



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO
E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS
(PPgDITM)**



ARTHUR JOSÉ PONTES OLIVEIRA DE ALMEIDA

**EFEITO DE TERPENOS NO ENVELHECIMENTO
CARDIOVASCULAR: O PAPEL DA SENESCÊNCIA E DO ESTRESSE
OXIDATIVO**

ORIENTADOR: PROF. DR. ISAC ALMEIDA DE MEDEIROS

João Pessoa - PB

2024

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

A447e Almeida, Arthur José Pontes Oliveira de.

Efeito de terpenos no envelhecimento cardiovascular
: o papel da senescência e do estresse oxidativo /
Arthur José Pontes Oliveira de Almeida. - João Pessoa,
2024.

145 f. : il.

Orientação: Isac Almeida de Medeiros.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Substâncias naturais - Terpenos. 2. Terpenos -
Envelhecimento cardiovascular. 3. Terpinolene. 4.
Senescência. I. Medeiros, Isac Almeida de. II. Título.

UFPB/BC

CDU 615.32(043)

ARTHUR JOSÉ PONTES OLIVEIRA DE ALMEIDA

**EFEITO DE TERPENOS NO ENVELHECIMENTO
CARDIOVASCULAR: O PAPEL DA SENESCÊNCIA E DO ESTRESSE
OXIDATIVO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamentos, da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção de título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: PROF. DR. ISAC ALMEIDA DE MEDEIROS

João Pessoa - PB

2024

ARTHUR JOSÉ PONTES OLIVEIRA DE ALMEIDA

EFEITO DE TERPENOS NO ENVELHECIMENTO CARDIOVASCULAR: O PAPEL DA SENESCÊNCIA E DO ESTRESSE OXIDATIVO

Aprovada em 26 / 02 / 2024

Banca examinadora

Documento assinado digitalmente
 ISAC ALMEIDA DE MEDEIROS
Data: 29/02/2024 10:26:18-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr Isac Almeida de Medeiros (presidente)

Documento assinado digitalmente
 ENEAS RICARDO DE MORAIS GOMES
Data: 27/02/2024 15:57:43-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr Enéas Ricardo de Moraes Gomes (examinador interno)

Documento assinado digitalmente
 ROBSON CAVALCANTE VERAS
Data: 28/02/2024 06:59:23-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr Robson Cavalcante Veras (examinador interno)

Documento assinado digitalmente
 OLGA LUISA TAVANO
Data: 26/02/2024 20:58:34-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profª. Drª Olga Luisa Tavano (examinadora externa)

Documento assinado digitalmente
 VANESSA VENDRAMINI VILELA
Data: 27/02/2024 09:21:30-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profª. Drª Vanessa Vendramini Vilela (examinadora externa).

Dedicatória

Dedico esse trabalho aos meus pais Fernando Honório de Almeida e Lúcia Pontes Oliveira de Almeida, exemplos de bondade e paciência, que me ensinaram os valores da vida de forma tão sábia. Dedico ainda, a minha esposa Larisse Virgolino da Silva Pontes, por todo o companheirismo, amor e dedicação, durante toda essa trajetória.

Meu muito Obrigado.

Agradecimentos

Primeiramente à Deus, por sua infinita sabedoria e por ter me guiado até aqui, sempre oferecendo o melhor caminho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros, por ter me iniciado no mundo da pesquisa, e por sempre ter confiado em mim. Com certeza, um dos responsáveis por ter chegado até aqui. Seu convite ao laboratório foi onde tudo começou.

À equipe do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular: Javanyr de Souza, Mathania Rezende, Tays Amanda, Viviane Lima, Julho Oliveira, Carol Menezes, Sabine Dantas, Alyne Vilar, Danilo Duarte, Rayane Maria, Eraldo Farias, Guilherme Marques, Itamar Lúcio, Adhonias dos Santos, Evyllen Soares, Maria Eduarda, Hayaly Felinto, Ricardo Cartaxo, Gabriel Felipe. Em especial, aos professores envolvidos com o laboratório: Islânia Giselia, Robson Veras e Maria do Socorro. Além de Fátima Azevedo.

À UFPB, seu corpo docente, direção e administração, em especial, aqueles que trabalham ligados direta ou indiretamente ao curso de farmácia. Em especial ao professor Jose Maria Barbosa Filho pela parceria. Ao professores da qualificação Enéas Ricardo de Moraes Gomes, Margareth de Fátima Formiga de Melo Diniz, Marcia Regina Piuvezam, Robson Cavalcante Veras, Thyago Moreira de Queiroz e Hilzeth de Luna Freire Pessôa.

Aos professores da banca, Enéas Ricardo de Moraes Gomes, Hilzeth de Luna Freire Pessôa, Olga Luisa Tavano, Robson Cavalcante Veras, Thyago Moreira de Queiroz e Vanessa Vendramini Vilela, pela disponibilidade e confiança.

Ao Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamentos, seu corpo docente, secretaria e alunos. Por sempre estarem sempre dispostos em ajudar.

A CAPES, CNPQ, FAPESQ E UFPB, por ter me concedido apoio financeiro durante toda essa trajetória. Em especial, ao probo brasileiro, que através dos impostos, financiam grande parte da pesquisa realizada no Brasil.

Aos meus pais, Fernando Honório e Lucia Pontes pelo amor, incentivo e apoio incondicional. Sem eles, com certeza não conseguiria.

A minha esposa, Larisse Silva, meu porto seguro. Te agradeço por toda amizade, parceria, risadas, carinho e amor.

A minha vó, Maria Salete, por ser fonte de inspiração na busca do envelhecimento saudável. Foi como minha segunda mãe nesse período.

A todos os meus familiares, por todo apoio dado durante essa jornada. Em especial, aos meus irmãos Emanuel Honório e Thamiris Pontes pelo apoio e incentivo.

Aos meus sogros, Severino Virgolino e Maria Lucia, por todo o apoio e amizade.

A minha turma de Pós-graduação, em especial aos meus amigos Humberto, Sonaly e Rebeca, pelos momentos de leveza e descontração.

Enfim, agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuiu para que eu chegasse nesse momento.

Arthur José Pontes Oliveira de Almeida

“Porque as pessoas que são loucas o suficiente para achar que podem mudar o mundo, são aquelas o que o fazem.”

Steve Jobs

Resumo

ALMEIDA, A.J.P.O.; **Efeito de terpenos no envelhecimento cardiovascular: O papel da senescência e do estresse oxidativo.** Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamentos, Tese de Doutorado. CCS/UFPB, 2024.

A população acima dos 60 anos está crescendo substancialmente, chegando a 22% em 2050. Doenças cardiovasculares (DCVs), a principal causa de morbidade e mortalidade pelo mundo, tem sua prevalência aumentada pela idade, por isso, urge estratégias para combater e/ou preveni-las. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito anti-senescente de 20 terpenos e caracterizar o efeito do mais promissor *in vitro* e *in vivo*. Para isso, células endoteliais de aorta de ratos (RAEC) e ratos Wistar foram utilizados. A D-(+)-Galactose (Dgal) foi usada como modelo do envelhecimento. Inicialmente, foi realizado um triplo *screening*, para ação anti-senescente, de viabilidade celular e antioxidante com 20 terpenos. O Terpinolene (TPO), apresentou eficácia para os três ensaios, sendo as concentrações de 10^{-7} e 10^{-6} mol.L⁻¹ com triplo efeito. O ensaio de Anexina V/7-AAD confirmou a capacidade do TPO em melhorar a viabilidade celular. Para os ensaios *in vivo*, as doses de 5 e 25 mg/kg foram utilizadas por 56 dias. Em paralelo, o animal recebeu salina ou Dgal via intraperitoneal na dose de 150 mg/kg. Durante o tratamento, não foi evidenciado alterações no peso corpóreo dos grupos. No dia anterior à eutanásia, a pressão arterial sistólica e frequência cardíaca foram avaliadas, sem alterações significativas. A glicemia capilar não foi alterada entre o grupo CTL (108.00 ± 1.64 ; n=8) e Dgal (111.87 ± 2.30 ; n=8), no entanto, o grupo TPO25 teve redução nos níveis glicêmicos (103.12 ± 2.57 ; n=8). Após anestesia, os registros eletrocardiográficos foram avaliados, com posterior coleta de sangue para os ensaios bioquímicos e hematológicos, além da retirada da artéria aorta e dos órgãos coração, fígado e rins. Os parâmetros bioquímicos foram divididos em lipídicos, proteicos, renais e hepáticos. Ademais, os níveis de proteína totais estavam elevados no grupo Dgal comparado ao CTL, e o TPO5 e TPO25 foram capazes de restaurar esses níveis. Já o perfil hematológico não detectou alterações entre os grupos. No entanto, para os testes de coagulação, o TP aumentado no grupo Dgal foi restaurado para os níveis basais pelo TPO25. O TPPA não detectou alterações entre os grupos, assim como a reatividade plaquetária. Além disso, foram realizados testes para reatividade vascular em tiras de aorta, os quais não houve alterações significativas entre os grupos no $E_{\text{máx}}$ para contração frente a FEN, nem para o relaxamento induzido por NPS. Por outro lado, o relaxamento induzido por ACh estava comprometido no grupo Dgal ($E_{\text{máx}}$: 85.20 ± 2.18 ; n=8) quando comparado ao grupo CTL ($E_{\text{máx}}$: 100.5 ± 2.40 ; n=6), e restaurado pelo TPO25 ($E_{\text{máx}}$: 98.60 ± 2.91 ; n=7). Tal achado foi acompanhado por um estresse oxidativo vascular, evidenciado pela sonda DHE nos grupos CTL (100.00 ± 4.05 ; n=6), DGAL (157.59 ± 6.01 ; n=6), restaurado pelo TPO25 (105.28 ± 6.96 ; n=6). Por fim, analisamos os aspectos eletrocardiográficos como duração de onda P com tendência de alta no grupo Dgal comparado ao CTL, restaurado pelo TPO25. Ademais, houve aumento no índice de hipertrofia cardíaca para o grupo Dgal (0.360 ± 0.012 , n=8) em relação ao CTL (0.312 ± 0.011 , n=7), e restaurado pelo TPO25 (0.301 ± 0.006 , n=10). Portanto, o TPO selecionado pelo *Screening* foi capaz de exercer efeitos benéficos sob o envelhecimento cardiovascular.

Palavras chaves: Cardiovascular; Envelhecimento; Terpenos; Terpinolene; Senescência.

Abstract

ALMEIDA, A.J.P.O.; **Effect of terpenes on cardiovascular aging: Role of senescence and oxidative stress.** Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamentos, Doctoral thesis. CCS/UFPB, 2024.

