**, pela disponibilidade e confiança.

Ao meu esposo, **Arthur José Pontes Oliveira de Almeida** por todo o incentivo, apoio incondicional, orientação nas questões relativas a ciência e por ser uma fonte de inspiração pra mim no caminho pela excelência.

Aos meus pais, **Severino Virgolino de Sousa e Maria Lúcia de Sousa** por construírem em mim valores voltados para a honestidade, bondade, empatia e dedicação; por todo amor e amparo.

À minha irmã, **Laise Virgolino da Silva**, a melhor amiga que eu poderia ter, por sempre me acompanhar, encorajar e me fazer bem.

A meus sogros, **Lucia Pontes e Fernando Honório** e cunhados **Emanuel Honório e Thamiris Pontes** por todo amparo, suporte e apoio.

A todos os meus colegas de trabalho das **Farmácias Verde Vida** e **Francy** em especial à **Mariana Sá**, por toda ajuda quando precisei alternar os horários de trabalho para cumprir as disciplinas e atividades do mestrado.

A meus chefes **Karen Polyane**, **Karlianne Cristinne** e **Wagner Barros**, por toda compreensão e apoio, me ajudando sempre que necessário para que eu pudesse vencer essa etapa.

A todas as pessoas, amigos, familiares e colegas que me incentivaram, deram força, compreenderam minhas ausências e de algum modo contribuíram para a realização desse sonho.

Muito Obrigada!

*Larisse Virgolino da Silva Pontes*

“E ainda que eu tivesse o dom de profecia,  
e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e  
ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que  
transportasse os montes, se não tivesse amor,  
nada seria”

1 Coríntios 13:2

*Resumo*

## **Investigação do potencial senoterapêutico das N-benzoiltiraminas de *Aniba riparia* em modelo de senescência endotelial induzida por D-galactose e por abordagens *in silico***

Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos).  
PPgPNSB/CCS/UFPB. 2024.

O envelhecimento biológico é uma proteção relacionada ao tempo das funções fisiológicas moleculares, celulares e teciduais. Durante o processo, há o acúmulo de células senescentes no organismo, tornando o indivíduo mais suscetível à doenças, como as cardiovasculares (DCV), principal causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo. O endotélio, camada interna que reveste os vasos sanguíneos, é susceptível a essa condição específica e, quando disfuncional, causa alterações negativas no funcionamento do sistema cardiovascular. Por outro lado, as ferramentas senoterapêuticas podem retardar os danos causados pelo envelhecimento. Portanto, há uma necessidade urgente de busca por novos candidatos a fármacos capazes de mitigar os danos causados pelo envelhecimento. As riparinas, moléculas extraídas da espécie nativa da região amazônica *Aniba riparia* (Nees) Mez, já demonstraram efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes significativos em estudos não clínicos, mecanismos críticos para atenuar a senescência celular. Portanto, este trabalho teve como objetivo investigar o potencial efeito quimioterápico de quatro análogos das N-benzoiltiraminas de *Aniba riparia* (Nees) Mez em modelo de envelhecimento endotelial *in vitro* e caracterizar potenciais alvos para sua ação farmacológica *in silico*. Para isso, foram cultivadas células endoteliais da aorta de rato (RAECs) e utilizada D-(+)-galactose (Dgal) como indutor de senescência. Inicialmente, foi realizada uma triagem tripla para ação anti-senescente (SA- $\beta$ -Gal), viabilidade celular (MTT) e ação antioxidante (DHE) para as quatro riparinas. Esses testes ocorreram em duas situações experimentais: condição basal e em modelo de senescência endotelial. Somente a riparina III conseguiu melhorar a viabilidade celular na condição modelo. Além disso, as riparinas I, III e IV foram capazes de reduzir os níveis de senilidade e melhorar o estresse oxidativo. Outro achado importante foi que apenas a riparina II promoveu redução da viabilidade celular e aumento dos níveis de senescência na condição basal, demonstrando efeito deletério nas concentrações testadas. A riparina III melhorou a viabilidade celular na condição basal, indicativo de maior proliferação ou melhora no metabolismo celular. Além disso, as riparinas I e III apresentaram atividade antioxidante na condição basal. Visando testes *in vivo*, foi investigado o perfil farmacocinético das riparinas, as quais mostraram-se boas candidatas para prospecção. Além disso, em busca de alvos para o mecanismo de ação, selecionamos a riparina I e sistemas proteicos envolvidos nas vias de senescência celular como Nrf-2/Keap1, MAPK, p38, mTOR, NADPH oxidase, Nf- $\kappa$ B, Sirtuin 1 e 5, para realizar o acoplamento molecular. Em conjunto, os resultados revelaram a capacidade da riparina I em se ligar de maneira energeticamente favorável aos alvos selecionados na abordagem *in silico*, relacionados às vias antioxidantes e anti-senescentes (NADPH oxidase, Nf- $\kappa$ B e Sirtuin 5), prospectando um possível mecanismo de ação para os efeitos encontrados.

**Palavras-chave:** Endotélio; envelhecimento; estresse oxidativo; riparinas; senescência.

*Abstract*

**Investigation of the senotherapeutic potential of N-benzoyltyramines from *Aniba riparia* in a model of endothelial senescence induced by D-galactose and by *in vitro* approaches.**

Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos).  
PPgPNSB/CCS/UFPB. 2024.

**ABSTRACT**

Biological aging is a time-related protection of molecular, cellular, and tissue physiological functions. During the process, there is an accumulation of senescent cells in the body, making the individual more susceptible to diseases, such as cardiovascular disease (CVD), the leading cause of morbidity and mortality worldwide. The endothelium, the inner layer that lines the blood vessels, is susceptible to this specific condition and, when dysfunctional, causes negative changes in the functioning of the cardiovascular system. On the other hand, senotherapeutic tools can delay damage caused by aging. Therefore, there is an urgent need to search for new drug candidates capable of mitigating the damage caused by aging. Riparins, molecules extracted from the species native to the Amazon region *Aniba riparia* (Nees) Mez, have already demonstrated significant anti-inflammatory and antioxidant effects in non-clinical studies, critical mechanisms for attenuating cellular senescence. Therefore, this work aimed to investigate the potential chemotherapeutic effect of four analogs of N-benzoyltyramines from *Aniba riparia* (Nees) Mez in an *in vitro* endothelial aging model and characterize potential targets for their pharmacological action *in silico*. For this, rat aortic endothelial cells (RAECs) were cultured, and D-(+)-galactose (Dgal) was used as a senescence inducer. Initially, a triple screening for anti-senescent action (SA- $\beta$ -Gal), cellular planning (MTT), and antioxidant action (DHE) was carried out for the four riparins. These tests took place in two experimental situations: basal condition and in an endothelial senescence model. Only riparin III was able to improve cellular improvement in the model condition. Furthermore, riparins I, III, and IV were able to reduce senility levels and improve oxidative stress. Another important finding was that only riparin II promoted reduced cellular radiation and increased senescence levels in the basal condition, demonstrating an exclusion effect at the concentrations tested. Riparin III improved cellular prediction in the basal condition, indicative of greater attention or improvement in cellular metabolism. Furthermore, riparins I and III showed antioxidant activity in the basal condition. Prospecting *in vivo* tests, the pharmacokinetic profile of riparins was investigated, showing them to be good candidates. Furthermore, in search of targets for the mechanism of action, we selected riparin I and protein systems involved in cellular senescence pathways such as Nrf-2/Keap1, MAPK, p38, mTOR, NADPH oxidase, Nf- $\kappa$ B, Sirtuin 1 and 5, to realize molecular protection. Taken together, the results revealed the ability of riparin to bind in an energetically favorable manner to targets selected in the *in silico* approach, related to antioxidant and anti-senescent pathways (NADPH oxidase, Nf- $\kappa$ B and Sirtuin 5), prospecting a possible mechanism of action for the effects found.

**Keywords:** Endothelium; aging; oxidative stress; riparin; senescence.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. <i>HALLMARKS OF AGING</i> – BIOMARCADORES DO ENVELHECIMENTO .....	29
FIGURA 2. INDUTORES E MARCADORES DE CÉLULAS SENESCENTES .....	31
FIGURA 3. MODELO CONCEITUAL PARA OS EFEITOS DELETÉRIOS DECORRENTES DAS CÉLULAS SENESCENTES NO ENVELHECIMENTO .....	34
FIGURA 4. MODELO CONCEITUAL PARA O PAPEL PATOGÊNICO DA SENESCÊNCIA CELULAR NO ENVELHECIMENTO VASCULAR .....	36
FIGURA 5. CONSEQUÊNCIAS DA SENESCÊNCIA ENDOTELIAL .....	37
FIGURA 6. ACÚMULO DE CÉLULAS SENESCENTES NO ENVELHECIMENTO E O POTENCIAL CLÍNICO DOS SENOTERAPÊUTICOS .....	40
FIGURA 7. MODELO DE ENVELHECIMENTO ACELERADO PELO AÇÚCAR D-(+)-GALACTOSE .....	41
FIGURA 8. FOLHA E FRUTO VERDE DE <i>ANIBA RIPARIA</i> ( <i>NESS</i> ) <i>MEZ</i> .....	44
FIGURA 9. MÉTODO DE PREPARAÇÃO DOS DERIVADOS DAS ALCAMIDAS DE <i>ANIBA RIPARIA</i> ( <i>NESS</i> ) <i>MEZ</i> .....	45
FIGURA 10. ALCAMIDAS NATURAIS ISOLADAS DA <i>ANIBA RIPARIA</i> ( <i>NESS</i> ) <i>MEZ</i> (RIPARINAS I, II E III) E SEU DERIVADO SINTÉTICO (RIPARINA IV) .....	45
FIGURA 11. ISOLAMENTO E CULTURA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DE AORTA DE RATOS (RAECs) .....	60
FIGURA 12. ESQUEMATIZAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS E SEUS RESPECTIVOS TRATAMENTOS .....	63
FIGURA 13. <i>BIOAVAILABILITY RADAR</i> – GRÁFICO DO PERFIL IDEAL DE BIODISPONIBILIDADE DE UM FÁRMACO .....	66
FIGURA 14. GRÁFICO BOILED-EGG .....	68
FIGURA 15. VIABILIDADE CELULAR DE RAECs TRATADAS COM AS RIPARINAS I, II, II E IV NA CONDIÇÃO BASAL UTILIZANDO O ENSAIO DE MTT .....	76
FIGURA 16. VIABILIDADE CELULAR DE RAECs TRATADAS COM AS RIPARINAS I, II, II E IV NO GRUPO MODELO UTILIZANDO O ENSAIO DE MTT .....	77
FIGURA 17. SENESCÊNCIA CELULAR DE RAECs TRATADAS COM AS RIPARINA I, II, II E IV UTILIZANDO O ENSAIO DE SA-B-GAL NO GRUPO BASAL .....	78
FIGURA 18. SENESCÊNCIA CELULAR DE RAECs TRATADAS COM AS RIPARINAS I, II, II E IV UTILIZANDO O ENSAIO DE SA-B-GAL NO GRUPO MODELO .....	80
FIGURA 19. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DAS RIPARINAS I, II, II E IV SOBRE A PRODUÇÃO DE ÂNIONS SUPERÓXIDO EM CULTIVO PRIMÁRIO DE RAECs NA CONDIÇÃO BASAL.....	81

FIGURA 20. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DAS RIPARINAS I, II, III E IV SOBRE A PRODUÇÃO DE ÂNIONS SUPERÓXIDO EM CULTIVO PRIMÁRIO DE RAECs NO GRUPO MODELO .....	83
FIGURA 21. RADAR DE BIODISPONIBILIDADE DAS N-BENZOILTIRAMINAS.....	88
FIGURA 22. GRÁFICO BOILED-EGG PARA AS N-BENZOILTIRAMINAS.....	89
FIGURA 23. INTERAÇÕES ENTRE A RIPARINA I E O NF-κB(A), SUBUNIDADE P40 DA NADPH OXIDASE (C) E SIRTUIN 5 (E) E INTERAÇÕES ENTRE OS LIGANTES-PADRÃO EMETINE E O COMPLEXO KEAP-1-NRF2 (B), APOCININA E A SUBUNIDADE P40 DA NADPH OXIDASE (D) E RESVERATROL E SIRTUIN 5 (F) .....	92

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO DE PBS .....	58
TABELA 2 – COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO DE COLORAÇÃO DE X-GAL .....	59
TABELA 3 – DESCRIÇÃO DOS ALVOS PROTEICOS PARA O ESTUDO DO DOCKING MOLECULAR ...	70
TABELA 4 – ANÁLISE <i>IN SÍLICO</i> DAS CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DAS N-BENZOILTIRAMINAS .....	86
TABELA 5 – PREDIÇÃO DO COMPORTAMENTO FARMACOCINÉTICO DAS N-BENZOILTIRAMINAS PARA ABSORÇÃO GASTRINTESTINAL, PERMEABILIDADE HEMATOENCEFÁLICA E INTERAÇÃO COM P-GP E ISOFORMAS DE CYP450 .....	87
TABELA 6 – VALORES DE ENERGIA DA RIPARINA I COM ALVOS-CHAVE DAS VIAS DE SENESCÊNCIA E ESTRESSE OXIDATIVO PARA AS DUAS FUNÇÕES DE PONTUAÇÃO EM ESTUDO .....	90

## LISTA DE SIGLAS

2-OHEt+: 2-hidroxi-etídio

ADMET: Absorção, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade

AGE: Produtos de Glicação Avançada

ALH: Número de aceptores de hidrogênio

BBB: Barreira hematoencefálica

Bcl-2: Célula B linfoma 2

BDNF: Fator neurotrófico capaz de promover a sobrevivência e a diferenciação neuronal

BrdU: Bromodeoxiuridina

BOP: Benzotriazol-1-il-oxi-tris-(dimetilamino) fosfônio hexafluorofosfato

CAT: Catalase

CDK: Quinases dependentes de ciclinas

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CFA: Adjuvante completo de Freund

cLogP: Coeficiente de partição octanol/água

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CTGF: Fator de crescimento do tecido conjuntivo

CTL: Controle

CYP: Citocromo P

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DBU: 1,8-diazobicyclo[5.4.0]undec-7eno

Dgal: D-(+)-Galactose

DHE: Dihidroetídeo

DCV: doenças cardiovasculares

DL50: Dose letal para 50% dos animais

DLH: Número de doadores de hidrogênio

DM: Dinâmica molecular

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EC: Células endoteliais

ECA: Enzima conversora de angiotensina

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

EGF: Fator de crescimento endotelial  
eNOS: Sintase de Óxido Nítrico endotelial  
ERNs: Espécies Reativas de Nitrogênio  
EROs: Espécies reativas de oxigênio  
ET-1: Endotelina-1  
FFT: Algoritmo rápido de transformação Fourier  
fMLP: N-formil-metionil-leucil-fenilalanina  
GI: Gastrintestinal  
GSH: Glutathiona reduzida  
gpP: Glicoproteína-P  
HIA: Absorção gastrintestinal passiva  
HO-1: Heme-oxigenase  
IA: Inteligência artificial  
ICAM-1: Molécula 1 de adesão intercelular  
IFN- $\gamma$ : Interferon  $\gamma$   
IL-(1 $\beta$ , 2, 4, 6 e 10): Interleucinas 1 $\beta$ , 2, 4, 6 e 10, respectivamente  
IP: Via intraperitoneal  
JAK: Janus cinase  
Keap1: Proteína 1 associada a ECH do tipo Kelch  
log S: Logaritmo decimal da solubilidade molar em água  
MDA: Malonaldeído  
MAPK: Proteína cinase ativada por mitógenos  
MEC: Matriz extracelular  
MMPs: Metaloproteases de matriz  
mTOR: Alvo mecanicista da rapamicina  
mTORC1: Alvo do mecanicista complexo 1 da rapamicina  
MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio  
MVD: Molegro Virtual Docking  
NAD<sup>+</sup>: Nicotinamida adenina dinucleotídeo  
NADPH oxidase: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase  
Nf- $\kappa$ B: Fator nuclear kappa B  
Nrf-2: Fator nuclear eritroíde 2 relacionado ao fator 2  
•NO: Óxido nítrico  
NPT: Partículas de pressão e temperatura constantes

P-(21, 38, 53): Proteína 21, 38 e 53, respectivamente

PAI-1: Inibidor-1 do ativador do plasminogênio

PBS: Solução tampão fosfato

PDB: Banco de dados de proteínas

PEA: População economicamente ativa

p-ERK1/2: Proteína cinase 1/2 ativada por mitógeno fosforilada

PGC1- $\alpha$ : Coativador gama 1-alfa do receptor ativado pelo proliferador de peroxissoma

PI3K: Fosfatidilinositol 3-cinase

p-MEK1/2: Proteína cinase 1/2 ativada por mitógeno fosforilada

pRB: Proteína do retinoblastoma

PVPI: Solução de iodopovidona

pyBOP: Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitripirrolidino-fosfônio

RAECs: Células endoteliais de aorta de ratos

RIP-(I, II, III e IV): riparinas I, II, III e IV, respectivamente

RMSD: Medida da distância média entre os átomos dos dois ligantes

RMSF: Flutuações da raiz quadrada média

RNA: Ácido ribonucleico

SA- $\beta$ -Gal:  $\beta$ -galactosidase associada a senescência

SASP: Fenótipo secretor associado a senescência

SBDD: Método computacional de design de medicamentos baseado em estrutura

SBF: Soro fetal bovino

SIRT-(1, 5, 6): Sirtuin 1, 5 e 6, respectivamente

SnCs: Células senescentes

SOD: Superóxido dismutase

STAT: Ativador de transcrição e transdução de sinal

TF: Fator tecidual

TGF- $\beta$ : Fator de crescimento transformador  $\beta$

THC: Tetra-hidrocurcumina

TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral  $\alpha$

TPSA: Área de superfície topológica polar

TX: Tromboxano

UFPB: Universidade Federal da Paraíba

UPA: Unidade de Produção Animal

VSMC: Células musculares lisas vascular

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>24</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>28</b>
2.1	CAMINHOS MOLECULARES DO ENVELHECIMENTO .....	28
2.2	SENESCÊNCIA ENDOTELIAL.....	35
2.3	CÉLULAS SENESCENTES COMO ALVO FARMACOLÓGICO .....	38
2.4	MODELO DE INDUÇÃO DA SENESCÊNCIA CELULAR POR D-GALACTOSE ...	41
2.5	PRODUTOS NATURAIS COM PROPRIEDADES SENOTERAPÊUTICAS .....	43
2.6	ESTUDOS <i>IN SÍLICO</i> PARA DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS .....	47
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>54</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	54
3.2	OBJETIVO ESPECIFICOS .....	54
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>57</b>
4.1	CONDIÇÕES PARA O ESTUDO .....	57
4.2	ANIMAIS.....	57
4.3	SUBSTÂNCIAS .....	58
4.4	ISOLAMENTO E CULTIVO CELULAR DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS DA ARTÉRIA AORTA DE RATOS (RAECs) .....	59
4.5	SOLUÇÕES NUTRITIVAS PARA CULTIVO CELULAR .....	61
4.6	CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS DA ARTÉRIA AORTA DE RATOS (RAECS).....	61
4.7	INDUÇÃO DA SENESCÊNCIA EM RAECs ISOLADAS COM D-GALACTOSE.....	62
4.8	AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA E POTÊNCIA DAS RIPARINAS I, II, III E IV FRENTE ÀS PROPRIEDADES ANTI-SENESCENTES ( <i>SCREENING</i> ) .....	62
4.8.1	<i>Delineamento experimental</i> .....	62
4.8.2	<i>Teste de viabilidade pelo ensaio do MTT</i> .....	63
4.8.3	<i>Avaliação da atividade da <math>\beta</math>-galactosidase (SA-<math>\beta</math>-GAL)</i> .....	64
4.8.4	<i>Determinação de espécie reativas de oxigênio (EROs)</i> .....	65
4.9	ESTUDOS <i>IN SILICO</i> .....	66
4.9.1	<i>Determinação do Perfil ADMET</i> .....	66

	23
4.9.2 Docking Molecular.....	68
4.9.3 Simulações de Dinâmica Molecular .....	72
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	73
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>75</b>
5.1 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS <i>IN VITRO</i> .....	75
5.1.1 Avaliação do efeito das riparinas I, II, III e IV na viabilidade celular .....	75
5.1.2 Avaliação do efeito das riparinas I, II, III e IV nos níveis de EROs.....	80
5.2 ESTUDOS <i>IN SILICO</i> .....	85
5.2.1 Avaliação do Perfil ADMET .....	85
5.2.2 Radar de Biodisponibilidade.....	87
5.2.3 Gráfico BOILED-Egg .....	88
5.2.4 Simulações de docking molecular.....	89
5.2.5 Simulações de Dinâmica molecular.....	94
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>99</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>110</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>113</b>
<b>ANEXO 1: CERTIDÃO DE APROVAÇÃO CEUA.....</b>	<b>123</b>
<b>APÊNDICE: ARTIGO.....</b>	<b>124</b>

*Introdução*

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo projeções das Nações Unidas, até 2050, 1 em cada 6 pessoas no mundo terá acima de 65 anos, o que infere uma alteração do perfil etário da população mundial (UN, 2022). Esse indicativo traz à tona preocupações com uma possível crise previdenciária, social e dos sistemas de saúde, tendo em vista a falta de políticas públicas para esse grupo, a diminuição da População Economicamente Ativa (PEA) e a maior incidência de doenças crônicas e degenerativas com o avançar da idade. Nesse contexto, a busca por terapias que visem retardar ou até reverter os danos decorrentes do envelhecimento, podem representar uma alternativa promissora para atenuar tal problemática (CHAIB; TCHKONIA; KIRKLAND, 2022).

No Brasil estima-se um aumento considerável na população idosa, com projeções de que o percentual de pessoas com mais de 65 anos atinja 25,5% em 2050, mais que o dobro que nos anos de 2022 quando as taxas eram de 10,9% (IBGE, 2018; 2022).

O envelhecimento refere-se ao conjunto de mudanças fisiológicas progressivas em um organismo que levam ao declínio das funções biológicas e da capacidade deste em se adaptar ao estresse metabólico (CHEN; SHEN; ZHANG; XIONG *et al.*, 2020). Tal processo, ocorre ao longo da vida por mecanismos moleculares, celulares e fisiológicos e que impactam de forma progressiva o indivíduo (CAMPISI, 2020). Atualmente, os doze marcadores envolvidos no envelhecimento, popularmente conhecidos como “*Hallmarks of ageing*” (LÓPEZ-OTÍN; BLASCO; PARTRIDGE; SERRANO *et al.*, 2023) são alvos para ferramentas farmacológicas que objetivem a busca pela longevidade saudável.

Um dos principais marcadores do envelhecimento é o acúmulo de células senescentes (SnCs), as quais são caracterizadas por um estado de parada permanente do ciclo celular, mesmo diante da presença de estímulos mitóticos, e se dá por diferentes indutores de estresse (CAMPISI, 2020). Ademais, o estado senescente é acompanhado por um fenótipo secretor característico (SASP), além da resistência à morte citológica (DI MICCO; KRIZHANOVSKY; BAKER; D'ADDA DI FAGAGNA, 2021). Em contrapartida, a senescência tem um lado positivo, como a supressão de tumores, no entanto, como o avanço da idade, as células nesse estado acumulam-se promovendo efeitos deletérios sistêmicos, os quais estão intimamente conectados como o surgimento de várias condições patológicas, como doenças neurodegenerativas, câncer e doenças cardiovasculares (CAMPISI; D'ADDA DI FAGAGNA, 2007).

O SASP (fenótipo secretor associado a senescência) por sua vez, refere-se ao aumento sistêmico de agentes secretados pelas SnCs, que incluem substâncias solúveis (citocinas pró-inflamatória e quimiocinas), fatores de crescimento e fatores de remodelamento da matriz, além de vesículas extracelulares e metabólitos (COPPÉ; DESPREZ; KRTOLICA; CAMPISI, 2010; FAFIÁN-LABORA; RODRÍGUEZ-NAVARRO; O'LOGHLEN, 2020). Tais mediadores agem reforçando a senescência para a vizinhança e ativando respostas imunes para a depuração celular. Portanto, o acúmulo de células senescentes no organismo leva a um estágio de inflamação crônica conhecido como “*inflammaging*”, contribuindo para os efeitos deletérios do envelhecimento e afetando os diversos órgãos do indivíduo (FRANCESCHI; CAMPISI, 2014).

Em particular, as células endoteliais (ECs) são sensíveis às mudanças decorrentes da senilidade (BLOOM; ISLAM; LESNIEWSKI; DONATO, 2023). No indivíduo jovem, as ECs são responsáveis pela regulação do tônus vascular, liberação de moléculas de sinalização, hemostasia e resposta inflamatória (HAN; KIM, 2023). De fato, com o avançar da idade, são vários os estímulos de estresse enfrentados pelas ECs, muito dos quais são fontes proeminentes de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), essas por sua vez levam a ativação de vias de sinalização sensíveis a variação no equilíbrio redox, incluindo a regulação do Fator de transcrição Nuclear KB (NF- $\kappa$ B) que amplifica a resposta pró-inflamatória (DE ALMEIDA; DE OLIVEIRA; PONTES; JÚNIOR *et al.*, 2022; DE ALMEIDA; REZENDE; DANTAS; SILVA *et al.*, 2020). O microambiente resultante contribui para a patogênese das doenças vasculares no envelhecimento, relacionadas ao dano endotelial, proliferação de células musculares lisas vascular (VSMC) e a remodelação da matriz extracelular, mecanismos envolvidos com a gênese e progressão de condições cardiovasculares, como aterosclerose e hipertensão (ALMEIDA; RIBEIRO; MEDEIROS, 2017; UNGVARI; TARANTINI; DONATO; GALVAN *et al.*, 2018). Infere-se, portanto, que a modulação do sensor redox NF- $\kappa$ B, por moléculas senoterapêuticas, pode exercer um papel importante na prevenção de manifestações clínicas vasculares no processo de senescência (DE ALMEIDA; REZENDE; DANTAS; SILVA *et al.*, 2020).

Cumulativamente, dados não-clínicos sugerem que a redução no número de SnCs levam ao retardamento do envelhecimento, além de prevenir o surgimento e agravamento de várias doenças relacionadas com a idade, como as cardiovasculopatias (ROBBINS; JURK; KHOSLA; KIRKLAND *et al.*, 2021; TCHKONIA; PALMER; KIRKLAND, 2021). Os senoterapêuticos, englobam vários métodos farmacológicos, os quais incluem o emprego de senolíticos (moléculas que direcionam e promovem especificamente a morte de SnCs) e os senomórficos (moléculas que diminuem ou inibem o SASP e a propagação das SnCs, através de mecanismos

antioxidantes e antiinflamatórios) (BLAGOSKLONNY, 2021; GASEK; KUCHEL; KIRKLAND; XU, 2021). Dentre os fármacos senoterapêuticos atualmente em estudo, algumas classes de substâncias de origem natural se destacam, como os flavonoides quercetina e fisetin os quais atuam como senolíticos e a apigenina e kaempferol com comprovada ação senomórfica em trabalhos anteriores (AL-NAGGAR; KUCHEL; XU, 2020).

Indubitavelmente, as plantas constituem uma fonte promissora de ativos com propriedades positivas na área de estudo em questão. Nesse sentido, as N-benzoiltiraminas, grupo de alcaloides extraídas da espécie *Aniba riparia* (Nees) Mez – planta típica da região Amazônica – dotadas de ação antioxidante e anti-inflamatória (de acordo com estudos *in vitro* presentes na literatura) traz à tona um potencial efeito benéfico no contexto da *senescência celular* (GOMES; ARAUJO; SILVA; SANTOS *et al.*, 2021; SILVA; DAMASCENO; SILVA; SILVA *et al.*, 2015). Portanto, o objetivo desse trabalho foi investigar os efeitos dos homólogos e análogos das N-benzoiltiraminas extraídas da *Aniba riparia* (Nees) Mez (riparinas I, II, III e IV) em modelo de senescência celular a partir do cultivo primário de Células Endoteliais da Artéria Aorta de Ratos induzidas por D-(+)-galactose através de abordagens *in silico* e *in vitro*.

*Referencial Teórico*

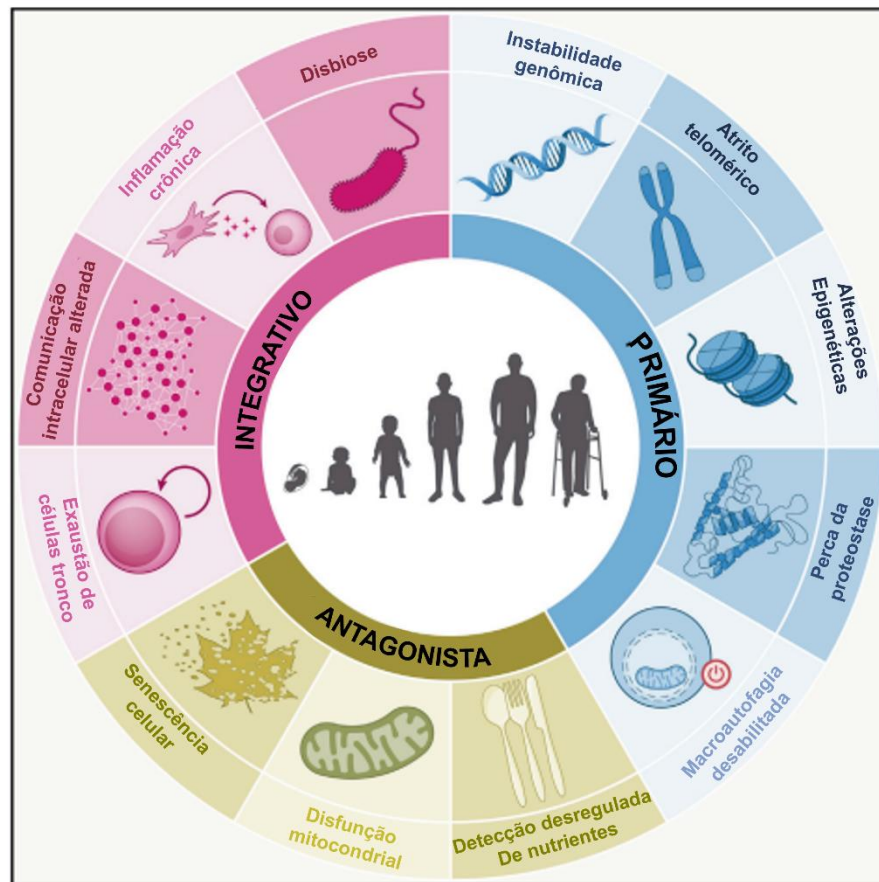
## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 CAMINHOS MOLECULARES DO ENVELHECIMENTO

O envelhecimento é um processo universal, intrínseco e deletério caracterizado pela perda progressiva da função dos tecidos e órgãos, resultando em aumento do risco no desenvolvimento de condições patológicas, como câncer, doenças cardiovasculares, diabetes e síndromes neurodegenerativas (GUO; HUANG; DOU; YAN *et al.*, 2022). A teoria celular postula que o envelhecimento humano é o resultado do envelhecimento celular, no qual gradativamente as células atingem a senescência (MOHAMAD KAMAL; SAFUAN; SHAMSUDDIN; FOROOZANDEH, 2020).

Diversos mecanismos estão implicados no envelhecimento, cujas principais características incluem o acúmulo progressivo de agressões moleculares e falta de reparo, resultando em disfunção orgânica e maior propensão ao desenvolvimento de doenças (DE MAGALHÃES; PASSOS, 2018). Todas as estruturas biológicas (DNA, proteínas, lipídeos, carboidratos e organelas) são suscetíveis ao desgaste metabólico e danos, que podem ter origens endógenas seja por superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs), ou ainda podem ser derivados de fontes extrínsecas como radiação, luz ultravioleta, exposição a toxinas, tratamento com quimioterápicos, mutações químicas e infecções virais. Tais indutores estão intrinsecamente relacionados aos caracteres relacionados ao envelhecimento que incluem alterações epigenéticas, perda da homeostase proteica, instabilidade genômica com ativação de oncogenes, disfunção mitocondrial, exaustão de linhagens regenerativas, disfunção mitocondrial, atrito telomérico, falha nos mecanismos de sinalização celular, presença de disbiose e acúmulo de células senescentes, além de falha nos mecanismos de autofagia. Em conjunto, tais marcadores são conhecidos popularmente como os pontos-chave do envelhecimento ou “*Hallmarks of ageing*” em inglês (Figura 1) (LÓPEZ-OTÍN; BLASCO; PARTRIDGE; SERRANO *et al.*, 2023).

**Figura 1.** *Hallmarks of aging* – biomarcadores do envelhecimento.



**Legenda.** Esquema representativo de 12 características do envelhecimento, incluindo: instabilidade genômica, atrito nos telômeros, alterações epigenéticas, perda de proteostase, macroautofagia desativada, detecção desregulada de nutrientes, disfunção mitocondrial, senescência celular, exaustão de células-tronco, alterações comunicação intercelular, inflamação crônica e disbiose. Tais mecanismos são agrupados em três categorias: primários, antagonísticos e integrativos.

**Fonte:** Adaptado (LÓPEZ-OTÍN; BLASCO; PARTRIDGE; SERRANO *et al.*, 2023)

A Hipótese “*Geroscience*” sustenta que estes pilares, incluindo a senescência celular, progridem em conjunto e podem ser causas fundamentais que contribuem para a fisiopatologia de múltiplas doenças e disfunções relacionadas com a idade (incluindo as síndromes geriátricas como fragilidade, imobilidade, sarcopenia/perda muscular, comprometimento cognitivo) e perda de resiliência, que envolve a diminuição da capacidade de recuperação de estresses como lesões, cirurgias, quimioterapia, infecções, ou a capacidade de montar uma resposta de anticorpos às imunizações (KENNEDY; BERGER; BRUNET; CAMPISI *et al.*, 2014). Ao compreender e visar a senescência celular e os outros pilares do envelhecimento, em detrimento das doenças individuais é concebível que a multimorbidade possa ser reduzida e a esperança de

saúde aumentada, com a realização de benefícios sociais e econômicos substanciais (SCOTT; ELLISON; SINCLAIR, 2021).

Nesse contexto, o processo de senescência celular vem ganhando bastante destaque.. De fato, vários “*Hallmarks of aging*”, aliado a vários estressores ao longo do tempo, conduzem ao estado de senescência. Nessa condição, as células tem seu metabolismo preservado, mas o ciclo celular é interrompido (principalmente na fase G1) – geralmente de forma irreversível – mesmo diante da presença de estímulos para a divisão (CAMPISI, 2020).

É crucial ressaltar que a senescência representa em um destino previsível para as células, mediante um mecanismo denominado senescência replicativa, estratégia de proteção no qual parte de uma sequência bem conservada de bases nitrogenadas presentes na porção final de cada cromossomo – telômeros – nas células somáticas é perdida, após cada divisão celular, promovendo o encurtamento dessa região, conhecida como o “relógio biológico” que permite a manutenção da integridade cromossômica (LIU; WANG; WANG; LIU, 2019). Assim, estima-se um número finito de divisões celulares, conhecido como “*hayflick limit*” (HAYFLICK; MOORHEAD, 1961) e, depois disso, as células tornam-se senescentes, exibindo características morfológicas (aumento do volume, presença de vacúolos citoplasmáticos e achatamento à microscopia óptica) e funcionais, com alterações transcricionais, metabólicas e epigenéticas. Tais alterações são evidenciadas pela presença de marcadores específicos, utilizados como parâmetros em ensaios experimentais que visam o estudo desta condição. Portanto, durante o processo de envelhecimento, ocorre o acúmulo de células senescentes (SnCs), seja de forma replicativa ou induzida por estresses – prematura – as quais são consideradas alvos para terapias que objetivam a melhora na longevidade (Figura 2) (CHAIB; TCHKONIA; KIRKLAND, 2022; GASEK; KUCHEL; KIRKLAND; XU, 2021).

**Figura 2.** Indutores e marcadores de células senescentes



**Legenda.** O envelhecimento é caracterizado pelo acúmulo de células senescentes no corpo. A senescência pode ser alcançada de forma replicativa ou induzida por estresse. Após estímulo, as vias p16 e p53/p21 convergem entre si, regulando o mecanismo Rb, levando à parada do ciclo celular e, conseqüentemente, as mudanças fenotípicas associadas à senescência. Isto resulta na liberação de citocinas e quimiocinas, conduzindo a uma inflamação sistêmica, processo característico do envelhecimento e de doenças relacionadas com a idade. As células senescentes são caracterizadas por alta atividade lisossomal da enzima  $\beta$ -galactosidase que em associação com outros fatores característicos, constitui o padrão ouro para sua caracterização. SA- $\beta$ -Gal:  $\beta$ -galactosidase associada a senescência; BrdU: Bromodeoxiuridina; Ki67: Membro da família de histonas H2A X; TIF: Focos induzidos por disfunção de telômeros; IL-6 e IL-8: Interleucinas 6 e 8 respectivamente.