The population over 60 is growing substantially, reaching 22% in 2050. Cardiovascular diseases (CVDs), the leading cause of morbidity and mortality around the world, have an increased prevalence with age. Therefore, strategies are urgently needed to combat and/or prevent them. In this context, this work aimed to evaluate the anti-senescent effect of 20 terpenes and characterize the effect of the most promising in vitro and in vivo. For this, rat aortic endothelial cells (RAEC) and Wistar rats were used. D-(+)-Galactose (Dgal) was used as an aging model. Initially, a triple screening was performed for anti-senescent cell viability and antioxidant action with 20 terpenes. Terpinolene (TPO) was effective in the three trials, with concentrations of 10^{-7} and 10^{-6} mol.L⁻¹ having a triple beneficial effect. The Annexin V/7-AAD assay confirmed the ability of TPO to improve cell viability. For in vivo tests, doses of 5 and 25 mg/kg were used for 56 days. In parallel, the animal received saline or Dgal intraperitoneally to induce the accelerated aging model. During treatment, there were no changes in the body weight of the groups. The day before euthanasia, systolic blood pressure and heart rate were evaluated without significant changes. Capillary glycemia was unchanged between the CTL group (108.00 ± 1.64 ; n=8) and Dgal (111.87 ± 2.30 ; n=8); however, the TPO25 group had a reduction in glycemic levels (103.12 ± 2.57 ; n=8). After the anaesthetic, electrocardiographic recordings were carried out, with subsequent blood collection for biochemical and haematological tests and removing the aorta artery and the heart, liver, and kidney organs. The biochemical parameters were divided into lipid, protein, renal, and hepatic. Furthermore, total protein levels were elevated in the Dgal group compared to CTL, and TPO5 and TPO25 restored these levels. The haematological profile was unchanged between the groups. However, for coagulation tests, the increased TP in the Dgal group was restored to baseline levels by TPO25. The TPPA did not detect changes between the groups, as well as platelet reactivity. Furthermore, tests were performed for vascular reactivity in aortic rings, which showed no significant changes between the groups in Emax for contraction against FEN nor relaxation induced by NPS. On the other hand, ACh-induced relaxation was compromised in the Dgal group (Emax: 85.20 ± 2.18 ; n=8) when compared to the CTL group (Emax: 100.5 ± 2.40 ; n=6) and restored by TPO25 (Emax: 98.60 ± 2.91 ; n=7). This finding was accompanied by vascular oxidative stress, evidenced by the DHE probe in the CTL (100.00 ± 4.05 ; n=6), DGAL (157.59 ± 6.01 ; n=6) groups, restored by TPO25 (105.28 ± 6.96 ; n=6). Finally, we analyzed the electrocardiographic aspects, such as P wave duration with an upward trend in the Dgal group compared to the CTL, restored by TPO25. Furthermore, the cardiac hypertrophy index in Dgal (0.360 ± 0.012 , n=8) increased in relation to CTL (0.312 ± 0.011 , n=7) and was restored by TPO25 (0.301 ± 0.006 , n=10). Therefore, the TPO selected by Screening was able to exert beneficial effects on cardiovascular aging, being a promising candidate in the search for healthy aging.

Keywords: cardiovascular; aging; terpenes; Terpinolene; senescence.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - UM MUNDO ENVELHECIDO - POPULAÇÃO ACIMA DOS 60 ANOS, EM 2015 E 2050	28
FIGURA 2 - TAXA DE MORTALIDADE POR DCVs POR GRUPO NO BRASIL, 2019	29
FIGURA 3 - BIOLOGIA DO ENVELHECIMENTO E A SUSCEPTIBILIDADE PARA DOENÇAS	30
FIGURA 4 – BIOMARCADORES DO ENVELHECIMENTO BIOLÓGICO.....	32
FIGURA 5 - ASPECTOS MOLECULARES DO ENVELHECIMENTO E AS DOENÇAS RELACIONADAS COM A IDADE....	33
FIGURA 6 - SENESCÊNCIA: INDUTORES, CARACTERIZAÇÃO E MECANISMO DE AÇÃO.....	35
FIGURA 7 - VISÃO GERAL ESQUEMÁTICA DA PRODUÇÃO/ELIMINAÇÃO DE EROS	37
FIGURA 8 - NÍVEIS ADEQUADOS DE EROS CONTROLAM O DESTINO CELULAR POR SINALIZAÇÃO REDOX	39
FIGURA 9 - ESTRESSE OXIDATIVO INDUZ CICLO DE SENESCÊNCIA PATOLÓGICO	40
FIGURA 10 - ENVELHECIMENTO CARDIOVASCULAR: <i>CROSSTALK</i> ENTRE ESTRESSE OXIDATIVO E INFLAMAÇÃO	41
FIGURA 11 - ENVELHECIMENTO VASCULAR E SUA INFLUÊNCIA SISTÊMICA.....	44
FIGURA 12 - MODELO DE ENVELHECIMENTO ACELERADO POR D-(+)-GALACTOSE	46
FIGURA 13 - SENESCÊNCIA E A PROMESSA DOS SENOTERAPÊUTICOS.....	48
FIGURA 14 - MECANISMO DE AÇÃO DOS SENOTERAPÊUTICOS.....	49
FIGURA 15 - ESTRUTURA QUÍMICA DO TERPINOLENE	50
FIGURA 16 - FONTES NATURAIS DO TERPINOLENE	52
FIGURA 17 - ISOLAMENTO E CULTURA DE RAECs	60
FIGURA 18 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA PADRONIZAÇÃO DO MODELO.....	61
FIGURA 19 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA O <i>SCREENING</i>	62
FIGURA 20 - CURVA DE CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA FRENTE A D-(+)-GALACTOSE	74
FIGURA 21 - CURVA DE CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA FRENTE A D-(+)-GALACTOSE	75
FIGURA 22 - CURVA DE CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA FRENTE A D-(+)-GALACTOSE	77
FIGURA 23 - HEATMAP DE SIGNIFICÂNCIA PARA OS NÍVEIS DE VIABILIDADE CELULAR	80
FIGURA 24 - HEATMAP DE SIGNIFICÂNCIA PARA OS NÍVEIS DE SENESCÊNCIA CELULAR	82
FIGURA 25 - HEATMAP DE SIGNIFICÂNCIA PARA OS NÍVEIS DE ÂNIONS SUPERÓXIDO	84
FIGURA 26 - QUANTIFICAÇÃO DA VIABILIDADE E APOPTOSE CELULAR	86
FIGURA 27 - MONITORAMENTO DO PESO CORPÓREO	87
FIGURA 28 - MONITORAMENTO DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA E FREQUÊNCIA CARDÍACA	88
FIGURA 29 - AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS GLICÊMICOS	89

FIGURA 30 - AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS LIPÍDICOS OBTIDOS DO SORO	90
FIGURA 31 - AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEPÁTICOS OBTIDOS DO SORO.....	91
FIGURA 32 - AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS PROTEICOS OBTIDOS DO SORO	92
FIGURA 33 - AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS RENAI OBTIDOS DO SORO	93
FIGURA 34 - AVALIAÇÃO DO TEMPO DE PROTROMBINA E TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIALMENTE ATIVADA	95
FIGURA 35 - AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE PLAQUETÁRIA FRENTE A DIFOSFATO DE ADENOSINA.....	96
FIGURA 36 - AVALIAÇÃO DA RESPOSTA CONTRÁTIL À FENILEFRINA EM ANÉIS DE ARTÉRIA AORTA	97
FIGURA 37 - AVALIAÇÃO DA RESPOSTA RELAXANTE À ACETILCOLINA EM ANÉIS DE ARTÉRIA AORTA	98
FIGURA 38 - AVALIAÇÃO DA RESPOSTA RELAXANTE AO NITROPRUSSIATO DE SÓDIO EM ANÉIS DE ARTÉRIA AORTA.....	99
FIGURA 39 - AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM ANÉIS DE AORTA	100
FIGURA 40 - AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE HIPERTROFIA CARDÍACA	102
FIGURA 41 - TERPINOLENE E CARACTERIZAÇÃO DE SEUS EFEITOS EM MODELO ANIMAL DE ENVELHECIMENTO ACELERADO POR D-(+)-GALACTOSE.....	115

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO TERPINOLENE	51
TABELA 2 - AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS: ERITROGRAMA, LEUCOGRAMA E PLAQUETOGAMA	94
TABELA 3 - AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS ELETROCARDIOGRÁFICOS	101
TABELA 4 - <i>SCREENING</i> DE VINTE TERPENOS PARA O ENSAIO DE MTT EM CONDIÇÃO BASAL	142
TABELA 5 - <i>SCREENING</i> DE VINTE TERPENOS PARA O ENSAIO DE MTT EM MODELO DE SENESCÊNCIA ENDOTELIAL.....	143
TABELA 6 - <i>SCREENING</i> DE VINTE TERPENOS PARA O ENSAIO DE MTT EM MODELO DE SENESCÊNCIA ENDOTELIAL.....	144
TABELA 7 - <i>SCREENING</i> DE VINTE TERPENOS PARA O ENSAIO DE DHE EM MODELO DE SENESCÊNCIA ENDOTELIAL.....	145

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO SALINA TAMPONADA (PBS).....	57
QUADRO 2 - COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO DE X-GAL	57
QUADRO 3 - COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO PARA O TESTE DE APOPTOSE CELULAR (PH=7,4).....	58
QUADRO 4 - COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO DE KREBS-RINGER PARA AORTA (PH 7,4).....	58
QUADRO 5 - COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO DE KREBS-RINGER MODIFICADO PARA AORTA COM KCL 60 MM (PH 7,4)	58

LISTA DE ABREVIações

7-AAD: 7-amino-actinomicina D

γ-H2AX: Membro X da família de Histona H2A

ACh: Acetilcolina

ADP: Difosfato de adenosina

ALT: Alanina aminotransferase

AST: Aspartato aminotransferase

BrdU: Bromodeoxyuridine

CAT: Catalase

CEUA: Comitê de Ética em Uso Animal

CDK: Quinase dependente de ciclina

CIC-3: Canal de cloreto-3

CTL: Controle

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

DCVs: Doenças cardiovasculares

DDR: Resposta de dano ao DNA

Dgal: D-(+)-galactose

DHE: Dihidroetídeo

DL50: Dose letal para 50% dos animais

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

ECG: Eletrocardiograma

ECs: Células endoteliais

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

Emáx: Efeito máximo

eNOS: Síntese de óxido nítrico endotelial

EPCs: Células endoteliais progenitoras

EROs: Espécie reativas de oxigênio

ER stress: Estresse do reticulo endoplasmático

ERO1: Oxidoredutina 1 do retículo endoplasmático

ETC: Cadeia de transporte de elétrons

FC: Frequência cardíaca

FEN: Fenilefrina

FOXO: Fator de transcrição *Forkhead box*

G-CSF: Fator estimulador de colônias de granulócitos

GM-CSF: Fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos

GPx: Glutathione peroxidase

GR: Glutathione reductase

GRAN: Granulócitos

GSE: Extrato de semente de uva

GSH: Glutathione reduzida

GSSG: Glutathione oxidada

H₂O₂: Peroxido de hidrogênio

HbA1c: Hemoglobina glicada

HCT: Hematócrito

HDL: Lipoproteína de alta densidade

HGB: Hemoglobina

Hira: Regulador de histona para o ciclo celular

HO-1: Heme oxygenase 1

HP1: Proteína de ligação a heterocromatina

HSP90: Proteína 90 do Shock térmico

HSPCs: Células- tronco/progenitoras hematopoiéticas

IL-1 β : Interleucina 1 β

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

iNOS: Sintase de óxido nítrico induzida

IP: Via intraperitoneal

Keap1: Proteína 1 associada a ECH do tipo Kelch

Ki67: Proteína de proliferação celular

LDL: Lipoproteína de baixa densidade

LOX: Lipoxigenase

LYM: Linfócitos

MCV: Volume corpuscular médio

MCH: Hemoglobina corpuscular média

MCHC: Concentração de hemoglobina corpuscular média

M-CSF: Fator estimulador de colônias de macrófagos

MID: Células intermediarias

MPO: Mieloperoxidase

MMPs: Metaloproteinases

MPV: Volume plaquetário médio

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio

NAD⁺: Dinucleotídeo de nicotinamida adenina

NADH: Dinucleotídeo de nicotinamida adenina hidrogenado

NADPH oxidase: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase

Nf-κB: Fator nuclear kappa B

•NO: Óxido nítrico

Nrf-2: Fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2

NPS: Nitroprussiato de sódio

NS: Não significativo

O₂•⁻: Ânion superóxido

OGDH: Oxoglutarato desidrogenase

ONOO⁻: Peroxinitrito

PAS: Pressão arterial sistólica

PBS: Solução tampão fosfato

PCR: Proteína C reativa

PCT: Plaquetócrito

PDH: Complexo piruvato desidrogenase

PDW: Largura de distribuição do volume plaquetário

PE: Fluoresceína

P-LCR: Percentual de plaquetas grandes, com volume maior que 12 fL

PLT: Plaquetas

p-p38: Proteína p38 fosforilada

p-p65: Proteína p65 fosforilada

PPP: Plasma pobre em plaquetas

pRB: Proteína retinoblastoma

PRP: Plasma rico em plaquetas

PRX: Peroxirredoxinas

PVPI: Iodopovidona

RAECs: Células endoteliais aórticas de ratos

RBC: Eritrócitos

RDW-CV: Amplitude de Distribuição dos Eritrócitos medido como Coeficiente de variação

RE: Retículo endoplasmático

RyRs: Receptores de rianodina

SA- β -Gal: β -galactosidase associada a senescência

SASP: Fenótipo secretor associado a senescência

SFB: Soro Bovino Fetal

SERCA: Ca²⁺-ATPase do retículo sarco/endoplasmático

SOD: Superóxido dismutase

TGF-1 β : Fator de crescimento transformador 1 β

TIFs: Focos induzidos por disfunção nos telômeros

Tnf- α : Fator de necrose tumoral α

TPO: Terpinolene

TP: Tempo de protrombina

TPPA: Tempo de tromboplastina parcial ativado

TRX: Tioredoxina

TRXR: Tioredoxina redutase

UFPB: Universidade Federal da Paraíba

WBC: Leucócitos

WHO: Organização mundial de saúde

VE: Ventrículo esquerdo

VLDL: Lipoproteína de muito baixa densidade

VO: Via oral

VSMCs: Células de músculo liso vascular

XO: Xantina oxidase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REFERENCIAL TEÓRICO	28
2.1	ENVELHECIMENTO DA POPULAÇÃO	28
2.2	ENVELHECIMENTO BIOLÓGICO COMO ALVO MOLECULAR	30
2.3	SENESCÊNCIA CELULAR E OS CAMINHOS DO ENVELHECIMENTO	33
2.4	O PAPEL DAS EROS NO ENVELHECIMENTO	36
2.5	ENVELHECIMENTO - IMPLICAÇÕES NO SISTEMA CARDIOVASCULAR	41
2.6	MODELO DE ENVELHECIMENTO ACELERADO POR D-(+)-GALACTOSE	45
2.7	O PAPEL DOS TERPENOS COMO GEROPROTETORES	47
2.8	UM NOVO HORIZONTE PARA O TERPINOLENE	50
3	OBJETIVOS	55
3.1	GERAL	55
3.2	ESPECÍFICOS	55
4	MATERIAL E MÉTODOS	57
4.1	ANIMAIS	57
4.2	SOLUÇÕES	57
4.3	ISOLAMENTO, CULTURA E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS AÓRTICA DE RATOS - RAECs	59
4.4	SCREENING DE 20 MONOTERPENOS	60
4.5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	61
4.5.1	<i>Determinação dos níveis de viabilidade celular</i>	<i>62</i>
4.5.2	<i>Determinação da senescência associada a atividade da β-galactosidase (S-β-gal)</i>	<i>63</i>
4.5.3	<i>Determinação de Espécie Reativas de Oxigênio (EROs)</i>	<i>64</i>
4.6	INVESTIGAÇÃO DA TAXA DE APOPTOSE EM RAECs APÓS TRATAMENTO COM TERPINOLENE (TPO) EM MODELO DE SENESCÊNCIA CELULAR INDUZIDO POR D-(+)-GALACTOSE	64
4.6.1	<i>Delineamento experimental</i>	<i>64</i>
4.6.2	<i>Estudo sobre apoptose celular</i>	<i>65</i>
4.7	AVALIAÇÃO DO EFEITO CRÔNICO COM TERPINOLENE (TPO) EM MODELO DE ENVELHECIMENTO ACELERADO INDUZIDO POR D-(+)-GALACTOSE	65
4.7.1	<i>Delineamento experimental</i>	<i>65</i>
4.7.2	<i>Avaliação do peso corpóreo dos animais durante o tratamento</i>	<i>66</i>
4.7.3	<i>Medida de pressão arterial sistólica (PAS) e frequência cardíaca (FC)</i>	<i>67</i>
4.7.4	<i>Coleta e manipulação do sangue</i>	<i>67</i>
4.7.5	<i>Coleta e manipulação dos órgãos</i>	<i>68</i>
4.7.6	<i>Ensaio bioquímicos</i>	<i>68</i>
4.7.7	<i>Medidas do tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcial ativado</i>	<i>69</i>
4.7.8	<i>Medidas de agregação plaquetária</i>	<i>69</i>
4.7.9	<i>Reatividade vascular</i>	<i>69</i>

4.7.10	<i>Análise das EROs vascular em aorta torácica de ratos</i>	70
4.7.11	<i>Avaliação dos parâmetros eletrocardiográficos (ECG)</i>	71
4.7.12	<i>Avaliação do índice de hipertrofia cardíaca</i>	71
4.8	ANÁLISE DE DADOS	72
5	RESULTADOS	74
5.1	PADRONIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL	74
5.1.1	<i>Ensaio de MTT</i>	74
5.1.2	<i>Ensaio da β-Galactosidase</i>	75
5.1.3	<i>Ensaio de DHE</i>	76
5.2	SCREENING DE 20 TERPENOS EM MODELO DE CÉLULA SENESCENTE INDUZIDA POR D-(+)-GALACTOSE	78
5.2.1	<i>Ensaio de MTT</i>	78
5.2.2	<i>Ensaio da β-Galactosidase</i>	80
5.2.3	<i>Ensaio de DHE</i>	82
5.3	INVESTIGAÇÃO DA TAXA DE APOPTOSE EM RAECS PELO TERPINOLENE (TPO)	85
5.3.1	<i>Análise da taxa de apoptose</i>	85
5.4	CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DO TERPINOLENE (TPO) EM RATOS TRATADOS POR OITO SEMANAS EM MODELO DE ENVELHECIMENTO ACELERADO PELO AÇÚCAR D-(+)-GALACTOSE	87
5.4.1	<i>Avaliação do peso corpóreo, pressão arterial sistólica e frequência cardíaca</i>	87
5.4.2	<i>Avaliação do perfil bioquímico</i>	88
5.4.3	<i>Avaliação do perfil hematológico</i>	93
5.4.4	<i>Avaliação sobre a coagulação e função plaquetária</i>	94
5.4.5	<i>Avaliação sobre a reatividade vascular</i>	96
5.4.6	<i>Quantificação de EROs em artérias de aorta</i>	99
5.4.7	<i>Avaliação da função cardíaca pelo eletrocardiograma (ECG)</i>	101
5.4.8	<i>Avaliação do índice de hipertrofia cardíaca</i>	102
6	DISCUSSÃO	105
7	CONCLUSÃO	115
8	PERSPECTIVAS	118
	REFERÊNCIAS	120
	ANEXO I	134
	ANEXO II	135
	ANEXO III	141
	APENDICE I	142
	APENDICE II.....	143
	APENDICE III.....	144
	APENDICE IV	145

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A expectativa de vida da população brasileira e mundial vem crescendo ao longo do tempo, consequentemente, o percentual de idosos na população, sendo a estimativa para 2050 que a população acima dos 60 anos de idade será de 22% pelo mundo (UN, 2015). No entanto, apesar desse aumento, não necessariamente os idosos desfrutam de uma qualidade de vida satisfatória. Várias doenças afetam essa parcela da população, sobretudo doenças as quais tem sua prevalência aumentada com a idade, como doenças cardiovasculares (DCVs), doenças neurodegenerativas e câncer (ALMEIDA; RIBEIRO; MEDEIROS, 2017; ROSER, 2021).

Entender a biologia do envelhecimento é fundamental na busca por estratégias a fim de manter a população saudável, sobretudo os idosos, fato que mitigaria o inchaço no sistema de saúde previsto para 2050. De fato, a própria biologia do envelhecimento é o principal fator de risco para o desenvolvimento das doenças da idade como as DCVs (DE ALMEIDA; REZENDE; DANTAS; SILVA *et al.*, 2020; DONATO; MORGAN; WALKER; LESNIEWSKI, 2015; NORTH; SINCLAIR, 2012). Assim, ferramentas que modulam a biologia do envelhecimento tem como finalidade, a diminuição na susceptibilidade do desenvolvimento de doenças em decorrência da idade.

Biologicamente, o envelhecimento é caracterizado por um declínio gradual das funções fisiológicas, a nível molecular, celular e tecidual (CAMPISI, 2020). Recentemente, pesquisadores elencaram vários fatores que estão relacionados com o envelhecimento, podendo ser alvo para ferramentas farmacológicas, popularmente conhecidos como “*Hallmarks of ageing*”, do inglês: os pontos chave do envelhecimento” (LÓPEZ-OTÍN; BLASCO; PARTRIDGE; SERRANO *et al.*, 2023). Dentre os mecanismos, o processo de senescência celular tem atraído atenção da comunidade científica pelo seu potencial clínico (CHAIB; TCHKONIA; KIRKLAND, 2022). Enquanto o acúmulo de células senescentes está relacionado com os aspectos deletérios da idade, a sua remoção do organismo tem sido levada a resultados promissores clinicamente na busca pelo envelhecimento saudável (CHAIB; TCHKONIA; KIRKLAND, 2022). Ademais, terapias que reduzam o estresse tecidual, como estresse oxidativo, inflamação, danos ao DNA e disfunção mitocondrial, podem

retardar o surgimento dessas células no organismo (CAMPISI, 2020; GASEK; KUCHEL; KIRKLAND; XU, 2021; TCHKONIA; PALMER; KIRKLAND, 2021).

O Brasil, país privilegiado por sua biodiversidade, apresenta amplo arsenal na busca por novos fármacos, sobretudo derivados de plantas. Dentre os produtos naturais, destacam-se os terpenoides, grupo de pequenas moléculas presente nos óleos essenciais de plantas aromáticas, com ampla variedade de ações biológicas (DE SOUSA; DAMASCENO; AMORATI; ELSHABRAWY *et al.*, 2023), incluindo ações cardioprotectivas, anti-inflamatórias, antitrombóticas e anticâncer (DANTAS; ALMEIDA; GONÇALVES; ARAÚJO *et al.*, 2022; DE SOUSA; DAMASCENO; AMORATI; ELSHABRAWY *et al.*, 2023; GONÇALVES; LIMA; DE ALMEIDA; DE ARRUDA *et al.*, 2023; KHALEEL; TABANCA; BUCHBAUER, 2018; RIBEIRO; PORTO; MENEZES; ANTUNES *et al.*, 2010). No entanto, os terpenos são raramente associados como geroprotetores, o que torna imperativa a necessidade de sua investigação como senoterapêuticos (PROSHKINA; PLYUSNIN; BABAK; LASHMANOVA *et al.*, 2020).