**Fonte:** (ALMEIDA; RIBEIRO; MEDEIROS, 2017).

Nas SnCs observa-se um aumento na atividade da enzima hidrolase lisossômica denominada  $\beta$ -galactosidase, funcional em pH 6,0, esta pode ser identificada por citometria de fluxo, utilizando o di-D-galactopiranosídeo de fluoresceína como substrato, a reação resultante gera um acúmulo de grânulos citoplasmáticos e hipertrofia a microscopia óptica (DEBACQ-CHAINIAUX; ERUSALIMSKY; CAMPISI; TOUSSAINT, 2009).

Ademais, observa-se à cessação da proliferação devido à ativação das vias supressoras de tumor p53/p21 e p16/RB. As proteínas p16, p21 e p53 atuam como inibidores das cinases dependentes de ciclinas (CDKs) – as quais por meio de fosforilação modulam a progressão ou

interrupção do ciclo celular – e atuam, portanto, interrompendo a divisão celular, mecanismo crucial contra o desenvolvimento de tumores (BURTON; KRIZHANOVSKY, 2014; DE MAGALHÃES; PASSOS, 2018). Em consequência da supressão da atividade das CDKs, a proteína do retinoblastoma (pRB) é ativada. A pRB desempenha um papel central na senescência, principalmente devido à sua capacidade em ligar-se e inativar a família de fatores de transcrição E2F, importantes indutores de proteínas do ciclo celular e fatores de replicação do DNA necessários para o crescimento celular (DI MICCO; KRIZHANOVSKY; BAKER; D'ADDA DI FAGAGNA, 2021).

Adicionalmente, as SnCs exibem caracteres associados a danos no DNA, como segmentos com alterações na cromatina que reforçam a senescência (DNA-SCARS) e focos de heterocromatina, além de redução na lamina-B1, refletindo uma ruptura na lamina nuclear. Essas alterações são potencialmente envolvidas na determinação da decisão do destino celular em direção à senescência (SCHUMACHER; POTHOF; VIJG; HOEIJMAKERS, 2021).

Outro marcador importante é a presença de um fenótipo secretor bem definido – Fenótipo Secretor Associado à Senescência (SASP) – caracterizado pela super produção de interleucinas, proteases, citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, lipídeos, enzimas degradadoras de matriz extracelular como metaloproteases de matriz (MMPs), componentes insolúveis/matriz extracelular (MEC) e outros fatores solúveis que levam a um processo inflamatório agudo mesmo na ausência de patógenos (“inflamação estéril”) (HUANG; HICKSON; EIRIN; KIRKLAND *et al.*, 2022), intimamente relacionado com a patogênese ou agravamento de doenças relacionadas com a idade, como hipertensão, arteriosclerose, Alzheimer e câncer, por exemplo (FERRUCCI; FABBRI, 2018; FRANCESCHI; CAMPISI, 2014; FRANCESCHI; GARAGNANI; PARINI; GIULIANI *et al.*, 2018).

Um importante alvo na senescência para direcionamento terapêutico são as Sirtuins, grupo de proteínas dependentes de NAD<sup>+</sup> que atuam como silenciadores da expressão gênica pela desacetilação de histonas, controle da recombinação do DNA ribossômico e reparo do DNA, conferindo estabilidade cromossômica e longevidade em múltiplos organismos. Estas moléculas são essenciais para os efeitos benéficos induzíveis por restrição alimentar (BLOOM; ISLAM; LESNIEWSKI; DONATO, 2023). A SIRT1 - Sirtuin de mamíferos mais bem caracterizada – está localizada na região subnuclear e desacetila muitas proteínas não-histonas impactando em numerosos processos fisiológicos, incluindo apoptose, metabolismo e resistência ao estresse. Além disso, a inibição de Sirtuins, como as SIRT1 e SIRT6, aumenta a senescência das células endoteliais em cultura e evidências sugerem que tais moléculas previnem a senescência protegendo o DNA e reduzindo a ativação da via de senescência p53-

p21 (TABIBZADEH, 2021). Outro achado importante indica a habilidade da SIRT5 (presente em abundância na mitocôndria) em prevenir a senescência de células-tronco mesenquimais derivadas do sangue do cordão umbilical humano induzida por TNF- $\alpha$ , mediante efeitos antioxidantes via aumento na expressão de superóxido dismutase-2 (SOD2) dependente de Nrf2, contribuindo com a manutenção da homeostase das espécies reativas de oxigênio mitocondriais (mtROS) (JUNG; CHAE; CHANG; CHOI *et al.*, 2022).

Outro importante mediador do metabolismo que pode regular o processo de senescência é o alvo mamífero da rapamicina (mTOR), uma serina-treonina cinase que detecta os níveis de nutrientes celulares e integra tanto os sinais intra quanto os extracelulares, servindo como um eixo central para o metabolismo, crescimento, proliferação e sobrevivência, regulando positivamente a síntese proteica e negativamente a via da autofagia. Nas células senescentes, altos níveis de atividade de mTOR podem mitigar o efeito da autofagia na eliminação de proteínas e organelas excessivas e danificadas, acelerando assim a progressão da senescência. A atividade excessiva de mTOR durante o envelhecimento pode gerar acúmulo de proteínas anormais em células senescentes, isto, por sua vez, pode estar relacionado com a gênese de doenças degenerativas onde observa-se a formação de agregados proteicos (TABIBZADEH, 2021).

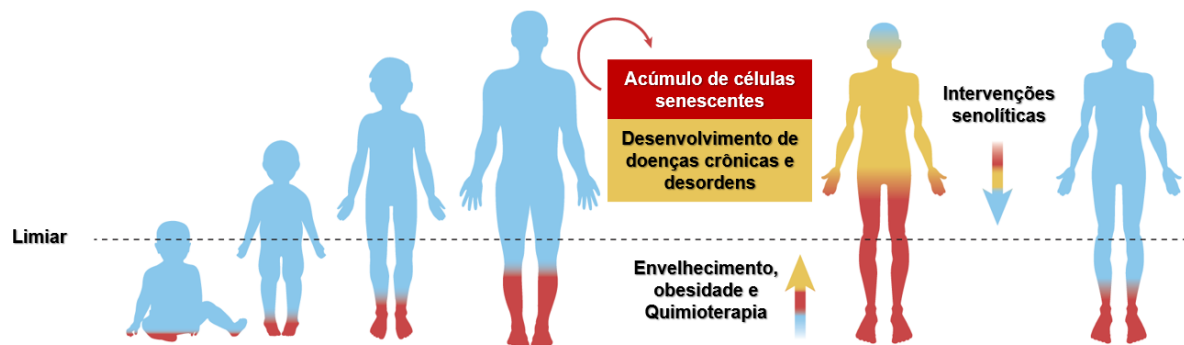
A desregulação do mTOR foi descrito em diversas doenças relacionadas à idade, como a diabetes tipo 2. Além disso, já existe, evidências substanciais de que mTOR desempenha um papel de modulação negativa na longevidade. Em *Drosophila melanogaster*, o aumento na expectativa de vida pode ser alcançado pela superexpressão de supressores desse complexo proteico (TOR, dTsc1 de dTsc2). Da mesma forma, a utilização de técnicas genéticas de manipulação, promovendo o esgotamento de proteínas-membro do mTORC1 (TOR ou RAPTOR) por RNA de interferência (RNAi) em *C.elegans* é capaz de prolongar a vida útil do modelo (TABIBZADEH, 2021).

Além disso, o mTORC1 está ligado à biogênese mitocondrial através da regulação da atividade do PGC1- $\alpha$  (coativador transcricional que regula os genes envolvidos no metabolismo energético). Apoiando essa ideia, estudos de Lerner e colaboradores mostram que a redução da função mTORC1 pelo tratamento com rapamicina aumenta o potencial da membrana mitocondrial, reduz os níveis de EROs e aumenta a expectativa de vida replicativa (LERNER; BITTO; PULLIAM; NACARELLI *et al.*, 2013).

A senescência desempenha um papel fundamental na fisiologia incluindo reparo tecidual, supressão de tumores, cicatrização de feridas e prevenção de danos; no entanto seu acúmulo gera injúria (HUANG; HICKSON; EIRIN; KIRKLAND *et al.*, 2022). Recentemente,

XU e colaboradores demonstraram que o transplante de um pequeno número de SnCs para animais jovens saudáveis da mesma linhagem resulta no desenvolvimento de funções físicas prejudicadas, mimetizando o estado de envelhecimento (XU; PIRTSKHALAVA; FARR; WEIGAND *et al.*, 2018). Isto apoia a hipótese de que, quando a carga de SnCs aumenta além da sustentabilidade em um tecido, são percebidas alterações patológicas que resultam em doenças (Figura 3) (CHAIB; TCHKONIA; KIRKLAND, 2022).

**Figura 3.** Modelo conceitual para os efeitos deletérios decorrentes das células senescentes no envelhecimento.



**Legenda.** As células senescentes (SnCs) estão presentes em todas as fases da vida de um indivíduo. Inicialmente, as SnCs apresentam efeito benéfico atuando como supressores de tumores, no entanto, durante o processo de envelhecimento, os estímulos são cada vez mais frequentes, culminando com o acúmulo delas no organismo. Dessa forma, após certo limite, as consequências negativas desse processo começam a surgir, como o desenvolvimento de doenças relacionadas com a idade. Atualmente, terapias direcionadas para as SnCs “senoterapêuticas” são uma alternativa na prevenção e/ou combate as doenças relacionadas com a idade.

**Fonte:** ADAPTADA de (CHAIB; TCHKONIA; KIRKLAND, 2022).

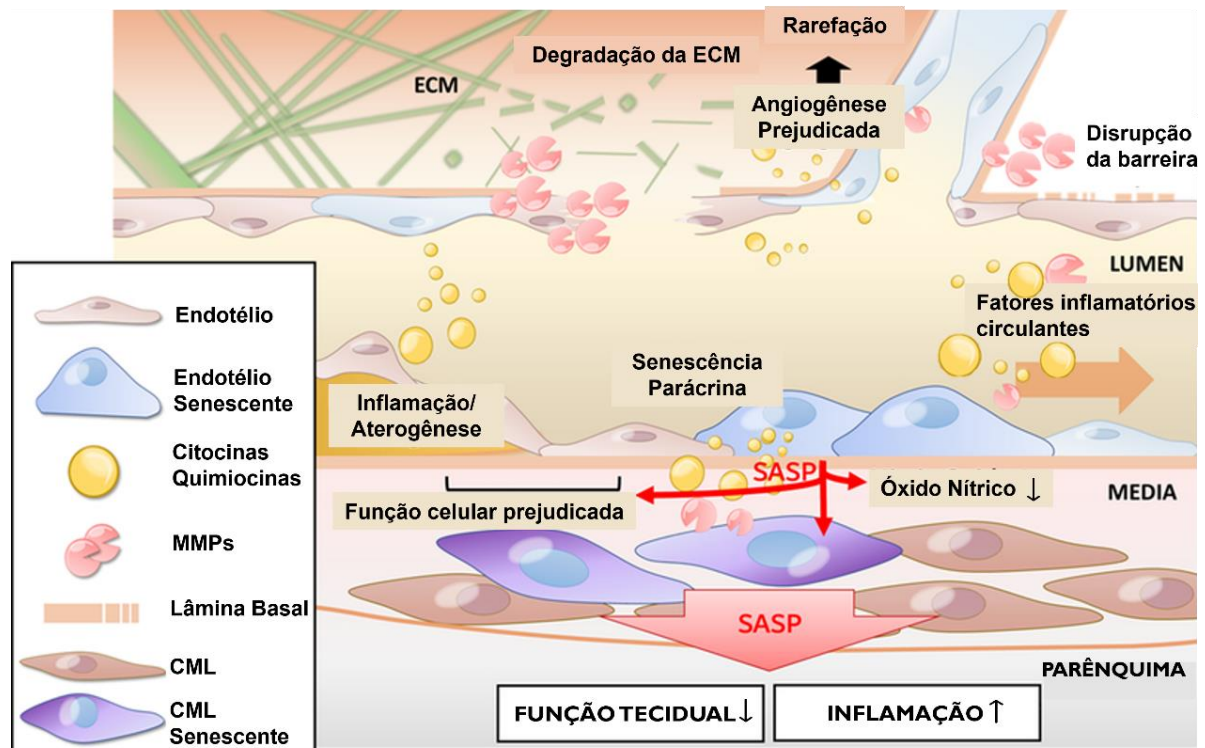
Além dos fatores de estresse, acredita-se que o aumento no número de SnCs deve-se a um sistema imunológico “desgastado”, incapacitando a eliminação destas – “imunosenescência” – somado a redução do potencial regenerativo por “exaustão de células-tronco” (LIU; LIANG; REN; GUO *et al.*, 2023; MYLONAS; O’LOGHLEN, 2022). Em detrimento disto, a gerociência busca o desenvolvimento de terapias que visem prevenir o acúmulo de células senescentes ou ainda a morte direcionada dessas, mediante emprego de tecnologias multidisciplinares de diversos campos, como biologia, química, nanotecnologia e imunologia com o objetivo de prevenir a progressão de enfermidades ou ainda o tratamento direcionado do dano gerado pelo SASP, diminuindo assim as comorbidades relacionadas com a idade (KIRKLAND; TCHKONIA, 2020; LAGOUMTZI; CHONDROGIANNI, 2021).

## 2.2 SENESCÊNCIA ENDOTELIAL

No âmbito do sistema cardiovascular, o aumento do número de células senescentes cardíacas, musculares, endoteliais e progenitoras endoteliais além do microambiente inflamatório tem sido associado à disfunção, que conduz à progressão de várias doenças, como hipertensão, aterosclerose, insuficiência cardíaca e acidente vascular cerebral (ALMEIDA; RIBEIRO; MEDEIROS, 2017; UNGVARI; TARANTINI; DONATO; GALVAN *et al.*, 2018). Tendo em vista o impacto destas na morbidade e mortalidade dos idosos, o estudo aprofundado dos marcadores do envelhecimento vascular, bem como, a busca por terapias de prevenção ou reversão de dano nesse sistema são de grande valia.

O endotélio é uma monocamada de células altamente dinâmica que reveste a camada interna vascular. As células endoteliais (ECs) desempenham papel importante na manutenção da função vascular, fluidez do sangue e hemostasia, recrutamento de células imunológicas, além do controle do tônus vascular (HAN; KIM, 2023; ROSSMAN; KAPLON; HILL; MCNAMARA *et al.*, 2017). Para tanto, as ECs sintetizam e liberam vários mediadores de sinalização, como por exemplo o Óxido Nítrico (NO), prostaciclina e endotelina 1 (KATSUUMI; SHIMIZU; YOSHIDA; MINAMINO, 2018). De fato, o NO contribui para controlar a interação entre as células circulantes e o endotélio, pois ajuda a prevenir a adesão de monócitos, que são uma importante fonte celular circulante de fator tecidual (TF), o iniciador fisiológico da cascata de coagulação do sangue. Além disso, o NO também impede a regulação positiva de TF pelo endotélio inflamado e inibe a adesão, ativação e agregação plaquetária limitando assim a formação de trombos, evento esse comum em idosos (Figura 4) (GROVER; MACKMAN, 2020).

**Figura 4.** Modelo conceitual para o papel patológico da senescência celular no envelhecimento vascular.



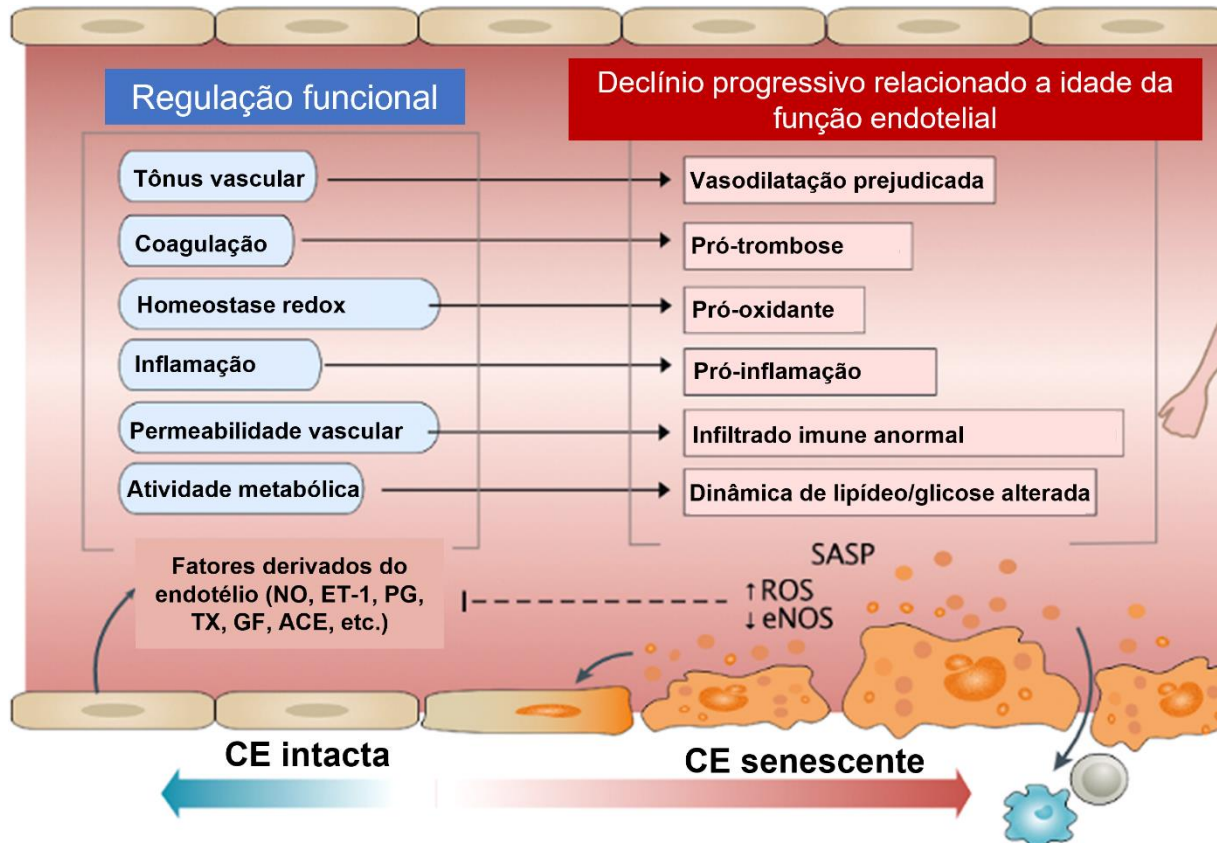
**Legenda:** Modelo conceitual para o papel patológico da senescência celular no envelhecimento vascular. O modelo prevê que o aumento da presença de células endoteliais ou musculares lisas (CML) senescentes na vasculatura envelhecida e seu secretoma pró-inflamatório (SASP [fenótipo secretor associado a senescência]) contribui para a angiogênese prejudicada e a rarefação microvascular, remodelação patológica da matriz extracelular (ECM), ruptura de barreira, inflamação crônica e aterogênese. Abreviações: ECM: Matrix extracelular; CML: Células Musculares Lisas; MMPs: Metaloproteinases.

**Fonte:** ADAPTADA de (UNGVARI; TARANTINI; DONATO; GALVAN *et al.*, 2018)

Células endoteliais senescentes produzem um fenótipo secretor associado a senescência complexo (SASP) que varia dependendo do tipo, duração e intensidade do dano, bem como das condições de crescimento, geralmente caracterizada pela liberação de fatores de crescimento, proteases e citocinas com potentes ações autócrinas e parácrinas que afetam a função da vizinhança, além da ineficácia da Sintase de Óxido Nítrico endotelial (eNOS) (JIA; AROOR; JIA; SOWERS, 2019; UNGVARI; TARANTINI; KISS; WREN *et al.*, 2018). Tais mecanismos, contribuem com a manutenção de um estado pró-inflamatório e pró-trombótico, gerando um *feedback* positivo nas vias que induzem o aumento de moléculas com ações imunomoduladoras (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ ), enzimas de degradação da matriz extracelular (metaloproteinases) e proteínas de superfície celular, como a ICAM-1 e o Inibidor-

1 do Ativador do Plasminogênio (PAI-1) (Figura 5) (BLOOM; ISLAM; LESNIEWSKI; DONATO, 2023; DONATO; MORGAN; WALKER; LESNIEWSKI, 2015).

**Figura 5.** Consequências da senescência endotelial.



**Legenda.** A senescência endotelial é caracterizada por um declínio da função endotelial associado à idade, que inclui a perda de controle sobre a vasodilatação, coagulação sanguínea, estresse oxidativo, inflamação, infiltração de células imunes e dinâmica de glicose e lipídios mediada por fatores derivados do endotélio, como óxido nítrico (NO), endotelina-1 (ET-1), prostaglandina (PG), tromboxano (TX), fator de crescimento endotelial (EGF) e enzima conversora de angiotensina (ECA). Uma redução na biodisponibilidade de NO, o principal regulador do endotélio, é um dos principais fatores que impulsionam essas alterações. Outros fatores incluem níveis aumentados de espécies reativas de oxigênio (ROS) e aquisição de fenótipo secretor associado a senescência (SASP). Abreviações; Célula endotelial (EC), sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS).

**Fonte:** ADAPTADA de (HAN; KIM, 2023)

Ademais, durante o envelhecimento endotelial observa-se uma exacerbação no estresse oxidativo em decorrência da superprodução, ou devido ao comprometimento nos sistemas de defesa antioxidantes (enzimas catalase, superóxido dismutase e glutatona peroxidase) (DONATO; MORGAN; WALKER; LESNIEWSKI, 2015; HALLIWELL, 2022; SIES; BELOUSOV; CHANDEL; DAVIES *et al.*, 2022). Além da respiração mitocondrial, as EROs

são produzidas por  $\beta$ -oxidação peroxissomal de ácidos graxos, xantina oxidase, lipoxigenase, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase (NOX), enzimas microsossomais P-450, ciclooxigenase e moléculas heme pró-oxidantes (DE ALMEIDA; DE OLIVEIRA; PONTES; JÚNIOR *et al.*, 2022; SIES; BERNDT; JONES, 2017). Dessa forma, células senescentes endoteliais apresentam aumento na expressão de NOX2 e NOX4, responsáveis por eventos deletérios, como danos na membrana, proteínas e DNA, além da perda na proteostasis (CANUGOVI; STEVENSON; VENDROV; HAYAMI *et al.*, 2019; LEE; KIM; HOANG; YANG *et al.*, 2020; LEE; ZEESHAN; KIM; CHAE, 2017).

É válido salientar que muitas das EROs estimulam enzimas pro-oxidantes, gerando feedback positivo, e contribuindo para exacerbação desse fenômeno (FUKAI; USHIO-FUKAI, 2020; SALAZAR, 2018). Dessa forma, embora os níveis fisiológicos de EROs sejam necessários para manter a homeostase, a sua superprodução persistente induz efeitos deletérios, como alterações na transcrição do DNA, interrupção de muitas vias de sinalização sensíveis a equilíbrio redox, comprometimento da estrutura e função celular, inflamação e disfunção orgânica (DE ALMEIDA; DE OLIVEIRA; PONTES; JÚNIOR *et al.*, 2022; SIES; JONES, 2020). Barnes e colaboradores demonstram que o estresse oxidativo gera lesões no DNA, com o encurtamento ou disfunção nos telômeros mecanismo-chave na senescência replicativa (BARNES; DE ROSA; THOSAR; DETWILER *et al.*, 2022; BARNES; FOUQUEREL; OPRESKO, 2019; BLOOM; LIU; TUCKER; ISLAM *et al.*, 2023).

Dada a importância da vasculatura na homeostase de todo o organismo e o impacto da senescência endotelial para a progressão das doenças cardiovasculares, é de suma importância o entendimento das vias moleculares envolvidas nesse processo para manejo farmacológico visando o desenvolvimento de estratégias para prevenir doenças vasculares relacionadas à idade.

### 2.3 CÉLULAS SENESCENTES COMO ALVO FARMACOLÓGICO

Devido o potencial terapêutico na estratégia de redução da carga de SnCs para prolongar a expectativa de vida e retardar o aparecimento de doenças relacionadas à idade, há um interesse crescente no desenvolvimento de senoterapêuticos. Atualmente, os fármacos em estudo tem objetivado duas condições: 1) inibição dos mecanismos antiapoptóticos característicos das SnCs, promovendo a morte dessas células de forma seletiva - senolíticos (KIRKLAND;

TCHKONIA, 2020); e 2) senomórficos, substâncias que visam suprimir as ações da SASP sem a eliminação das SnCs (KIM; KIM, 2019). Em ambos os casos, os resultados são promissores e podem revolucionar a busca pelo envelhecimento saudável.

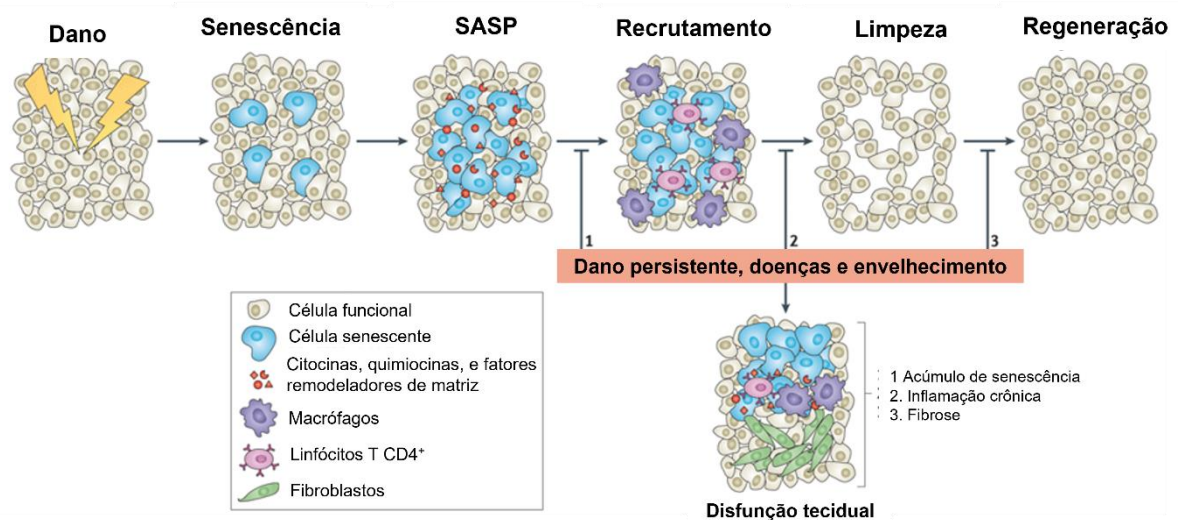
Dados pré-clínicos demonstraram que a depuração de apenas 30% das SnCs em camundongos progeroide foi suficiente para reverter parcialmente a lipodistrofia relacionada à idade e diminuir a progressão da sarcopenia, catarata e fragilidade (BAKER; WIJSHAKE; TCHKONIA; LEBRASSEUR *et al.*, 2011). Neste cenário, prevê-se que a administração de senolíticos deve ocorrer de forma intermitente com o objetivo de reduzir a possibilidade de efeitos indesejáveis fora do alvo, tendo em vista que células danificadas levam entre 2 e 6 semanas para entrar em senescência, e um certo limiar de SnCs deve ser alcançado no corpo antes da geração de dano (ROBBINS; JURK; KHOSLA; KIRKLAND *et al.*, 2021). Devido ao seu sucesso em estudos não-clínicos, os fármacos senolíticos estão sendo mais amplamente empregados dentre os senoterapêuticos e estão começando a ser testados em ensaios clínicos (HICKSON; LANGHI PRATA; BOBART; EVANS *et al.*, 2019). No entanto, uma ampla gama de efeitos colaterais já descritos para estas substâncias reforçou a necessidade de busca por alternativas, como os senomórficos (ZHANG; LI; CHEN; ZENG *et al.*, 2022).

Como grande parte do dano gerado pela senescência advém do secretoma induzido pelo SASP, moléculas capazes de modular as vias pró-inflamatórias melhorando o fenótipo surgem como uma esperança no campo de estudo em questão, visando um escape aos possíveis efeitos deletérios dos senolíticos, esses fármacos denominados senomórficos atuam interferindo nos reguladores transcricionais do SASP, como MAPK p38, JAK/STAT e as vias NF- $\kappa$ B e mTOR (GASEK; KUCHEL; KIRKLAND; XU, 2021). Como exemplo, o tratamento com glicocorticoides demonstrou diminuir a produção de componentes selecionados do SASP, nomeadamente, citocinas pró-inflamatórias como a IL-6, mediante inibição do NF- $\kappa$ B (LUÍS; MADURO; PEREIRA; MENDES *et al.*, 2022), além deste, o inibidor de MAPK p38 - SB203580 - reduziu marcadamente a secreção da maioria dos fatores SASP e mitigou os efeitos parácrinos de SnCs induzidos por irradiação (WONG; OMORI; DONGHIA; ZHENG *et al.*, 2023). Ademais, o medicamento antidiabético já em uso no mercado metformina alivia uma série de condições relacionadas à idade em modelos experimentais animais e em humanos e inibe múltiplos fatores pró-inflamatórios do SASP ao bloquear a translocação nuclear de NF- $\kappa$ B, demonstrando-se melhora na função cardiovascular e aumento na expectativa de vida de pacientes diabéticos, o que instigam a investigação sobre a capacidade da metformina de retardar o envelhecimento em indivíduos não diabéticos (PADKI; STAMBLER, 2021). Ilam e colaboradores revelaram que a supressão do mTOR em células endoteliais melhora os eventos

deletérios em animais idosos, como a função endotelial, remodelamento da aorta e a disfunção metabólica associada (ISLAM; HALL; DUTSON; BLOOM *et al.*, 2023).

Outras abordagens incluem o uso de ferramentas farmacológicas com capacidade de reverter o estágio senescente, que embora pareça arbitrário já foi alcançado em alguns tipos de células, como é o caso de fibroblastos dérmicos humanos que passaram para um estágio quiescente após inibição de vias de sinalização, como NF- $\kappa$ B e mTOR (GASEK; KUCHEL; KIRKLAND; XU, 2021). Em conjunto, os senoterapêuticos objetivam a redução do número de SnCs ou atenuação dos danos gerados por essas células, os quais podem levar a recuperação da homeostase tecidual e sistêmica (Figura 6) (MUÑOZ-ESPÍN; SERRANO, 2014; ZHANG; LI; CHEN; ZENG *et al.*, 2022).

**Figura 6.** Acúmulo de células senescentes no envelhecimento e o potencial clínico dos senoterapêuticos.



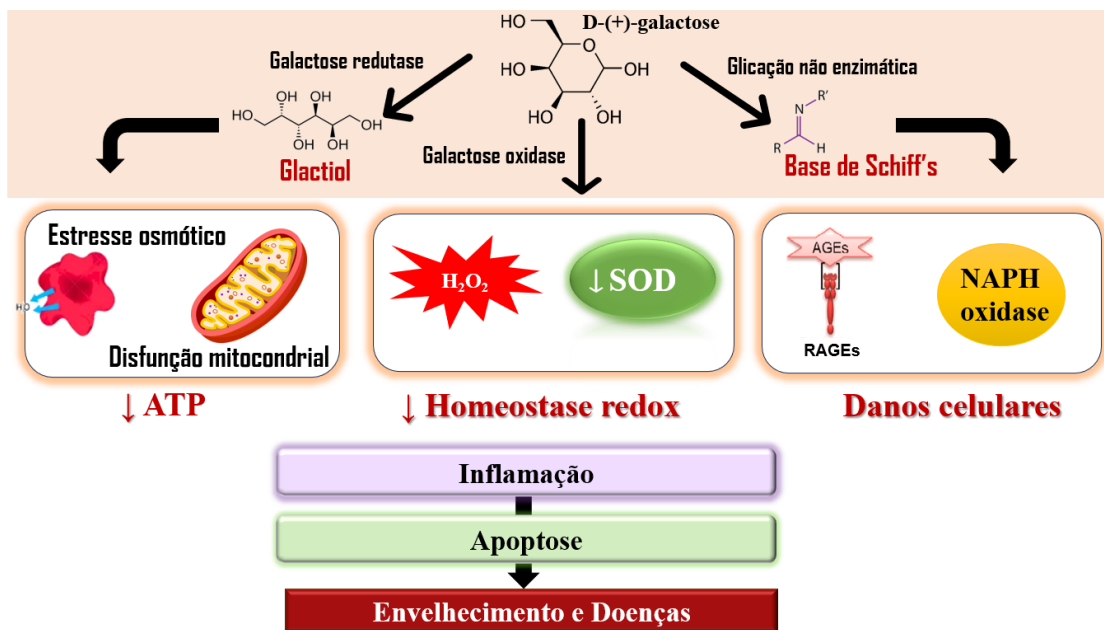
**Legenda.** A senescência inicia um processo de remodelação tecidual recrutando células imunes através do fenótipo secretor associado a senescência (SASP). Os macrófagos limpam as células senescentes e as células progenitoras repovoam e regeneram o tecido danificado. Esta sequência de senescência-eliminação-regeneração pode ser prejudicada por danos persistentes, estados patológicos ou o próprio processo de envelhecimento. Nestes casos, as células senescentes não são eliminadas de forma eficiente e o tecido não é totalmente regenerado. A resolução do dano nestes casos envolve uma cicatriz fibrótica com células senescentes, células inflamatórias e tecido fibrótico.

**Fonte:** ADAPTADA de (MUÑOZ-ESPÍN; SERRANO, 2014).

## 2.4 MODELO DE INDUÇÃO DA SENESCÊNCIA CELULAR POR D-GALACTOSE

Diversos modelos de indução da senescência são utilizados em ensaios *in vitro*, dentre eles, há a possibilidade de mimetização da instalação de um quadro de disfunção metabólica a partir da D-(+)-Galactose (Dgal), açúcar monossacarídeo precursor da síntese de diversas macromoléculas. O modelo acelerado de envelhecimento induzido por Dgal é amplamente aceito; baseia-se na teoria metabólica e apresenta muitos aspectos semelhantes ao processo natural de envelhecimento (Figura 7) (AZMAN; ZAKARIA, 2019; ELZI; SONG; SHIIO, 2016), podendo ser utilizado para melhor compreensão das doenças cardiovasculares relacionadas à idade a partir dos danos causados ao endotélio vascular (LEE; HOANG; JUNG; JUNG *et al.*, 2020; REZENDE; ALMEIDA; GONÇALVES; AZEVEDO *et al.*, 2021).

**Figura 7.** Modelo de envelhecimento acelerado pelo açúcar D-(+)-galactose



**Fonte:** Autora

**Legenda.** Modelo de envelhecimento acelerado induzido pelo açúcar D-(+)-galactose (Dgal). O excesso de Dgal gera um estresse metabólico e osmótico, culminando com disfunção mitocondrial, produtos de glicação avançada e espécies reativas de oxigênio. Conseqüentemente, aumento nos níveis de inflamação, apoptose, senescência, resultando em um fenótipo envelhecido. AGE: Produtos finais de glicação avançada; ATP: Adenosina trifosfato; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrógeno; RAGE: Receptores para produtos finais de glicação avançada; SOD: Enzima superóxido dismutase.

A administração crônica de Dgal resulta em desvios para vias metabólicas indesejáveis, com aumento na produção de EROs e Produtos de Glicação Avançada (AGEs) (CHENG; YANG; QIAO; YANG *et al.*, 2023). Além disso, tem como consequência o desenvolvimento de um fenótipo característico do envelhecimento, com aumento na atividade da  $\beta$ -galactosidase, disfunção mitocondrial, ativação de vias antiproliferativas (ex. p16, p21, p53), diminuição da capacidade antioxidante, aumento na produção de mediadores pró-inflamatórios, resultando no acúmulo de células senescentes (AZMAN; ZAKARIA, 2019). Vários tecidos e órgãos, incluindo cérebro, pulmão, fígado, rim, sistema reprodutivo, sistema cardiovascular, sistema gastrointestinal, demonstram fenótipos de envelhecimento após o tratamento com Dgal (AZMAN; SAFDAR; ZAKARIA, 2021; REZENDE; ALMEIDA; GONÇALVES; AZEVEDO *et al.*, 2021; WANG; ZHANG; KE; WEN *et al.*, 2022).