Portanto, o objetivo desse trabalho é avaliar o potencial efeito senoterapêutico de 20 terpenos e caracterizar o mecanismo de ação do mais promissor em modelos de envelhecimento cardiovascular *in vitro* e *in vivo*.

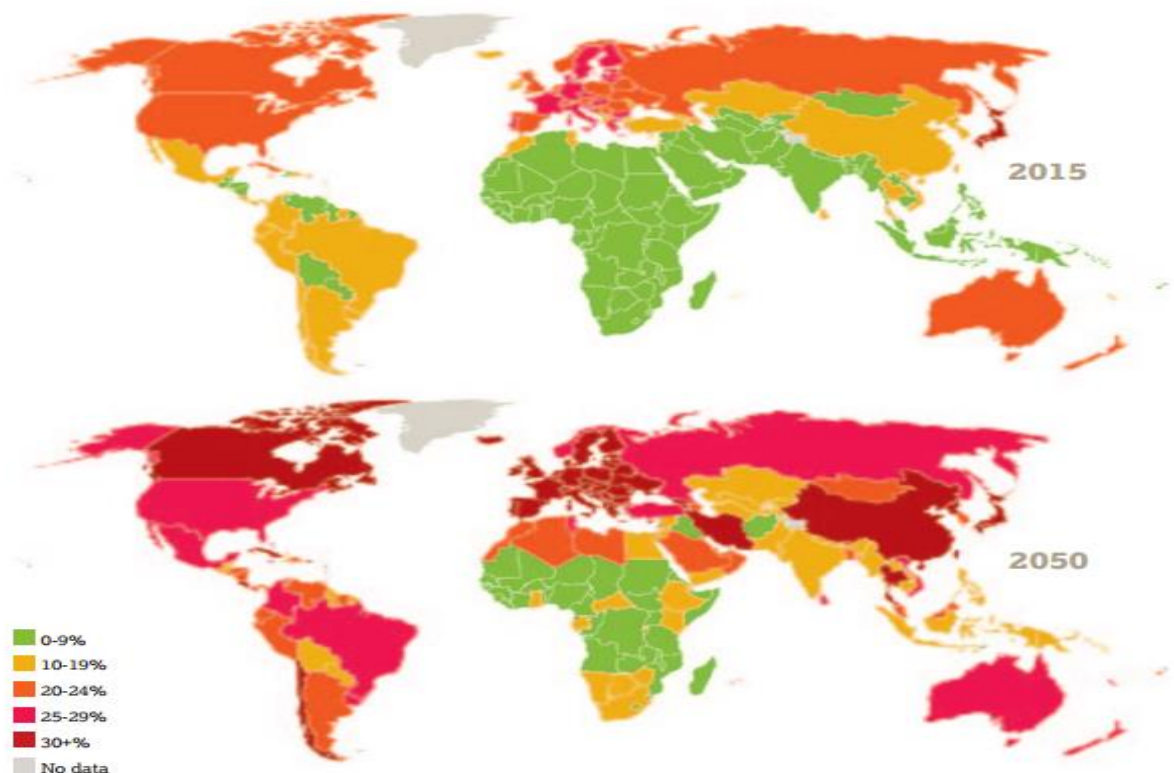
Referencial teórico

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ENVELHECIMENTO DA POPULAÇÃO

Segundo as Nações Unidas, a população mundial acima dos 60 anos crescerá exponencialmente nas próximas décadas, saindo de 12%, dados de 2015, para 22% em 2050 (UN, 2015). No Brasil, tal realidade é observada na figura abaixo, e caminha em paralelo com a expectativa global (Figura 1). Além de seus efeitos negativos sobre os custos para fundos de aposentadoria, o aumento da idade média vai amplificar o encargo econômico para os custos de saúde. Países em desenvolvimento como Brasil, Índia e China precisarão de 170 anos para se adequar a mudança na pirâmide etária, 20 anos a mais que os países desenvolvidos, como a França e os Estados Unidos (WHO, 2015).

Figura 1 - Um mundo envelhecido - População acima dos 60 anos, em 2015 e 2050

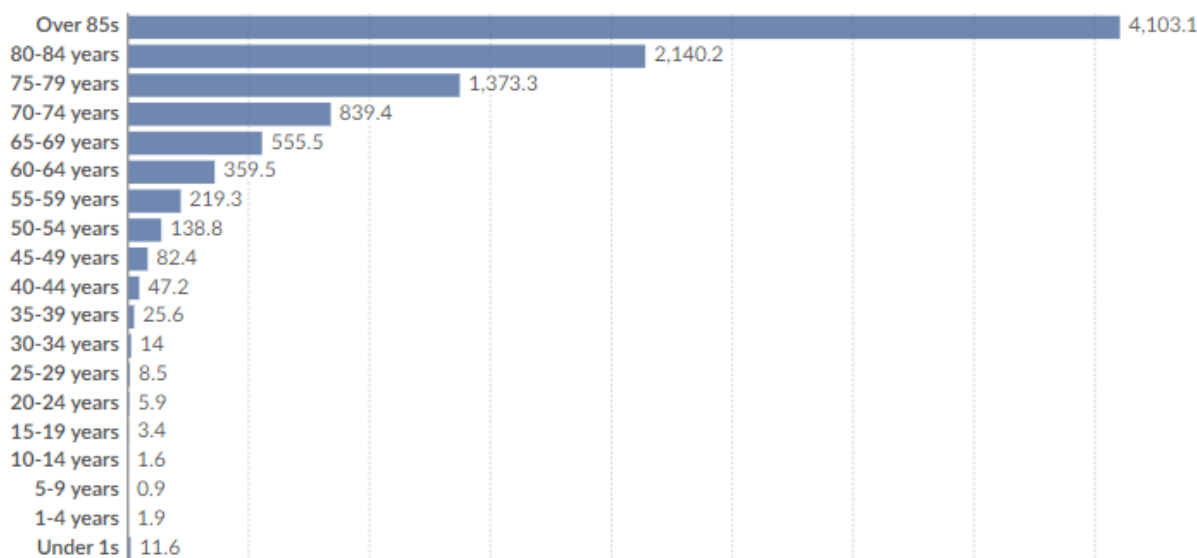


Legenda. Panorama da expectativa de vida média global em 2015 e 2050. No mundo, ~22% da população terá acima dos 60 anos. No Brasil, esse número chegara a ~28%, tornando o Brasil, um país envelhecido.

Fonte: Nações Unidas, 2015.

Entretanto, apesar do aumento da expectativa de vida da população, não necessariamente o indivíduo apresenta melhora na sua qualidade de vida. Estudos epidemiológicos mostram o próprio envelhecimento como principal fator de risco para o desenvolvimentos de doenças, mesmo na ausência de fatores de risco clássicos, como hipertensão e hipercolesterolemia. Doenças como câncer, diabetes, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares têm sua prevalência aumentada com a idade. Em 2019, 74% das mortes mundiais foram relacionadas com doenças não transmissíveis, destacando as doenças cardiovasculares (DCVs), responsáveis por 33% deste total (ROSER, 2021). No Brasil, em 2019, ano anterior à pandemia por COVID-19, a taxa de mortalidade por DCVs para cada 100.000 habitantes revela aumento exponencial para cada grupo etário, sobretudo a partir dos 60 anos de idade, sendo 359,5 mortes para faixa de 60-64 anos de idade, para 2.140,2 mortes para faixa de 80-84 anos de idade (Figura 2) (WHO, 2022).

Figura 2 - Taxa de mortalidade por DCVs por grupo no Brasil, 2019



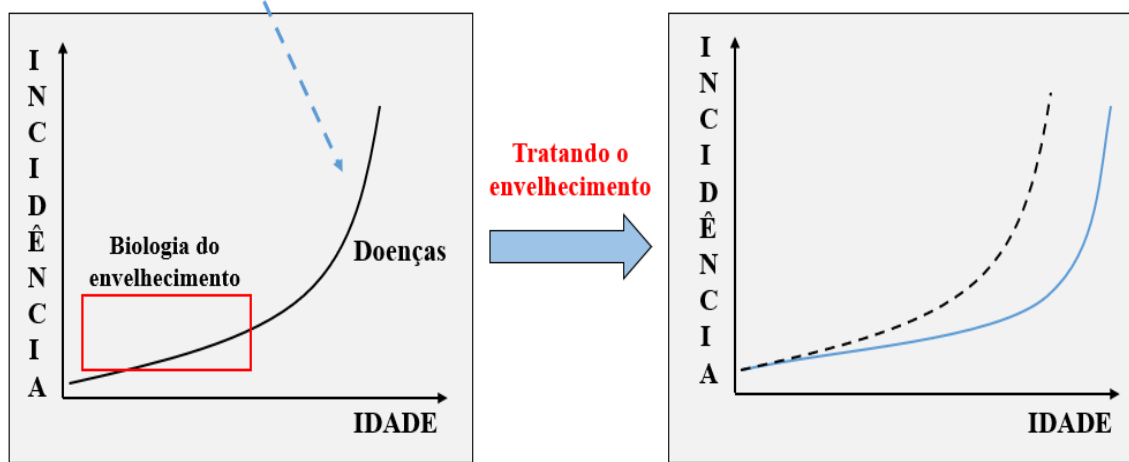
Legenda. O gráfico mostra a relação da taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares (DCVs) no Brasil por grupo etário em 2019. Dados relativos a 100.000 habitantes. Doenças cardiovasculares são doenças do coração e vasos sanguíneos, incluindo derrame e ataque cardíaco e arteriosclerose.

Fonte: (WHO, 2022).

Tal prevalência nos idosos deve-se à própria biologia do envelhecimento, aumentando a susceptibilidade do indivíduo ao desenvolvimento de doenças. Portanto, terapias que objetivem a biologia do envelhecimento, podem levar a uma diminuição na incidência dessas doenças em decorrência da idade, como as DCVs (Figura 3).

Figura 3 - Biologia do envelhecimento e a susceptibilidade para doenças

Isso não é coincidência!



Legenda. Os gráficos mostram a relação entre a incidência de doenças pela idade do indivíduo. Tal característica não é uma coincidência, o que pode ser explicado pela própria biologia do envelhecimento. Por outro lado, criar ferramentas farmacológicas para atuar sobre os mecanismos do envelhecimento, é uma estratégia fundamental para adiar o surgimento das doenças para o final da vida do indivíduo, mantendo-o saudável por grande parte de sua vida.

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

Portanto, ter a biologia do envelhecimento como alvo farmacológico deve proporcionar anos saudáveis de vida ao indivíduo, mantendo-o ativo para disfrutar da terceira idade. Além disso, tais terapias devem acelerar o aumento da expectativa de vida da população, porém, com saúde.

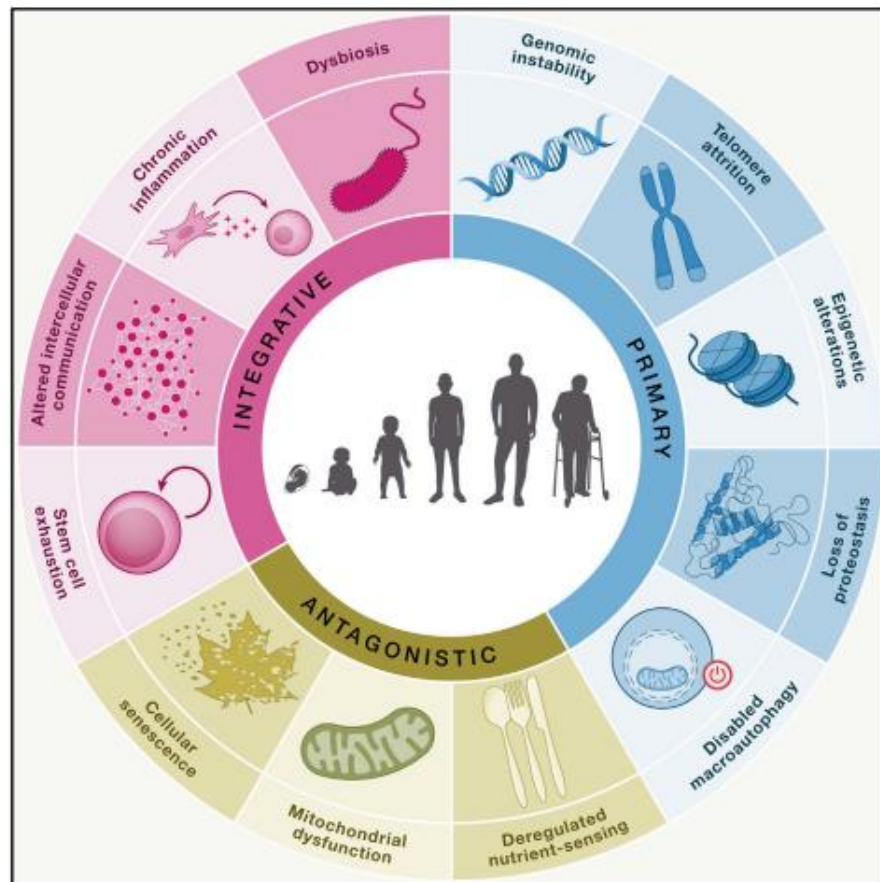
2.2 ENVELHECIMENTO BIOLÓGICO COMO ALVO MOLECULAR

O envelhecimento é um processo universal e multifatorial, caracterizado por um declínio gradual das funções fisiológicas, que ocorre a nível molecular, celular e

tecidual (ALMEIDA; RIBEIRO; MEDEIROS, 2017). Embora muitas teorias tenham sido propostas para explicar o processo de envelhecimento, nenhuma delas parece ser totalmente satisfatória, o que dificulta ainda mais a busca por ferramentas farmacológicas que desacelerem ou revertam esse processo (POGANIK; GLADYSHEV, 2023).

Em 2013, López-Otin e colaboradores elencaram vários biomarcadores a partir de critérios experimentais, os quais são conhecidos como “*Hallmarks of aging*”, ou simplesmente, pontos chave do envelhecimento. No total, nove biomarcadores foram selecionados, por se manifestar durante o processo de envelhecimento fisiológico, e sua disfunção experimental, causar o aceleração do envelhecimento, além de sua melhora experimental, causar a atenuação do envelhecimento (LÓPEZ-OTÍN; BLASCO; PARTRIDGE; SERRANO *et al.*, 2013). Em 2023, tais biomarcadores foram atualizados, com a adição de três novos biomarcadores (Figura 4) (LÓPEZ-OTÍN; BLASCO; PARTRIDGE; SERRANO *et al.*, 2023). Tais mecanismos atuam de forma integrada, e a disfunção de um dos mecanismos terá efeito deletério ao longo do tempo sobre os demais.

Figura 4 – Biomarcadores do envelhecimento biológico



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 na comunicação intercelular, inflamação crônica e disbiose. Tais mecanismos são agrupados em três categorias: primários, antagonísticos e integrativos.

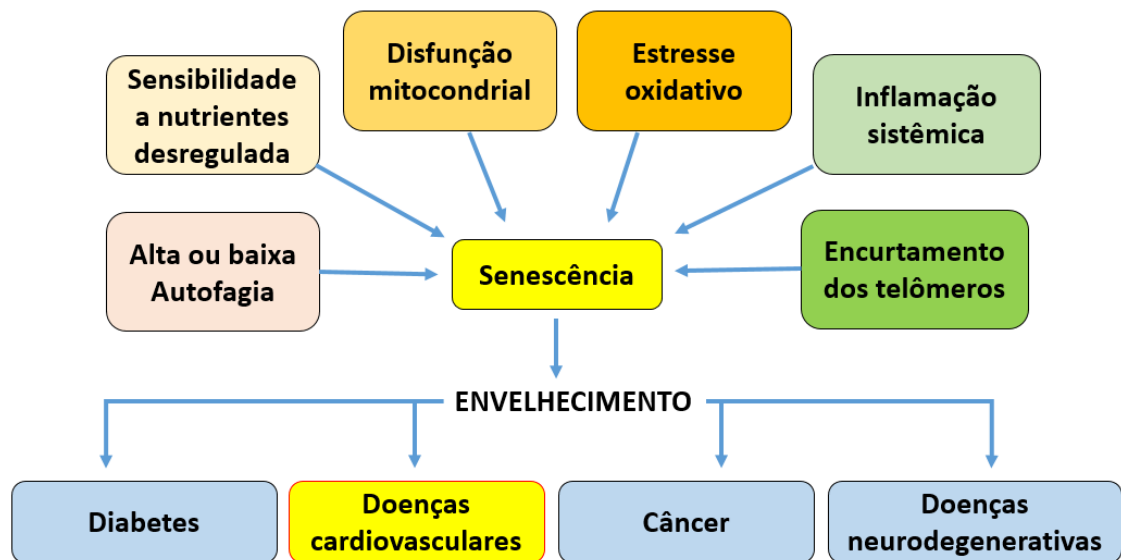
Fonte: (LÓPEZ-OTÍN; BLASCO; PARTRIDGE; SERRANO et al., 2023).

Os biomarcadores primários, são aqueles que se desenvolvem de forma espontânea com o decorrer do tempo e são essencialmente deletérios à função orgânica. Já os antagonistas, têm efeito contrário aos primários e são inicialmente benéficos dependendo da intensidade, no entanto, com o passar do tempo e o aumento da estimulação passam a ser deletérios ao organismo. E por fim, os biomarcadores integrativos, que são resultado dos efeitos supracitados ao longo do tempo, afetando diretamente a homeostase e a função de todos os tecidos (LÓPEZ-OTÍN; BLASCO; PARTRIDGE; SERRANO et al., 2013; 2023).

Além disso, a classificação proposta por LÓPEZ-OTIN e colaboradores leva em consideração aspectos moleculares, celulares e sistêmicos. A desregulação dos

aspectos moleculares leva a célula a um estado senescente, no qual contribuem para a perda da homeostase a nível fisiológico durante o envelhecimento, e consequentemente, sendo o caminho para as doenças associadas ao envelhecimento (Figura 5) (ALMEIDA; RIBEIRO; MEDEIROS, 2017; CAMPISI, 2020).

Figura 5 - Aspectos moleculares do envelhecimento e as doenças relacionadas com a idade



Legenda. No nível celular, o envelhecimento é caracterizado por um aumento de células senescentes no organismo, causado por vários fatores, incluindo estresse oxidativo, inflamação sistêmica, disfunção mitocondrial, sensibilidade desregulada aos nutrientes, disfunção autofágica e encurtamento dos telômeros. Os mesmos mecanismos que levam ao envelhecimento conduzem às doenças relacionadas à idade, em especial às doenças cardiovasculares, principal causa de morte no mundo.

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

2.3 SENESCÊNCIA CELULAR E OS CAMINHOS DO ENVELHECIMENTO

Senescência, comumente relacionada ao envelhecimento celular, é o estado celular no qual ocorre a interrupção do ciclo celular, mas é mantida sua atividade metabólica (CAMPISI, 2020). Células senescentes secretam uma variedade de agentes pró-inflamatórios como citocinas, interleucinas e fatores de crescimento, as quais são conhecidos como “fenótipo secretório associada à senescência” (SASP) (HERRANZ; GIL, 2018).

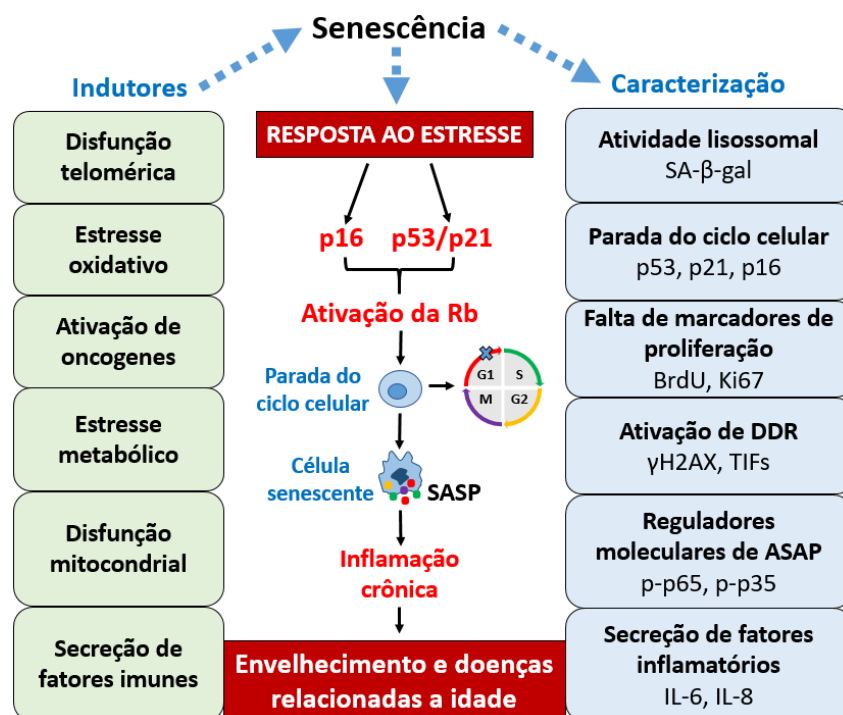
Vários fatores levam à senescência, e uma delas é a divisão celular, com encurtamento de telômeros, chamada senescência replicativa (DI MICCO; KRIZHANOVSKY; BAKER; D'ADDA DI FAGAGNA, 2021). A senescência também pode ser induzida por estresse, como estresse oxidativo e inflamação, levando a danos no DNA, ativação de oncogenes e mudanças na cromatina (BURTON; KRIZHANOVSKY, 2014; DE MAGALHÃES; PASSOS, 2018; DI MICCO; KRIZHANOVSKY; BAKER; D'ADDA DI FAGAGNA, 2021). Outra via que leva à senescência, é a disfunção mitocondrial, um processo que diminui o suprimento de energia celular, levando a célula a diminuir a sua atividade metabólica (AMORIM; COPPOTELLI; ROLO; PALMEIRA *et al.*, 2022; XIE; ZHANG; GAO; HUANG *et al.*, 2020). Além disso, a deficiência nas vias da autofagia também leva a célula à senescência através do acúmulo de "lixo" celular, que é tóxico para a célula (DIKIC; ELAZAR, 2018).