O endotélio é particularmente sensível ao estresse gerado pelo Dgal. Estudos revelam que a disfunção endotelial antecede a disfunção de células da musculatura vascular, indicando a disfunção endotelial como um evento inicial durante o envelhecimento cardiovascular (YU; LIAO; HU; LV *et al.*, 2022). De fato, a senescência endotelial induzida por Dgal é caracterizada pela perda da capacidade antioxidante, evidenciada pela diminuição da expressão do fator de transcrição Nrf-2 e das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e heme-oxigenase (HO-1), além do aumento de produtos derivados do estresse oxidativo como malonaldeído (MDA), proteínas carboniladas e oxidação de bases nitrogenadas (LEE; HOANG; JUNG; JUNG *et al.*, 2020; YU; LIAO; HU; LV *et al.*, 2022). Ademais, ocorre um desbalanço na liberação de fatores reguladores do tônus vascular, com aumento da liberação de fatores pro-contraturantes como endotelina (ET-1) e diminuição de fatores relaxantes como o óxido nítrico (NO) e sua enzima produtora Sintase de Óxido Nítrico endotelial (eNOS), e diminuição da atividade de Sirtuínas (LEE; HOANG; JUNG; JUNG *et al.*, 2020). Além disso, o tratamento com Dgal leva ao aumento de marcadores fibróticos, como fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF), fator de crescimento transformador  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), proteína quinase 1/2 ativada por mitógeno fosforilada (p-MEK1/2), sinal extracelular fosforilada, quinase regulada 1/2 (p-ERK1/2) e metaloproteinases de matriz (MMP) (ANGELIKI; JUNCO; KONSTANTINOS, 2023). Em conjunto, tais mecanismos afetam a funcionalidade e estrutura vascular, favorecendo o desenvolvimento de doenças, sobretudo as DCVs.

Portanto, o modelo de envelhecimento induzido por Dgal tem sido cada vez mais empregado no estudo de doenças cardiovasculares nos últimos anos devido às suas vantagens de baixa mortalidade, curto tempo e baixo custo (WANG; ZHANG; KE; WEN *et al.*, 2022).

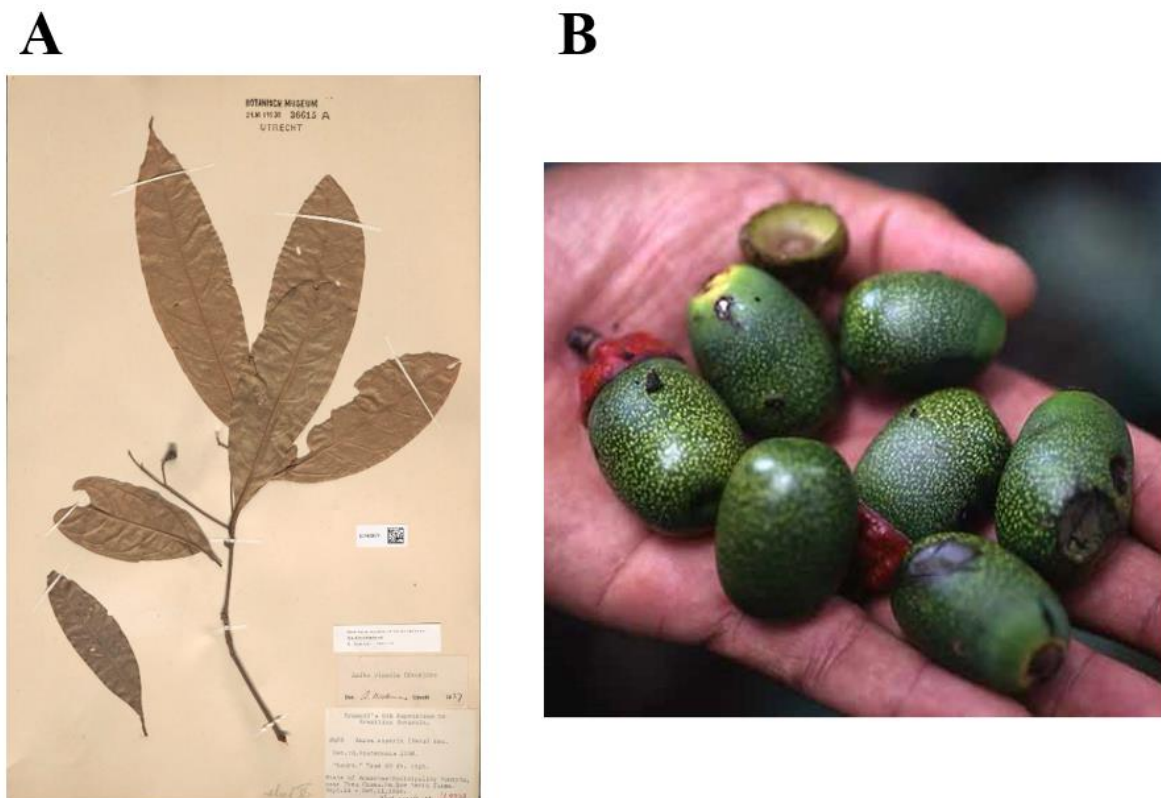
## 2.5 PRODUTOS NATURAIS COM PROPRIEDADES SENOTERAPÊUTICAS

O Brasil, país privilegiado por sua biodiversidade, possui grande arsenal para exploração tecnológica no desenvolvimento de fármacos derivados de produtos naturais, sobretudo de origem vegetal. Muitas das propriedades medicinais ou efeitos curativos das fontes vegetais podem estar associados à presença de metabólitos (ex. terpenos, alcaloides e compostos fenólicos), os quais conferem às plantas propriedades diversas como ação antioxidante, anti-inflamatória e senoterapêuticas (DE SOUSA; DAMASCENO; AMORATI; ELSHABRAWY *et al.*, 2023; LEE; HOANG; JUNG; JUNG *et al.*, 2020; XU; FU; LI; LIU *et al.*, 2021). Numerosos estudos experimentais e clínicos indicam que estes compostos devam proteger o sistema cardiovascular, melhorando a função endotelial e reduzindo os riscos de doenças (GONÇALVES; LIMA; DE ALMEIDA; DE ARRUDA *et al.*, 2023; OAK; AUGER; BELCASTRO; PARK *et al.*, 2018). Além disso, tais compostos já demonstraram efeitos antienvhecimento bastante satisfatórios, principalmente através da modulação do SASP (GURĂU; BALDONI; PRATTICIZZO; ESPINOSA *et al.*, 2018), com destaque para os polifenóis quercetina, curcumina, fisetin, resveratrol e kaempferol (HICKSON; LANGHI PRATA; BOBART; EVANS *et al.*, 2019). Estes, exercem suas atividades através de mecanismos citotóxicos seletivos (AL-NAGGAR; KUCHEL; XU, 2020), além de diminuir o estresse oxidativo celular ou ainda por imunomodulação, tal qual ocorre com o kaempferol, identificado como tendo forte atividade senomórfica através da inibição do NF- $\kappa$ B em fibroblastos senescentes (KIM; LEE; KIM; YU *et al.*, 2010).

Uma espécie fitoquímica que constitui uma fonte rica de moléculas promissoras é a *Aniba riparia* (Ness) Mez pertencente à família *Lauraceae*, tipicamente encontrada nas Guianas e região Amazônica brasileira onde é popularmente conhecida como “Louro”, “louro-faia” ou “pau-rosa” (Figura 8) (DOS SANTOS; QUEIROGA; DE OLIVEIRA; TAVARES *et al.*, 2011). Muitas espécies desse gênero são usadas na medicina popular para tratar lesões de pele, distúrbios circulatórios, e alguns delas têm propriedades anti-inflamatórias, hipoglicemiantes e efeitos centrais (GOMES; ARAUJO; SILVA; SANTOS *et al.*, 2021). A análise química do fruto verde da planta, revela a existência de uma variedade de substâncias pertencentes a classe dos lignoides, terpenoides, benzaldeídos e pironas, além da presença de um grupo especial de alcaloides, raramente encontrados em plantas - as alcanidas - que possuem em sua estrutura básica a função amida originada da condensação de um ácido graxo insaturado, geralmente alifático, e uma amina oriunda de aminoácidos. Estas moléculas, são denominadas riparinas em

homenagem a planta que as origina (BARBOSA FILHO; SILVA; BHATTACHARYYA, 1990). Ademais, as riparinas podem ainda ser sintetizadas por métodos simples, potencializando a sua aplicação no âmbito farmacêutico.

**Figura 8.** Folha e fruto verde de *Aniba riparia* (Ness) Mez



**Fonte:** (Folhas de *Aniba Riparia* (Nees) Mez, 2012).

**Legenda.** Folhas da de *Aniba riparia* (Ness) Mez. Herbário virtual Austral Americano **B.** Fruto verde da de *Aniba riparia* (Ness) Mez.

Dentre as alcanidas naturais, isoladas da *Aniba riparia* (Ness) Mez tem-se o éter metílico de N-benzoil-tiramina (riparina I), assim como alguns de seus análogos substituídos, (O-metil)-N-2-hidroxibenzoil-tiramina (riparina II) e (O-metil)-N-2,6-dihidroxibenzoil-tiramina (riparina III) (BARBOSA FILHO; SILVA; BHATTACHARYYA, 1990). Baseando-se no protótipo natural pode-se sintetizar moléculas derivadas com modificações estruturais a fim de otimizar suas propriedades farmacológicas seguindo-se as seguintes metodologias: reação de Schotten-Baumann, partindo-se de cloreto de benzoíla e derivados; aminólise de ésteres organocatalisada por 1,8-diazobicyclo[5.4.0]undec-7-eno, (DBU); e amidação via reagentes de acoplamento de sais de fosfônio - benzotriazol-1-il-oxi-tris-(dimetilamino) fosfônio hexafluorofosfato (BOP) e hexafluorofosfato de benzotriazol-1-

iloxitripirrolidinofosfônio (pyBOP) - utilizando ácidos carboxílicos como substratos. Tal mecanismo dá origem ao derivado sintético (riparina IV) (Figura 9), as quais estão representadas com suas respectivas estruturas químicas na Figura 10 (Figura 10).

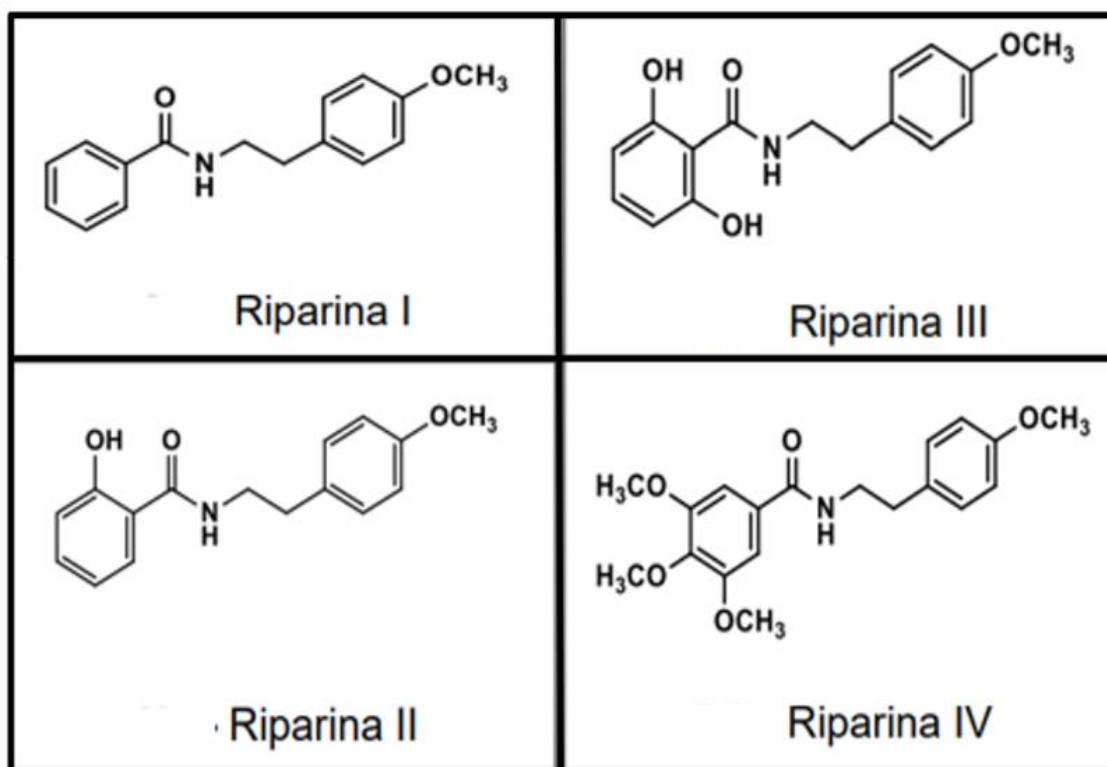
**Figura 9.** Método de preparação dos derivados das alcamidas de *Aniba riparia* (Ness) Mez



**Fonte:** (BARBOSA FILHO; SILVA; BHATTACHARYYA, 1990).

**Legenda.** Reação de síntese de análogos das Alcamidas a partir da substituição de cloretos de benzoila, obtidos pela reação de ácidos benzoicos com cloreto de tionila (SOCl<sub>2</sub>), seguido por amidação com a O-metiltiramina.

**Figura 10.** Alcamidas naturais isoladas da *Aniba riparia* (Ness) Mez (riparinas I, II e III) e seu derivado sintético (riparina IV)



**Legenda.** Estrutura química das riparinas I, II, III e IV.

Estudos de toxicidade aguda evidenciaram que a administração das riparinas I, II e III, por via oral (V.O.), em doses de até 1 g/kg, não causam morte de camundongos dentro de um período de 48 horas. Da mesma forma, as administrações das riparinas I e II por via intraperitoneal (I.P.), em doses semelhantes, também não foram letais. Contudo, a administração da riparina III apresentou DL50 de 104,2 mg/kg (CASTELO BRANCO; CASTELO BRANCO; THOMAS; ARAUJO *et al.*, 2000).

As riparinas naturais e seus derivados sintéticos já demonstraram bioatividade em diferentes ensaios biológicos, que incluem propriedade antinociceptiva (GOMES; ARAUJO; SILVA; SANTOS *et al.*, 2021; NASCIMENTO; ESPÍRITO-SANTO; OPRETZKA; BARBOSA-FILHO *et al.*, 2016) para a riparina I através da administração intra peritoneal nas fases inicial e tardia da dor pós administração de formalina, atividade associada a mecanismos periféricos (via do óxido nítrico) e centrais, sem envolvimento do sistema opioide; antimicrobiana contra cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (OLIVEIRA-JÚNIOR; DA SILVA; VERAS; RIBEIRO *et al.*, 2020), anti-inflamatória, diminuindo a produção das citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , efeito antioxidante, com evidência da diminuição nos níveis de malonaldeído (marcador da peroxidação lipídica) e aumento da glutatona, em ensaios *in vivo* de indução do edema de pata (SILVA; DAMASCENO; SILVA; SILVA *et al.*, 2015), além de neuroproteção em desordens degenerativas, bem como atividade ansiolítica e antidepressiva em modelos animais (DE SOUSA; MONTEIRO; DE MELO; DE OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Igualmente, para a riparina II, estudos anteriores demonstram efeitos anti-inflamatório com redução do edema de pata induzido por carragenina, histamina e dextrana em roedores, postulando-se um possível bloqueio em receptores de histamina e/ou serotonina, redução da migração leucocitária provavelmente por diminuição na permeabilidade vascular, com adicional decaimento das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no fluido peritoneal de ratos que receberam injeções intraperitoneais de carragenina e fMLP, (N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine) (DE CARVALHO; ROCHA; VASCONCELOS; RIOS *et al.*, 2013).

A riparina III por sua vez, tem suas principais atividades descritas no âmbito do sistema nervoso central com evidência de efeitos antidepressivos - por um aumento no comportamento ativo (escalada e natação) nas provas de natação forçada - e ansiolíticos, semelhantes aos apresentados pelos benzodiazepínicos, com adicional poder antioxidante demonstrado pela restauração nos níveis de Glutathione reduzida (GSH), além de efeito positivo sobre a neurogênese ao reverter a redução nos níveis de BDNF (fator neurotrófico capaz de promover a

sobrevivência e a diferenciação neuronal) (MALLMANN; CHAVES; DE OLIVEIRA; OLIVEIRA *et al.*, 2021).

Foram observadas ainda para a riparina IV, importantes atividades contra a neuroinflamação através da análise do hipocampo, córtex pré-frontal e estriado, que mostraram a capacidade desta em reduzir substancialmente a produção de citocinas pro-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-2) contrabalanceando com um aumento nas concentrações de IL-4 e IL-10 que por sua vez tem perfis regulador e anti-inflamatório (CHAVES; MALLMANN; OLIVEIRA; OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Frente a tais achados, as moléculas em questão representam uma alternativa promissora para extrapolação a outras condições de desvio da homeostase, os quais envolvam estresse oxidante, inflamação e resistência à apoptose, tal qual observado na senescência.

## 2.6 ESTUDOS *IN SÍLICO* PARA DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS

Durante o processo de desenvolvimento de novos fármacos é imprescindível a averiguação além das propriedades farmacológicas a habilidade destes acessarem o alvo de ação na concentração adequada. A disponibilização do fármaco é dividida em quatro estágios denominados “ADME”:

- Absorção a partir do local de administração
- Distribuição pelo organismo
- Metabolização
- Eliminação

É sabido de acordo com a prática, que a estimativa precoce do ADME na fase de descoberta reduz drasticamente a fração de falha relacionada à farmacocinética nas fases clínicas. Os modelos computacionais têm sido utilizados largamente como uma alternativa válida aos procedimentos experimentais para tais predições, especialmente nas etapas iniciais, de modo que uma grande variedade de métodos *in silico* compartilham o objetivo de prever parâmetros ADME, os quais incluem a absorção e distribuição, para alcançar o órgão alvo em uma concentração apropriada; metabolismo, onde ocorre a inativação/modificação do fármaco e excreção em que o fármaco é liberado do corpo para que o mesmo não venha provocar toxicidade (RANG, 2016).

A absorção é a transferência de um fármaco do seu local de administração para o compartimento central, devendo este atingir o alvo de ação na concentração adequada para obtenção do efeito terapêutico, o que é determinante para uma boa biodisponibilidade. O termo biodisponibilidade descreve o percentual com que a dose de um fármaco administrado alcança seu local de ação ou um líquido biológico (em geral, circulação sistêmica), portanto um fármaco administrado por via oral precisa primeiramente ser absorvido pelo trato gastrointestinal (GI), o que vai ser diretamente influenciado pelas características da preparação posológica, propriedades físico-químicas da molécula, pelo ataque metabólico no intestino e pelo transporte através do epitélio intestinal para a circulação porta. Após a absorção, o fármaco passa pelo fígado, onde podem ocorrer metabolismo e excreção biliar antes que ele chegue à circulação sistêmica, devendo após isto ser distribuído para os locais de ação. O padrão do equilíbrio de distribuição entre os diversos compartimentos depende, da permeabilidade através das barreiras teciduais; ligação dentro dos compartimentos; partição pelo pH e partição óleo/água (BRUNTON, 2019).

A eliminação de um fármaco representa sua exclusão irreversível do corpo. Ela ocorre por meio de dois processos: metabolismo e excreção. O metabolismo consiste na conversão enzimática de uma entidade química em outra, enquanto a excreção determina a saída do fármaco ou seus metabólitos do organismo principalmente pelos rins, sistema hepatobiliar e pulmões (no caso de compostos voláteis e gasosos como alguns anestésicos). As etapas de biotransformação envolvem as ações de diversas enzimas capazes de alterar os compostos, tornando-os ativos, prejudiciais ou simplesmente ineficientes, passíveis de excreção (BRUNTON, 2019).

O metabolismo dos fármacos envolve dois tipos de reação, conhecidos como de fase 1 e fase 2, as quais diminuem a lipossolubilidade, aumentando, assim, a eliminação renal. As enzimas do citocromo P450 são hemoproteínas abrangendo uma grande família de enzimas relacionadas, mas distintas (cada uma chamada de CYP, seguida por um conjunto de números e uma letra) responsáveis por essas reações (RANG, 2016). Elas se diferenciam entre si pela sequência de aminoácidos, sensibilidade a inibidores e agentes indutores e na especificidade das reações que catalisam. Os diferentes membros da família apresentam especificidades de substratos distintas, mas que frequentemente se sobrepõem. Foram descritas 74 famílias de genes para o Citocromo P (CYP), das quais as três principais (CYP1, CYP2 e CYP3) estão envolvidas no metabolismo de substâncias no fígado humano. A capacidade de diferentes fármacos em alterar o metabolismo de outros, de acordo com a propensão em inibir ou induzir a atividade das diferentes CYPs hepáticas são comuns e clinicamente importantes, portanto,

torna-se necessário a investigação deste parâmetro nas etapas pré-clínicas de desenvolvimento de novas drogas (VAN DER VORST; DAISSORMONT; ASLANI; SEJKENS *et al.*, 2020).

Tendo em vista a importância dos parâmetros ADME, esforços da comunidade científica e indústria farmacêutica vem sendo adotados para traçar o perfil farmacocinético das moléculas candidatas a fármacos nas etapas iniciais dos estudos a partir do uso de ferramentas computacionais, abrangendo diversas modalidades *in silico*. Tais métodos envolvem redução de gastos, tempo e investimentos em ensaios biológicos, com maior direcionamento para o sucesso (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017).

Dentre os parâmetros mais utilizados nos estudos *in silico* para a previsão de um bom perfil ADMET de um fármaco tem-se a “Regra dos 5 de Lipinski”. Segundo Lipinski *et al.* (1996), compostos que apresentam determinadas características físico-químicas, tais como massa molecular < 500 Da, lipofilicidade ( $\log P$ ) < 5, número de grupos doadores < 10 e aceptores de hidrogênio < 5 podem se comportar como bons candidatos a fármacos administrados por via oral. Contudo, moléculas que violam mais do que duas destas regras podem ter problemas de biodisponibilidade oral (MAHGOUB; ATATREH; GHATTAS, 2022).

Além disso, diversos outros descritores estão se tornando cada vez mais sofisticados, como por exemplo o logaritmo decimal da solubilidade molar em água ( $\log S$ ) e a determinação da área de superfície topológica polar (TPSA), definida como a soma da superfície de todos os átomos ou moléculas polares, principalmente oxigênio e nitrogênio, incluindo também seus átomos de hidrogênio ligados, tem sido utilizado para prever absorção tanto gastrointestinal quanto na barreira hematoencefálica (LEE; JANG; SEO; LIM *et al.*, 2022).

Outro indicador amplamente avaliado é a similaridade química dos compostos em estudo com drogas já disponíveis no mercado a partir da presença em comum de grupos funcionais e/ou compartilhamento de propriedades físicas, fenômeno denominado *drug-likeness* capaz de prever o potencial terapêutico das moléculas, sendo frequentemente usado para descrever a farmacocinética e a segurança desses, auxiliando na previsão de compostos com perfis ADMET desejáveis (YOUNG; FLITSCH; GRIGALUNAS; LEESON *et al.*, 2022). Ademais, utiliza-se como parâmetro de grande valor preditivo o *drug-score* que combina *drug-likeness*,  $c\log P$ ,  $\log S$ , peso molecular e riscos de toxicidade em um valor útil que pode ser usado para avaliar o potencial geral do composto para se qualificar como medicamento.

As abordagens de Inteligência Artificial (IA) são formas poderosas de facilitar a descoberta de candidatos a medicamentos, mediante emprego de softwares robustos ou ferramentas online de fácil manejo. O SwissADME, por exemplo é uma ferramenta da web gratuita para avaliar propriedades físico-químicas moleculares, semelhança com medicamentos

e farmacocinéticas . Uma interface amigável, dados abrangentes e interpretação eficiente são uma grande vantagem que determinam a escolha da metodologia adequada (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017) .

Outro objeto de estudo durante as abordagens *in silico* de desenvolvimento de novos fármacos, é o emprego de técnicas capazes de prever a interação das moléculas em investigação com possíveis alvos proteicos envolvidos com as vias bioquímicas de interesse, tal abordagem é denominada *docking* molecular sendo o método computacional de design de medicamentos baseado em estrutura (SBDD) mais comum. O principal objetivo do *docking* é compreender e prever estrutural e energeticamente o reconhecimento molecular, predizendo o modo e a afinidade das interações, o que auxilia na avaliação de qual estrutura e rotação do ligante é mais vantajosa em relação ao receptor (STANZIONE; GIANGRECO; COLE, 2021).

O processo de *docking molecular* envolve duas etapas básicas: previsão da conformação do ligante (geralmente uma molécula pequena), bem como sua posição e orientação dentro do local de ligação da proteína (geralmente referido como pose) e avaliação da qualidade da pose usando uma função de pontuação. Funções de pontuação são métodos matemáticos aproximados rápidos usados para prever a força da interação (ou afinidade de ligação) entre duas ou mais moléculas (STANZIONE; GIANGRECO; COLE, 2021).

As moléculas ancoradas são cuidadosamente classificadas usando uma variedade de abordagens e sistemas, como exemplo tem-se o Moldock, software de acoplamento molecular desenvolvido pela MolSof LLC40, este suporta vários formatos de arquivo de entrada incluindo PDB MOL2 e SDF, permitindo um processamento rápido e eficiente de acoplamento que pode ser usado para ancorar pequenas moléculas em um local de ligação ao receptor. O Moldock usa um rápido algoritmo de transformação Fourier (FFT) para avaliar a afinidade de ligação dos ligantes ao receptor (AGU; AFIUKWA; ORJI; EZEH *et al.*, 2023). Também inclui uma função de pontuação que leva em consideração a complementaridade física, interações eletrostáticas e forças de van der Waals entre o ligante e o receptor.

As etapas do *docking* incluem:

Seleção e obtenção das estruturas das proteínas-alvo e ligantes-padrão, os quais podem ser obtidos a partir de bases de dados como o banco de dados Protein Data Bank (PDB) (<http://pdb.org>) e PubChem ([//pubchem.org](http://pubchem.org)), Zinc ([//blaster.docking.org/zinc/](http://blaster.docking.org/zinc/)), respectivamente;

Preparação das proteínas, cujo objetivo é otimizar a estrutura e prepará-la para um acoplamento preciso. Este procedimento é feito a partir de modificações como a adição de quaisquer átomos ou resíduos extras, minimização de energia para afrouxar a estrutura e

eliminar a interferência estérica. Os estados de protonação dos resíduos ionizáveis são então estabelecidos para fornecer interações durante o acoplamento; eliminação de moléculas de água e ligantes estranhos, por fim, para refletir adequadamente o comportamento da proteína durante simulações de acoplamento, os parâmetros de campo de força adequados são finalmente fornecidos. Através destas etapas de preparação, a estrutura da proteína é otimizado e refinada, fornecendo um ponto de partida adequado para estudos de *docking* molecular bem-sucedidos (STANZIONE; GIANGRECO; COLE, 2021).

Seleção dos ligantes a serem acoplados, com posterior preparo mediante atribuição de cargas, geração de conformadores e otimização da sua geometria.

Previsão de sítio ativo: Durante o acoplamento molecular, os bolsões de ligação podem ser inicialmente especificados ou identificados após o acoplamento. Portanto são demarcados na estrutura da proteína os aminoácidos referentes ao sítio de ligação pretendido de acordo informações obtidas previamente na literatura. No caso dos ligantes co-cristalizados com a estrutura proteica, no entanto, este já encontra-se localizado no sítio de ação (STANZIONE; GIANGRECO; COLE, 2021).

Ancoragem proteína-ligante: O ligante é acoplado à proteína e as interações são analisadas. A função de pontuação (*scoring function*) fornece uma pontuação baseada no complexo de ligante mais bem encaixado escolhido (JOYSE; HARITHA; SRAVANI; MUNWAR, 2019).

Análise pós-*docking*: Após o acoplamento entre o ligante e a proteína, os resultados são minuciosamente analisados para a identificação dos candidatos mais promissores destinados a estudos complementares. Aferições de afinidade das interações são calculadas com base na energia de interação prevista, e os ligantes são classificados conforme seus índices de afinidade. Adicionalmente, as estruturas ancoradas são examinadas para destacar interações cruciais entre os ligantes e a proteína, tais como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas. Essas análises proporcionam “insights” valiosos sobre o mecanismo de ação dos ligantes, orientando assim a otimização subsequente de suas estruturas (STANZIONE; GIANGRECO; COLE, 2021).

Outras técnicas podem ser performadas para otimizar a acurácia dos resultados, como por exemplo, a Simulação de dinâmica molecular, método que objetiva estudar o comportamento dinâmico dos complexos formados. Essas simulações desempenham um papel crucial na compreensão das mudanças conformacionais decorrentes da interação do ligante, assim como na avaliação da estabilidade dessa interação ao longo do tempo. A análise do

comportamento dinâmico contribui para elucidar nuances importantes (SALMASO; MORO, 2018).

Nesse contexto, é imperativo o uso de ferramentas *in silico* nas fases pré-clínicas de desenvolvimento de novos fármacos com o objetivo de prever parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos e mensurar o potencial dos compostos em estudo, fornecendo resultados robustos em um curto espaço de tempo e com alto valor preditivo, dos futuros fármacos e assim instigar o avanço para as etapas posteriores da investigação farmacológica.

Objetivos

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos das N-benzoiltiraminas extraídas da *Aniba Riparia (Nees) Mez* (riparinas I, II, III e IV) em modelo de senescência celular a partir do cultivo primário de Células Endoteliais da Artéria Aorta de Ratos induzidas por D-galactose e avaliar possíveis alvos modulados mediante estratégias *in silico*.

#### 3.2 OBJETIVO ESPECIFICOS

Analisar o potencial anti-senescente das riparinas I, II, III e IV, a fim de selecionar uma molécula de acordo com a eficácia e potência (*Screening*), mediante os seguintes ensaios:

- Atividade da  $\beta$ -galactosidase associada à senescência
- Modulação do estresse oxidativo celular
- Determinação da viabilidade celular
- Proceder os ensaios *in silico* a partir da verificação do perfil ADMET das moléculas alvo através do uso dos softwares Osiris Property Explorer e *SwissADME* a fim de identificar estruturas mais promissoras, e/ou com características mais adequadas.

Empregar técnicas de *docking molecular* com a riparina, previamente selecionada por sua eficácia em atenuar a senescência, para orientar a condução de ensaios visando elucidar os mecanismos moleculares subjacentes, tendo como base os seguintes alvos:

- Interação proteína-proteína Keap 1-Nrf2
- Subunidade p40 da enzima NADPH oxidase
- Complexo I $\kappa$ Ba/NF- $\kappa$ B
- Complexo alvo da Rapamicina (mTORC) 1
- Proteína Sirtuin 1
- Proteína Sirtuin 5

Investigar a flexibilidade de interações entre a riparina com melhor efeito nos ensaios *in vitro* e a proteína selecionada na etapa de *docking*, através de análises de simulações de dinâmica molecular.

*Material e Métodos*

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 CONDIÇÕES PARA O ESTUDO

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular (LabCardio) localizado no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IpeFarM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), *Campus I*, João Pessoa-PB. Tratou-se de um estudo experimental *in vitro* a partir do cultivo primário de células endoteliais da artéria aorta de ratos Wistar, com ensaios farmacológicos e moleculares e *in silico* em colaboração com o Prof. Dr. Marcus Tullius Scotti, coordenador do laboratório de quimioinformática do PPgPNSB/CCS/UFPB. Sendo performed inicialmente uma triagem entre 4 moléculas (riparinas I, II, III e IV) com o objetivo de se fazer uma seleção prévia da mais promissora com posteriores ensaios *in silico* para determinação das características farmacocinéticas e físico-químicas dessas e posteriormente estudo de ancoragem (*docking*) e dinâmica molecular, finalizando-se com ensaios *in vitro* voltados para a elucidação do mecanismo de ação para obtenção da atividade farmacológica.

### 4.2 ANIMAIS

Para viabilização dos protocolos experimentais foram utilizados no estudo ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), com oito semanas de idade provenientes do biotério José Paulino, pertencente ao departamento de nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco e mantidos na Unidade de Produção Animal (UPA) do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IpeFarM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), os quais foram mantidos sob condições controladas de temperatura ( $22 \pm 1$  °C), em um ciclo claro-escuro de 12 horas (6:00-18:00 horas) com livre acesso à água e alimentação (ração Purina<sup>®</sup>) conforme recomendações internacionais. Os animais foram acomodados em gaiolas plásticas micro-isoladoras de dimensão 49x34x16 (CxLxA, em cm), cada uma com no máximo 4 ratos.

Para operacionalização da pesquisa, o projeto foi submetido à análise para apreciação e julgamento pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Paraíba sendo lograda a aprovação, protocolada sob o CEUA nº 3541070323, ID 001842 CEUA nº 3541070323, ID 001842 (Anexo I). Todos os protocolos experimentais foram realizados conforme as orientações estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), obedecendo aos preceitos da lei 11.794/2008 e ainda da resolução nº 879/2008. Todos os cuidados foram tomados para evitar o sofrimento, minimizar o desconforto e dor dos ratos desde o início do estudo até o momento da eutanásia.

### 4.3 SUBSTÂNCIAS

Para a realização dos protocolos experimentais foram utilizadas as seguintes substâncias: N-benzoiltiraminas (o éter metílico de N-benzoil-tiramina (riparina I), (O-metil)-N-2-hidroxibenzoil-tiramina (riparina II) e (O-metil)-N-2,6- dihidroxibenzoil-tiramina (riparina III) e o derivado sintético (riparina IV) cedidos gentilmente pelo professor Dr. Jailton de Souza Ferrari, associado do Departamento de Química da UFPB (*Campus I*), HEPES, L-glutamina, estreptomicina, cremofor®, D-Valina, D-(+)-Galactose, Tripsina, 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (X-Gal), Dihidroetídeo (DHE), formaldeído, glutaraldeído, dimetilsulfóxido (DMSO), gelatina 2%, meio para cultivo celular DMEM *low glucose*, soro bovino fetal, L-glutamina, D-valina, antibiótico penicilina-estreptomicina, MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio), sal sódico de heparina (Hepamax-s®), anti-CD31, todos obtidos da Sigma-Aldrich Brasil Ltda (São Paulo - SP, Brasil), soro bovino fetal além de cloridrato de xilazina e cloridrato de cetamina, ambos obtidos da Syntec; Santana de Parnaíba – SP, Brasil.

As tabelas a seguir, mostram as composições das soluções que foram utilizadas.

**Tabela 1** – Composição da solução de PBS

Composição	Concentração (mM)
NaCl	161,0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1,8
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	15,8

**Tabela 2** – Composição da solução de coloração de X-gal

<b>Composição</b>	<b>Concentração (mM)</b>
<b>Tampão citrato-fosfato (pH 6,0)</b>	40,0
<b>NaCl</b>	150,0
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	2,0
<b>C<sub>6</sub>N<sub>6</sub>FeK<sub>4</sub></b>	5,0
<b>C<sub>6</sub>N<sub>6</sub>FeK<sub>3</sub></b>	5,0
<b>X-gal</b>	1 mg/mL

#### 4.4 ISOLAMENTO E CULTIVO CELULAR DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS DA ARTÉRIA AORTA DE RATOS (RAECs)

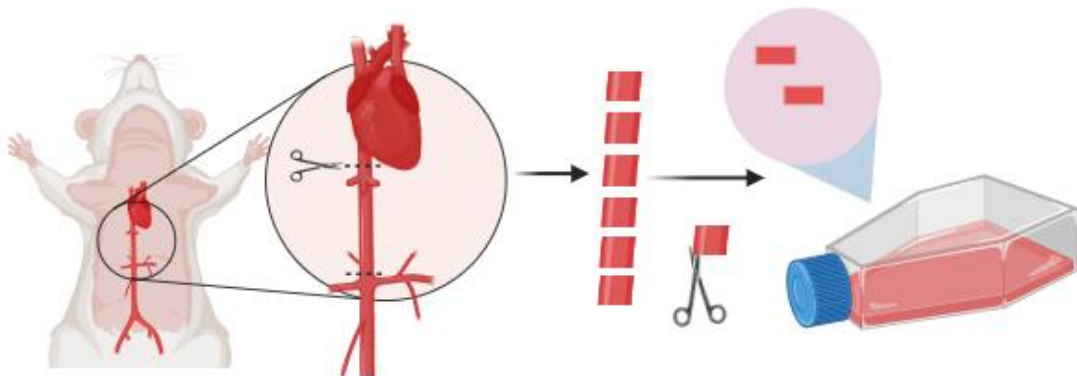
Inicialmente, os animais foram eutanasiados utilizando o método de sobredosagem da mistura anestésica de cetamina e xilazina. Para tanto, foi utilizado três vezes a dose necessária para a anestesia, 180 mg/kg de cetamina e 30 mg/kg de xilazina, por via intraperitoneal, segundo o Guia de eutanásia para animais de ensino e pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP, 2019) o qual segue recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Sendo realizado em caso de não obtenção da eutanásia, um método complementar imediatamente após a confirmação da perda da consciência do animal. Sendo procedido nesse caso a exsanguinação, realizada por meio da punção cardíaca conforme recomendações do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) na Resolução Normativa Nº 37/2018.

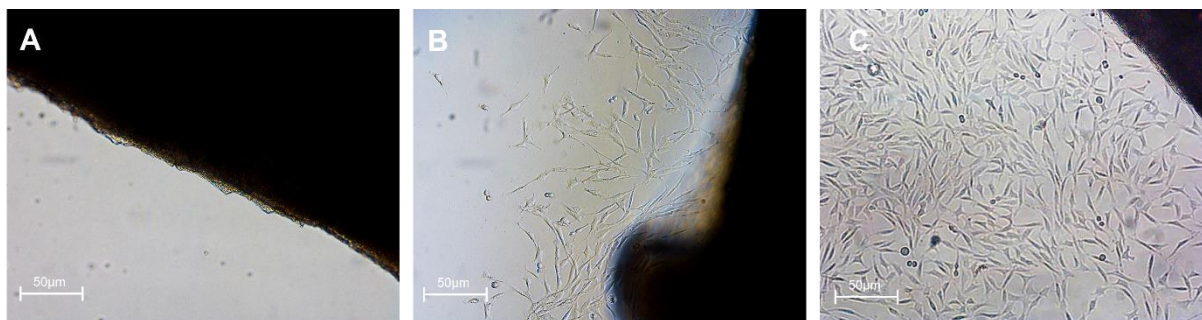
Em seguida, o animal foi colocado em decúbito dorsal e nas regiões abdominal e torácica foi pulverizado uma solução de iodopovidona (PVPI) e álcool 70% para a assepsia, sendo em seguida feito um corte na linha média para exposição da aorta abdominal, coração e pulmões. A aorta abdominal foi então incisada transversalmente para liberar o sangue e o ventrículo esquerdo foi submetido a uma injeção contendo uma solução de PBS com 1000 U/mL de heparina (Hepamax-s®), com o objetivo de perfundir a artéria aorta. Em seguida, a aorta torácica foi exposta, rapidamente removida e colocada em um recipiente de PBS esterilizado gelado, e imediatamente transportado para uma capela de fluxo de ar laminar.

Nesta, a aorta foi suavemente perfundida com PBS gelado para remover o sangue residual e dissecada para remoção do tecido adiposo e pequenos vasos laterais. Os tecidos aórticos foram então dissecados em anéis de 2 a 5 mm de comprimento para obtenção de aproximadamente 5 a 8 anéis por animal.

Cada anel aórtico foi aberto usando um par de tesouras de microdissecção e imediatamente colocado com o lado do lúmen para baixo em uma garrafa de meio de cultura pré-tratada com gelatina a 0,1% na presença de meio de cultura DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) baixa glicose suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina e 10 µg/mL de estreptomicina, com dois segmentos aórticos próximos um do outro em um total de 6 explantes. Em seguida, os anéis aórticos foram mantidos em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C, com inspeção diária do nível médio e adição de meio de cultura, se necessário, para manutenção da umidade. Após verificado crescimento celular com atingimento de 80% de confluência, os explantes teciduais foram removidos suavemente. Posteriormente, as células foram submetidas a tripsinização (tripsina 0,05%) por cinco minutos, centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos, à 4 °C e ressuspensas para passagem e cultivo em garrafas para cultura celular. Durante os dois primeiros dias após o primeiro repique, as células foram incubadas com D-valina (100 µg/mL) para inibição do crescimento de fibroblasto, garantindo com isso a purificação no crescimento das células endoteliais (ZHU; MIAO; GONG; FU *et al.*, 2019). O meio de cultura foi trocado a cada 2-3 dias, e quando as células chegavam a 80% de confluência, foi feito um novo repique, sendo as passagens P2 a P4 utilizadas para experimentos (Figura 11).

**Figura 11.** Isolamento e cultura de células endoteliais de aorta de ratos (RAECs)





**Legenda.** Evolução do cultivo celular de RAECs. **A.** Dia 0 após montagem do explante da artéria aorta em garrafa de cultivo celular (objetiva de 10x). **B.** Dia 5 após a montagem do explante da artéria aorta em garrafa de cultivo celular: observação da migração das primeiras células endoteliais cultivadas (objetiva de 10x). **C.** Dia 10 após a montagem do explante da artéria aorta em garrafa de cultivo celular: observação da migração de mais células endoteliais cultivadas (objetiva de 10x): retirada do explante e observação do tapete de células endoteliais abaixo do explante (objetiva de 10x).

#### 4.5 SOLUÇÕES NUTRITIVAS PARA CULTIVO CELULAR

Durante os experimentos *in vitro*, as células foram mantidas em contato com o meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) low glucose suplementado com 25 mM de HEPES, 4 mM de L-glutamina, 1% de estreptomicina/penicilina, 100 UI/mL de heparina e soro bovino fetal, em placas e garrafas para a cultura celular acondicionadas numa incubadora de CO<sub>2</sub> controlada, sob temperatura constante de 37 °C, em umidade relativa de 95%. Durante as diferentes fases do cultivo celular, apenas a concentração do Soro bovino fetal foi modificada, com 20% na fase inicial do explante até o primeiro repique, em seguida com 10% até a fase de experimentação, no qual foi utilizada a concentração de 2%.

#### 4.6 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS DA ARTÉRIA AORTA DE RATOS (RAECS)

A porcentagem de células endoteliais presentes na amostra foi confirmada através da marcação com o anticorpo para a molécula de superfície CD31, característico dessa linhagem. Para tanto, após o tratamento, as RAECs foram ressuspensas em 100 µL de PBS a uma

densidade de  $1 \times 10^5$  células/mL, incubadas com 5  $\mu$ L do anticorpo anti-CD31 em temperatura ambiente por 30 minutos, e em seguida ressuspensas em 300  $\mu$ L de PBS, a suspensão obtida foi analisada por citometria de fluxo (FACSCANTO II).

#### 4.7 INDUÇÃO DA SENESCÊNCIA EM RAECs ISOLADAS COM D-GALACTOSE

Para a indução da senescência, as células foram submetidas à exposição ao composto D-Galactose na concentração de 50 mM (equivalente a 20 mg/mL) por 48 horas em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Após esse período, as células foram lavadas com solução de PBS três vezes e incubadas com seus respectivos marcadores.

#### 4.8 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA E POTÊNCIA DAS RIPARINAS I, II, III E IV FRENTE ÀS PROPRIEDADES ANTI-SENESCENTES (*SCREENING*)

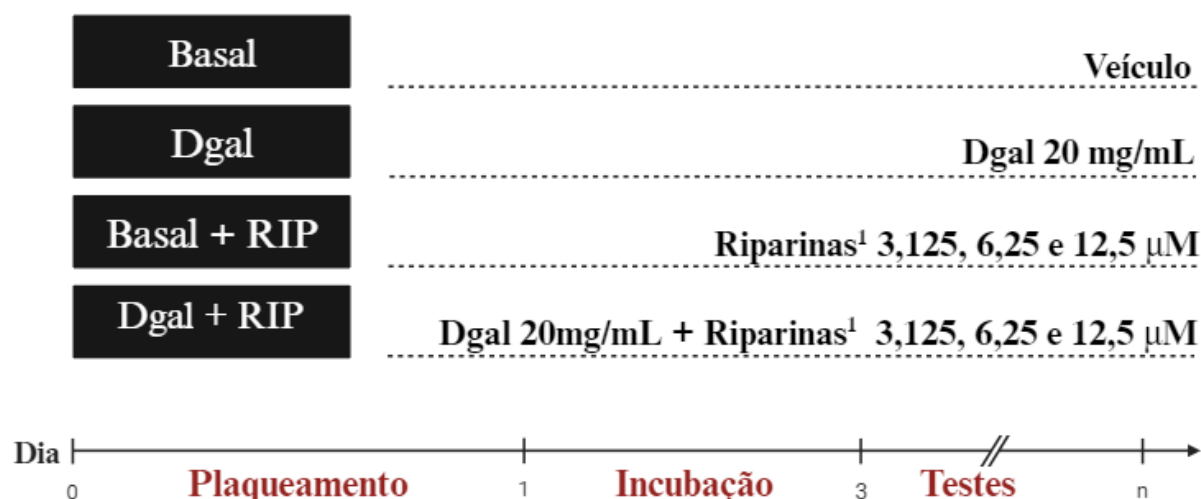
Foram verificados no estudo as ações das riparinas I, II, III e IV, a fim de se obter a molécula e concentração com o melhor efeito, de acordo com a eficácia (*screening* inicial), mediante os seguintes protocolos: avaliação da viabilidade celular pelo ensaio do MTT, verificação do potencial antioxidante mediante quantificação de ânions superóxido, bem como, determinação da atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase associada à senescência, para assim averiguar a reversão do fenótipo senescente.

##### 4.8.1 Delineamento experimental

Para o experimento, o grupo basal foi subdividido em CTL (células controle incubadas com DMSO em meio DMEM suplementado com 2% de SFB), e os grupos de tratamento com as riparinas I, II, III e IV nas concentrações de 3,125 – 12,5  $\mu$ M (diluídas em meio DMEM suplementado com 2% de SFB). Já na condição modelo, o grupo foi subdividido em Dgal

(células tratadas com D-Galactose 20 mg/mL diluída em meio DMEM suplementado com 2% de SFB), e os grupos de tratamento nos quais as células foram incubadas com a D-(+)-galactose 20 mg/mL e concomitantemente com as riparinas I, II, III e IV nas concentrações de 3,125 – 12,5  $\mu$ M (diluídas em meio DMEM suplementado com 2% de SFB). (Figura 12).

**Figura 12.** Esquematização dos grupos experimentais e seus respectivos tratamentos



**Legenda.** Esquema com grupos experimentais do estudo. Basal: RAECs na presença do veículo DMSO sem o indutor de senescência D-galactose. Células estimuladas com a D-galactose na ausência (Dgal) ou em concomitância com as moléculas-teste (Dgal +RIP). Basal + RIP: RAECs sem o indutor de senescência D-galactose incubadas com os compostos-teste. <sup>1</sup>riparina I, riparina II, riparina III, riparina IV

#### 4.8.2 Teste de viabilidade pelo ensaio do MTT

Para determinar a capacidade das N-benzoiltiraminas de modulação na viabilidade das RAECs, após o período de tratamento foi feito o ensaio de redução do tetrazólio MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). Esse teste se baseia na habilidade de conversão – através da atividade mitocondrial em células viáveis - desse composto, que apresenta uma coloração amarelo-esverdeada, em cristais de formazan de cor púrpura. A quantidade de formazan (presumivelmente diretamente proporcional ao número de células viáveis) é medida registrando alterações na absorvância utilizando um espectrofotômetro de leitura de placas.

Para o ensaio, as RAECs foram semeadas a uma concentração de  $5 \times 10^4$  células/mL em microplacas de 96 poços com fundo plano e mantidas por 24 horas a 37 °C em atmosfera

umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> para a adesão celular. Após esse período, as células foram incubadas com as respectivas moléculas-teste e mantidas por 48 horas a 37 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Ao término do período de tratamento, foi adicionado ao meio 10 µL do reagente de marcação MTT a 5 mg/mL. Posteriormente, as microplacas foram incubadas por 4 horas em estufa a 37 °C contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Passado esse período, foi retirado cuidadosamente todo o sobrenadante e adicionado 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) em cada poço por 1 hora ao abrigo da luz para solubilizar os cristais roxos de formazan. Por fim, absorvância foi mensurada no comprimento de onda de 595 nm (iMark™ Microplate Absorbance Reader, Heiwajima, Ota-ku, TO, Japão). A absorvância dos respectivos grupos foi normalizada em relação ao grupo controle.

#### 4.8.3 Avaliação da atividade da β-galactosidase (SA-β-GAL)

A caracterização da senescência é frequentemente associada a uma regulação positiva da enzima β-galactosidase lisossomal (“β-galactosidase associada à senescência”, SA-β-GAL), amplamente utilizada como biomarcador de células senescentes *in vitro* (DEBACQ-CHAINIAUX; ERUSALIMSKY; CAMPISI; TOUSSAINT, 2009). Desse modo, o SA-β-gal serve como instrumento de estudo para averiguar o aumento no número de células senescentes após diferentes tipos de estresse e para identificar os potenciais efeitos protetores anti-senescente de possíveis compostos senoterapêuticos. A detecção da atividade de SA-β-gal requer a incubação de células fixadas com o substrato cromogênico da β-gal (X-gal) em um tampão de pH 6,0.

Portanto, para quantificação do padrão de senescência, a porcentagem de células positivas para SA-β-gal foi mensurada de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen™, Waltham, MA, USA). Para isso, após 48 de incubação com os compostos testes o meio de cultura foi descartado, as células foram lavadas com solução de PBS e fixadas com uma mistura de Formaldeído 2% + Glutaraldeído 0,2% por 1 minuto, sendo posteriormente (pós lavagem com PBS) incubadas *overnight* a 37 °C numa estufa (sem CO<sub>2</sub>) em solução recém preparada a pH 6,0, contendo 1 mg/mL de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactopyranoside (X-Gal). No dia seguinte, as células foram lavadas com PBS, coradas com DAPI (300 nM) à temperatura ambiente por 5 minutos na ausência de luz para contagem de núcleos. Posteriormente, após lavagem com PBS, as células foram mantidas em glicerol 20% até análise. As Células β-Gal

positivas foram observadas em um microscópio de luz Nikon Eclipse TS100 (Tóquio, Japão), de modo que a atividade da  $\beta$ -galactosidase foi calculada manualmente utilizando a partir da contagem das células positivas para tal marcação e o percentual determinado a partir da razão pelo total de pelo menos 200 células por poço. Os experimentos foram feitos em triplicata com resultados de três experimentos (3n) independentes.

#### 4.8.4 Determinação de espécie reativas de oxigênio (EROs)

Para a avaliação do efeito das riparinas sobre o estresse oxidativo nos diferentes grupos experimentais foi utilizada uma sonda fluorescente sensível às Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), Dihidroetídeo (DHE), excitada no comprimento de onda de 488 nm e com emissão em 515 nm para quantificação do estresse oxidativo. A sonda DHE é passivamente difundida para o interior das células sendo oxidada por ânions superóxido, formando um produto intermediário, o 2-hidroetídio (2-OHEt<sup>+</sup>) que intercala com o DNA, levando à exibição de uma imagem fluorescente avermelhada.

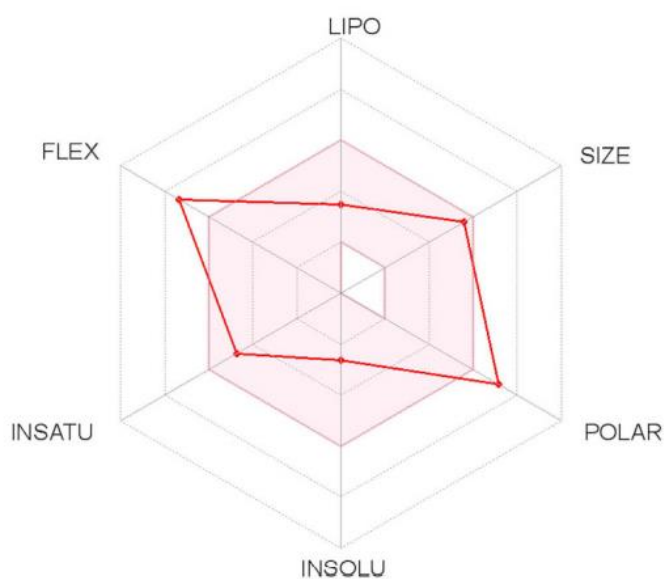
Para a realização do protocolo experimental, passado o período de incubação, as células foram lavadas com solução de PBS, e incubadas com DHE 5  $\mu$ M, durante 40 minutos, a 37 °C, ao abrigo da luz. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e levadas ao microscópio de fluorescência (NIKON Eclipse Ti-E 200-S, NIKON®, Japão) para posterior análise dos níveis de EROs dos diversos grupos. Por fim, as imagens foram analisadas e a quantificação da intensidade de fluorescência foi realizada através do software ImageJ® versão 1.53t, quantificando-se a intensidade de fluorescência obtida pela emissão da sonda DHE. Todos os experimentos foram feitos em triplicata e os dados foram expressos como percentual de fluorescência, normalizados pela fluorescência emitida pelos grupos controle. Os experimentos foram feitos em triplicata com resultados de três experimentos (3n) independentes.

## 4.9 ESTUDOS IN SILICO

### 4.9.1 Determinação do Perfil ADMET

O perfil ADMET - parâmetro de grande valor a ser avaliado no desenvolvimento de novos fármacos - foi previsto através do uso das ferramentas online SwissADME (<http://www.swissadme.ch>) e Osiris Property Explorer (<https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>). De modo que foram avaliados os parâmetros físico-químicos: Peso molecular, coeficiente de partição octanol/água (LogP), número de grupos aceptores e doadores de ligação hidrogênio, Área de Superfície Topológica Polar (TPSA) e solubilidade em água (LogS), mediante emprego da ferramenta SwissADME, o qual também permitiu a apresentação de dados na forma do gráfico de *Bioavailability Radar* que determina a partir de seis propriedades físico-químicas: lipofilicidade, tamanho, polaridade, solubilidade, flexibilidade e saturação uma faixa ideal (delimitada por uma área rosa) para uma substância ser considerada semelhante a uma droga (Figura 13) (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017)

**Figura 13.** *Bioavailability Radar* – Gráfico do perfil ideal de Biodisponibilidade de um fármaco.



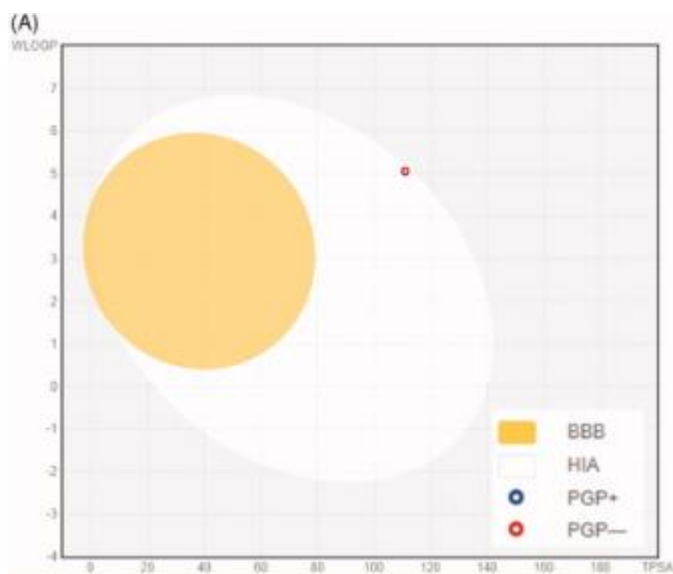
**Fonte:** (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017).

**Legenda:** Radar de Biodisponibilidade, que delimita em uma marcação gráfica sombreada na cor rosa as condições ideais para um fármaco ser absorvido por via oral.

Ademais foi possível a predição a partir do software Osiris Property Explorer do parâmetro de *Drug-likeness*, algoritmo responsável por fornecer a comparação de compostos pretendidos com os fragmentos e propriedades físicas de fármacos já comerciais baseado em uma lista de cerca de 5.300 fragmentos de subestruturas distintas com escores *drug-likeness* associados, onde os valores positivos representam a semelhança de candidatos a fármacos aos *building blocks* existentes ao passo que os negativos demonstram pouca semelhança (WANG; HOU, 2010). A mesma ferramenta também foi utilizado para determinação do drug-score, valor obtido a partir da conversão do logS, drug-likeness, cLogP, peso molecular e toxicidade em um valor útil utilizado para prever o potencial geral de um determinado composto para se qualificar para um medicamento, este oferece um único valor numérico preditivo a partir de uma escala que varia entre 1% (menor potencial) e 100% (maior potencial) de novas moléculas para atuarem como novo fármaco (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017).

O Software SwissADME também foi capaz de fornecer o gráfico *BOILED-Egg* (Figura 14), modelo de classificação gráfica intuitiva para prever simultaneamente a absorção gastrointestinal passiva (HIA) - retângulo branco - e o acesso cerebral, a partir da capacidade fármaco atravessar a barreira hematoencefálica (BBB) – elipse de coloração amarela, nessa representação os compartimentos não são mutuamente exclusivos e a região cinza externa representa moléculas com propriedades que implicam baixa absorção gastrointestinal e cerebral prevista. Ademais, o *BOILED-Egg*, fornece a informação acerca da capacidade da molécula em interagir e ser substrato para a glicoproteína-P (gpP), responsável pelo efluxo ativo mais importante envolvido nessas barreiras biológicas e participa no fenômeno de resistência a múltiplos fármacos (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017). Este parâmetro é demonstrado por codificação de cores: pontos azuis para substratos da P-gp (PGP+) e pontos vermelhos para não-substrato P-gp (PGP-). Tais dados foram representados ainda em uma tabela (**Tabela 5**), juntamente com as informações de interação (capacidade de inibição enzimática) das moléculas em estudos com as 5 principais isoenzimas do citocromo P450 (CYP-450) - CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2C9, CYP3A4 (IBRAHIM; UZAIRU; SHALLANGWA; ABECHI, 2021).

**Figura 14.** Gráfico Boiled-Egg



**Fonte:** (AL-RASHOOD; HAMED; HASSAN; ALKAHTANI et al., 2020).

**Legenda:** círculo amarelo representa moléculas que podem atravessar a barreira hematoencefálica, elipse branca delimita região para a absorção gastrointestinal passiva, região cinza - moléculas com perfil farmacocinético indesejável.

#### 4.9.2 Docking Molecular

A etapa de docagem molecular teve como objetivo averiguar a interação da molécula mais promissora – de acordo com as etapas anteriores do estudo – com alvos envolvidos com as possíveis vias moleculares moduladas para obtenção dos efeitos anti-senescente e antioxidante, e foi performada a partir do software Molegro Virtual Docking 6.0 (MVD). As etapas incluíram escolha dos alvos a serem investigados, preparo das proteínas alvos e respectivos ligantes-padrão, estimativa da energia de ligação do complexo proteína-ligante e análise dos resultados (TRIPATHI; MISRA, 2017). Para a criação do modelo final foi realizado a otimização dos receptores com a retirada da água e cofatores e foram selecionados os sítios ativos de ligação com base nas coordenadas dos ligantes provenientes das estruturas co-cristalizadas ou de acordo com informações presentes na literatura, indicativas da região responsável pela obtenção do efeito desejado de acordo com a interação com o padrão. Foram selecionados os confôrmeros de menor energia para a realização do *docking* molecular no sítio de ligação das proteínas abordadas. Para a avaliação da energia de ligação das macromoléculas

e ligantes foram utilizados o Moldock score e o Rerank score (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006). Além dos valores de Moldock Score, foram avaliadas por meio do mapa do ligante 2D, as interações intermoleculares do complexo ligante-proteína, por meio de ligações de hidrogênio, interações estéricas e eletrostáticas, bem como a posição 3D dos ligantes e composto-teste no sítio ativo das macromoléculas.

A pontuação Moldock é a energia total da interação do ligante externo mais a interação do ligante interno. A interação ligante externo é a soma de energia que consiste na interação proteína-ligante e interação cofator-ligante enquanto a interação de energia interna é a soma de energia dependente da estrutura química do ligante como deformação torcional, deformação torcional sp<sup>2</sup>-sp<sup>2</sup>, estérica e eletrostática. A pontuação mais baixa do Moldock indica que é necessária menor quantidade de energia para formar a interação do receptor do ligante, portanto, interpreta toda a energia de acumulação entre a interação ligante-receptor, que inclui ligação de hidrogênio, interação estérica e interação eletrônica. Enquanto o Rerank score (pontuação de reclassificação) é uma combinação linear de energia inter (estérica, Van der Waals, ligação de hidrogênio, eletrostática) entre o ligante e a proteína, e energia intra (torção, sp<sup>2</sup>-sp<sup>2</sup>, ligação de hidrogênio, Van der Waals, eletrostática) do ligante ponderado por coeficientes pré-definidos.

#### 4.9.2.1 Obtenção e preparo dos ligantes

Os alvos moleculares investigados na etapa de *docking* foram selecionados de acordo com os mecanismos envolvidos no processo de senescência e controle redox celular, de modo que foram escolhidas os seguintes complexos proteicos para a análise: Domínio SH3 da subunidade p40 da NADPH oxidase, complexo IKK $\alpha$ / Nf- $\kappa$ B, Complexo Keap1-Nrf2, mTOR, Sirtuin 1, Sirtuin 5 e MAPK-p38, cujas estruturas tridimensionais determinada por difração de raios-X, foram obtidas através do banco de dados de proteínas online (PDB, <http://www.rcsb.org/pdb/>) (BERMAN et al., 2000), com codificação, resolução e ligantes-padrão descritos na **Tabela 3**.

Os compostos-controle utilizados que não se encontravam co-cristalizados com seus respectivos alvos, bem como a estrutura tridimensional 3D da molécula teste (riparina I) foram obtidos a partir da plataforma Pubchem ([CID:3083797](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3083797)), sendo salvos no formato .sdf. As estruturas em 2D após download foram minimizadas, pelo método da mecânica molecular,

utilizando o programa Spartan' 14 V1.1.4 for Windows (Wavefunction, Inc., Irvine, CA, USA) ([https://store.wavefun.com/Spartan\\_Software\\_s/12.htm](https://store.wavefun.com/Spartan_Software_s/12.htm)) (HEHRE; OHLINGER, 2014; YOUNG, 2001). Após a inserção neste, as moléculas foram imediatamente convertidas em 3D e foi obtida a conformação mais estável, posteriormente, os arquivos foram salvos no formato Spartan document e finalmente carregados no software de docagem molecular Molegro Virtual Docking 6.0 (MVD).

**Tabela 3** – Descrição dos alvos Proteicos para o estudo do *Docking* Molecular

PROTEÍNA	PDB ID	RESOLUÇÃO	LIGANTE	REFERÊNCIA
Keap1-Nrf2	81VG	1,80 Å	<u>Ligante co-cristalizado</u> Ácido 3-[4-(5,5,8,8-tetrametil-6,7-dihidronaftalen-2-il)-4,5,6,7-tetrahydro-1-benzotiofen-2-il]propanoico	(OTAKE; UBUKATA; NAGAHASHI; OGAWA <i>et al.</i> , 2023)
MAPK p38	5WJJ	1,60 Å	<u>Ligante co-cristalizado</u> N-[4-[2-(4-fluoro-3-metilfenil)imidazo[1,2-b]piridazin-3-il]piridin-2-il]quinolina-6-carboxamida	(KAIEDA; TAKAHASHI; TAKAI; GOTO <i>et al.</i> , 2018)
mTOR	5WBY	3,10 Å	Rapamicina PubChem CID: 5284616	(VITTORIO; GITTO; ADORNATO; RUSSO <i>et al.</i> , 2021)
Domínio SH3 - Subunidade p40 NADPH oxidase	1W6X	2,00 Å	Apocinina PubChem CID: 2214	(KUMAR TIWARI; GANDHI; AGARWAL; TYAGI <i>et al.</i> , 2023)
IKK $\alpha$ / NF- $\kappa$ B	1IKN	2,30 Å	Emetine PubChem CID: 10219	(MILLER; HUANG; SAKAMURU; SHUKLA <i>et al.</i> , 2010)
Sirtuin 1	5BTR	3,20 Å	<u>Ligante co-cristalizado</u> Resveratrol	(CAO; WANG; QIU; LIU <i>et al.</i> , 2015)
Sirtuin 5	4HDA	2,60 Å	<u>Ligante co-cristalizado</u> Resveratrol	(GERTZ; NGUYEN; FISCHER; SUENKEL <i>et al.</i> , 2012)

**Legenda:** Valores de energia de ligação (kJ/mol) para riparina I e Ligantes-padrão: Ácido 3-[4-(5,5,8,8-tetrametil-6,7-dihidronaftalen-2-il)-4,5,6,7-tetrahydro-1-benzotiofen-2-il]propanoico; N-[4-[2-(4-fluoro-3-metilfenil)imidazo[1,2-b]piridazin-3-il]piridin-2-il]quinolina-6-carboxamida; Rapamicina; apocinina ; Emetine; resveratrol. PDB ID: Código de Identificação da macromolécula no Protein Data Bank (PDL).

#### 4.9.2.2 Avaliação da interação entre os ligantes e o alvo molecular

O programa MVD foi utilizado de acordo com os parâmetros predefinidos. Os compostos foram importados, sendo a estabilidade do sistema analisada através das interações identificadas com o sítio ativo da enzima, tomando como referência o valor energético do Moldock Score (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006). O algoritmo Moldock SE (Simplex Evolution) foi usado com os seguintes parâmetros: Um total de 10 execuções com um máximo de 1.500 interações usando uma população de 50 indivíduos, 2.000 etapas de minimização para cada resíduo flexível e 2.000 etapas de minimização global por simulação. As funções de pontuação Moldock Score (GRID) e Rerank score foram usados para calcular os valores de energia de encaixe; um GRID foi fixado em 0,3 Å e a esfera de busca foi fixada em 18 Å de raio.

Após carregamento da proteína alvo no MVD seguiu-se as seguintes etapas:

- Procedeu-se a remoção de todas as moléculas de água e cofatores presentes na estrutura;
- Foram feitos reparos moleculares em aminoácidos com erros estruturais quando aplicado;
- Nos casos de ligantes co-cristalizados junto a estrutura proteica demarcou-se a referida região para interação do composto alvo do estudo, nos casos em que o controle positivo era oriundo de fontes externas procedeu-se a demarcação do sítio ativo através de dados contidos na literatura e/ou a partir do emprego da função detectar cavidades, sendo selecionado a cavidade mais coerente com as informações previamente encontradas nos artigos referenciados
- A riparina I e os ligantes-padrão (quando aplicado), com suas estruturas minimizadas pelo método da mecânica molecular, foram inseridos como dados de entrada no programa MVD;
- O conjunto de moléculas foi submetido a simulação de *docking* molecular através da função *docking wizard*;
- Finalizadas as análises, foram observados os valores de energia para cada pose dos algoritmos Moldock Score e Rerank Score. Além disso, avaliou-se os tipos de interações existentes (ligações de hidrogênio internas, interações eletrostáticas internas e torções sp<sup>2</sup>-sp<sup>2</sup>) entre o receptor e os compostos.

#### 4.9.2.3 Avaliação da interação entre os ligantes e o alvo molecular

Para a visualização em 2D das interações intermoleculares do complexo ligante-proteína, por meio de ligações de hidrogênio (tracejado em verde) interações hidrofóbicas (linhas rosa tracejadas:  $\pi$ -alquil; linhas roxas tracejadas:  $\pi$ - $\sigma$ ; linhas azuis tracejadas: halogênios - Br, Cl e I) e eletrostáticas (tracejado verde), e obtenção das figuras de acoplamento molecular utilizou-se o programa discovery studio visualizer v20.1.0.19295 (BIOVIA, 2020) (<https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>).

#### 4.9.3 Simulações de Dinâmica Molecular

As simulações de Dinâmica Molecular (DM) foram realizadas para estimar a flexibilidade das interações entre proteínas e ligantes, usando o software GROMACS 5.0 (Programa Horizon 2020 da União Europeia, Suécia) (ABRAHAM; MURTOLA; SCHULZ; PÁLL *et al.*, 2015; BERENDSEN; VAN DER SPOEL; VAN DRUNEN, 1995). As topologias de proteínas e ligantes também foram preparadas usando o campo de força GROMOS96 54a7. A simulação MD foi realizada utilizando o modelo de água SPC de carga pontual, estendido em uma caixa cúbica (BONDI, 1964). O sistema foi neutralizado pela adição de íons ( $\text{Cl}^-$  e  $\text{Na}^+$ ) e minimizado, para remover maus contatos entre moléculas complexas e o solvente. O sistema também foi balanceado a 300K, usando o algoritmo V-rescale de 100 ps, representado por NVT (número constante de partículas, volume e temperatura), seguido de equilíbrio a 1 atm de pressão, usando o algoritmo de Parrinello-Rahman como o NPT (partículas de pressão e temperatura constantes), até 100 ps. As simulações de DM foram realizadas em 5.000.000 passos, a 10 ns. Para determinar a flexibilidade da estrutura e se o complexo é estável próximo à estrutura experimental, os valores de RMSD de todos os átomos de  $\text{C}\alpha$  foram calculados em relação às estruturas iniciais. Os valores de RMSF também foram analisados, para entender os papéis desempenhados pelos resíduos próximos ao sítio de ligação do receptor. Os gráficos RMSD e RMSF foram gerados no software Grace (Grace Development Team, <http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/>) e a proteína e os ligantes foram visualizados no UCSF Chimera (4–6).

#### 4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m). Os testes *t* de Student (não pareado) e análise de variância “one-way” ANOVA com o pós-teste de Tukey foram utilizados, onde os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes em avaliar as diferenças entre as médias. Todas as análises realizadas foram calculadas pelo programa estatístico Graph Pad Prism versão 8.0®.

*Resultados*

## 5 RESULTADOS

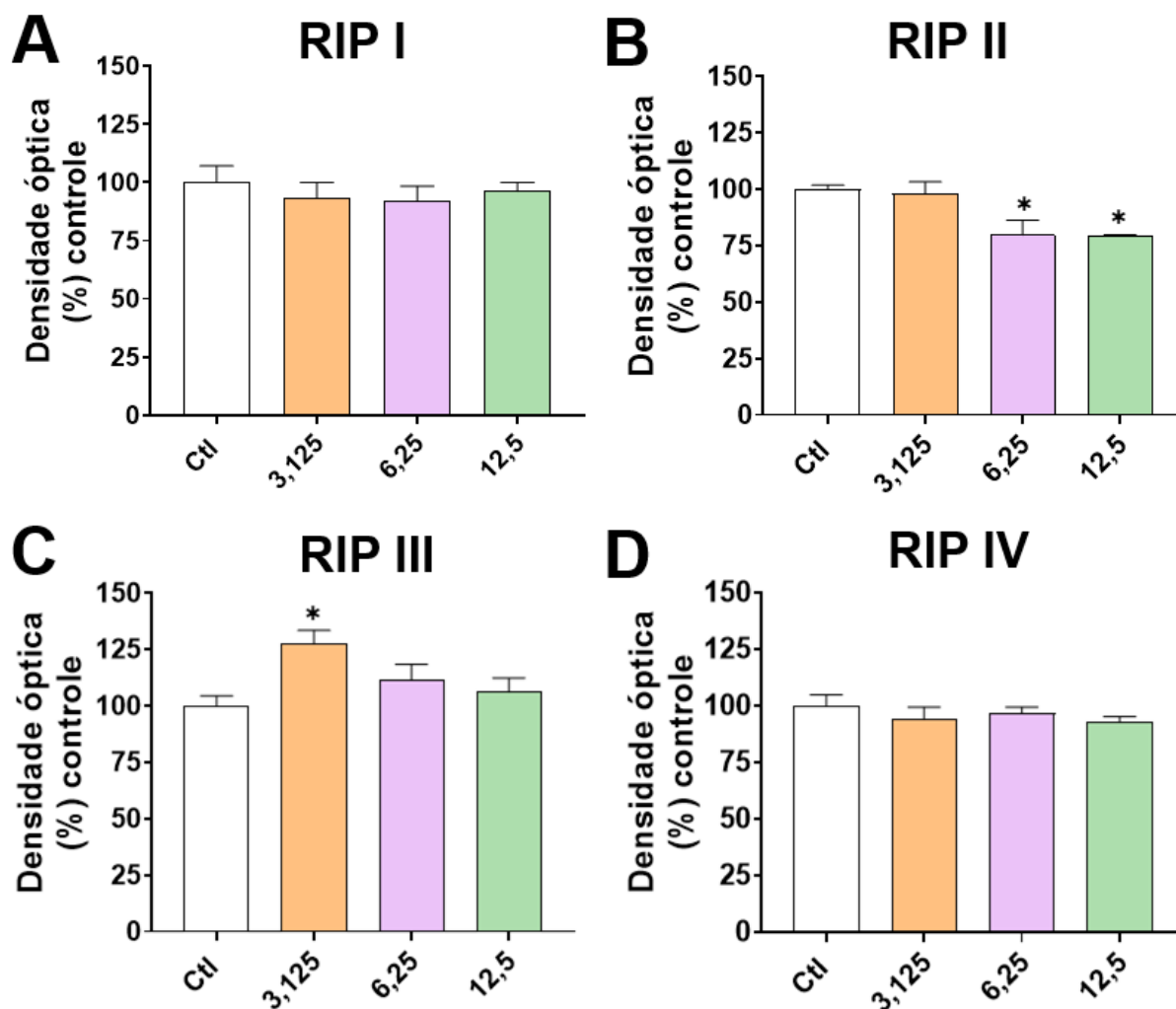
### 5.1 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS *IN VITRO*

Inicialmente, foi realizado um *Screening* para verificação do efeito das riparinas I, II, III e IV em três diferentes aspectos: 1) Viabilidade celular; 2) Senescência celular; e 3) Atividade antioxidante. Além disso, os ensaios foram realizados em duas diferentes condições experimentais: 1) condição basal (verificação apenas do efeito das riparinas em células saudáveis); e 2) Em modelo de senescência celular prematura induzida pela D-(+)-galactose (Dgal). As concentrações utilizadas para cada riparina foram de 3,125, 6,25 e 12,5  $\mu\text{M}$ .