O estágio de senescência é controlado majoritariamente por duas vias principais: p53 / p21 e p16 / pRB (MIJIT; CARACCIOLO; MELILLO; AMICARELLI *et al.*, 2020). De modo geral, em resposta ao dano ao DNA (DDR), a p53 é estimulada e induz a expressão de p21, um inibidor de quinase dependente de ciclina (CDK). Em consequência da supressão da atividade de CDK, a proteína retinoblastoma (pRB) é ativada. A p16, outro inibidor de CDK, também impede a fosforilação de pRB, conduzindo à inativação de pRB (DI MICCO; KRIZHANOVSKY; BAKER; D'ADDA DI FAGAGNA, 2021). Assim, o pRB desempenha um papel central na senescência e a sua atividade é principalmente atribuída à sua capacidade de ligar e inativar fatores de transcrição da família E2F (fator E2), induzindo proteínas do ciclo celular e fatores de replicação do DNA necessários para o crescimento celular (LANIGAN; GERAGHTY; BRACKEN, 2011). Desta forma, há uma regulação recíproca entre a sinalização p53 / p21 e p16 / pRB, no entanto, estas vias podem induzir a senescência de forma independente (CAMPISI; D'ADDA DI FAGAGNA, 2007). De fato, células p16 positivas de ocorrência natural diminuem a duração da vida saudável em ratos (BAKER; CHILDS; DURIK; WIJERS *et al.*, 2016; XU; FU; LI; LIU *et al.*, 2021).

Morfologicamente, as células senescentes são caracterizadas pelo aumento de seu volume e, se aderentes, adotam uma morfologia achatada (CAMPISI, 2013). Em 1995, Judith Campisi descobriu a atividade da enzima β -galactosidase, uma hidrolase lisossomal, que cliva resíduos terminais de β -d-galactose, em pH 4. Posteriormente, também revelou que as células senescentes contêm β -galactosidase, que pode ser

detectada em pH 6, ao contrário das células jovens que apresentam a enzima apenas em pH 4 (DIMRI; LEE; BASILE; ACOSTA *et al.*, 1995). Logo, passou a ser utilizada na detecção de senescência associada à atividade de β -galactosidase (SA- β -gal) em pH 6 (DEBACQ-CHAINIAUX; ERUSALIMSKY; CAMPISI; TOUSSAINT, 2009). Recentemente, vários marcadores moleculares foram desenvolvidos e sua associação com SA- β -gal é o padrão-ouro para confirmar a fase de senescência. Estes marcadores representam proteínas de paragem do ciclo celular (p16, p21, p53), falta de marcadores de proliferação (Ki67, BrdU), expressão de fatores de secreção (IL-6, IL-8), ativação de vias de regulação do fenótipo secretório (p-p65 ou p-p38), alterações na cromatina (HP1, Hira) e ativação da DDR (γ -H2AX, TIFs) (Figura 6) (MYLONAS; O'LOGHLEN, 2022).

Figura 6 - Senescência: indutores, caracterização e mecanismo de ação



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, consequentemente, a 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 β -galactosidase e, em associação com outros fatores característicos, constituem o padrão para sua caracterização.

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

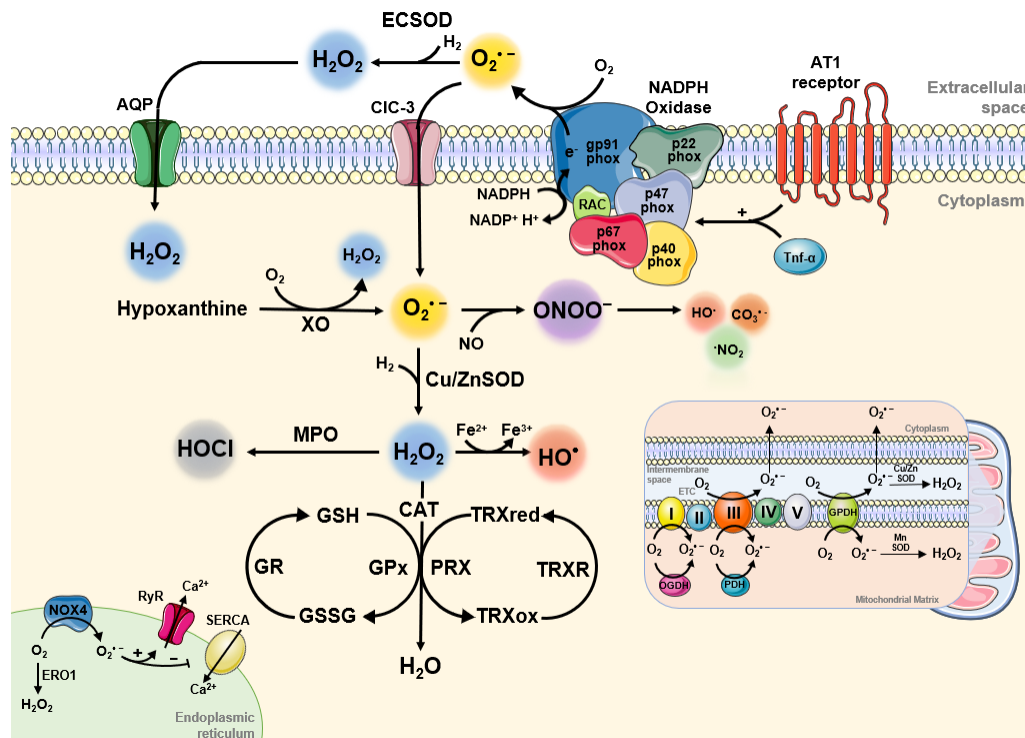
O aumento no número de células senescentes cardíacas, musculares, endoteliais e progenitoras endoteliais estão implicadas na disfunção cardiovascular, levando a progressão de várias doenças, como hipertensão, arteriosclerose, insuficiência cardíaca e derrame (CHILDS; BAKER; WIJSHAKE; CONOVER *et al.*, 2016; DE ALMEIDA; REZENDE; DANTAS; SILVA *et al.*, 2020; JIA; AROOR; JIA; SOWERS, 2019; MYLONAS; O'LOGHLEN, 2022). Portanto, terapias que objetivem retardar ou até mesmo reverter o processo de senescência têm sido propostas para o tratamento dessas doenças (OWENS; WALASZCZYK; SPYRIDOPOULOS; DOOKUN *et al.*, 2021; XIE; LOU; ZHANG, 2021; XU; FU; LI; LIU *et al.*, 2021).

2.4 O PAPEL DAS EROS NO ENVELHECIMENTO

As espécie reativas de oxigênio (EROs) são produzidas por todos os organismos vivos como resultado do metabolismo celular (SCHIEBER; CHANDEL, 2014). Apesar dos organismos apresentarem as suas próprias defesas antioxidantes (por exemplo, enzimas, proteínas e vitaminas), as EROs podem acumular-se com a idade devido à sua superprodução ou disfunção no sistema antioxidante, levando ao estágio de “estresse oxidativo” (DE ALMEIDA; DE OLIVEIRA; PONTES; JÚNIOR *et al.*, 2022; SIES; BERNDT; JONES, 2017).

Há várias fontes de EROs intracelular, como as mitocôndrias e a NADPH oxidase (DE ALMEIDA; REZENDE; DANTAS; SILVA *et al.*, 2020). Tais fontes tem a capacidade de produzir uma gama de moléculas com propriedades oxidantes, como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (RADI, 2018; SIES; JONES, 2020). Por outro lado, o equilíbrio basal nos níveis de ROS é mediado pela atividade de complexos enzimáticos e não-enzimáticos com a função de desintoxicação celular, chamados coletivamente de antioxidantes (Figura 7) (HALLIWELL, 2022). O fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf-2), um fator de transcrição, é o principal regulador do sistema enzimático antioxidante, pela indução da transcrição de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx) (HALLIWELL, 2024). De modo geral, este sistema é o principal mecanismo de defesa contra a produção de EROs.

Figura 7 - Visão geral esquemática da produção/eliminação de EROs



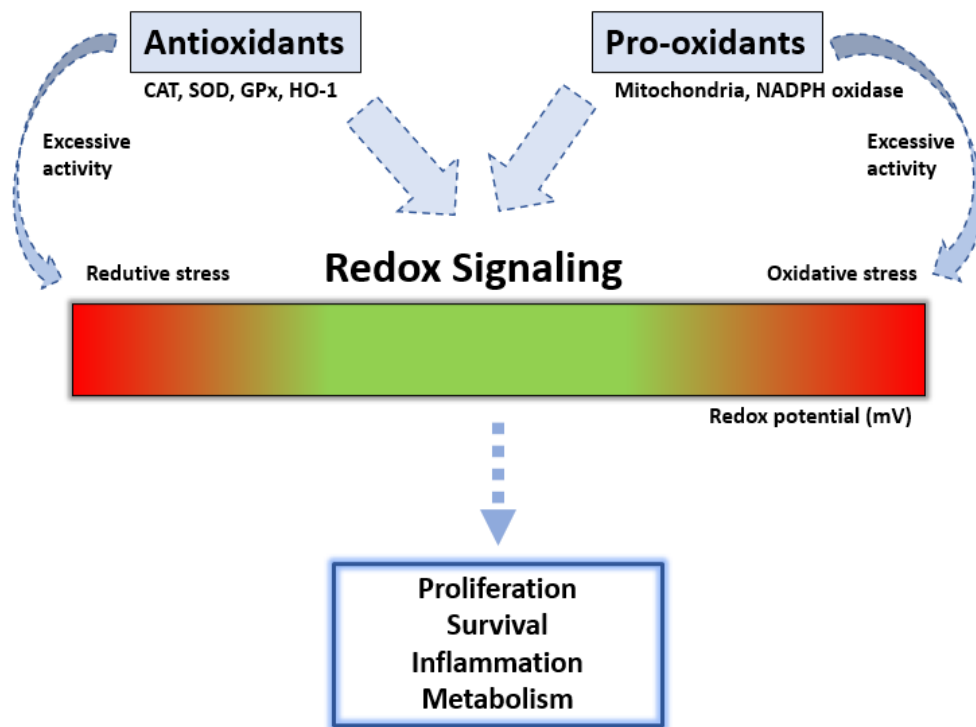
Legenda. Visão geral esquemática da produção/eliminação de EROs. Várias fontes são responsáveis por gerar ânions superóxido ($O_2^{\bullet-}$) citoplasmático, incluindo a NADPH oxidase, mitocôndria e xantina oxidase. Além disso, $O_2^{\bullet-}$ pode reagir com $\bullet NO$ para formar $ONOO^-$, cuja decomposição resulta na formação de algumas espécies muito reativas, como $\bullet OH$, $\bullet NO_2$ e $CO_3^{\bullet-}$. Entretanto, a isoforma citoplasmática Cu/ZnSOD pode atuar em $O_2^{\bullet-}$, produzindo H_2O_2 , o qual pode servir de substrato para MPO, formando $HOCl$, ou por CAT, GPx e peroxirredoxinas (PRX), formando H_2O . Ademais, através da reação de Fenton, o H_2O_2 é reduzido a $\bullet OH$, um radical altamente tóxico na presença de ferro. Nas mitocôndrias, os complexos I e III da cadeia de transporte de elétrons (ETC) são os principais locais de produção de oxidantes, com a produção de $O_2^{\bullet-}$ ocorrendo tanto no lado da matriz mitocondrial quanto no espaço intermembranoso das mitocôndrias. Outras fontes importantes de EROs incluem o retículo endoplasmático (RE), que impacta diretamente a sinalização do cálcio e a proteostase. Abreviaturas: NADPH oxidase (NOX); canal de cloreto-3 (CIC-3); xantina oxidase (XO); mieloperoxidase (MPO); oxidoredutina 1 do retículo endoplasmático (ERO1); receptores de rianodina (RyRs); Ca^{2+} -ATPase do retículo sarco/endoplasmático (SERCA); oxoglutarato desidrogenase (OGDH); complexo piruvato desidrogenase (PDH); fator de necrose tumoral α (Tnf- α); glutatona reduzida (GSH); glutatona oxidada (GSSG); glutatona redutase (GR); tioredoxina (TRX); e tioredoxina redutase (TRXR).

Fonte: (DE ALMEIDA; DE OLIVEIRA; PONTES; JÚNIOR *et al.*, 2022).

Denham Harman, em 1956, propôs a “teoria dos radicais livres do envelhecimento”, postulando que as EROs derivadas do metabolismo são os responsáveis pelos danos de macromoléculas como proteínas e nucleotídeos,

contribuindo para o declínio das funções fisiológicas durante o envelhecimento (HARMAN, 1956). No entanto, estudos recentes desafiam a teoria de Harman. Primeiro, porque muitas das EROs são consideradas moléculas de sinalização celular, controlando diversas funções como proliferação e metabolismo energético celular (SIES; JONES, 2020). Segundo, porque em várias espécies, as EROs apresentam efeito positivo sobre a longevidade, além de dietas antioxidantes diminuir a expectativa de vida desses animais (LAPOINTE; HEKIMI, 2010; SCIALÒ; SRIRAM; FERNÁNDEZ-AYALA; GUBINA *et al.*, 2016). Em terceiro, estudos clínicos com antioxidantes falharam em aumentar a longevidade e doenças em humanos (CONTI; IZZO; CORBI; RUSSOMANNO *et al.*, 2016; FORMAN; ZHANG, 2021; HALLIWELL, 2024; STEINHUBL, 2008). No entanto, é evidente a participação do estresse oxidativo na fisiopatologia de várias doenças, além do próprio envelhecimento, como revela vários biomarcadores do estresse oxidativo presente nessas condições, como aumento de dano em proteínas, lipídeos e DNA (SHIELDS; TRAA; VAN RAAMSDONK, 2021; SIES; BELOUSOV; CHANDEL; DAVIES *et al.*, 2022). Desse modo, as EROs parecem ter um duplo efeito. Inicialmente, como ativador de uma resposta compensatória homeostática que aumenta com a idade para manter a sobrevivência através da ativação de vários mecanismos de defesa, sobrevivência celular e, a partir de certo limite, como fator que ao invés de aliviar, agrava os danos associados ao envelhecimento (ALMEIDA; RIBEIRO; MEDEIROS, 2017; HEKIMI; LAPOINTE; WEN, 2011). Portanto, a manutenção dos níveis de EROs durante o envelhecimento pode levar a benefícios inerentes ao controle do destino celular (Figura 8) (DE ALMEIDA; DE OLIVEIRA; PONTES; JÚNIOR *et al.*, 2022; LENNICKE; COCHEMÉ, 2021).

Figura 8 - Níveis adequados de EROs controlam o destino celular por sinalização redox

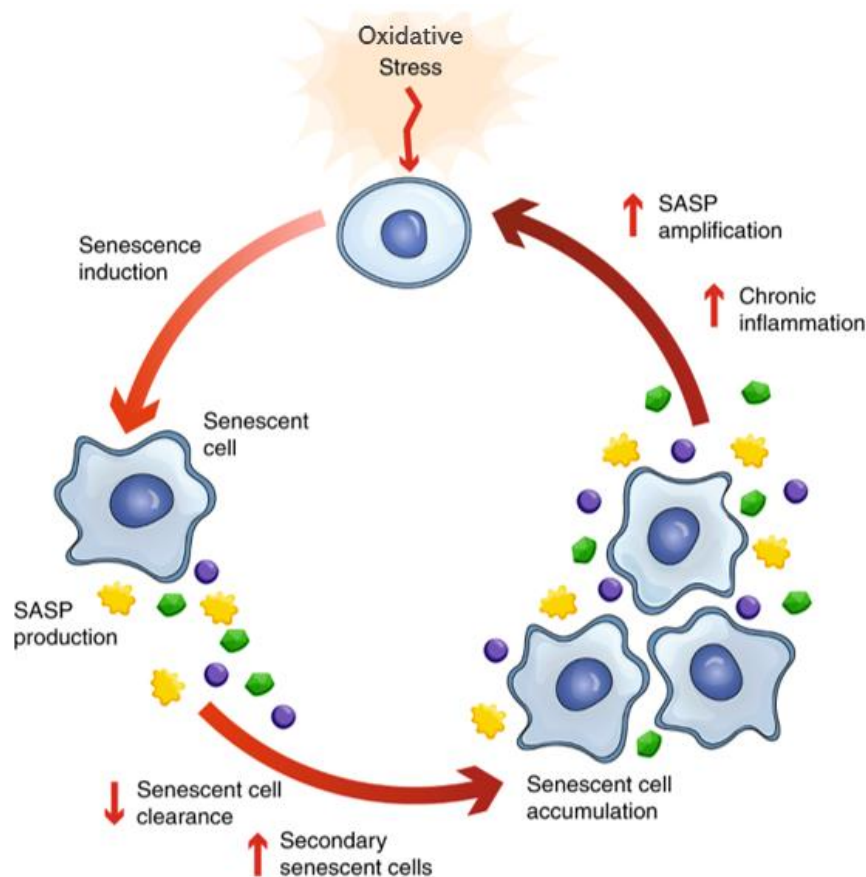


Legenda. As EROs em nível ideal controlam o destino das células por sinalização redox. O equilíbrio de pró-oxidantes e antioxidantes mantém as EROs numa zona segura para a célula. Porém, tanto o estresse redutor (excesso de atividades antioxidantes) quanto o oxidativo podem levar a célula à morte. Além disso, proliferação, sobrevivência, inflamação e metabolismo são algumas características controladas pela sinalização redox.

Fonte: (DE ALMEIDA; DE OLIVEIRA; PONTES; JÚNIOR *et al.*, 2022).

Um dos mecanismos mais característicos de sinalização mediada pelas EROs, reside no crosstalk entre o Nrf-2 (fator de transcrição para diversas enzimas antioxidantes) e o Nf-κB (fator de transcrição relacionado a transcrição de agentes pró-inflamatórios). A mudança na expressão de Nrf-2/Keap1 e Nf-κB é gradual e acompanha o curso do envelhecimento (Figura 9) (DE ALMEIDA; REZENDE; DANTAS; SILVA *et al.*, 2020). Além de atuarem individualmente na cascata de sinalização redox, ambos interagem entre si, orientando a comunicação entre estresse oxidativo e inflamação. De fato, durante o envelhecimento, ocorre uma perda progressiva da capacidade antioxidante e um aumento do processo de inflamação sistêmica pelo organismo (Figura 10) (DE ALMEIDA; REZENDE; DANTAS; SILVA *et al.*, 2020; SCHIEBER; CHANDEL, 2014).

Figura 9 - Estresse oxidativo induz ciclo de senescência patológico

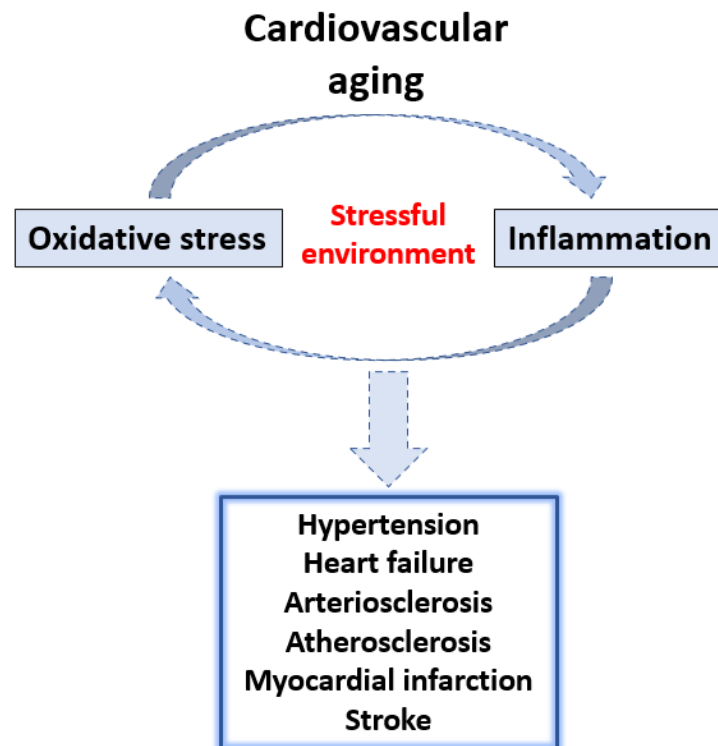


Legenda. A senescência celular é induzida após a exposição a um estresse inicial, como o estresse oxidativo. As células senescentes resultantes produzem um SASP que pode potencializar ainda mais o acúmulo de células senescentes e prejudicar a depuração. Por sua vez, o SASP pode ser amplificado, provocando um ambiente de inflamação crônica, os quais podem ser indutores de senescência que conduzem um ciclo de retroalimentação positiva para acumulação de células senescentes.

Fonte: (GASEK; KUCHEL; KIRKLAND; XU, 2021).

Os idosos são mais suscetíveis a este processo. Órgãos como o coração, que tem uma taxa de replicação limitada e altos níveis de consumo de oxigênio, são particularmente mais sensíveis a esse fenômeno, o que explica, em parte, uma alta prevalência de doenças cardiovasculares no envelhecimento (CERVANTES GRACIA; LLANAS-CORNEJO; HUSI, 2017; DE ALMEIDA; REZENDE; DANTAS; SILVA *et al.*, 2020; NORTH; SINCLAIR, 2012).

Figura 10 - Envelhecimento cardiovascular: *crosstalk* entre estresse oxidativo e inflamação



Legenda. Envelhecimento e DCV. O envelhecimento cardíaco e arterial é caracterizado por um ambiente estressante para as células, derivado, pelo menos em parte, dos elevados níveis de estresse oxidativo e inflamação crônica. O crosstalk entre eles é um ciclo vicioso e gradual, que acompanha o curso do envelhecimento. Essas alterações estão implicadas no desenvolvimento de DCVs, como hipertensão, insuficiência cardíaca, arteriosclerose, aterosclerose, infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral.

Fonte: (DE ALMEIDA; REZENDE; DANTAS; SILVA *et al.*, 2020).