#### 5.1.1 Avaliação do efeito das riparinas I, II, III e IV na viabilidade celular

De acordo com o ensaio de MTT, após 48 horas de incubação das RAECs com as riparinas I,II, III e IV na condição basal, observou-se manutenção na viabilidade celular para as riparinas I e IV em todas as concentrações testadas comparado ao grupo controle: RIP I: Ctl ( $100,0 \pm 7,16$  %; n = 6); 3,125  $\mu\text{M}$  ( $93,23 \pm 6,74$  %; n = 6); 6,25  $\mu\text{M}$  ( $92,06 \pm 6,43$  %; n = 6); e 12,5  $\mu\text{M}$  ( $96,15 \pm 3,80$  %; n = 6); e RPI IV: Ctl ( $100,0 \pm 4,84$  %; n = 6); 3,125  $\mu\text{M}$  ( $93,85 \pm 5,50$  %; n = 6); 6,25  $\mu\text{M}$  ( $96,64 \pm 2,72$  %; n = 6); e 12,5  $\mu\text{M}$  ( $93,03 \pm 2,08$  %; n = 6). No entanto, no grupo tratado com a riparina II observou-se a diminuição nesse parâmetro nas concentrações de 6,25  $\mu\text{M}$  ( $79,60 \pm 6,56$  %; n = 6); e 12,5  $\mu\text{M}$  ( $79,21 \pm 0,65$  %; n = 6), frente ao controle ( $100,0 \pm 1,80$  %). Contudo, a concentração de 3,125  $\mu\text{M}$  ( $97,99 \pm 6,74$  %; n = 6) não provocou alterações. Por outro lado, para o grupo de células incubado a riparina III observou-se um aumento na viabilidade na concentração de 3,12  $\mu\text{M}$  ( $127,44 \pm 5,91$  %; n = 6) em relação ao controle ( $100,0 \pm 4,36$  %), mantendo, no entanto, o padrão relativo ao controle nas demais concentrações: 6,25  $\mu\text{M}$  ( $111,51 \pm 6,83$  %; n = 6) e 12,5  $\mu\text{M}$  ( $105,97 \pm 6,28$  %; n = 6).

**Figura 15.** Viabilidade celular de RAECs tratadas com as riparinas I, II, III e IV na condição basal utilizando o ensaio de MTT.

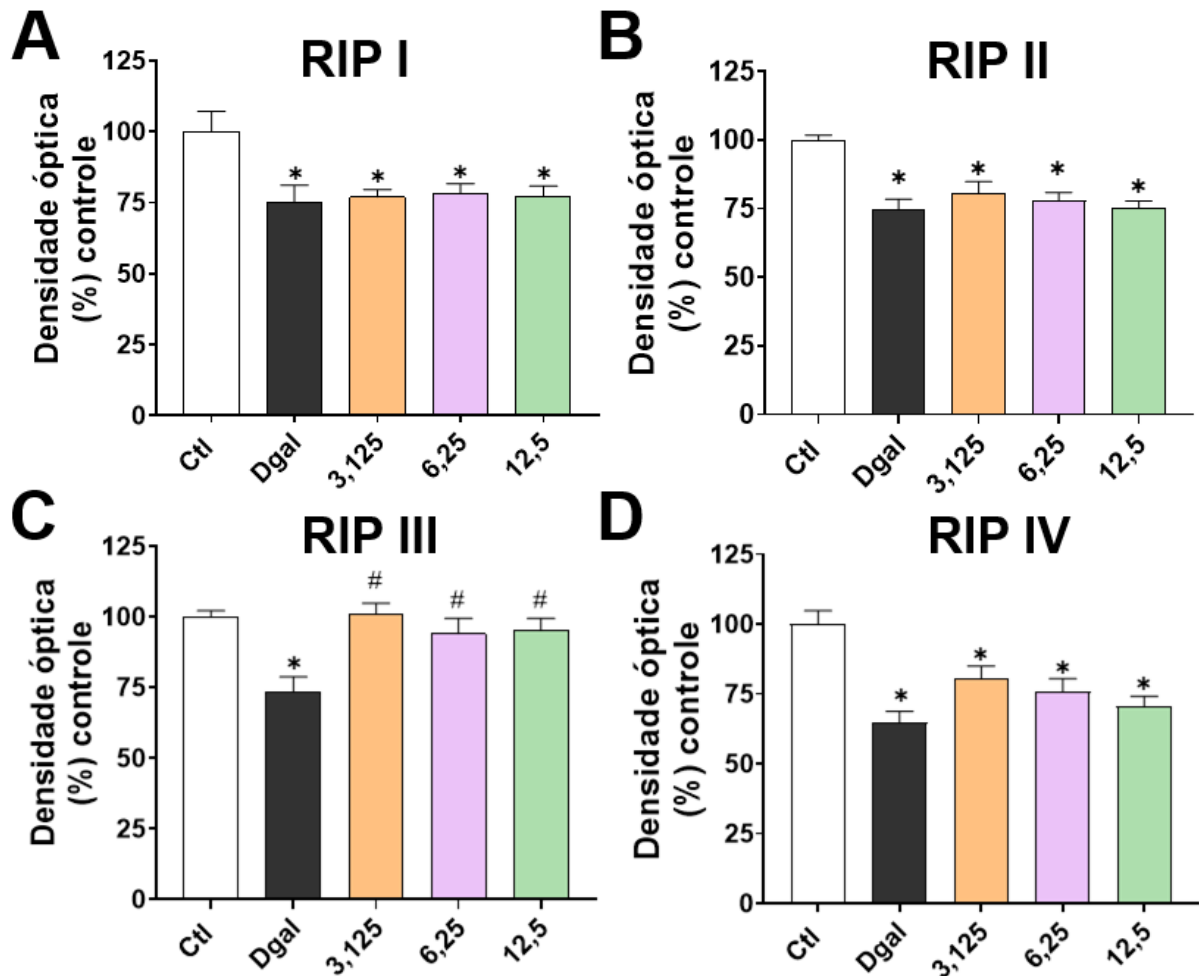


**Legenda.** Viabilidade celular de RAECs tratadas com as riparina I (A); riparina II (B); riparina III (C) e riparina IV (D) em diferentes concentrações numa condição basal. Grupos: CTL (veículo) e RIP (riparinas I, II, III e IV nas concentrações de 3,125; 6,25 e 12,5  $\mu\text{M}$ ). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m (n = 6). Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA “one way”, seguida de pós-teste de Tukey. \*p < 0,05 vs CTL.

Além disso, a avaliação da viabilidade celular na presença do Dgal, demonstra a redução na viabilidade para o grupo Dgal nos 4 gráficos, em valores normalizados pelo grupo Ctl. Das quatro riparinas testadas, apenas a riparina III foi capaz de reverter esse fenômeno retomando para os níveis do controle quando comparado ao grupo Dgal, sendo as concentrações em  $\mu\text{M}$ , obtivemos: Ctl ( $100,0 \pm 2,26$  %; n = 6); Dgal ( $73,66 \pm 5,12$  %; n = 6); 3,125 ( $100,95 \pm 3,93$  %; n = 6); 6,25 ( $94,08 \pm 5,43$  %; n = 6); 12,5 ( $95,40 \pm 4,13$  %; n = 6). As demais riparinas mantiveram o padrão de viabilidade observado no grupo Dgal. Assim, a RIP I: Ctl ( $100,0 \pm 7,16$  %; n = 6); Dgal ( $75,31 \pm 5,79$  %; n = 6); 3,125 ( $76,95 \pm 2,67$  %; n = 6); 6,25 ( $78,31 \pm 3,32$

%; n = 6); e 12,5 (77,37 ± 3,48 %; n = 6). Para a RIP II: Ctl (100,0 ± 1,81 %; n = 6); Dgal (74,80 ± 3,60 %; n = 6); 3,125 (80,38 ± 4,39 %; n = 6); 6,25 (77,76 ± 3,15 %; n = 6); 12,5 (75,08 ± 2,66 %; n = 6). Para a RIP IV: Ctl (100,0 ± 4,84 %; n = 6); Dgal (64,77 ± 4,07 %; n = 6); 3,125 (80,53 ± 4,44 %; n = 6); 6,25 (77,76 ± 3,15 %; n = 6); e 12,5 (70,34 ± 3,88 %; n = 6).

**Figura 16.** Viabilidade celular de RAECs tratadas com as riparinas I, II, III e IV na condição Modelo utilizando o ensaio de MTT.



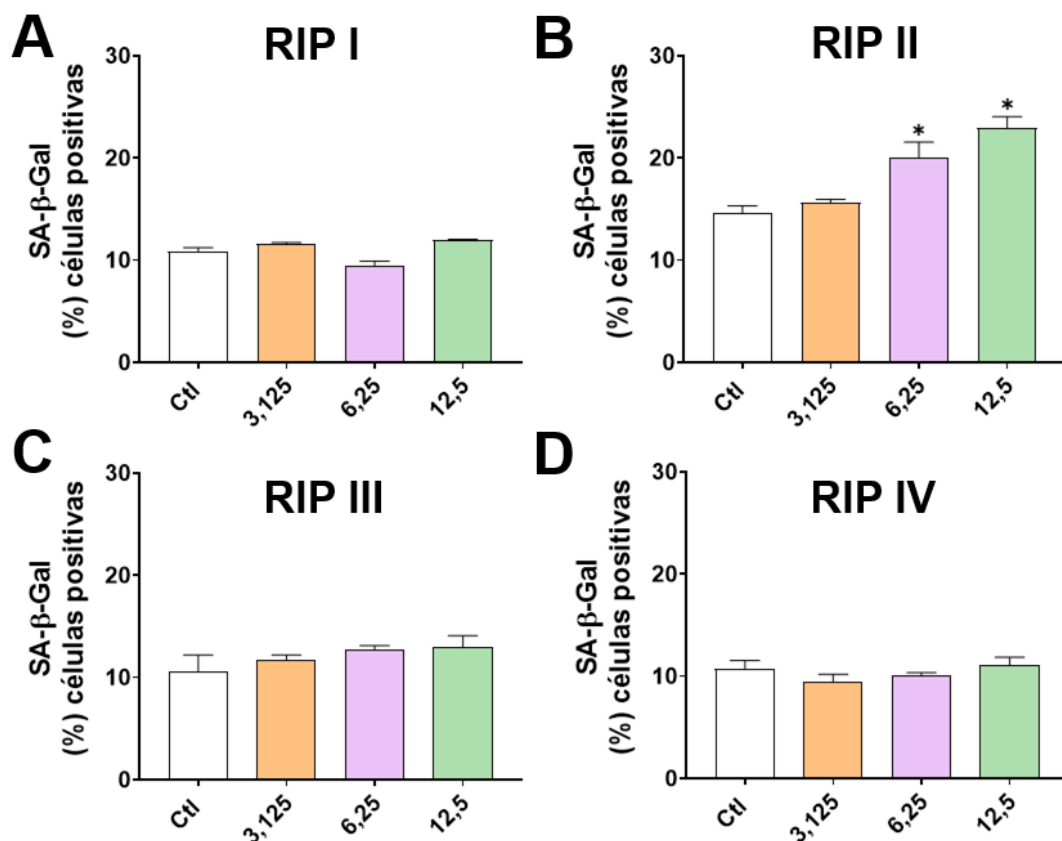
**Legenda.** Viabilidade celular de RAECs tratadas com as riparina I (A); riparina II (B); riparina III (C) e riparina IV (D) em diferentes concentrações na presença do D-(+)-galactose (Dgal). Grupos: CTL (veículo); Dgal (D-galactose 20 mg/mL); Dgal+RIP (D-galactose 20mg/mL + riparinas I, II, III e IV nas concentrações de 3,125; 6,25 e 12,5 μM). Os resultados estão expressos como média ± e.p.m (n = 6). Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA “one way”, seguida de pós-teste de Tukey. \**p* < 0,05 vs CTL. # *p* < 0,05 vs Dgal.

### 5.1.2 Avaliação dos efeitos das riparinas I, II, III e IV na senescência celular

Frente a senescência, observou-se aumento no número de células positivas para o teste de atividade lisossomal da SA-β-gal na condição de estimulação com a D-galactose. Na

condição basal não foram observadas alterações no padrão de senescência para riparinas I, III e IV. Assim, a RIP I: Ctl ( $10,85 \pm 0,38$  %;  $n = 3$ ); 3,125 ( $11,58 \pm 0,14$  %;  $n = 3$ ); 6,25 ( $9,40 \pm 0,50$  %;  $n = 3$ ); e 12,5 ( $11,97 \pm 0,09$  %;  $n = 3$ ). Para a RIP III: Ctl ( $10,60 \pm 1,61$  %;  $n = 3$ ); 3,125 ( $11,76 \pm 0,45$  %;  $n = 3$ ); 6,25 ( $12,71 \pm 0,40$  %;  $n = 3$ ); e 12,5 ( $13,00 \pm 1,09$  %;  $n = 3$ ). Para a RIP IV: Ctl ( $10,69 \pm 0,86$  %;  $n = 3$ ); 3,125 ( $9,47 \pm 0,73$  %;  $n = 3$ ); 6,25 ( $10,00 \pm 0,34$  %;  $n = 3$ ); e 12,5 ( $11,06 \pm 0,81$  %;  $n = 3$ ). No entanto, a RIP II promoveu um aumento na quantidade de células positivas para SA- $\beta$ -Gal a partir da concentração de 6,25  $\mu$ M, sendo: CTL ( $14,65 \pm 0,67$  %;  $n = 3$ ); 3,125 ( $15,64 \pm 0,33$  %;  $n = 3$ ); 6,25 ( $20,05 \pm 1,49$  %;  $n = 3$ ); e 12,5 ( $22,91 \pm 1,12$  %;  $n = 3$ ).

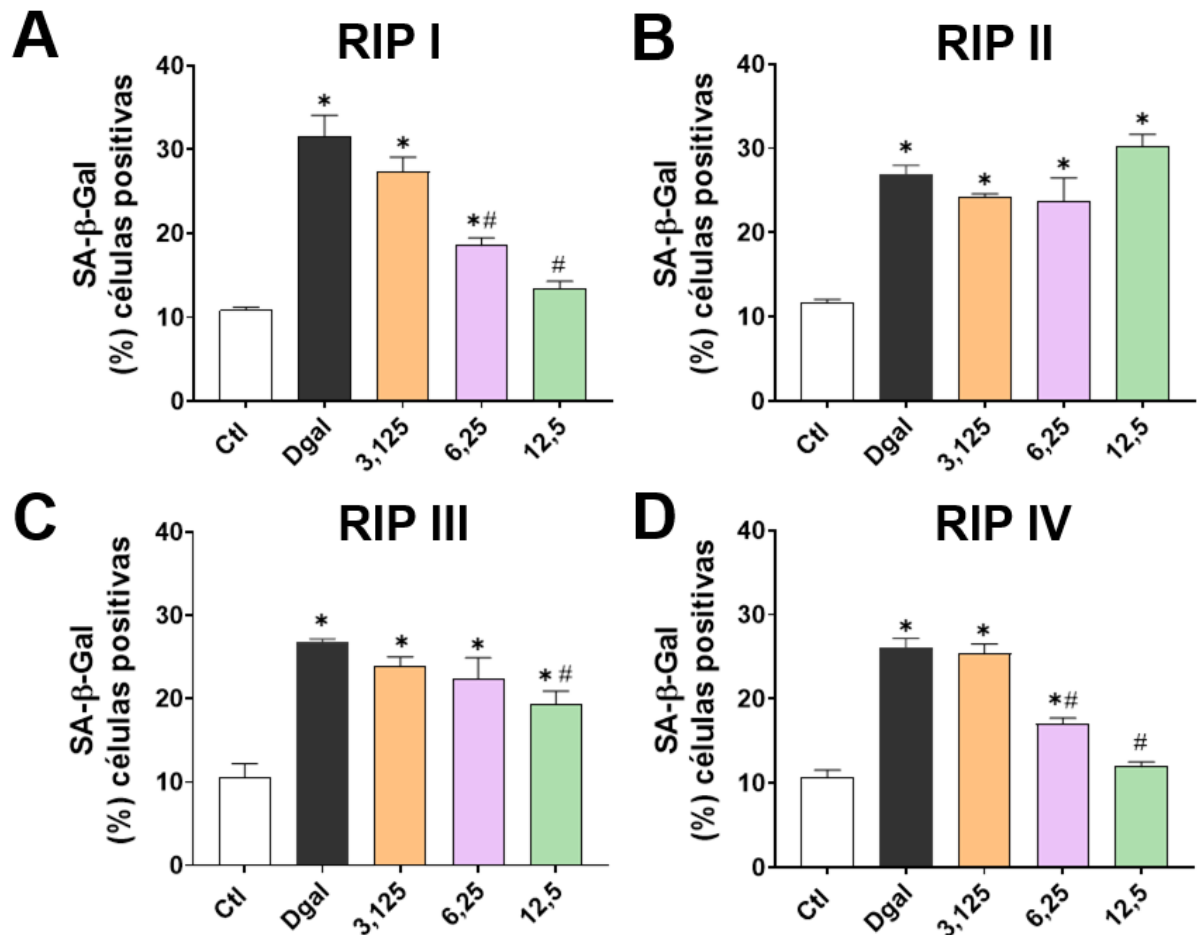
**Figura 17.** Senescência celular de RAECs tratadas com as riparina I, II, III e IV utilizando o ensaio de SA- $\beta$ -gal no grupo Basal.



**Legenda.** Efeito da incubação com as riparina I (A); riparina II (B); riparina III (C) e riparina IV (D) sobre a atividade da  $\beta$ -galactosidase associada à senescência (SA- $\beta$ -gal) em RAECs na condição basal. Grupos: Ctl (veículo) e RIP I (riparinas I, II, III e IV nas concentrações de 3,125; 6,25 e 12,5  $\mu$ M). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m ( $n = 3$ ). Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA “one way”, seguida de pós-teste de Tukey. \* $p < 0,05$  vs Ctl.

A partir da avaliação da atividade lisossomal da SA- $\beta$ -gal das células incubadas concomitantemente com a D-galactose, observou-se o aumento no percentual de senescência para o grupo Dgal nos 4 ensaios, sendo o tratamento com as riparinas I, III e IV capaz de reverter esse aumento para as riparinas I, III e IV. Os resultados foram expressos em percentual de células positivas pelo total de células contabilizadas. Para a RIP I, houve um aumento no grupo Dgal ( $31,61 \pm 2,46$  %;  $n = 3$ ) comparado ao grupo Ctl ( $10,84 \pm 0,37$  %;  $n = 3$ ). Embora a concentração de 3,125 não tenha alterado esse parâmetro ( $27,30 \pm 1,77$  %;  $n = 3$ ) em relação ao grupo Dgal, as concentrações de 6,25  $\mu$ M ( $18,52 \pm 0,93$  %;  $n = 3$ ) e 12,5  $\mu$ M ( $13,43 \pm 0,84$  %;  $n = 3$ ) reduziram o número de células positivas comparado ao grupo Dgal. Para a RIP II, no grupo Dgal ( $26,84 \pm 1,12$  %;  $n = 3$ ) observa-se aumento no número de células positivas comparado ao grupo Ctl ( $11,71 \pm 0,34$  %;  $n = 3$ ). Com manutenção nessa condição nas três concentrações testadas: 3,125  $\mu$ M ( $24,22 \pm 0,36$  %;  $n = 3$ ); 6,25  $\mu$ M ( $23,76 \pm 2,70$  %;  $n = 3$ ) e 12,5  $\mu$ M ( $30,19 \pm 1,46$  %;  $n = 3$ ). Para a RIP III, houve um aumento no grupo Dgal ( $26,78 \pm 0,39$  %;  $n = 3$ ) comparado ao grupo Ctl ( $10,60 \pm 1,60$  %;  $n = 3$ ). Além disso, nas concentrações 3,125  $\mu$ M ( $23,95 \pm 1,06$  %;  $n = 3$ ) e 6,25  $\mu$ M ( $22,42 \pm 2,47$ ;  $n = 3$ ) não foram observadas alterações significativas em relação ao grupo Dgal. No entanto, a concentração de 12,5  $\mu$ M ( $19,31 \pm 1,59$ ;  $n = 3$ ) promoveu redução no quantitativo de células senescentes comparado ao grupo Dgal. Para a RIP IV, houve um aumento no grupo Dgal ( $25,99 \pm 1,19$  %;  $n = 3$ ) comparado ao grupo Ctl ( $10,69 \pm 0,86$  %;  $n = 3$ ). Embora a concentração de 3,125 não tenha alterado esse parâmetro ( $25,42 \pm 1,10$  %;  $n = 3$ ), as concentrações de 6,25  $\mu$ M ( $17,02 \pm 0,69$  %;  $n = 3$ ) e 12,5  $\mu$ M ( $11,93 \pm 0,57$  %;  $n = 3$ ) reduziram o número de células positivas comparado ao grupo Dgal.

**Figura 18.** Senescência celular de RAECs tratadas com as riparinas I, II, III e IV utilizando o ensaio de SA- $\beta$ -gal IV na condição Modelo.



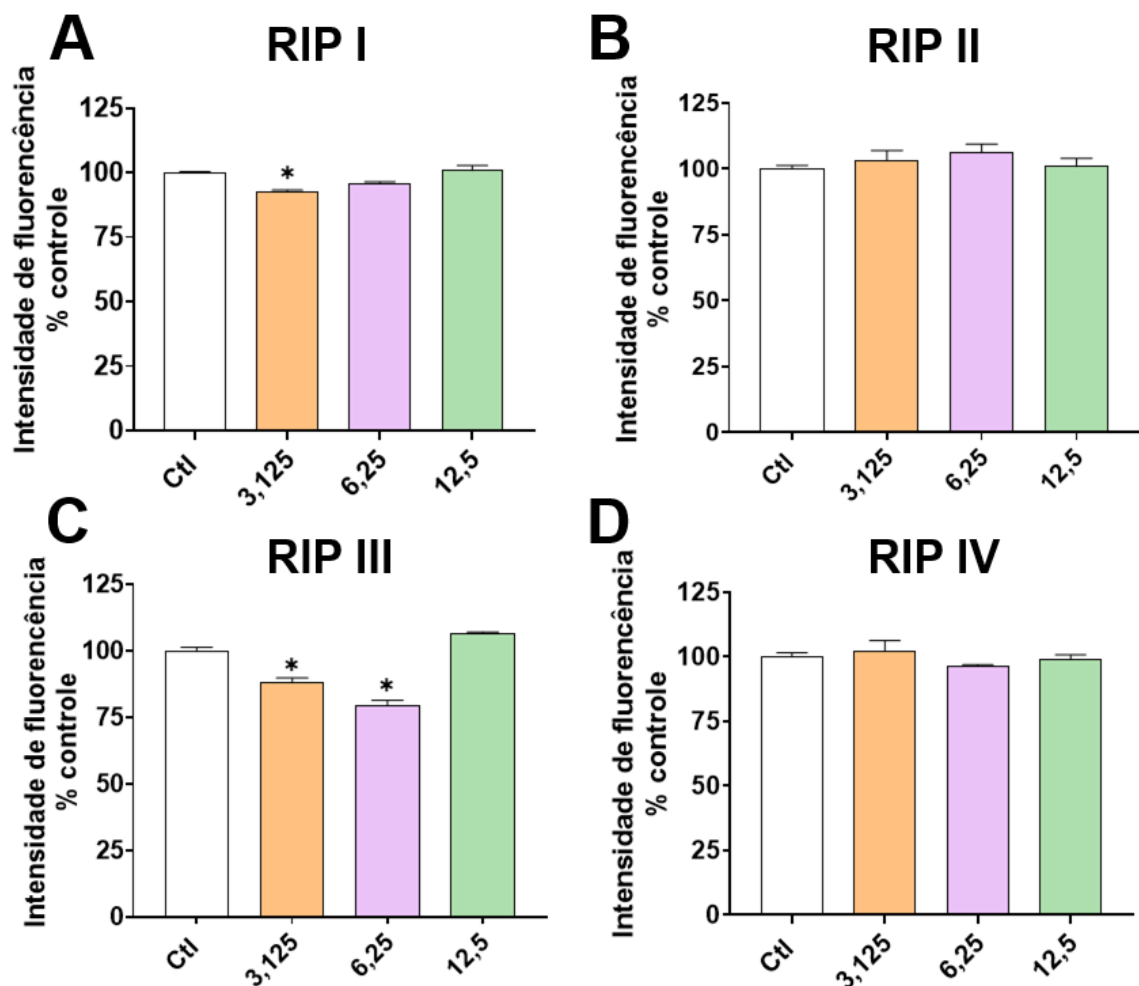
**Legenda.** Efeito da incubação com as riparina I (A); riparina II (B); riparina III (C) e riparina IV (D) sobre a atividade da  $\beta$ -galactosidase associada à senescência (SA- $\beta$ gal) em RAECs na presença de D-(+)-galactose. Grupos: Ctl (veículo); Dgal (D-(+)-galactose 20 mg/mL); Dgal+RIP (D-(+)-galactose 20mg/mL + riparinas I, II, III e IV nas concentrações de 3,125; 6,25 e 12,5  $\mu$ M). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m (n = 3). Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA “one way”, seguida de pós-teste de Tukey. \* $p < 0,05$  vs Ctl. #  $p < 0,05$  vs Dgal.

### 5.1.2 Avaliação do efeito das riparinas I, II, III e IV nos níveis de EROs

De acordo com ensaio de DHE, após 48 horas de incubação das RAECs com as riparinas I,II, III e IV na condição basal, observou-se manutenção nos níveis de EROs para as riparinas II e IV em todas as concentrações testadas comparado ao grupo controle: RIP II: Ctl (100,0  $\pm$

1,28 %; n = 3); 3,125  $\mu$ M (103,23  $\pm$  3,68 %; n = 3); 6,25  $\mu$ M (106,00  $\pm$  3,34 %; n = 3); e 12,5  $\mu$ M (100,78  $\pm$  3,11 %; n = 3); e RIP IV: Ctl (100,0  $\pm$  1,49 %; n = 3); 3,125  $\mu$ M (102,07  $\pm$  4,14 %; n = 3); 6,25  $\mu$ M (96,15  $\pm$  0,68 %; n = 3); e 12,5  $\mu$ M (99,00  $\pm$  1,67 %; n = 3). Além disso, para a riparina I houve uma diminuição na intensidade de fluorescência na menor concentração, sendo: Ctl (100,0  $\pm$  0,42 %; n = 3); 3,125  $\mu$ M (92,47  $\pm$  0,77 %; n = 3); 6,25  $\mu$ M (95,94  $\pm$  0,55 %; n = 3); e 12,5  $\mu$ M (100,78  $\pm$  1,94 %; n = 3). Já a riparina II, apresentou atividade antioxidante, mesmo em condições basais para duas concentrações teste: Ctl (100,0  $\pm$  1,30 %; n = 3); 3,125  $\mu$ M (87,93  $\pm$  1,82 %; n = 3); 6,25  $\mu$ M (79,53  $\pm$  1,80 %; n = 3); e 12,5  $\mu$ M (106,53  $\pm$  0,51 %; n = 3).

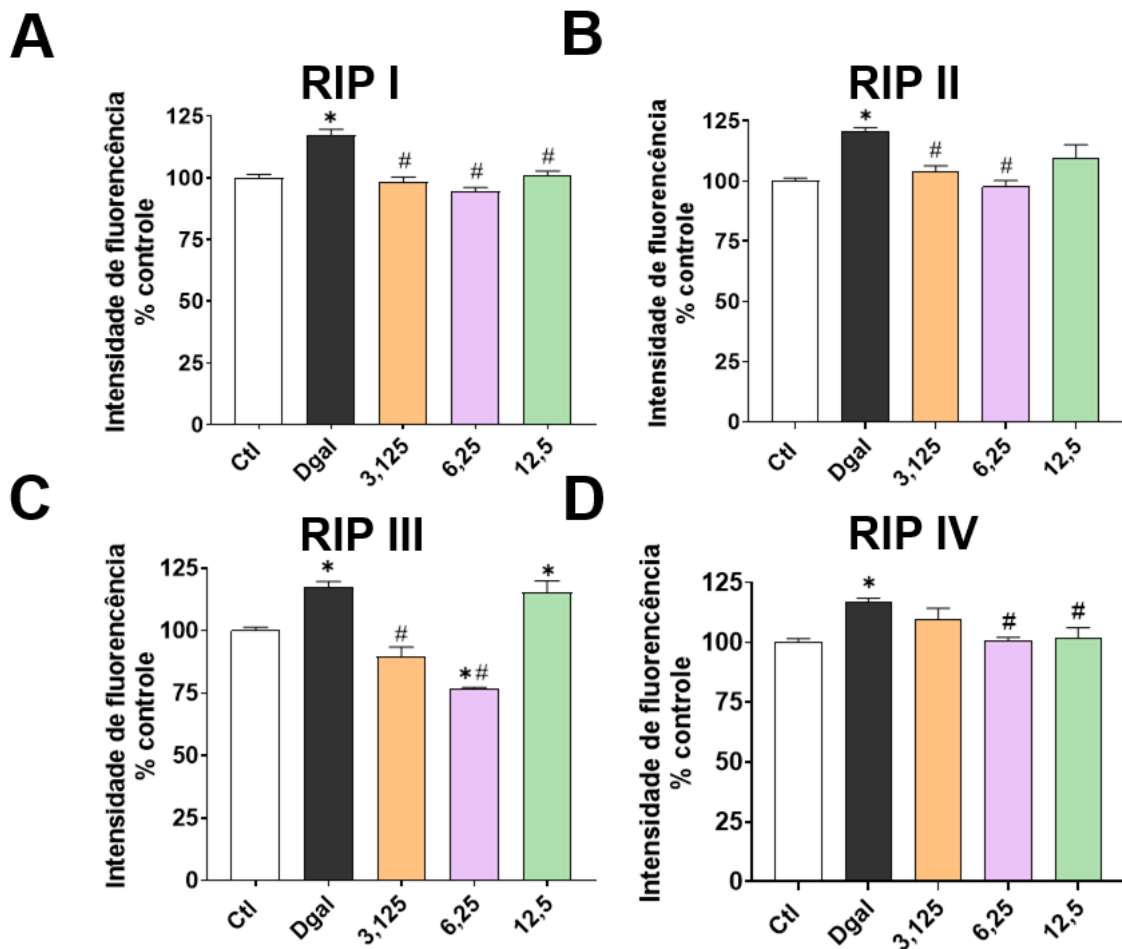
**Figura 19.** Avaliação dos efeitos das riparinas I, II, III e IV sobre a produção de ânions superóxido em cultivo primário de RAECs na condição Basal.



**Legenda.** Efeito da incubação com as riparina I (A); riparina II (B); riparina III (C) e riparina IV (D) sobre a produção de ânions superóxido em RAECs na condição basal. Grupos: Ctl (veículo) e RIP I (riparinas I, II, III e IV nas concentrações de 3,125; 6,25 e 12,5  $\mu$ M). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m (n = 3). Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA “one way”, seguida de pós-teste de Tukey. \* $p$  < 0,05 vs Ctl.

A partir da avaliação da atividade antioxidante em células incubadas concomitantemente com a D-(+)-galactose, observou-se o aumento na intensidade de fluorescência para o grupo Dgal nos 4 ensaios, sendo o tratamento capaz de reverter esse aumento para as quatro riparinas-teste, indicativo de atividade antioxidante. Para a RIP I, houve um aumento no grupo Dgal ( $117,22 \pm 2,43$  %;  $n = 3$ ) comparado ao grupo Ctl ( $100,0 \pm 1,30$  %;  $n = 3$ ), sendo esse aumento atenuado pelas concentrações:  $3,125 \mu\text{M}$  ( $98,27 \pm 1,92$  %;  $n = 3$ );  $6,25 \mu\text{M}$  ( $94,49 \pm 1,55$  %;  $n = 3$ );  $12,5 \mu\text{M}$  ( $100,78 \pm 1,94$  %;  $n = 3$ ). Já na riparina II, o grupo Dgal ( $120,47 \pm 1,64$  %;  $n = 3$ ) teve aumento nos níveis de EROs comparado ao grupo Ctl ( $100,0 \pm 1,28$  %;  $n = 3$ ), sendo as concentrações de  $3,125 \mu\text{M}$  ( $103,67 \pm 2,69$  %;  $n = 3$ ) e  $6,25 \mu\text{M}$  ( $97,63 \pm 2,56$  %;  $n = 3$ ) capazes de reverter esse aumento. Por outro lado, na concentração de  $12,5 \mu\text{M}$  ( $109,31 \pm 5,69$  %;  $n = 3$ ) há perda da capacidade antioxidante, com valores similares aos encontrados no grupo Dgal. De forma similar ao efeito da riparina II, os valores obtidos para a riparina III seguiram o mesmo perfil, com aumento no grupo Dgal ( $117,22 \pm 2,43$  %;  $n = 3$ ) comparado ao grupo Ctl ( $100,0 \pm 1,30$  %;  $n = 3$ ). Além disso, as concentrações  $3,125 \mu\text{M}$  ( $89,46 \pm 3,95$  %;  $n = 3$ ) e  $6,25 \mu\text{M}$  ( $76,58 \pm 0,69$ ;  $n = 3$ ) demonstraram atividade antioxidante, sendo a concentração de  $6,25 \mu\text{M}$  capaz de diminuir além dos valores encontrados no grupo Ctl. Por outro lado, as concentrações de  $12,5 \mu\text{M}$  ( $115,20 \pm 4,74$ ;  $n = 3$ ) teve perda de efeito, sendo seus valores semelhantes aos encontrados no grupo Dgal. Para a RIP IV, houve um aumento no grupo Dgal ( $116,75 \pm 1,67$  %;  $n = 3$ ) comparado ao grupo Ctl ( $100,0 \pm 1,49$  %;  $n = 3$ ). Embora a concentração de  $3,125 \mu\text{M}$  não tenha alterado esse parâmetro ( $109,74 \pm 4,56$  %;  $n = 3$ ) em relação ao grupo Dgal, as concentrações de  $6,25 \mu\text{M}$  ( $100,60 \pm 1,55$  %;  $n = 3$ ) e  $12,5 \mu\text{M}$  ( $101,62 \pm 4,60$  %;  $n = 3$ ) apresentaram atividade antioxidante.

**Figura 20.** Avaliação dos efeitos das riparinas I, II, III e IV sobre a produção de ânions superóxido em cultivo primário de RAECs IV na condição Modelo.

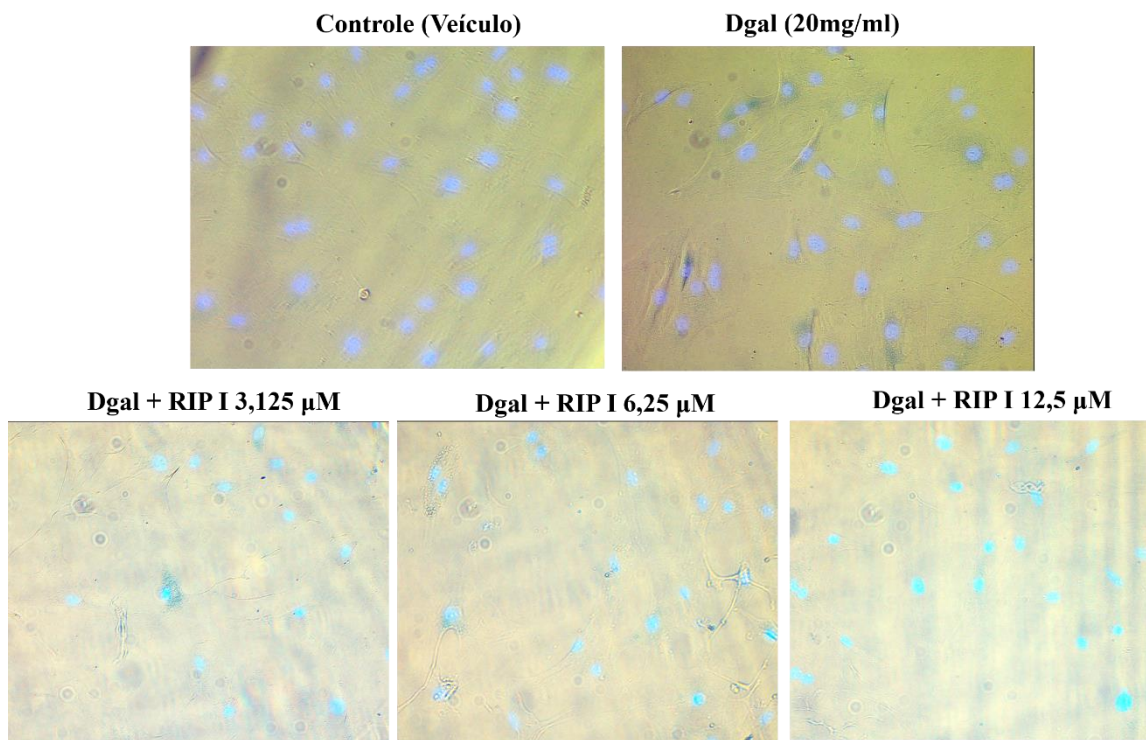


**Legenda.** Efeito da incubação com as riparina I (A); riparina II (B); riparina III (C) e riparina IV (D) sobre a produção de ânions superóxido em RAECs na presença de D-(+)-galactose. Grupos: Ctl (veículo); DGAL (D-galactose 20 mg/mL); DGAL+RIP (D-galactose 20mg/mL + riparinas I, II, III e IV nas concentrações de 3,125; 6,25 e 12,5  $\mu$ M. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m (n = 3). Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA “one way”, seguida de pós-teste de Tukey. \* $p < 0,05$  vs Ctl #  $p < 0,05$  vs DGAL.

Resumidamente, com os resultados do *screening* observa-se a vantagem da riparina I em detrimento das demais moléculas sob a melhora da senescência e estresse oxidativo no modelo de indução por D-galactose nas células endoteliais da artérias aorta de ratos, tendo em vista que essa foi capaz de reduzir a produção de ânions superóxido e a atividade da SA- $\beta$ -gal em baixas concentrações, tendo efeito antioxidante já a partir de 3,125  $\mu$ M, sendo ainda incapaz de modificar a viabilidade, estado de senescência e balanço redox na condição basal. Portanto, RIP I foi escolhida para dar segmento aos ensaios *in sílico* para avaliar sua capacidade em interagir com alvos envolvidos com as vias de longevidade, predizendo, portanto, as próximas

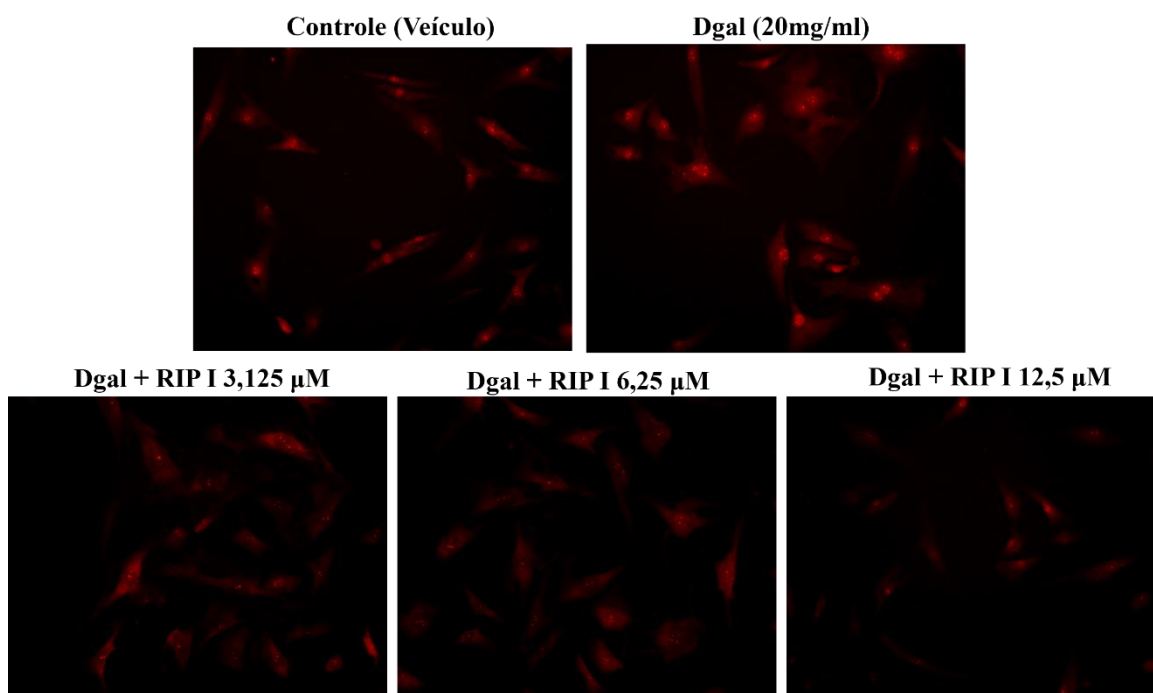
etapas no delineamento experimental para investigação do potencial senoterapêuticos das N-benzoiltiraminas de *Aniba riparia*.

**Figura 21:** Senescência celular de RAECs tratadas com a riparina I utilizando o ensaio de SA- $\beta$ -gal na condição de estimulação com D-galactose.



**Legenda:** Imagens representativas da coloração de SA- $\beta$ -gal em RAECs em função do tratamento com diferentes concentrações da riparina I (3,125, 6,25 e 12,5  $\mu$ M (objetiva de 20x).

**Figura 22:** Produção de ânions superóxido em RAECs tratadas com a riparina I utilizando na condição de estimulação com D-galactose utilizando o ensaio de DHE.



**Legenda:** Imagens representativas da fluorescência emitida pelo DHE em RAECs em função do tratamento com diferentes concentrações da riparina I (3,125, 6,25 e 12,5  $\mu\text{M}$ ) (objetiva de 20x).

## 5.2 ESTUDOS *IN SILICO*

Após a seleção da riparina I mediante *screening* farmacológico, seguimos para os estudos *in silico*. Nessa etapa, foram avaliados os perfis físico-químicos e farmacocinéticos das riparinas I, II, III e IV. Além disso, a riparina I foi selecionada para testes de *docking* e dinâmica molecular.

### 5.2.1 Avaliação do Perfil ADMET

Foram avaliadas as propriedades físico-químicas e farmacocinéticas das moléculas-teste a partir de técnicas *in silico*, com o objetivo de prever as habilidades destas em atravessar as membranas biológicas o que determina a absorção via oral e permeabilidade na barreira

Hematoencefálica. Nesse contexto, observou-se para as quatro riparinas a grande possibilidade de boa biodisponibilidade para a absorção gastrointestinal posto que essas obedeceram à regra dos 5 de Lipinski, ou seja, peso molecular  $\leq 500$ g/mol; número de aceptores de hidrogênio (ALH)  $\leq 10$ , número de doadores de hidrogênio (DLH)  $\leq 5$  e coeficiente de lipofilicidade (cLogP)  $\leq 5$  (LIPINSKI et al., 1997), bem como apresentam valores de TPSA  $< 140$ (A°). Para as riparinas I, II, e IV denota-se ainda, a possibilidade de ação central devido a habilidade destas em cruzarem a barreira hematoencefálica. Além disso, os parâmetros de *drug-likeness* e *drug score* indicam de acordo com a similaridade química que todas as moléculas se comportam como excelentes candidatos a fármacos, com valores de *drug-likeness* maiores que 2 e *drug score* maior que 80%.

**Tabela 4** – Análise *in silico* das características moleculares das N-benzoiltiraminas

PROPRIEDADE	RIP I	RIP II	RIP III	RIP IV
<b>Peso molecular (g/mol)</b>	255,31	271,31	287,31	345,39
<b>cLogP</b>	2,98	2,67	2,35	3,05
<b>DLH</b>	1	2	3	1
<b>ALD</b>	2	3	4	5
<b>Violações de Lipinski</b>	0	0	0	0
<b>TPSA (A°)</b>	37,30	58,56	78,79	66,02
<b>LogS</b>	-3,07	-2,78	-2,48	-3,13
<b>Drug-likeness</b>	2,14	2,25	2,24	10,77
<b>Drug score</b>	0,82	0,84	0,86	0,83
<b>Administração Oral</b>	Sim	Sim	Sim	Sim

**Legenda:** PM: peso molecular  $\leq 500$ g/mol; ALD: número de aceptores de hidrogênio  $\leq 10$ , DLH: número de doadores de hidrogênio  $\leq 5$ , cLogP: coeficiente de lipofilicidade; TPSA: área de superfície topológica polar; %ABS: porcentagem de absorção, Log S: solubilidade em meio aquoso.

Ademais, foi possível prever possíveis modulações nas enzimas do citocromo p450, parâmetro importante para presumir interações medicamentosas. Os resultados demonstram diferentes níveis de interações das riparinas com as cinco isoformas de CYPs hepáticas, de modo que todas elas mostraram-se capazes de inibir as CYP1A2 e CYP2D6, apenas a riparina IV parece inibir a CYP3A4, para CYP2C19 tanto a riparina I quanto a riparina IV parecem produzir inibição e a CYP2C9 pode ter como inibidores as riparina III e IV.

**Tabela 5** – Predição do comportamento farmacocinético das N-benzoiltiraminas para absorção gastrointestinal, permeabilidade hematoencefálica e interação com P-gp e isoformas de CYP450

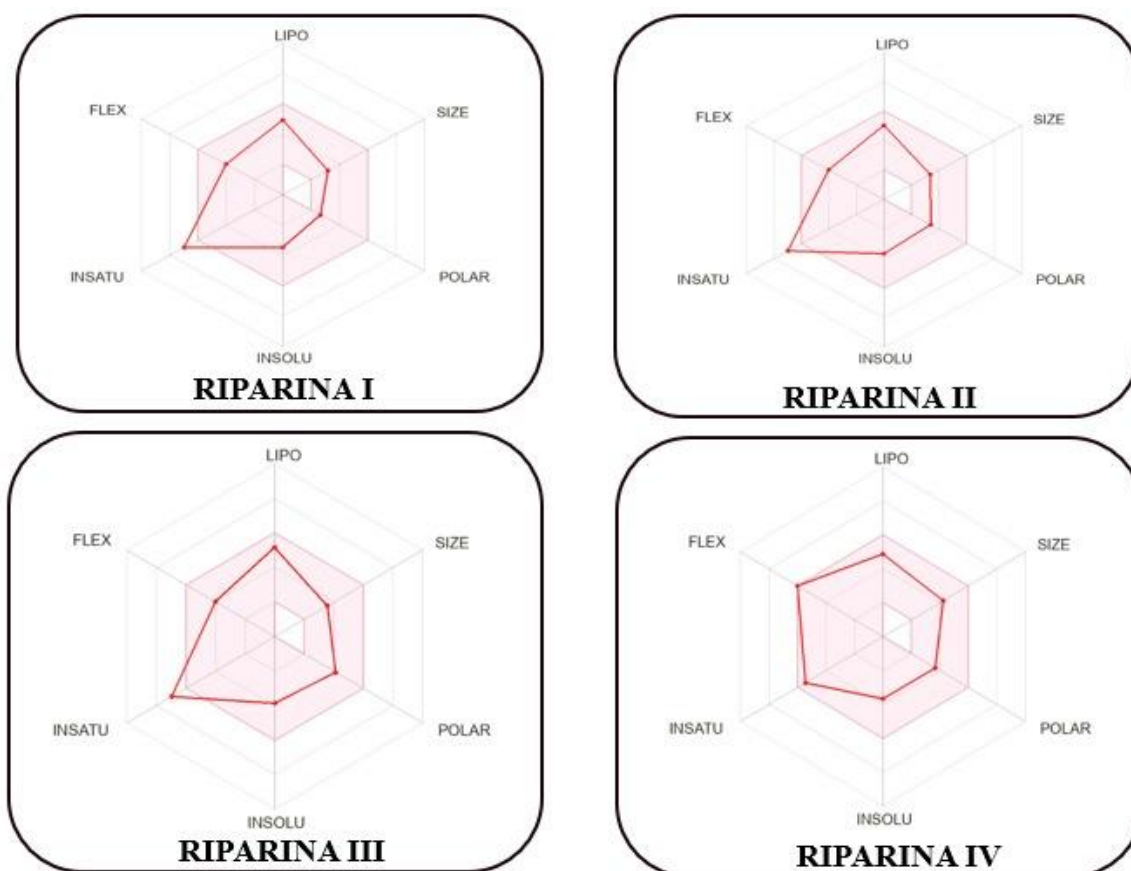
<b>PROPRIEDADE</b>	<b>RIP I</b>	<b>RIP II</b>	<b>RIP III</b>	<b>RIP IV</b>
<b>Absorção GI</b>	Alta	Alta	Alta	Alta
<b>Permeabilidade BHE</b>	Sim	Sim	Não	Sim
<b>Substrato P-gp</b>	Não	Não	Não	Não
<b>Inibidor CYP1A2</b>	Sim	Sim	Sim	Sim
<b>Inibidor CYP2C19</b>	Sim	Não	Não	Sim
<b>Inibidor CYP2C9</b>	Não	Não	Sim	Sim
<b>Inibidor CYP2D6</b>	Sim	Sim	Sim	Sim
<b>Inibidor CYP3A4</b>	Não	Não	Não	Sim

**Legenda:** GI: trato gastrointestinal, BHE: Barreira Hematoencefálica; P-gp: glicoproteína P (a molécula se associa com o substrato), CYP: Isoformas da enzima do citocromo P-450 oxidase (Sim: inibidor da enzima/ Não: Não é inibidor da enzima).

### 5.2.2 Radar de Biodisponibilidade

As quatro riparinas demonstraram boas predições para a biodisponibilidade oral tendo em vista que as moléculas encontram-se dentro do sombreado rosado, fornecido pelo software SwissADME, que delimita uma área em uma estrutura gráfica correspondente às condições ideais de biodisponibilidade para a administração de um fármaco via oral de acordo com tamanho da molécula, flexibilidade, solubilidade, lipofilicidade, saturação e polaridade, com leves desvios em decorrência da presença de insaturações (Figura 23).

**Figura 23.** Radar de biodisponibilidade das N-benzoiltiraminas



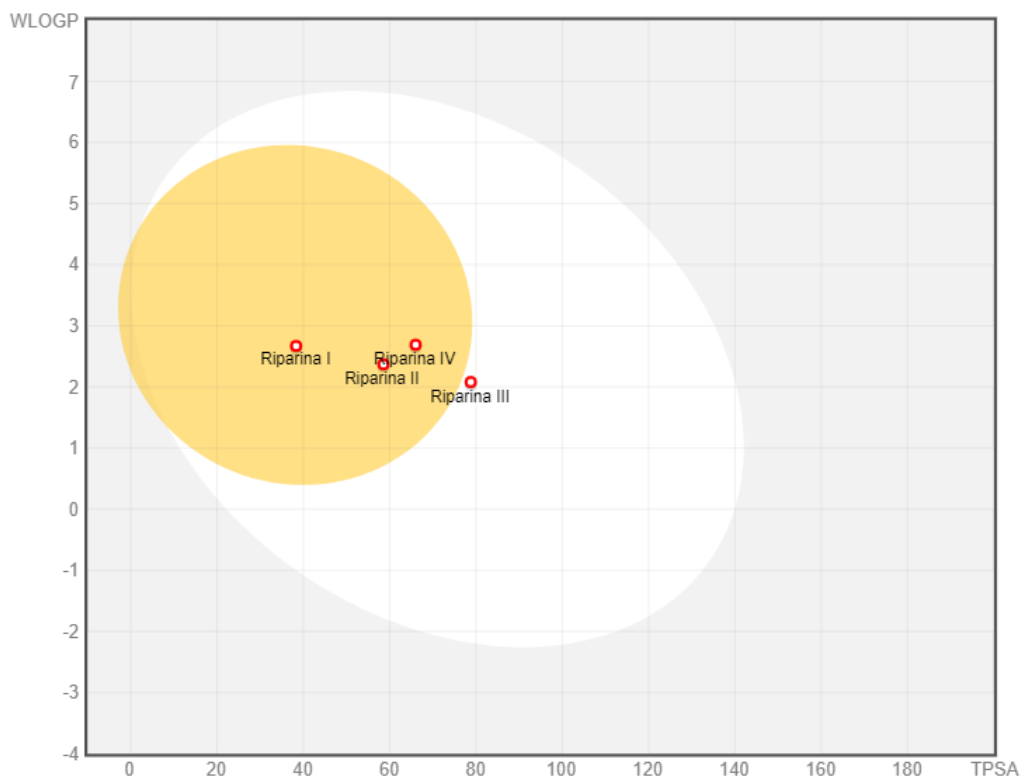
**Legenda:** LIPO (lipofilicidade)= XLOGP3 entre -0.7 e +0.5; SIZE (tamanho da molécula)= entre 150 e 500 g/mol; POLAR (polaridade)= TPSA entre 20 e 130Å<sup>2</sup>; INSOLU (insolubilidade)= LOG S < 6; INSATU (saturação)= fração de carbonos em sp<sup>3</sup> . ≥0.25; FLEX(flexibilidade) ≤9 grupos rotáveis.

### 5.2.3 Gráfico BOILED-Egg

Com relação ao *BOILED-Egg* (Gráfico 24) que correlaciona a área superficial topológica polar (TPSA) com a lipofilicidade (WLogP), nota-se que com exceção da riparina III, todos os compostos mostraram-se capazes de ultrapassar a barreira hematoencefálica (BHE) delimitada pelo círculo amarelo, o que pode conferir vantagem em reverter o padrão de senescência à nível central. A representação ainda indica que nenhuma das moléculas é substrato para a proteína gp que está relacionada com uma estratégia de extrusão de toxinas e xenobióticos para fora das células - mecanismo importante de resistência a ação farmacológica - portanto, tal achado

demonstra uma vantagem em relação às moléculas em estudo, pois estas não estão sujeitas a essa ferramenta de controle de biodisponibilidade.

**Figura 24.** Gráfico BOILED-Egg para as N-benzoiltiraminas.



**Legenda:** Círculo amarelo delimita a região onde concentram-se as moléculas que apresentam capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica; O elipse branco demarca região para absorção passiva pelo trato gastrointestinal; Área cinza - moléculas com propriedade farmacocinéticas desfavoráveis; Pontos vermelhos- não-substrato para P-gp, pontos azuis: substrato de P-gp.

#### 5.2.4 Simulações de *docking* molecular

A riparina I foi submetida ao rastreamento de *docking*, sendo os resultados da simulação gerados por meio de duas funções de pontuação, o *Moldock Score* e o *Rerank Score*, de modo que os valores mais negativos indicam melhores previsões. Os resultados obtidos foram bastante promissores frente à alvos importantes nas vias relacionadas ao equilíbrio redox (Nrf2 e NADPH oxidase), controle de produção de mediadores pró-inflamatórios (NF- $\kappa$ B e MAPK p38) e senescência (MAPK p38, Sirtuin 1, Sirtuin 5 e mTOR).

Conforme demonstrado na Tabela 6, a complexação da riparina I com todos os alvos do rastreio (Keap1-Nrf2, MAPK p38, mTOR, NADPH Oxidase, NF- $\kappa$ B e Sirtuins 1 e 5) resultou em valores de energia de interação negativos (energia perdida pelas moléculas quando ocorre o acoplamento). Notavelmente, os scores do *Moldock* revelaram valores mais negativos para a interação da riparina I com a NADPH Oxidase, NF- $\kappa$ B e Sirtuins 5, apresentando diferenças significativas nos padrões de -13,0665, -34,7806 e 2,3337, respectivamente.

Em relação ao score Rerank, observou-se que os valores de energia foram menores para a riparina I em interações com a NADPH Oxidase, mTOR e Sirtuins 1 e 5. As diferenças mostraram uma clara tendência para a riparina I, com variações nos padrões de -17,2876, -12,0392, -10,406 e -6,5985, respectivamente.

**Tabela 6** – Valores de energia da riparina I com alvos-chave das vias de senescência e estresse oxidativo para as duas funções de pontuação em estudo

Proteína	Ligante	Moldock Score*	Rerank Score *
Keap 1-Nrf2	Riparina I	-65,7187	-60,7901
	Padrão <sup>a</sup>	-139,89	-103,08
MAPK p38	Riparina I	-95,4087	-78,3388
	Padrão <sup>b</sup>	-191,28	-156,488
mTOR	Riparina I	-72,441	-59,6829
	Padrão <sup>c</sup>	-89,811	-47,6437
Domínio SH3 - p40 NADPH oxidase	Riparina I	-74,9757	-66,9456
	Padrão <sup>d</sup>	-61,9092	-49,658
IKK $\alpha$ / NF- $\kappa$ B	Riparina I	-105,139	-60,6579
	Padrão <sup>e</sup>	-70,3584	-79,8912
Sirtuin 1	Riparina I	-52,1581	-66,3526
	Padrão <sup>f</sup>	-66,3526	-55,9466
Sirtuin 5	Riparina I	-21,2487	-17,7596
	Padrão <sup>f</sup>	-18,915	-11,1611

**Legenda:** \*Valores de energia expressos em kJ/mês; Padrão (ligantes de referência para comparação do acoplamento com o alvo proteico): a: Ácido 3-[4-(5,5,8,8-tetrametil-6,7-dihidronaftalen-2-il)-4,5,6,7-tetrahidro-1-benzotiofen-2-il]propanoico; b: N-[4-[2-(4-fluoro-3-metilfenil)imidazo[1,2-b]piridazin-3-il]piridin-2-il]quinolina-6-carboxamida; c: Rapamicinae; d: apocinina ; e: Emetine; f: resveratrol.

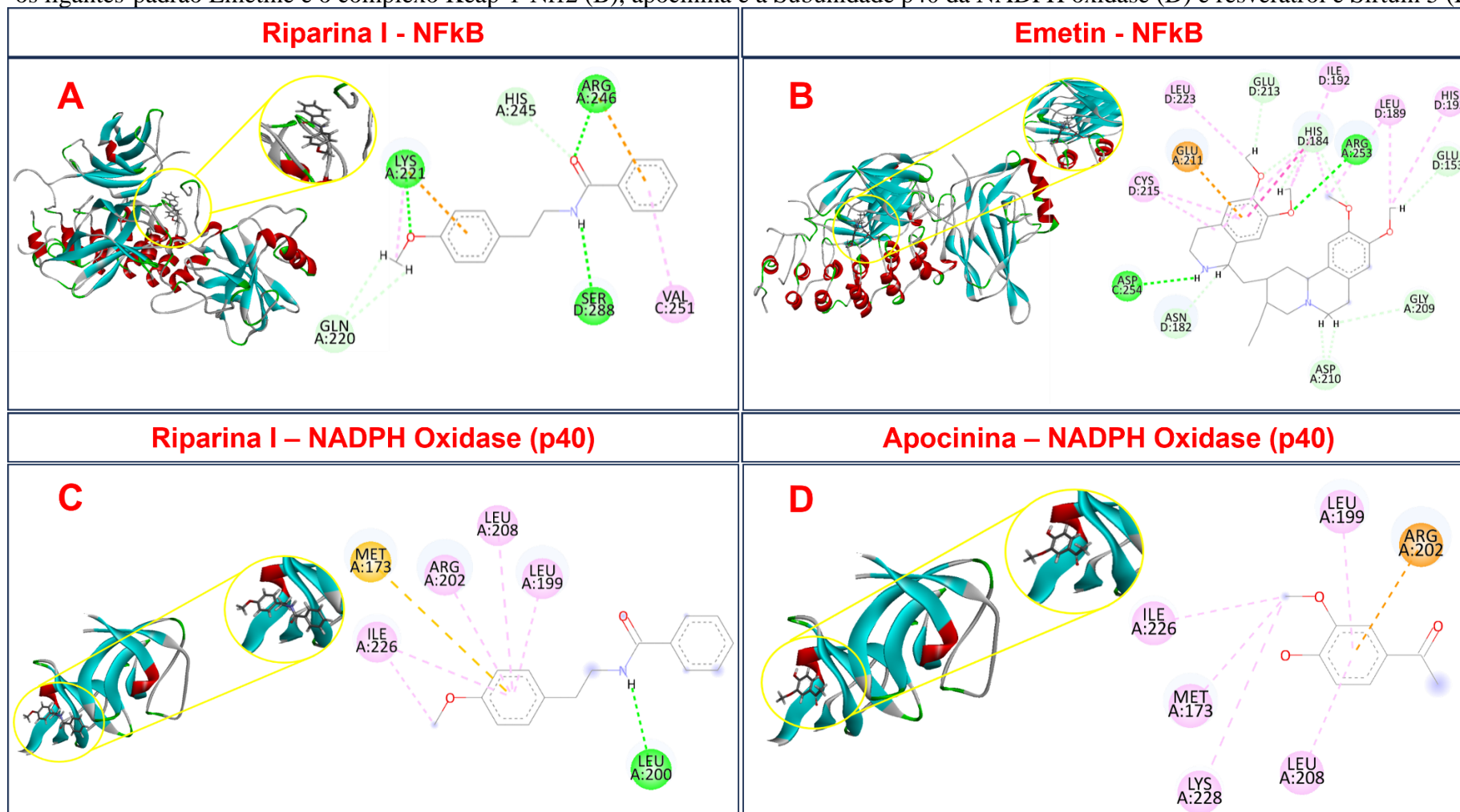
Frente a tais achados foram investigadas as interações entre a riparina I e os alvos que demonstram menores valores de energia em relação ao padrão (NF- $\kappa$ B; NADPH oxidase e Sirtuin 5), o que revelou diferentes graus de especificidade (Figura 25).

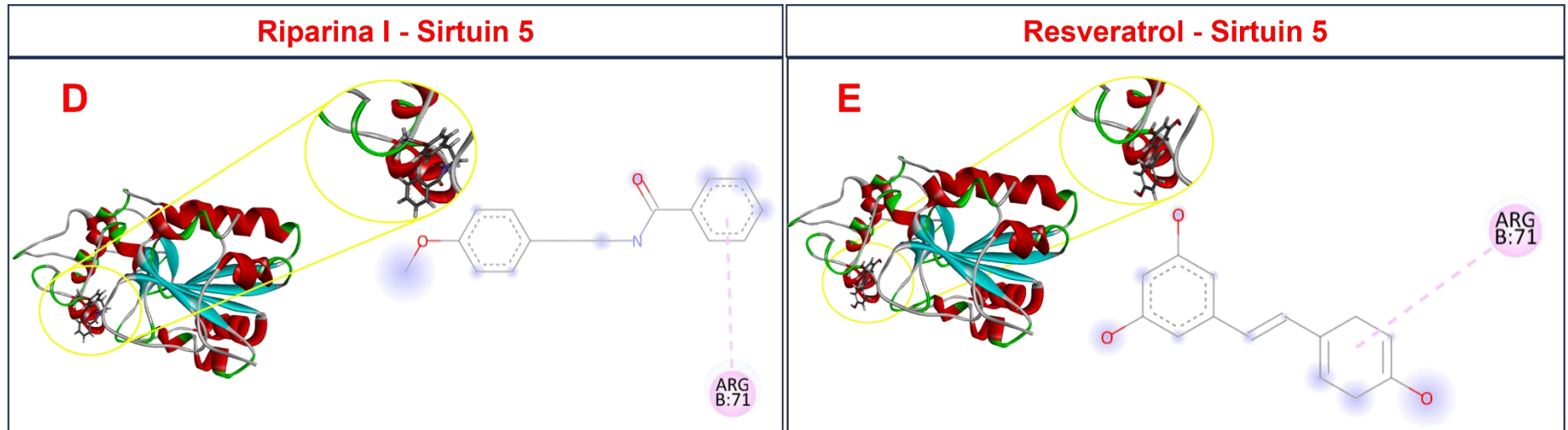
Nesse contexto, observou-se no acoplamento riparina I – NF- $\kappa$ B a estabilização por meio de interações de hidrogênio com os seguintes resíduos de aminoácidos: Lys-A221, Arg-A246 e Ser-D288, sendo nesses dois primeiros ainda formadas interações do tipo Pi-cation; Interações carbono-hidrogênio com o resíduo His-A245, além das interações hidrofóbicas com os aminoácidos Val-C251 e Lys-A221. Em relação a complexação com o padrão Emetine observou-se a presença de interações hidrofóbicas do tipo alquil nos seguintes resíduos: Cys-D215, Leu-D223, Ile-D192, Leu-D189, His-D193; Pi-Ânion no resíduo Glu-A211; carbono-hidrogênio em Asn-D182, Asp-A210, Gly-A209, His-D184, Glu-D213 e Glu-D153. Ademais observa-se a formação de ligações de hidrogênio nos resíduos Asp-C254 e Arg-A253.

Por outro lado, a interação com a macromolécula NADPH oxidase deu-se por meio de interações estéricas com Ile226, Met173, Arg202, Leu208, Leu199 e interações de hidrogênio em Leu200; já no controle – apocinina – observa-se um padrão semelhante, com interações hidrofóbicas do tipo alquil nos resíduos Ile226, Met173, Lys228, Leu208 e Leu199 e interações pi-cátion com o aminoácido Arg202.





Para a Sirtuin 5 a estabilização do complexo ocorreu a partir de interações hidrofóbicas do tipo Pi-alquil no resíduo Arg71, o mesmo foi encontrado para o padrão resveratrol.




**Figura 25.** Interações entre a riparina I e o complexo IKK $\alpha$ /NF- $\kappa$ B(A), Subunidade p40 da NADPH oxidase (C) e Sirtuin 5 (E) e Interações entre os ligantes-padrão Emetine e o complexo Keap-1-Nrf2 (B), apocinina e a Subunidade p40 da NADPH oxidase (D) e resveratrol e Sirtuin 5 (F)





### Interactions

	Conventional Hydrogen Bond
	Carbon Hydrogen Bond
	Pi-Cation
	Pi-Sulfur

	Pi-Sigma
	Alkyl
	Pi-Alkyl
	Pi-Pi T-shaped

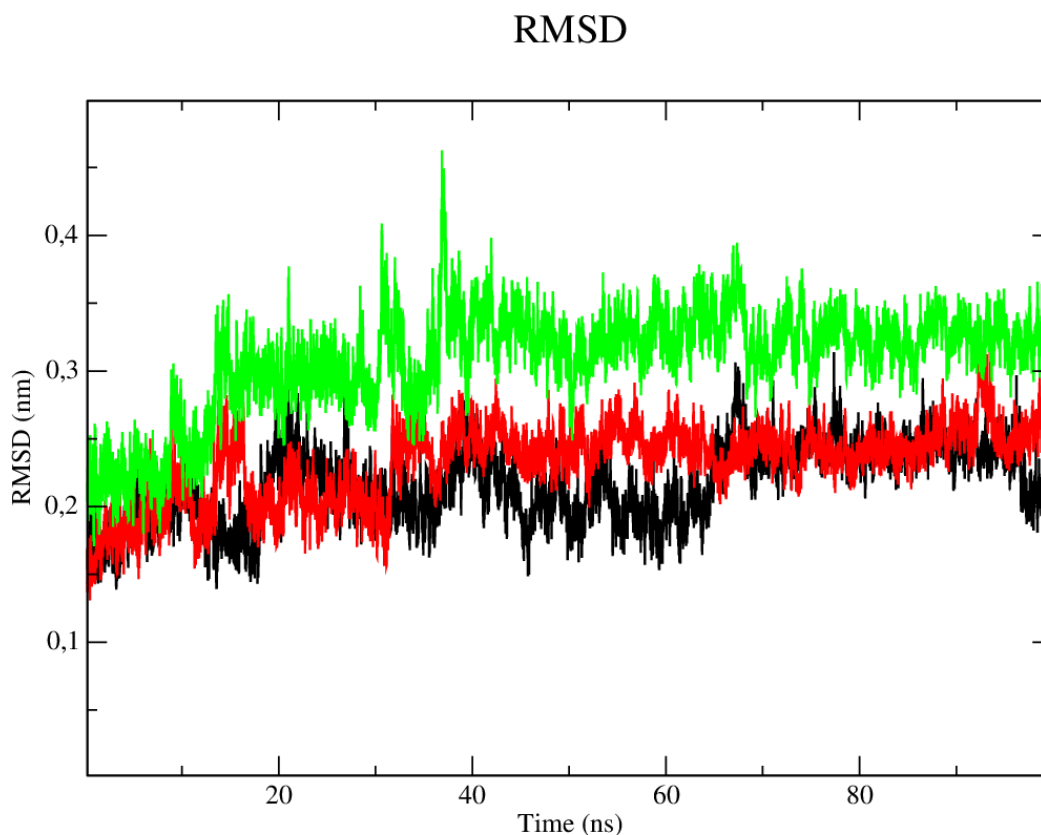
**Legenda:** A) Estrutura 3D do acoplamento molecular e Interações 2D da riparina I com o NF-kB B) Estrutura 3D do acoplamento molecular e Interações 2D do composto padrão – Emetina – com o NF-kB C) Estrutura 3D do acoplamento molecular e Interações 2D da riparina I com a subunidade p40 da NADPH oxidase D) Estrutura 3D do acoplamento molecular e Interações 2D do composto padrão – apocinina – com a subunidade p40 da NADPH oxidase E) Estrutura 3D do acoplamento molecular e Interações 2D da riparina I com a Sirtuin 5 F) Estrutura 3D do acoplamento molecular e Interações 2D do composto padrão – resveratrol – com a subunidade p40 da Sirtuin 5. Interações: hidrofóbicas estão destacadas em rosa, as interações de hidrogênio estão destacadas em verde. Resíduos: Gln (Glicina), Lys (Lisina), Arg (Arginina), His (Histidina), Ser (Serina) e Val (Valina), Cys (Cisteína), Glu (Glutamato), Leu (Leucina), Asn (Asparagina), Ile (Isoleucina).

### 5.2.5 Simulações de Dinâmica molecular

Após a análise do potencial de atividade do composto teste riparina I frente à importantes mecanismos de avaliação da atividade anti-senescente e antioxidante, foram realizadas simulações de dinâmica molecular com a presente molécula para avaliar a flexibilidade da enzima e a estabilidade das interações na presença de fatores como solvente, íons, pressão e temperatura. Esta informação é importante porque complementa os resultados de *docking* e permite avaliar se os compostos permanecem fortemente ligados às enzimas estudadas na presença de fatores que são encontrados no organismo hospedeiro. Para isso, foi escolhida para esta análise a enzima: Domínio SH3 de p40phox, componente da NADPH oxidase (PDB ID: 1W6X) (7) pois o composto teste riparina I apresentou uma maior afinidade para esta proteína. Em seguida, calculou-se a medida da distância média entre os átomos dos dois ligantes (RMSD) e as flutuações da raiz quadrada média (RMSF) para os átomos de C $\alpha$  da enzima complexada e as estruturas de cada ligante, separadamente.

Com relação a métrica RMSD da proteína (Figura 26) mostrou que a enzima NOX (PDB ID: 1W6X – linha preta) e o complexo formado pela riparina I (linha vermelha) foram os complexos mais estáveis, visto que apresentaram valores de RMSD mais baixos, como também foram observadas uma presença menor de flutuações ou contatos, principalmente após o período de 30 ns, pois o valor de RMSD permaneceu constante em 0.25 nm para o composto riparina I. Já o complexo formado pelo controle apocinina (linha verde) apresentou uma maior instabilidade visto que foram observadas várias flutuações após o período de 10 ns, em que foram visualizados valores de RMSD de até 0.45 nm. A estabilidade da proteína Domínio SH3 de p40phox, componente da NADPH oxidase (PDB ID: 1W6X) é essencial para manter os compostos ligados ao sítio ativo.

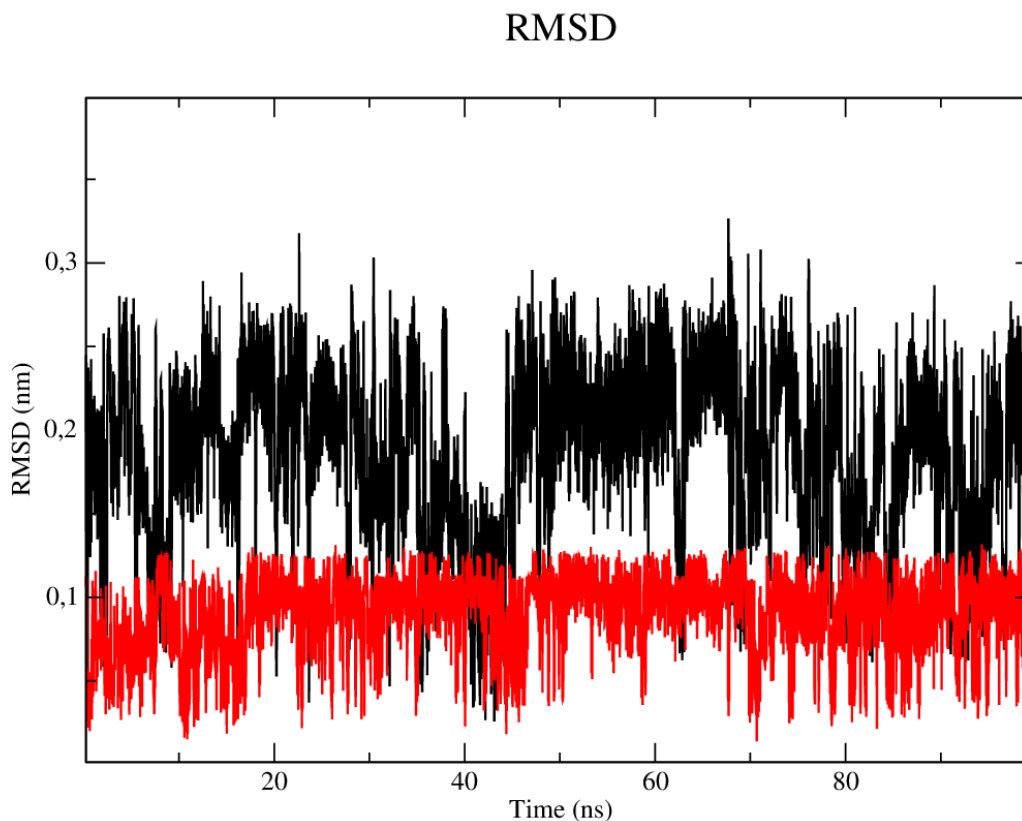
**Figura 26:** RMSD da proteína Domínio SH3 de p40phox, componente da NADPH oxidase e dos compostos.



**Legenda:** RMSD dos átomos de Ca. A) da enzima Domínio SH3 de p40phox, componente da NADPH oxidase (PDB ID: 1W6X) (linha preta) e complexados aos compostos riparina I (linha vermelha) e apocinina (linha verde). Abreviações: RMSD: Medida da distância média entre os átomos dos dois ligantes.

Ao analisar a estabilidade dos ligantes mediante a presença de solventes (Figura 27), foi verificado que o composto teste riparina I (linha preta) apresentou valores de RMSD mais altos que os resultados obtidos pelo controle apocinina (linha vermelha). Dessa forma, sugere-se que a apocinina apresenta uma maior probabilidade de permanecer no sítio ativo mesmo na presença de diferentes fatores como temperatura, pressão, solvente e íons. Este resultado pode ser justificado pelo fato do composto apocinina possuir uma estrutura mais rígida, que configura o composto como um sistema molecular com menor grau de liberdade, em termos de coordenadas atômicas cartesianas, o que dificulta a movimentação do complexo, como também reduz a sobreposição da estrutura.

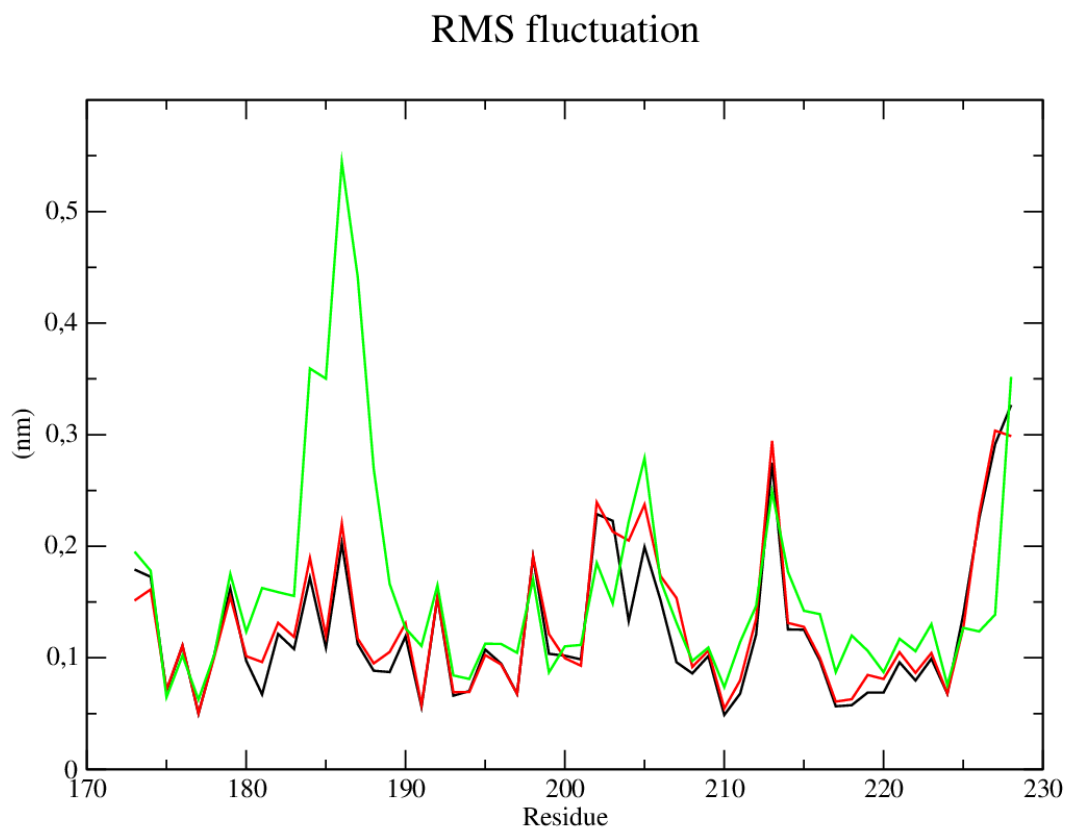
**Figura 27.** RMSD dos átomos de  $\text{Ca}$  dos compostos riparina I e Apocinina.



**Legenda:** RMSD dos átomos de  $\text{Ca}$  dos compostos. riparina I (linha preta) e apocinina (linha vermelha).  
Abreviações: Medida da distância média entre os átomos dos dois ligantes.

Para entender a flexibilidade dos resíduos e dos aminoácidos que contribuem para a mudança conformacional na enzima Domínio SH3 de p40phox, componente da NADPH oxidase (PDB ID: 1W6X), foram calculadas as RMSF de cada aminoácido na proteína. Resíduos com altos valores de RMSF sugerem mais flexibilidade e baixos valores de RMSF refletem menos flexibilidade. Considerando que aminoácidos com flutuações acima de 0,3nm contribuem para a flexibilidade da estrutura da macromolécula, foi verificado que dentre os aminoácidos presentes na proteína, os resíduos da posição 227 contribuem para a mudança conformacional da proteína complexada ao composto riparina I (Figura 28), apesar disso, o resíduo mencionado não é componente do sítio ativo da proteína em estudo, o que contribui para que o composto riparina I permaneça no sítio ativo.

**Figura 28.** RMS da proteína Domínio SH3 de p40phox, componente da NADPH oxidase e dos compostos.



**Legenda:** RMSF dos átomos. A) da enzima Domínio SH3 de p40phox, componente da NADPH oxidase (PDB ID: 1W6X) (linha preta) complexados aos compostos riparina I (linha vermelha) e apocinina (linha verde). Abreviações: flutuações da raiz quadrada média (RMSF).

*Discussão*

## 6 DISCUSSÃO

O nosso trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de um grupo de alcaloides (riparinas) extraído de uma planta nativa da região amazônica em modelo de senescência induzida por D-(+)-galactose (Dgal) em cultura primária de células endoteliais isoladas da artéria aorta de ratos (RAECs), usando abordagens *in vitro* e *in silico*. Os resultados obtidos demonstram a habilidade das moléculas-teste em reduzir o dano oxidativo gerado pelo indutor de senescência, além de diminuir a atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase, padrão ouro na caracterização desta condição, tais respostas foram acompanhadas da manutenção na viabilidade e ausência de efeito pró-oxidante no grupo controle para as moléculas mais promissoras. Ademais, após rastreamento *in silico*, foram verificadas possibilidades de interação com alvos proteicos importantes nas vias de senescência, com baixos valores de energia de acoplamento - em certas condições inferiores aos ligantes-padrão - sugerindo uma possível habilidade das N-benzoiltiraminas em modular tais proteínas o que pode explicar os efeitos encontrados *in vitro*.

O Envelhecimento é um processo natural de declínio das funções biológicas e perda da capacidade em manter a homeostase sistêmica, tornando o indivíduo susceptível ao desgaste metabólico, o que corrobora com o observável aumento na incidência de doenças com o avançar da idade (CAMPISI, 2020). Tais condições decorrem de um estado de inflamação crônica, acúmulo de erros no DNA, associado à disfunção nos mecanismos de reparo, perda de linhagens celulares regeneradoras, proteostase prejudicada, com acúmulo de proteínas oxidadas, mal dobradas, glicadas e ubiquitiniladas, formando agregados, além de declínio da autofagia, disbiose, disfunção mitocondrial e como principal marcador o acúmulo de células senescentes (LÓPEZ-OTÍN; BLASCO; PARTRIDGE; SERRANO *et al.*, 2023).

As células endoteliais estão localizadas na interface crítica entre o sangue circulante e os tecidos, desempenhando papéis essenciais na manutenção da função fisiológica sistêmica. O endotélio vascular é particularmente susceptível a estímulos patogênicos que ativam vias supressoras de tumor que levam à senescência celular, caracterizada pela hiper-reatividade, padrão secretório e pró-inflamatório com um fenótipo morfológico aberrante. Além disso, a senescência endotelial foi identificada como um importante contribuinte para várias doenças cardiovasculares e metabólicas, tendo em vista que esta prejudica a dilatação dependente do endotélio, a angiogênese e a função de barreira, além de aumentar a expressão de moléculas de adesão de membrana, inflamação, e pressão sanguínea, com consequente hipertrofia e falha

cardíaca. As células endoteliais - devido à sua localização anatômica e exposição a estímulos mecânicos e bioquímicos únicos - são uma das primeiras linhagens a se tornarem senescentes com o avançar da idade e portanto são um alvo central no combate às doenças cardiometabólicas (BLOOM; ISLAM; LESNIEWSKI; DONATO, 2023).

Uma ampla gama de modelos animais de doenças específicas pode ser afetada pela manipulação de um único mecanismo de envelhecimento em laboratório, tal qual, o combate da senescência é um ponto central na prevenção de morbidades relacionadas à idade. Nesse contexto, diversos produtos de origem natural são fontes proeminentes de fármacos geroprotetores (CHAIB; TCHKONIA; KIRKLAND, 2022). Como exemplos, pode-se citar os flavonoides fisetin que exerce suas ações direcionando a morte seletiva de células senescentes por modular vias importantes na manutenção dessa condição, incluindo BCL-2, PI3K/AKT, p53, NF- $\kappa$ B ou a curcumina que por sua vez regula negativamente o fator de transcrição NF- $\kappa$ B – importante na síntese de citocinas pró-inflamatórias, além de modular positivamente as Sirtuin 1 e 5 (proteínas *anti-aging*), ativar a AMPK e inibir o mTOR, estratégias que demonstram prolongar a vida útil e saúde de alguns organismos modelo (BIELAK-ZMIJEWSKA; GRABOWSKA; CIOLKO; BOJKO *et al.*, 2019; ZHU; DOORNEBAL; PIRTSKHALAVA; GIORGADZE *et al.*, 2017). Outro importante metabólito secundário – piperlongumina – alcaloide encontrado no fruto da pimenta longa induz seletivamente a morte de SnCs, ligando-se diretamente à proteína de resistência à oxidação 1 (OXR1), levando à sua degradação proteossomal e subsequente aumento da produção de EROs (LAGOUMTZI; CHONDROGIANNI, 2021).

O Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, e esse imenso patrimônio, já escasso nos países desenvolvidos, tem valor econômico-estratégico inestimável em várias atividades, mas é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos no qual reside sua maior potencialidade (CALIXTO, 2003). Isso instiga o interesse em estudar diferentes produtos do bioma brasileiro para o desenvolvimento de novos fármacos. O metabolismo de plantas, portanto, é capaz de gerar moléculas com efeitos benéfico sobre as mais diversas condições patológicas, bem como de alto valor preventivo, reduzindo o dano associado ao envelhecimento e contribuindo para a prevenção de doenças relacionadas a idade.

Espécies do gênero *Aniba* pertencente à grande família *Lauraceae* tem sua distribuição limitada a América do Sul, com ocorrência principalmente na Amazônia central nos países Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana, Venezuela e Suriname. De modo que apesar de ser uma planta rudimentar, considerada uma das mais primitivas famílias, poucos foram os estudos já realizados para elucidar as possíveis atividades biológicas dos seus metabólitos

secundários, com trabalhos mais voltados à atividade antimicrobiana contra bactérias, fungos e protozoários e atividade sob o sistema nervoso central em modelos de ansiedade e depressão (CHAVES; MALLMANN; DE OLIVEIRA; CAPIBARIBE *et al.*, 2020; MALLMANN; CHAVES; DE OLIVEIRA; OLIVEIRA *et al.*, 2021; NASCIMENTO; ESPÍRITO-SANTO; OPRETZKA; BARBOSA-FILHO *et al.*, 2016; OLIVEIRA-JÚNIOR; DA SILVA; VERAS; RIBEIRO *et al.*, 2020). As alcaloides oriundas da *Aniba riparia*, são um grupo especial de alcaloides, isolados do fruto verde da planta e que podem ser obtidos por diferentes rotas sintéticas, entre elas a condensação de ácidos benzoicos com O-metiltiraminas, métodos simples que facilitam a exploração de tais moléculas em ensaios biológicos.

No contexto do envelhecimento, a busca por fármacos capazes de reduzir o acúmulo de células senescentes tem demonstrado resultados promissores. Corroborando essa prerrogativa, um trabalho publicado na revista *Nature* por Baker e colaboradores demonstrou que a estimulação da apoptose de células senescentes retardou a degradação física de ratos a medida que envelheciam, além de aumentar a expectativa média de vida em mais de 20% e reduzir a proliferação de tumores (BAKER; WIJSHAKE; TCHKONIA; LEBRASSEUR *et al.*, 2011). A concentração de células em estado de quiescência é progressiva com o avançar da idade e está diretamente relacionada com processos deteriorantes como inflamação crônica, vigilância imunológica e envelhecimento do organismo, tal qual demonstrado por Jeon e colaboradores em que a troca sanguínea heterocrônica de células senescentes em camundongos jovens saudáveis causa indução sistêmica da senescência e do envelhecimento, o que pode ser anulado se animais velhos forem tratados com drogas senolíticas antes da troca sanguínea (JEON; MEHDIPOUR; GIL; KANG *et al.*, 2022).

O presente trabalho buscou avaliar a capacidade das N-benzoiltiraminas em reduzir o número de células positivas para o marcador de senescência  $\beta$ -galactosidase, em condições de indução da senescência com D-galactose, juntamente com as riparinas I, II, III e IV em diferentes concentrações, bem como na condição basal que envolve apenas as moléculas-teste.

Os resultados demonstraram a habilidade da Dgal em conduzir as células a um estado de senescência com observável aumento na produção das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), corroborando com os achados de Chen e colaboradores, além disso o modelo demonstrou ser capaz de reduzir a viabilidade celular, tal qual os achados de LEE e colaboradores (LEE; HOANG; JUNG; JUNG *et al.*, 2020; WANG; ZHANG; KE; WEN *et al.*, 2022).

Em nossos resultados, observou-se que as riparinas I e IV preservaram a viabilidade celular na condição basal em todas as concentrações estudadas e, portanto, não são citotóxicas

nessas concentrações, de modo que no grupo incubado com a Dgal houve redução na viabilidade o que não foi reparado por tais moléculas. A riparina III por sua vez, manteve a viabilidade na condição basal, tendo ainda um efeito proliferativo na concentração de 3,125  $\mu\text{M}$  e nas células desafiadas com a Dgal recuperou a viabilidade em todas as concentrações testadas, com valores de densidade óptica semelhantes ao controle saudável. Já a riparina II causou uma diminuição na viabilidade na condição basal nas concentrações de 12,5 e 25  $\mu\text{M}$  em relação ao controle, mantendo o padrão de redução no número de células pós estimulação com Dgal.

A partir da observação dos ensaios de viabilidade celular, analisou-se a habilidade das riparinas em reduzir a atividade lisossomal da enzima da  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal), marcador padrão que prediz o estado de senescência celular, sendo usado para quantificar o aparecimento de células senescentes após diferentes tipos de estresse e para identificar os potenciais efeitos protetores anti-senescente dos compostos.

Na condição basal, observa-se a presença de cerca de 10% das células positivas para a SA- $\beta$ -gal, o que é esperado para células endoteliais de acordo com a literatura (BERNDT; CARPENTIER; TURZI; BORLAT *et al.*, 2021), sendo as riparinas I, III e IV incapazes de causar alterações nesse parâmetro em condições saudáveis, contrapondo os efeitos pró senescentes da riparina II que elevou a atividade da  $\beta$ -galactosidase na condição basal a partir de 6,25  $\mu\text{M}$ . Como esperado, a incubação das RAECs com a Dgal promoveu um aumento na atividade da SA- $\beta$ -gal para em média 30%, corroborando com os achados de Ye e colaboradores (YE; FENG; ZHANG; LI *et al.*, 2023). Tal indicador, foi atenuado pelas riparinas I, e IV a partir das concentrações de 6,25  $\mu\text{M}$  e na concentração de 12,5  $\mu\text{M}$  para a Riparina III, demonstrando um previsível efeito anti-senescente destas. A riparina II por sua vez, foi incapaz de restaurar significativamente o padrão de senescência nas concentrações testadas.

Seguindo este método indutivo, tendo em vista a capacidade da Dgal em causar desbalanço redox com exacerbação na produção das espécies reativas de oxigênio (LEE; HOANG; JUNG; JUNG *et al.*, 2020) e sabendo que as riparinas são capazes de reduzir a senescência celular na presença de Dgal, analisamos a habilidade destas em modular o estresse oxidativo. Frente a este ensaio, foi observado que a riparina I promoveu redução na produção de ânions superóxido nas concentrações de 3,125  $\mu\text{M}$  e a RIP III teve igual efeito concentrações de 3,125 e 6,25  $\mu\text{M}$  na condição basal, enquanto as demais moléculas não produziram alterações significativas. Na presença de Dgal, no entanto, observou-se aumento na produção de ânions superóxido, o qual foi atenuado pelas riparinas. Para as riparinas I, II e III observa-se resultados significativos a partir 3,125  $\mu\text{M}$ , enquanto para a riparina IV a redução na concentração de EROs deu-se a partir de 6,25  $\mu\text{M}$ .

O referido *screening* evidenciou que a riparina I teve efeitos positivos, revertendo o padrão de senescência e estresse oxidativo nas mesmas concentrações, além disso, não provocou efeitos citotóxicos ou pró-oxidantes na condição basal, o que demonstra um perfil de segurança frente a tais parâmetros nas concentrações avaliadas. Apesar de dados escassos na literatura sobre o papel da riparina I nas vias moleculares da senescência e estresse oxidativo, essa molécula já mostrou-se capaz de reduzir os níveis de nitrito e do marcador de dano oxidativo – Malonaldeído (MDA) - no córtex pré-frontal e estriado induzido por corticosterona em modelo de depressão (OLIVEIRA; MALLMANN; RODRIGUES; VIDAL *et al.*, 2021).

A riparina II, por sua vez, produziu redução na viabilidade na condição basal além de não recuperar esse parâmetro no modelo. Somado a isso, RIP II exacerbou a senescência na condição basal, mantendo os níveis aumentados da atividade da SA- $\beta$ -gal após indução com Dgal, indicando uma possível habilidade dessa molécula em gerar dano que tem como provável consequência o escape a um estado de quiescência, constatado pelo aumento na atividade lisossomal da enzima  $\beta$ -galactosidase. De acordo com os ensaios de Qiong Wang e colaboradores, a riparina II é capaz de atenuar os níveis alterados de MDA e EROs, bem como, a atividade modificada da SOD, no tecido pulmonar homogeneizados de ratos asmáticos, demonstrando seu poder antioxidante em condições patológicas (WANG; CUI; WU; WANG, 2021). Tais achados, demonstram que apesar dos efeitos positivos encontrados sob a redução na produção de ânions superóxido, já descritos em outros modelos de estresse oxidativo, a molécula pode apresentar algum grau de citotoxicidade em células saudáveis.

A riparina III, apesar dos efeitos positivos sob a viabilidade celular e estresse oxidativo, demonstrou atividade anti-senescente apenas na concentração mais alta testada, o que pode indicar que tal molécula apresenta efeitos benéficos frente os parâmetros avaliados, mas menor potência quando comparada com as riparinas I e IV tendo em vista a tendência observada à redução da senescência com o aumento progressivo da concentração-teste. De fato, a riparina III já demonstrou efeitos antioxidantes ao aumentar a expressão da glutatona redutase (GSH), e reduzir os níveis do marcador de dano oxidativo Malonaldeído *in vivo* em modelo de depressão induzido pela corticosterona (MALLMANN; CHAVES; DE OLIVEIRA; OLIVEIRA *et al.*, 2021).

Por fim, o *screening* revelou que a riparina IV tal qual a riparina I, foi capaz de atenuar o padrão de senescência e estresse oxidativo nas células incubadas com a Dgal nas mesmas concentrações, mantendo a viabilidade e balanço redox no grupo basal, no entanto a atividade antioxidante para RIP IV deu-se a partir da concentração de 6,25  $\mu$ M, evidenciando uma menor potência desta em relação à riparina I.

Na busca pela molécula com habilidade de diminuir o padrão de senescência e estresse oxidativo, mantendo a viabilidade na condição basal em baixas concentrações, o estudo *in vitro* evidenciou uma vantagem da riparina I em detrimento dos outros compostos, frente ao seu potencial em modular negativamente a senescência endotelial, com redução na produção de ânions superóxido na condição basal e mediante a estimulação com a D-galactose, a partir da concentração mais baixa testada (3,125  $\mu\text{M}$ ), além da ausência de citotoxicidade no grupo saudável.

Somado a tais achados os resultados de triagem farmacocinética a partir do delineamento do perfil ADME *in silico*, demonstram vantagem no uso das N-benzoiltiraminas para exploração farmacológica, tendo em vista o grau de similaridade química com outras moléculas já presentes no mercado refletido pelos elevados valores de *Drug-likeness* e *Drug score* encontrados. O *Drug-likeness* é um algoritmo utilizado para comparar compostos em investigação com os fragmentos e propriedades físicas de fármacos já comerciais, nos quais valores positivos representam a semelhança de candidatos a fármacos aos *Building blocks* existentes, ao passo que os negativos demonstram pouca semelhança (BELAL, 2018). O *Drug score* por sua vez avalia a potencialidade de um composto como candidato a novo fármaco através da combinação entre concordância com as regras de Lipinski, *Drug-likeness* e toxicidade, variando entre 1 e 100% (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017). Os achados incluem resultados positivos em relação aos dois parâmetros com valores de *Drug-likeness* positivos e *Drug score* acima de 80% para todas as moléculas investigadas.

A riparina IV já demonstrou a capacidade de reduzir a neuroinflamação em modelo de depressão crônica induzida por corticosterona em ratos, atenuando os níveis de marcadores de peroxidação lipídica por quantificação de MDA, e de nitrito/nitrato, além de aumentar as concentrações de glutatona reduzida e dos sistemas antioxidantes SOD e CAT, outro efeito reportado foi a habilidade desta em modular negativamente as citocinas TNF- $\alpha$ ; IL-2 e IL-4 (CHAVES; MALLMANN; DE OLIVEIRA; CAPIBARIBE *et al.*, 2020). Já em ensaios de dor e inflamação da pata de camundongos induzido pelo adjuvante completo de Freund (CFA), a RIP IV promoveu redução nos níveis de TNF- $\alpha$  e PGE<sub>2</sub> (NASCIMENTO; ESPÍRITO-SANTO; OPRETZKA; BARBOSA-FILHO *et al.*, 2016).

Tendo em vista que um mecanismo importante dos fármacos senomórficos é modificar o fenótipo das células senescentes, intervindo nas vias de sinalização associadas à senescência e SASP sem causar apoptose (GASEK; KUCHEL; KIRKLAND; XU, 2021; LAGOUMTZI; CHONDROGIANNI, 2021), alguns compostos, como os flavonoides resveratrol, apigenina e kaempferol atuam por inibir o fator de transcrição NF- $\kappa\text{B}$  com observável menor produção de

citocinas pró-inflamatórias, além disso, a neutralização direta de citocinas por meio de anticorpos monoclonais produz efeito semelhante na redução do status pró-inflamatório e pró oxidante, observados nas doenças crônicas relacionadas ao envelhecimento, como nas cardiovasculopatias, com diminuição na síntese e atividade da IL-6, IL-8, IL-1 $\alpha$ , TNF-  $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (CHOY; MURUGAN; LEONG; ABAS *et al.*, 2019).

Outro mecanismo interessante de redução do SASP advém dos efeitos antioxidantes dos senomórficos, a curcumina por exemplo, e seu metabólito, tetra-hidrocurcumina (THC), podem aumentar a expectativa de vida média de pelo menos três organismos modelo, como a mosca da fruta *Drosophila*, o camundongo e a lombriga nematoide, mediante diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio pelos genes (*skn-1*, *sek-1*, *osr-1*, *mek-1*, *sir-2.1*, *unc-43* e *idade-1*) e aumento da atividade da superóxido dismutase (SOD) (SHEN; PARNELL; ORDOVAS; LAI, 2013).

A modulação de proteínas-chave das vias de senescência também tem demonstrado resultados promissores, tal qual a rapamicina, macrolídeo natural isolado de cepas de *Streptomyces* que atua como um inibidor específico da mTOR quinase. Arriola e colaboradores demonstraram que a rapamicina foi capaz de produzir redução da atividade SA- $\beta$ -gal e, reprimir a capacidade das SnCs de induzir tumorigênese *in vivo*, elevando a expectativa de vida de camundongos de meia idade, além de melhorar a função muscular e coordenação motora (ARRIOLA APELO; LAMMING, 2016).

Tendo em vista os efeitos antioxidantes e anti-senescentes encontrados para a riparina I, bem como, a partir de dados encontrados na literatura sobre a capacidade de outros análogos estruturais da mesma classe em suprimir a produção de mediadores pró-inflamatório, pró-oxidantes e induzir sistemas antioxidantes, decidiu-se realizar estudos *in silico* (ensaios de *docking* e dinâmica molecular) para avaliar a capacidade da riparina I em interagir com alvos envolvidos nas vias de senescência, estresse oxidativo e inflamação.

O *docking* molecular é uma ferramenta de predição da orientação preferencial das moléculas candidatas à fármacos em um sítio ativo de determinada proteína para a formação de um complexo estável. Essa análise revela os vizinhos mais próximos da molécula ligante, ligações intermoleculares, energia de ligação e afinidade da interação (ŚLEDŹ; CAFLISCH, 2018).

A previsão de acoplamento molecular para analisar a estabilidade do sistema através das interações identificadas entre a riparina I com os alvos proteicos, demonstrou diferentes valores de energia nos algoritmos Moldock Score e Rerank Score. A função Rerank, faz referência a um reordenamento das energias obtidas com a função Moldock, porém com diferentes pesos

para cada contribuição energética. Deste modo, foram utilizados ambos os resultados (função Moldock e com a função Rerank) para prever a afinidade da interação riparina-ligante.

A riparina I apresentou maior estabilidade nas interações tomando como base o Moldock score para o NF- $\kappa$ B, Sirtuin 5 e a subunidade p40 da NADPH oxidase. Além disso, nesses dois últimos e no acoplamento com o mTOR, foram observados menores valores de energia em relação aos ligantes-padrão com base no algoritmo Rerank score.

Algumas funções de pontuação exibem viés na priorização de moléculas mais complexas decorrentes de componentes aditivos dentro da função. No cálculo do score de afinidade, o Moldock utiliza como um dos parâmetros de cálculo a massa molecular do composto em análise, dessa forma, moléculas de massa molecular mais baixa podem apresentar uma menor afinidade de ligação, o que pode explicar as diferenças encontradas na tendência de interação entre as duas funções de pontuação (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

Tendo em vista os baixos valores de energia de interação entre a molécula-teste e o NF- $\kappa$ B, Sirtuin 5 a subunidade p40 da NADPH oxidase, foram avaliadas as interações intermoleculares envolvidas na estabilização dos complexos.

A riparina I se acoplou com a subunidade p40 da NOX a partir de interações estéricas com os resíduos Ile226, Met173, Arg202, Leu208, Leu199, as quais também são observadas no complexo com o ligante padrão apocinina, no entanto observa-se entre RIP I e NOX ainda a formação de ligações de hidrogênio que tornam o acoplamento ainda mais estável.

No acoplamento riparina I –NF- $\kappa$ B a estabilização deu-se por meio de interações de hidrogênio, interações do tipo Pi-cátion, interações carbono-hidrogênio além das interações hidrofóbicas, semelhante ao encontrado em relação a complexação com o padrão emetine, observou-se ainda a presença de interações hidrofóbicas do tipo alquil e Pi-Ânion.

Enquanto com a Sirtuin 5, a estabilização do complexo ocorreu envolvendo o mesmo tipo de interação hidrofóbica para a riparina I e o padrão resveratrol - Pi-alquil no resíduo Arg71 - indicando que as moléculas podem promover mecanismos semelhantes de ativação dessa proteína.

As Sirtuins são proteínas desacetilases que regulam o metabolismo, respostas ao estresse e envelhecimento, e foram sugeridas por mediar a longevidade, mimetizando uma condição de restrição calórica. Achados de Sadhukhan e colaboradores demonstram que camundongos deficientes em Sirt5 desenvolvem cardiomiopatia hipertrófica e apresentam função cardíaca reduzida durante o envelhecimento (SADHUKHAN; LIU; RYU; NELSON *et al.*, 2016). Por outro lado, a estimulação da Sirt5, mediada pelo resveratrol, leva a benefícios mediante indução na expressão de sistemas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e glutatona, além de afetar

múltiplos fatores de transcrição envolvidos na função mitocondrial, autofagia, metabolismo e senescência (AMORIM; COPPOTELLI; ROLO; PALMEIRA *et al.*, 2022). De fato, a administração oral de resveratrol melhora a fisiologia endotelial em diferentes modelos animais de doenças cardiometabólicas, como hipertensão sistêmica (DUNTAS, 2011). Recentemente, pequenas moléculas não flavonoides, capazes de ativar a Sirt, foram identificadas e propostas como capazes de melhorar a biogênese mitocondrial, promovendo a expressão de antioxidantes e atenuando a inflamação através da regulação do NF- $\kappa$ B (MINISTRINI; PUSPITASARI; BEER; LIBERALE *et al.*, 2021). Scisciola e colaboradores identificaram dois novos inibidores potentes de SIRT1, SCIC2 e seu derivado SCIC2.1, que demonstraram reduzir a progressão da senescência celular *in vitro*, reforçando a importância desse grupo de macromoléculas no contexto do envelhecimento cardiovascular (SCISCIOLA; SARNO; CARAFA; COSCONATI *et al.*, 2020).

Outro método *in silico* de alto valor para a avaliação detalhada do panorama conformacional de complexos proteína-ligante que é substancialmente semelhante às circunstâncias fisiológicas reais é fornecido pela simulação de dinâmica molecular (RAJIV GANDHI; SHARANYA; JAYANANDAN; HARIDAS *et al.*, 2023). Esse método captura o comportamento de proteínas e outras biomoléculas com detalhes atômicos completos e com resolução temporal muito fina (HOLLINGSWORTH; DROR, 2018).

Os resultados da Dinâmica molecular frente ao RMSD da subunidade p40 da NADPH oxidase demonstram que a riparina I apresentou uma maior estabilidade de interação com a NOX e menores flutuações, evidenciando uma vantagem desta em relação a essa métrica, quando comparado ao ligante padrão apocinina. Ao levar em conta alguns interferentes como a temperatura, pressão, solventes e íons, a apocinina promoveu uma maior estabilidade na interação. Este resultado pode ser justificado pelo fato de a apocinina possuir uma estrutura mais rígida, que configura o composto como um sistema molecular com menor grau de liberdade, aumentando sua probabilidade de permanência no sítio ativo da enzima.

Tais achados, combinados com a ação anti-senescente e antioxidante encontrados *in vitro*, sugerem que o efeito positivo da riparina I, pode estar relacionado, pelo menos em parte, com a estimulação das Sirtuin 5, com melhora das condições de senescência e estresse oxidativo, e redução do SASP por modulação de sistemas pró inflamatórias como o NF- $\kappa$ B, que também pode ser inibido diretamente pela riparina I, tendo em vista a baixa energia de ligação observada *in silico* na formação do complexo RIP 1-NF- $\kappa$ B. Além disso, a formação estável do complexo com a subunidade p40 da NADPH oxidase, com valores de energia nas funções Moldock e Rerank score inferiores ao ligante padrão (apocinina) demonstram ainda um possível

mecanismo antioxidante capaz de explicar os efeitos encontrados nos ensaios *in vitro* em modelo de senescência endotelial induzido pela D-(+)-galactose.

Portanto, a elevada permeabilidade gastrointestinal, associada a habilidade de ação central, bem como, efeitos positivos sobre a senescência, estresse oxidativo e capacidade de interação com alvos proteicos das vias anti-*aging* instigam a exploração das N-benzoiltiraminas de *Aniba riparia* como possíveis senoterapêuticos.

*Conclusões*

## 7 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo demonstram as seguintes ações das N-benzoiltiraminas *de Aniba Riparia* em modelo de senescência endotelial induzida por D-(+)-galactose:

- ✓ Baixa toxicidade das moléculas-teste na condição basal, exceto a riparina II que mostrou-se capaz de reduzir a viabilidade das RAECs;
- ✓ A riparina III tem a capacidade de aumentar a viabilidade celular no grupo de células desafiadas com a Dgal, indicando uma possível atividade proliferativa ou a habilidade desta em melhorar o metabolismo celular;
- ✓ As riparinas I, III e IV mantêm o percentual de células senescentes na condição basal, enquanto a riparina II tem efeito pró-senescente
- ✓ As riparinas I, III e IV diminuem o percentual de células senescentes na condição de estimulação com o monossacarídeo Dgal, enquanto a riparina II manteve o padrão de senescência nas concentrações testadas;
- ✓ As riparinas I, II, III e IV reduzem o estresse oxidativo ocasionado pós indução da senescência com a Dgal

O *screening* revelou resultados promissores para as N-benzoiltiraminas em modelo de senescência endotelial, com habilidade de redução da atividade do marcador de senescência S- $\beta$ -gal e da produção de espécies reativas de oxigênio para a maior parte das moléculas testadas (riparinas I, III e IV), com observável vantagem da riparina I tendo em vista seus efeitos antioxidantes e anti-senescentes em baixas concentrações, além da ausência de efeito citotóxico na condição basal.

Seguindo os ensaios *in silico* do perfil ADME, as moléculas apresentam parâmetros farmacocinéticos adequados para a administração oral, com ainda alta probabilidade de atravessar a barreira hematoencefálica para as riparinas I, II e IV. Além disso, não são substrato para a proteína de resistência a múltiplos fármacos P-gp, corroborando a previsível biodisponibilidade elevada após absorção gastrointestinal.

Os resultados de *Docking* molecular por sua vez, revelam a possibilidade de interação com alvos importantes para os efeitos observados *in vitro*, entre eles a subunidade p40 da NADH oxidase, responsável pela produção de espécies reativas de oxigênio, o fator de transcrição de moléculas pró inflamatória Nf- $\kappa$ B com valores de energia menores do que os inibidores padrão usando como base o algoritmo Rerank score, além da habilidade de interação

com o mesmo resíduo de aminoácido modulado pelo ligante padrão resveratrol, ativador de Sirtuin 5.

Já a simulação de dinâmica molecular revelou uma elevada estabilidade com baixas flutuações do complexo riparina I com a subunidade p40 da NADPH oxidase frente ao RMSD.

Logo, os resultados obtidos demonstram efeitos promissores para as riparinas em modelo de senescência endotelial, com previsível capacidade na modulação em alvos proteicos envolvidos com as vias de senescência além de apresentarem um adequado perfil farmacocinético e similaridade química com outras drogas presentes no mercado, revelando uma potencialidade dessa classe de moléculas para o desenvolvimento de senoterapêuticos.

*Referências*

## 8. REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, M. J.; MURTOLA, T.; SCHULZ, R.; PÁLL, S. *et al.* GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, 1-2, p. 19-25, 2015/09/01/ 2015.
- AGU, P. C.; AFIUKWA, C. A.; ORJI, O. U.; EZEH, E. M. *et al.* Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in diseases management. **Scientific Reports**, 13, n. 1, p. 13398, 2023/08/17 2023.
- AL-NAGGAR, I. M. A.; KUCHEL, G. A.; XU, M. Senolytics: targeting senescent cells for age-associated diseases. **Curr Mol Biol Rep**, 6, n. 4, p. 161-172, Dec 2020.
- AL-RASHOOD, S. T.; HAMED, A. R.; HASSAN, G. S.; ALKAHTANI, H. M. *et al.* Antitumor properties of certain spirooxindoles towards hepatocellular carcinoma endowed with antioxidant activity. **J Enzyme Inhib Med Chem**, 35, n. 1, p. 831-839, Dec 2020.
- ALMEIDA, A. J. P. O.; RIBEIRO, T. P.; MEDEIROS, I. A. Aging: Molecular Pathways and Implications on the Cardiovascular System. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2017, p. 19, 2017.
- AMORIM, J. A.; COPPOTELLI, G.; ROLO, A. P.; PALMEIRA, C. M. *et al.* Mitochondrial and metabolic dysfunction in ageing and age-related diseases. **Nature Reviews Endocrinology**, 18, n. 4, p. 243-258, 2022/04/01 2022.
- ANGELIKI, V.; JUNCO, S. W.; KONSTANTINOS, D. Cardiovascular aging: from cellular and molecular changes to therapeutic interventions. **The Journal of Cardiovascular Aging**, 3, n. 3, p. 23, 2023.
- ARRIOLA APELO, S. I.; LAMMING, D. W. Rapamycin: An InhibiTOR of Aging Emerges From the Soil of Easter Island. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, 71, n. 7, p. 841-849, Jul 2016.
- AZMAN, K. F.; SAFDAR, A.; ZAKARIA, R. D-galactose-induced liver aging model: Its underlying mechanisms and potential therapeutic interventions. **Experimental Gerontology**, 150, p. 111372, 2021/07/15/ 2021.
- AZMAN, K. F.; ZAKARIA, R. D-Galactose-induced accelerated aging model: an overview. **Biogerontology**, 20, n. 6, p. 763-782, Dec 2019.
- BAKER, D. J.; WIJSHAKE, T.; TCHKONIA, T.; LEBRASSEUR, N. K. *et al.* Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. **Nature**, 479, n. 7372, p. 232-236, 2011.
- BARBOSA FILHO, J. M.; SILVA, E. C.; BHATTACHARYYA, J. Synthesis of Several New Phenylethylamides of Substituted Benzoic Acids. **Química Nova**, 13, p. 332-334, 1990.
- BARNES, R. P.; DE ROSA, M.; THOSAR, S. A.; DETWILER, A. C. *et al.* Telomeric 8-oxo-guanine drives rapid premature senescence in the absence of telomere shortening. **Nature Structural & Molecular Biology**, 29, n. 7, p. 639-652, 2022/07/01 2022.
- BARNES, R. P.; FOUQUEREL, E.; OPRESKO, P. L. The impact of oxidative DNA damage and stress on telomere homeostasis. **Mechanisms of ageing and development**, 177, p. 37-45, 2019.
- BELAL, A. Drug likeness, targets, molecular docking and ADMET studies for some indolizine derivatives. **Pharmazie**, 73, n. 11, p. 635-642, Nov 1 2018.

- BERENDSEN, H. J. C.; VAN DER SPOEL, D.; VAN DRUNEN, R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. **Computer Physics Communications**, 91, n. 1, p. 43-56, 1995/09/02/ 1995.
- BERNDT, S.; CARPENTIER, G.; TURZI, A.; BORLAT, F. *et al.* Angiogenesis Is Differentially Modulated by Platelet-Derived Products. **Biomedicines**, 9, n. 3, Mar 4 2021.
- BIELAK-ZMIJEWSKA, A.; GRABOWSKA, W.; CIOLKO, A.; BOJKO, A. *et al.* The Role of Curcumin in the Modulation of Ageing. **Int J Mol Sci**, 20, n. 5, Mar 12 2019.
- BLAGOSKLONNY, M. V. Anti-aging: senolytics or gerostatics (unconventional view). **Oncotarget**, 12, n. 18, p. 1821-1835, Aug 31 2021.
- BLOOM, S. I.; ISLAM, M. T.; LESNIEWSKI, L. A.; DONATO, A. J. Mechanisms and consequences of endothelial cell senescence. **Nature Reviews Cardiology**, 20, n. 1, p. 38-51, 2023/01/01 2023.
- BLOOM, S. I.; LIU, Y.; TUCKER, J. R.; ISLAM, M. T. *et al.* Endothelial cell telomere dysfunction induces senescence and results in vascular and metabolic impairments. 22, n. 8, p. e13875, 2023.
- BONDI, A. van der Waals Volumes and Radii. **The Journal of Physical Chemistry**, 68, n. 3, p. 441-451, 1964/03/01 1964.
- BRUNTON, L. L. **As Bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 2019. 2112 p. 978-8580551167.
- BURTON, D. G.; KRIZHANOVSKY, V. Physiological and pathological consequences of cellular senescence. **Cell Mol Life Sci**, 71, n. 22, p. 4373-4386, Nov 2014.
- CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos %J Ciência e Cultura. 55, p. 37-39, 2003.
- CAMPISI, J. Cellular Senescence and Mammalian Healthspan. **Innovation in Aging**, 4, n. Suppl 1, p. 742-742, 2020.
- CAMPISI, J.; D'ADDA DI FAGAGNA, F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 8, n. 9, p. 729-740, Sep 2007.
- CANUGOVI, C.; STEVENSON, M. D.; VENDROV, A. E.; HAYAMI, T. *et al.* Increased mitochondrial NADPH oxidase 4 (NOX4) expression in aging is a causative factor in aortic stiffening. **Redox Biology**, 26, p. 101288, 2019/09/01/ 2019.
- CASTELO BRANCO, U. V.; CASTELO BRANCO, U. J. V.; THOMAS, G.; ARAUJO, C. C. *et al.* Preliminary pharmacological studies on three benzoyl amides, constituents of aniba riparia (ness) mez (lauraceae). **Acta Farm. Bonaerense**, 19, n. 3, p. 197-202, 2000.
- CHAIB, S.; TCHKONIA, T.; KIRKLAND, J. L. Cellular senescence and senolytics: the path to the clinic. **Nature Medicine**, 28, n. 8, p. 1556-1568, 2022/08/01 2022.
- CHAVES, R. d. C.; MALLMANN, A. S. V.; DE OLIVEIRA, N. F.; CAPIBARIBE, V. C. C. *et al.* The neuroprotective effect of Riparin IV on oxidative stress and neuroinflammation related to chronic stress-induced cognitive impairment. **Hormones and Behavior**, 122, p. 104758, 2020/06/01/ 2020.

CHAVES, R. d. C.; MALLMANN, A. S. V.; OLIVEIRA, N. F.; OLIVEIRA, I. C. M. *et al.* Reversal effect of Riparin IV in depression and anxiety caused by corticosterone chronic administration in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 180, p. 44-51, 2019/05/01/ 2019.

CHEN, K.; SHEN, W.; ZHANG, Z.; XIONG, F. *et al.* Age-dependent decline in stress response capacity revealed by proteins dynamics analysis. **Scientific Reports**, 10, n. 1, p. 15211, 2020/09/16 2020.

CHENG, M.; YANG, Z.; QIAO, L.; YANG, Y. *et al.* AGEs induce endothelial cells senescence and endothelial barrier dysfunction via miR-1-3p/MLCK signaling pathways. **Gene**, 851, p. 147030, 2023/01/30/ 2023.

CHOY, K. W.; MURUGAN, D.; LEONG, X. F.; ABAS, R. *et al.* Flavonoids as Natural Anti-Inflammatory Agents Targeting Nuclear Factor-Kappa B (NFκB) Signaling in Cardiovascular Diseases: A Mini Review. **Front Pharmacol**, 10, p. 1295, 2019.

COPPÉ, J. P.; DESPREZ, P. Y.; KRTOLICA, A.; CAMPISI, J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. **Annu Rev Pathol**, 5, p. 99-118, 2010.

DAINA, A.; MICHELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, 7, n. 1, p. 42717, 2017/03/03 2017.

DE ALMEIDA, A. J. P. O.; DE OLIVEIRA, J. C. P. L.; PONTES, L. V. d. S.; JÚNIOR, J. F. d. S. *et al.* ROS: Basic Concepts, Sources, Cellular Signaling, and its Implications in Aging Pathways. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2022, p. 1225578, 2022/10/19 2022.

DE ALMEIDA, A. J. P. O.; REZENDE, M. S. d. A.; DANTAS, S. H.; SILVA, S. d. L. *et al.* Unveiling the Role of Inflammation and Oxidative Stress on Age-Related Cardiovascular Diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2020, p. 1954398, 2020/05/09 2020.

DE CARVALHO, A. M. R.; ROCHA, N. F. M.; VASCONCELOS, L. F.; RIOS, E. R. V. *et al.* Evaluation of the anti-inflammatory activity of riparin II (O-methyl-N-2-hidroxi-benzoyl tyramine) in animal models. **Chemico-Biological Interactions**, 205, n. 3, p. 165-172, 2013/10/05/ 2013.

DE MAGALHÃES, J. P.; PASSOS, J. F. Stress, cell senescence and organismal ageing. **Mechanisms of Ageing and Development**, 170, p. 2-9, 2018/03/01/ 2018.

DE SOUSA, D. P.; DAMASCENO, R. O. S.; AMORATI, R.; ELSHABRAWY, H. A. *et al.* Essential Oils: Chemistry and Pharmacological Activities. **Biomolecules**, 13, n. 7, Jul 18 2023.

DE SOUSA, F. C.; MONTEIRO, A. P.; DE MELO, C. T.; DE OLIVEIRA, G. R. *et al.* Antianxiety effects of riparin I from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Phytother Res**, 19, n. 12, p. 1005-1008, Dec 2005.

DEBACQ-CHAINIAUX, F.; ERUSALIMSKY, J. D.; CAMPISI, J.; TOUSSAINT, O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. **Nat Protoc**, 4, n. 12, p. 1798-1806, 2009.

DI MICCO, R.; KRIZHANOVSKY, V.; BAKER, D.; D'ADDA DI FAGAGNA, F. Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 22, n. 2, p. 75-95, Feb 2021.

- DONATO, A. J.; MORGAN, R. G.; WALKER, A. E.; LESNIEWSKI, L. A. Cellular and molecular biology of aging endothelial cells. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, 89, p. 122-135, 2015.
- DOS SANTOS, S. G.; QUEIROGA, K. F.; DE OLIVEIRA, A. M.; TAVARES, J. F. *et al.* Blood matrix effects for male and female Wistar rats, in simultaneous HPLC-UV determination of riparin I and III from *Aniba riparia* (Nees) Mez. (Lauraceae). **Talanta**, 86, p. 233-240, Oct 30 2011.
- DUNTAS, L. H. Resveratrol and its impact on aging and thyroid function. **J Endocrinol Invest**, 34, n. 10, p. 788-792, Nov 2011.
- ELZI, D. J.; SONG, M.; SHIIO, Y. Role of galactose in cellular senescence. **Exp Gerontol**, 73, p. 1-4, Jan 2016.
- FAFIÁN-LABORA, J. A.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, J. A.; O'LOGHLEN, A. Small Extracellular Vesicles Have GST Activity and Ameliorate Senescence-Related Tissue Damage. **Cell Metab**, 32, n. 1, p. 71-86.e75, Jul 7 2020.
- FERRUCCI, L.; FABBRI, E. Inflammageing: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. **Nature Reviews Cardiology**, 15, n. 9, p. 505-522, 2018/09/01 2018.
- Folhas de *Aniba Riparia* (Nees) Mez. REFLORA - Plantas do Brasil: Resgate Histórico e Herbário Virtual para o Conhecimento e Conservação da Flora Brasileira. Jardim Botânico do Rio de Janeiro 2012.
- FRANCESCHI, C.; CAMPISI, J. Chronic Inflammation (Inflammaging) and Its Potential Contribution to Age-Associated Diseases. **The Journals of Gerontology: Series A**, 69, n. Suppl\_1, p. S4-S9, 2014.
- FRANCESCHI, C.; GARAGNANI, P.; PARINI, P.; GIULIANI, C. *et al.* Inflammaging: a new immune-metabolic viewpoint for age-related diseases. **Nature Reviews Endocrinology**, 14, n. 10, p. 576-590, 2018/10/01 2018.
- FUKAI, T.; USHIO-FUKAI, M. Cross-Talk between NADPH Oxidase and Mitochondria: Role in ROS Signaling and Angiogenesis. **Cells**, 9, n. 8, Aug 6 2020.
- GASEK, N. S.; KUCHEL, G. A.; KIRKLAND, J. L.; XU, M. Strategies for targeting senescent cells in human disease. **Nature Aging**, 1, n. 10, p. 870-879, 2021/10/01 2021.
- GOMES, D. M.; ARAUJO, P. M.; SILVA, S. F. d.; SANTOS, V. R. d. *et al.* Bioactive potential of riparina synthetic analogs: a systematic review. **Research, Society and Development**, 10, n. 16, p. e328101623510, 12/13 2021.
- GONÇALVES, T. A. F.; LIMA, V. S.; DE ALMEIDA, A. J. P. O.; DE ARRUDA, A. V. *et al.* Carvacrol Improves Vascular Function in Hypertensive Animals by Modulating Endothelial Progenitor Cells. 15, n. 13, p. 3032, 2023.
- GROVER, S. P.; MACKMAN, N. Tissue factor in atherosclerosis and atherothrombosis. **Atherosclerosis**, 307, p. 80-86, Aug 2020.
- GUO, J.; HUANG, X.; DOU, L.; YAN, M. *et al.* Aging and aging-related diseases: from molecular mechanisms to interventions and treatments. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, 7, n. 1, p. 391, 2022/12/16 2022.
- GURĂU, F.; BALDONI, S.; PRATTICHIZZO, F.; ESPINOSA, E. *et al.* Anti-senescence compounds: A potential nutraceutical approach to healthy aging. **Ageing Res Rev**, 46, p. 14-31, Sep 2018.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species (ROS), oxygen radicals and antioxidants: Where are we now, where is the field going and where should we go? **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 633, p. 17-19, 2022/12/10/ 2022.

HAN, Y.; KIM, S. Y. Endothelial senescence in vascular diseases: current understanding and future opportunities in senotherapeutics. **Experimental & Molecular Medicine**, 55, n. 1, p. 1-12, 2023/01/01 2023.

HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. **Exp Cell Res**, 25, p. 585-621, Dec 1961.

HICKSON, L. J.; LANGHI PRATA, L. G. P.; BOBART, S. A.; EVANS, T. K. *et al.* Senolytics decrease senescent cells in humans: Preliminary report from a clinical trial of Dasatinib plus Quercetin in individuals with diabetic kidney disease. **EBioMedicine**, 47, p. 446-456, Sep 2019.

HOLLINGSWORTH, S. A.; DROR, R. O. Molecular Dynamics Simulation for All. **Neuron**, 99, n. 6, p. 1129-1143, Sep 19 2018.

HUANG, W.; HICKSON, L. J.; EIRIN, A.; KIRKLAND, J. L. *et al.* Cellular senescence: the good, the bad and the unknown. **Nature Reviews Nephrology**, 18, n. 10, p. 611-627, 2022/10/01 2022.

IBGE, I. B. d. G. e. E.-. **Projeção da População**. 2018. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-detalhe-de-midia.html?view=mediaibge&catid=2103&id=2188>.

IBGE, I. B. d. G. e. E.-. **Censo Demográfico 2022**. 2022. Disponível em: <https://censo2022.ibge.gov.br/panorama/>.

IBRAHIM, Z. Y.; UZAIRU, A.; SHALLANGWA, G. A.; ABECHI, S. E. Application of QSAR Method in the Design of Enhanced Antimalarial Derivatives of Azetidine-2-carbonitriles, their Molecular Docking, Drug-likeness, and SwissADME Properties. **Iran J Pharm Res**, 20, n. 3, p. 254-270, Summer 2021.

ISLAM, M. T.; HALL, S. A.; DUTSON, T.; BLOOM, S. I. *et al.* Endothelial cell-specific reduction in mTOR ameliorates age-related arterial and metabolic dysfunction. **Aging cell**, n/a, n. n/a, p. e14040, 2023.

JEON, O. H.; MEHDIPOUR, M.; GIL, T. H.; KANG, M. *et al.* Systemic induction of senescence in young mice after single heterochronic blood exchange. **Nat Metab**, 4, n. 8, p. 995-1006, Aug 2022.

JIA, G.; AROOR, A. R.; JIA, C.; SOWERS, J. R. Endothelial cell senescence in aging-related vascular dysfunction. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, 1865, n. 7, p. 1802-1809, 2019/07/01/ 2019.

JOYSE, R. L.; HARITHA, S.; SRAVANI, T. D.; MUNWAR, S., 2019, **Molecular Docking Approaches , Types , Applications and Basic Challenges**.

JUNG, Y. H.; CHAE, C. W.; CHANG, H. S.; CHOI, G. E. *et al.* Silencing SIRT5 induces the senescence of UCB-MSCs exposed to TNF- $\alpha$  by reduction of fatty acid  $\beta$ -oxidation and anti-oxidation. **Free Radical Biology and Medicine**, 192, p. 1-12, 2022/11/01/ 2022.

KATSUUMI, G.; SHIMIZU, I.; YOSHIDA, Y.; MINAMINO, T. Vascular Senescence in Cardiovascular and Metabolic Diseases. **Front Cardiovasc Med**, 5, p. 18, 2018.

- KENNEDY, B. K.; BERGER, S. L.; BRUNET, A.; CAMPISI, J. *et al.* Geroscience: linking aging to chronic disease. **Cell**, 159, n. 4, p. 709-713, Nov 6 2014.
- KIM, E. C.; KIM, J. R. Senotherapeutics: emerging strategy for healthy aging and age-related disease. **BMB Rep**, 52, n. 1, p. 47-55, Jan 2019.
- KIM, J. M.; LEE, E. K.; KIM, D. H.; YU, B. P. *et al.* Kaempferol modulates pro-inflammatory NF-kappaB activation by suppressing advanced glycation endproducts-induced NADPH oxidase. **Age (Dordr)**, 32, n. 2, p. 197-208, Jun 2010.
- KIRKLAND, J. L.; TCHKONIA, T. Senolytic drugs: from discovery to translation. **J Intern Med**, 288, n. 5, p. 518-536, Nov 2020.
- LAGOUMTZI, S. M.; CHONDROGIANNI, N. Senolytics and senomorphics: Natural and synthetic therapeutics in the treatment of aging and chronic diseases. **Free Radic Biol Med**, 171, p. 169-190, Aug 1 2021.
- LEE, G. H.; HOANG, T. H.; JUNG, E. S.; JUNG, S. J. *et al.* Anthocyanins attenuate endothelial dysfunction through regulation of uncoupling of nitric oxide synthase in aged rats. **Ageing Cell**, 19, n. 12, p. e13279, Dec 2020.
- LEE, H.-Y.; KIM, H.-K.; HOANG, T.-H.; YANG, S. *et al.* The correlation of IRE1 $\alpha$  oxidation with Nox4 activation in aging-associated vascular dysfunction. **Redox Biology**, 37, p. 101727, 2020/10/01/ 2020.
- LEE, H.-Y.; ZEESHAN, H. M. A.; KIM, H.-R.; CHAE, H.-J. Nox4 regulates the eNOS uncoupling process in aging endothelial cells. **Free Radical Biology and Medicine**, 113, p. 26-35, 2017/12/01/ 2017.
- LEE, K.; JANG, J.; SEO, S.; LIM, J. *et al.* Drug-likeness scoring based on unsupervised learning. **Chem Sci**, 13, n. 2, p. 554-565, Jan 5 2022.
- LERNER, C.; BITTO, A.; PULLIAM, D.; NACARELLI, T. *et al.* Reduced mammalian target of rapamycin activity facilitates mitochondrial retrograde signaling and increases life span in normal human fibroblasts. **Ageing Cell**, 12, n. 6, p. 966-977, Dec 2013.
- LIU, J.; WANG, L.; WANG, Z.; LIU, J.-P. Roles of Telomere Biology in Cell Senescence, Replicative and Chronological Ageing. **Cells**, 8, n. 1, p. 54, 2019.
- LIU, Z.; LIANG, Q.; REN, Y.; GUO, C. *et al.* Immunosenescence: molecular mechanisms and diseases. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, 8, n. 1, p. 200, 2023/05/13 2023.
- LÓPEZ-OTÍN, C.; BLASCO, M. A.; PARTRIDGE, L.; SERRANO, M. *et al.* Hallmarks of aging: An expanding universe. **Cell**, 186, n. 2, p. 243-278, 2023/01/19/ 2023.
- LUÍS, C.; MADURO, A. T.; PEREIRA, P.; MENDES, J. J. *et al.* Nutritional senolytics and senomorphics: Implications to immune cells metabolism and aging - from theory to practice. **Front Nutr**, 9, p. 958563, 2022.
- MAHGOUB, R. E.; ATATREH, N.; GHATTAS, M. A. Chapter Three - Using filters in virtual screening: A comprehensive guide to minimize errors and maximize efficiency. *In: CABALLERO, J. (Ed.). Annual Reports in Medicinal Chemistry: Academic Press, 2022. v. 59, p. 99-136.*

- MALLMANN, A. S. V.; CHAVES, R. d. C.; DE OLIVEIRA, N. F.; OLIVEIRA, I. C. M. *et al.* Is Riparin III a promising drug in the treatment for depression? **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 162, p. 105824, 2021/07/01/ 2021.
- MINISTRINI, S.; PUSPITASARI, Y. M.; BEER, G.; LIBERALE, L. *et al.* Sirtuin 1 in Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Aging. **Front Physiol**, 12, p. 733696, 2021.
- MOHAMAD KAMAL, N. S.; SAFUAN, S.; SHAMSUDDIN, S.; FOROOZANDEH, P. Aging of the cells: Insight into cellular senescence and detection Methods. **Eur J Cell Biol**, 99, n. 6, p. 151108, Aug 2020.
- MUÑOZ-ESPÍN, D.; SERRANO, M. Cellular senescence: from physiology to pathology. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 15, n. 7, p. 482-496, Jul 2014.
- MYLONAS, A.; O'LOGHLEN, A. Cellular Senescence and Ageing: Mechanisms and Interventions. **Front Aging**, 3, p. 866718, 2022.
- NASCIMENTO, O. A.; ESPÍRITO-SANTO, R. F.; OPRETZKA, L. C.; BARBOSA-FILHO, J. M. *et al.* Pharmacological Properties of Riparin IV in Models of Pain and Inflammation. **Molecules**, 21, n. 12, Dec 21 2016.
- OAK, M.-H.; AUGER, C.; BELCASTRO, E.; PARK, S.-H. *et al.* Potential mechanisms underlying cardiovascular protection by polyphenols: Role of the endothelium. **Free Radical Biology and Medicine**, 122, p. 161-170, 2018/07/01/ 2018.
- OLIVEIRA-JÚNIOR, J. B.; DA SILVA, E. M.; VERAS, D. L.; RIBEIRO, K. R. C. *et al.* Antimicrobial activity and biofilm inhibition of riparins I, II and III and ultrastructural changes in multidrug-resistant bacteria of medical importance. **Microbial Pathogenesis**, 149, p. 104529, 2020/12/01/ 2020.
- OLIVEIRA, I. C. M.; MALLMANN, A. S. V.; RODRIGUES, F. A. d. P.; VIDAL, L. M. T. *et al.* Neuroprotective and Antioxidant Effects of Riparin I in a Model of Depression Induced by Corticosterone in Female Mice. **Neuropsychobiology**, 81, n. 1, p. 28-38, 2021.
- PADKI, M. M.; STAMBLER, I. Targeting Aging with Metformin (TAME). In: GU, D. e DUPRE, M. E. (Ed.). **Encyclopedia of Gerontology and Population Aging**. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 4908-4910.
- RAJIV GANDHI, G.; SHARANYA, C. S.; JAYANANDAN, A.; HARIDAS, M. *et al.* Multitargeted molecular docking and dynamics simulation studies of flavonoids and volatile components from the peel of Citrus sinensis L. (Osbeck) against specific tumor protein markers. **J Biomol Struct Dyn**, p. 1-30, May 19 2023.
- RANG, H. P. R., J. M. ; FLOWER, R. J. ; HENDERSON, G. **Rang & Dale farmacologia**. 2016. 760 p.
- REZENDE, M. S. A.; ALMEIDA, A. J. P. O.; GONÇALVES, T. A. F.; AZEVEDO, F. L. A. A. *et al.* D-(+)-Galactose-induced aging: A novel experimental model of erectile dysfunction. **PLoS One**, 16, n. 4, p. e0249487, 2021.
- ROBBINS, P. D.; JURK, D.; KHOSLA, S.; KIRKLAND, J. L. *et al.* Senolytic Drugs: Reducing Senescent Cell Viability to Extend Health Span. 61, n. 1, p. 779-803, 2021.
- ROSSMAN, M. J.; KAPLON, R. E.; HILL, S. D.; MCNAMARA, M. N. *et al.* Endothelial cell senescence with aging in healthy humans: prevention by habitual exercise and relation to vascular

endothelial function. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, 313, n. 5, p. H890-H895, 2017.

SADHUKHAN, S.; LIU, X.; RYU, D.; NELSON, O. D. *et al.* Metabolomics-assisted proteomics identifies succinylation and SIRT5 as important regulators of cardiac function. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 113, n. 16, p. 4320-4325, Apr 19 2016.

SALAZAR, G. NADPH Oxidases and Mitochondria in Vascular Senescence. 19, n. 5, p. 1327, 2018.

SALMASO, V.; MORO, S. Bridging Molecular Docking to Molecular Dynamics in Exploring Ligand-Protein Recognition Process: An Overview. 9, 2018-August-22 2018. Review.

SCHUMACHER, B.; POTHOF, J.; VIJG, J.; HOEIJMAKERS, J. H. J. The central role of DNA damage in the ageing process. **Nature**, 592, n. 7856, p. 695-703, 2021/04/01 2021.

SCISCIOLA, L.; SARNO, F.; CARAFA, V.; COSCONATI, S. *et al.* Two novel SIRT1 activators, SCIC2 and SCIC2.1, enhance SIRT1-mediated effects in stress response and senescence. **Epigenetics**, 15, n. 6-7, p. 664-683, Jun-Jul 2020.

SCOTT, A. J.; ELLISON, M.; SINCLAIR, D. A. The economic value of targeting aging. **Nature Aging**, 1, n. 7, p. 616-623, 2021/07/01 2021.

SHEN, L. R.; PARNELL, L. D.; ORDOVAS, J. M.; LAI, C. Q. Curcumin and aging. **Biofactors**, 39, n. 1, p. 133-140, Jan-Feb 2013.

SIES, H.; BELOUSOV, V. V.; CHANDEL, N. S.; DAVIES, M. J. *et al.* Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2022/02/21 2022.

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative Stress. 86, n. 1, p. 715-748, 2017.

SIES, H.; JONES, D. P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 21, n. 7, p. 363-383, Jul 2020.

SILVA, R. O.; DAMASCENO, S. R.; SILVA, I. S.; SILVA, V. G. *et al.* Riparin A, a compound from *Aniba riparia*, attenuate the inflammatory response by modulation of neutrophil migration. **Chem Biol Interact**, 229, p. 55-63, Mar 5 2015.

ŚLEDŹ, P.; CAFLISCH, A. Protein structure-based drug design: from docking to molecular dynamics. **Curr Opin Struct Biol**, 48, p. 93-102, Feb 2018.

STANZIONE, F.; GIANGRECO, I.; COLE, J. C. Chapter Four - Use of molecular docking computational tools in drug discovery. *In*: WITTY, D. R. e COX, B. (Ed.). **Progress in Medicinal Chemistry**: Elsevier, 2021. v. 60, p. 273-343.

TABIBZADEH, S. Signaling pathways and effectors of aging. **Front Biosci (Landmark Ed)**, 26, n. 1, p. 50-96, Jan 1 2021.

TCHKONIA, T.; PALMER, A. K.; KIRKLAND, J. L. New Horizons: Novel Approaches to Enhance Healthspan Through Targeting Cellular Senescence and Related Aging Mechanisms. **J Clin Endocrinol Metab**, 106, n. 3, p. e1481-e1487, Mar 8 2021.

THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. H. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. **J Med Chem**, 49, n. 11, p. 3315-3321, Jun 1 2006.

UN. World Population Prospects 2022: Summary of Results. UN DESA/POP/2022/TR/NO. 3. UNITED NATIONS DEPARTMENT OF ECONOMIC AND SOCIAL AFFAIRS, P. D. 2022.

UNGVARI, Z.; TARANTINI, S.; DONATO, A. J.; GALVAN, V. *et al.* Mechanisms of Vascular Aging. **Circ Res**, 123, n. 7, p. 849-867, Sep 14 2018.

UNGVARI, Z.; TARANTINI, S.; KISS, T.; WREN, J. D. *et al.* Endothelial dysfunction and angiogenesis impairment in the ageing vasculature. **Nature Reviews Cardiology**, 15, n. 9, p. 555-565, 2018/09/01 2018.

VAN DER VORST, E. P. C.; DAISSORMONT, I.; ASLANI, M.; SEIJKENS, T. *et al.* Interruption of the CXCL13/CXCR5 Chemokine Axis Enhances Plasma IgM Levels and Attenuates Atherosclerosis Development. **Thromb Haemost**, n. EFirst, // 2020.

WANG, J.; HOU, T. Drug and drug candidate building block analysis. **J Chem Inf Model**, 50, n. 1, p. 55-67, Jan 2010.

WANG, Q.; CUI, Y.; WU, X.; WANG, J. Riparin II potentials the effect of ephedrine on inflammation and remodelling in the airway of rats suffering from asthma by regulating transforming growth factor- $\beta$ /Smad3 signalling pathway. **Int Immunopharmacol**, 90, p. 107116, Jan 2021.

WANG, S. S.; ZHANG, X.; KE, Z. Z.; WEN, X. Y. *et al.* D-galactose-induced cardiac ageing: A review of model establishment and potential interventions. **J Cell Mol Med**, 26, n. 21, p. 5335-5359, Nov 2022.

WONG, F.; OMORI, S.; DONGHIA, N. M.; ZHENG, E. J. *et al.* Discovering small-molecule senolytics with deep neural networks. **Nature Aging**, 3, n. 6, p. 734-750, 2023/06/01 2023.

XU, M.; PIRTSKHALAVA, T.; FARR, J. N.; WEIGAND, B. M. *et al.* Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. **Nature Medicine**, 24, n. 8, p. 1246-1256, 2018/08/01 2018.

XU, Q.; FU, Q.; LI, Z.; LIU, H. *et al.* The flavonoid procyanidin C1 has senotherapeutic activity and increases lifespan in mice. **Nature Metabolism**, 3, n. 12, p. 1706-1726, 2021/12/01 2021.

YE, P.; FENG, L.; ZHANG, D.; LI, R. *et al.* Metformin Ameliorates D-Galactose-Induced Senescent Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells by Enhancing Autophagy. **Stem Cells Int**, 2023, p. 1429642, 2023.

YOUNG, R. J.; FLITSCH, S. L.; GRIGALUNAS, M.; LEESON, P. D. *et al.* The Time and Place for Nature in Drug Discovery. **JACS Au**, 2, n. 11, p. 2400-2416, Nov 28 2022.

YU, H.; LIAO, K.; HU, Y.; LV, D. *et al.* Role of the cGAS-STING Pathway in Aging-related Endothelial Dysfunction. **Aging Dis**, 13, n. 6, p. 1901-1918, Dec 1 2022.

ZHANG, Q.; LI, S.; CHEN, F.; ZENG, R. *et al.* Targeted delivery strategy: A beneficial partner for emerging senotherapy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 155, p. 113737, 2022/11/01/ 2022.

ZHU, X.-X.; MIAO, X.-Y.; GONG, Y.-P.; FU, B. *et al.* Isolation and culture of rat aortic endothelial cells in vitro: A novel approach without collagenase digestion. 120, n. 8, p. 14127-14135, 2019.

ZHU, Y.; DOORNEBAL, E. J.; PIRTSKHALAVA, T.; GIORGADZE, N. *et al.* New agents that target senescent cells: the flavone, fisetin, and the BCL-X(L) inhibitors, A1331852 and A1155463. **Aging (Albany NY)**, 9, n. 3, p. 955-963, Mar 8 2017.

*Anexos*

## ANEXO 1: CERTIDÃO DE APROVAÇÃO CEUA

### Certidão de aprovação da CEUA-UFPPB



Universidade  
Federal da  
Paraíba



Universidade Federal da Paraíba

Comissão de Ética no  
Uso de Animais

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do potencial anti-senescente de N-benzoiltiraminas (Riparinas I, II, III e IV) de Aniba Riparia (Nees) Mez em células endoteliais da artéria aorta de ratos induzidas com D-galactose", protocolada sob o CEUA nº 3541070323 (ID 001842), sob a responsabilidade de **Isac Almeida de Medeiros** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPPB) na reunião de 17/05/2023.

We certify that the proposal "Evaluation of the anti-senescent potential of N-benzoyltyramines (Riparin I, II, III and IV) f.r.o.m Aniba Riparia (Nees) Mez in endothelial cells of the aorta artery of rats induced with D-galactose. ", utilizing 30 Heterogenics rats (30 males), protocol number CEUA 3541070323 (ID 001842), under the responsibility of **Isac Almeida de Medeiros** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPPB) in the meeting of 05/17/2023.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **03/2023 a 03/2024** Área: **Ciências Farmacêuticas**

Origem: **Biotério Convencional de Roedores do Departamento de Fisiologia e Patologia (UFPE)**

Espécie: **Ratos heterogênicos** sexo: **Machos** idade: **7 a 8 semanas** Quantidade: **30**

Linhagem: **Rattus Norvegicus - Wistar** Peso: **250 a 300 g**

João Pessoa, 24 de julho de 2023

Prof. Dr. Luiz Henrique César Vasconcelos  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal da Paraíba



Profa. Dra. Gláucia Veríssimo Faheina Martins  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal da Paraíba

## APÊNDICE: ARTIGO

Artigo publicado como co-autora  
Fator de impacto: 7.310

Hindawi  
Oxidative Medicine and Cellular Longevity  
Volume 2022, Article ID 1225578, 23 pages  
<https://doi.org/10.1155/2022/1225578>

*Review Article***ROS: Basic Concepts, Sources, Cellular Signaling, and its Implications in Aging Pathways**

**Arthur José Pontes Oliveira de Almeida** <sup>1</sup>, **Júlio César Pinheiro Lúcio de Oliveira**,<sup>1</sup>  
**Larisse Virgolino da Silva Pontes**,<sup>1</sup> **Javanyr Frederico de Souza Júnior**,<sup>1</sup>  
**Tays Amanda Felisberto Gonçalves**,<sup>1</sup> **Sabine Helena Dantas**,<sup>1</sup>  
**Mathania Silva de Almeida Feitosa**,<sup>1</sup> **Antonia Oliveira Silva**,<sup>2</sup>  
and **Isac Almeida de Medeiros** <sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Ciências Farmacêuticas/Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária-Campus I, Caixa Postal 5009, 58051-970 João Pessoa, PB, Brazil*

<sup>2</sup>*Programa de Pós-Graduação em Enfermagem/Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária-Campus I, Caixa Postal 5009, 58051-970 João Pessoa, PB, Brazil*

Correspondence should be addressed to Isac Almeida de Medeiros; [isac@lftf.ufpb.br](mailto:isac@lftf.ufpb.br)

Received 20 May 2022; Revised 24 September 2022; Accepted 26 September 2022; Published 19 October 2022

Academic Editor: Daniela Giustarini

Copyright © 2022 Arthur José Pontes Oliveira de Almeida et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Reactive oxygen species (ROS) are bioproducts of cellular metabolism. There is a range of molecules with oxidizing properties known as ROS. Despite those molecules being implied negatively in aging and numerous diseases, their key role in cellular signaling is evident. ROS control several biological processes such as inflammation, proliferation, and cell death. The redox signaling underlying these cellular events is one characteristic of the new generation of scientists aimed at defining the role of ROS in the cellular environment. The control of redox potential, which includes the balance of the sources of ROS and the antioxidant system, implies an important target for understanding the cells' fate derived from redox signaling. In this review, we summarized the chemical, the redox balance, the signaling, and the implications of ROS in biological aging.