2.5 ENVELHECIMENTO - IMPLICAÇÕES NO SISTEMA CARDIOVASCULAR

O envelhecimento cardiovascular é definido como uma degeneração progressiva dependente da idade, o que torna o coração e os vasos mais vulneráveis ao estresse, contribuindo para o aumento da mortalidade e morbidade (CHIAO; RABINOVITCH, 2015; DONATO; MACHIN; LESNIEWSKI, 2018; UNGVARI; TARANTINI; DONATO; GALVAN *et al.*, 2018).

No envelhecimento cardíaco, ocorre aumento significativo da hipertrofia ventricular esquerda, mesmo na ausência de doenças como hipertensão, devido ao processo fibrótico e perda da elasticidade ventricular (DAI; CHEN; JOHNSON; SZETO *et al.*, 2012; XIE; XU; DENG; TANG, 2023). No entanto, a fração de ejeção ventricular esquerda está preservada durante o envelhecimento cardíaco (PANENI; DIAZ CAÑESTRO; LIBBY; LÜSCHER *et al.*, 2017). Além disso, taxas reduzidas de recaptação de cálcio pela ATPase de cálcio do retículo sarcoplasmático miocárdico (SERCA) atrasam o relaxamento ventricular, exacerbando ainda mais o enchimento comprometido do ventrículo esquerdo (VE) no início da diástole (DAI; CHEN; JOHNSON; SZETO *et al.*, 2012). Para manter o enchimento do VE, a contração atrial aumenta gradualmente com o envelhecimento, o que também aumenta a pressão atrial e contribui negativamente para a hipertrofia atrial e para um risco aumentado de fibrilação atrial (MESQUITA; ZHANG; DE COUTO; VALLE *et al.*, 2020; PARIKH; HOLLINGSWORTH; WALLACE; BLAMIRE *et al.*, 2016). Portanto, uma parcela maior do enchimento sanguíneo do VE resulta do enchimento diastólico tardio, em oposição ao enchimento diastólico precoce, sendo clinicamente interpretado como uma indicação de disfunção diastólica (BELLO; NORTON; PETERSON; MMOPI *et al.*, 2020; OKURA; TAKADA; YAMABE; KUBO *et al.*, 2009).

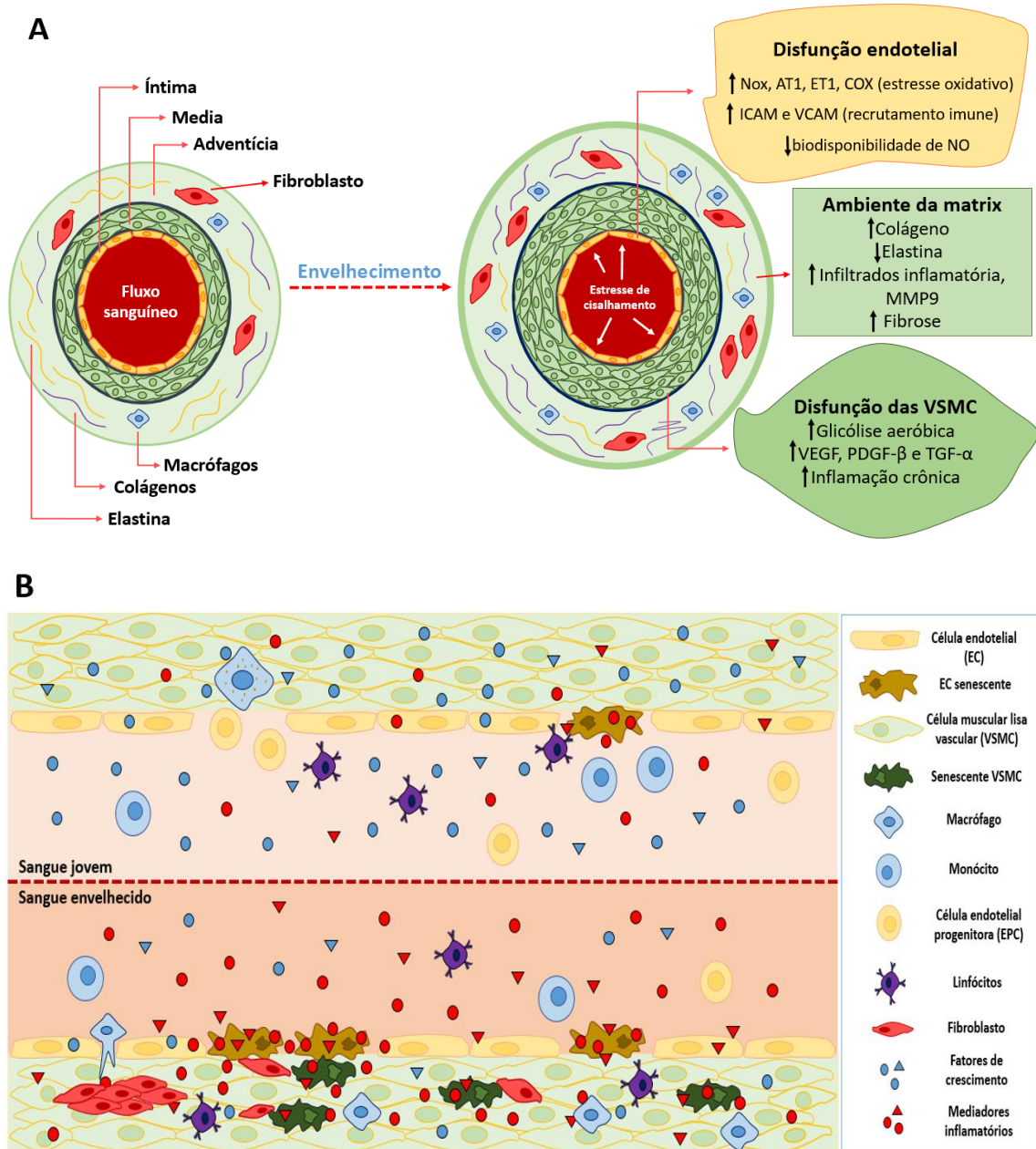
A fibrose, um dos principais determinantes do remodelamento cardíaco, é caracterizada pelo aumento da deposição de colágeno, resultando em aumento da rigidez miocárdica e, consequentemente, disfunção cardíaca (CHIAO; RABINOVITCH, 2015). Além disso, o acúmulo de células senescentes, o aumento da inflamação e do estresse oxidativo, e aumento do número de morte celular apoptótica dos miócitos são importantes determinantes do processo de envelhecimento, mediando a ocorrência na disfunção cardíaca no envelhecimento (ANDERSON; RICHARDSON; PASSOS, 2018; DONATO; MACHIN; LESNIEWSKI, 2018; DOOKUN; WALASZCZYK; REDGRAVE; PALMOWSKI *et al.*, 2020).

A nível vascular, o envelhecimento é associado ao espessamento da camada íntima e da camada média (remodelamento vascular), bem como à perda gradual da elasticidade arterial, resultando em rigidez vascular (ALGHATRIF; LAKATTA, 2015; PIERCE; COUTINHO; DUBOSE; DONATO, 2022; TRIPOSKIADIS; XANTHOPOULOS; BUTLER, 2019). Ademais, o aumento de colágeno e diminuição do conteúdo de elastina, além de proteínas glicosiladas aumentadas, atividade da metaloproteinases (MMPs) da matriz e estímulos sistêmicos como a sinalização da

angiotensina II, estão relacionados à rigidez vascular (Figura 11.A) (UNGVARI; TARANTINI; KISS; WREN *et al.*, 2018). As células endoteliais (ECs) envelhecidas e as células de músculo liso vascular (VSMCs) também mostram uma maior secreção de citocinas pró-inflamatórias, resultando em inflamação vascular persistente (FERRUCCI; FABBRI, 2018). De fato, o espessamento de artérias como a aorta, é um grande fator de risco para DCVs associadas a idade, visto a correlação existente entre o remodelamento aórtico e as DCVs (DONATO; MACHIN; LESNIEWSKI, 2018; TRIPOSKIADIS; XANTHOPOULOS; LAMPROPOULOS; BRIASOULIS *et al.*, 2023).

Um dos principais marcadores da função vascular é a produção de óxido nítrico (NO) (DONATO; MORGAN; WALKER; LESNIEWSKI, 2015; POURBAGHER-SHAHRI; FARKHONDEH; TALEBI; KOPUSTINSKIENE *et al.*, 2021). No vaso, a sua síntese é feita principalmente pela síntese de óxido nítrico endotelial (eNOS). No envelhecimento, ocorre diminuição da expressão da eNOS, e consequentemente, uma diminuição da produção de NO (UNGVARI; TARANTINI; KISS; WREN *et al.*, 2018). Além disso, o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) leva inativação do NO, com a formação de peroxinitrito (ONOO^-), sendo um mecanismo importante envolvido na diminuição do relaxamento do vaso dependente do endotélio (ALMEIDA; RIBEIRO; MEDEIROS, 2017; BLOOM; ISLAM; LESNIEWSKI; DONATO, 2023). Ademais, a senescência endotelial está relacionada com eventos pró-coagulantes, pró-oxidantes, pró inflamatórios com infiltração anormal de células imunes e alterações no metabolismo da glicose (HAN; KIM, 2023). Com o processo de exaustão de células tronco e imunosenescência no envelhecimento, linhagens regenerativas como as células endoteliais progenitoras (EPCs) estão diminuídas na circulação, acarretando o agravamento da homeostase vascular. Células do sistema imune também estão disfuncionais e sem a depuração de células senescentes pelo sistema imune, ocorre um aumento das células senescentes nesses tecidos (Figura 11.B) (ALMEIDA; RIBEIRO; MEDEIROS, 2017; DE ALMEIDA; REZENDE; DANTAS; SILVA *et al.*, 2020; XU XIANGLAI, 2017). As células endoteliais têm importância fundamental no desenvolvimento do remodelamento vascular, sendo a disfunção endotelial alvo de terapias contra DCVs, tais como hipertensão, aterosclerose e insuficiência cardíaca (CLAYTON; HUTTON; BRUNT; VANDONGEN *et al.*, 2021; DONATO; MORGAN; WALKER; LESNIEWSKI, 2015; JIA; AROOR; JIA; SOWERS, 2019; XIE; LOU; ZHANG, 2021).

Figura 11 - Envelhecimento vascular e sua influência sistêmica



Legenda. Comparação vascular entre jovens e idosos em duas perspectivas diferentes. A) O envelhecimento vascular está associado a modificações críticas da parede vascular, como disfunção endotelial e aumento da espessura e rigidez arterial. A disfunção endotelial inclui redução das propriedades vasodilatadoras e antitrombóticas, com aumento do estresse oxidativo e de citocinas inflamatórias. A rigidez arterial central está relacionada à perda de fibras elásticas e ao aumento do acúmulo de colágeno na parede do vaso, o que deteriora a funcionalidade vascular. A disfunção endotelial e a rigidez arterial são mediadores intimamente ligados à disfunção vascular durante o envelhecimento. B) No sangue jovem, há predominância de fatores de crescimento, além de células saudáveis de imunidade e células progenitoras que conduzem à “limpeza” e regeneração vascular, respectivamente. No sangue envelhecido verifica-se que há predomínio de fatores pró-inflamatórios, liberados em grande parte pelas células senescentes. As células senescentes acumulam-se com a

idade devido a constantes estímulos estressores, além da falha do sistema imunitário, um termo conhecido como imunosenescência.

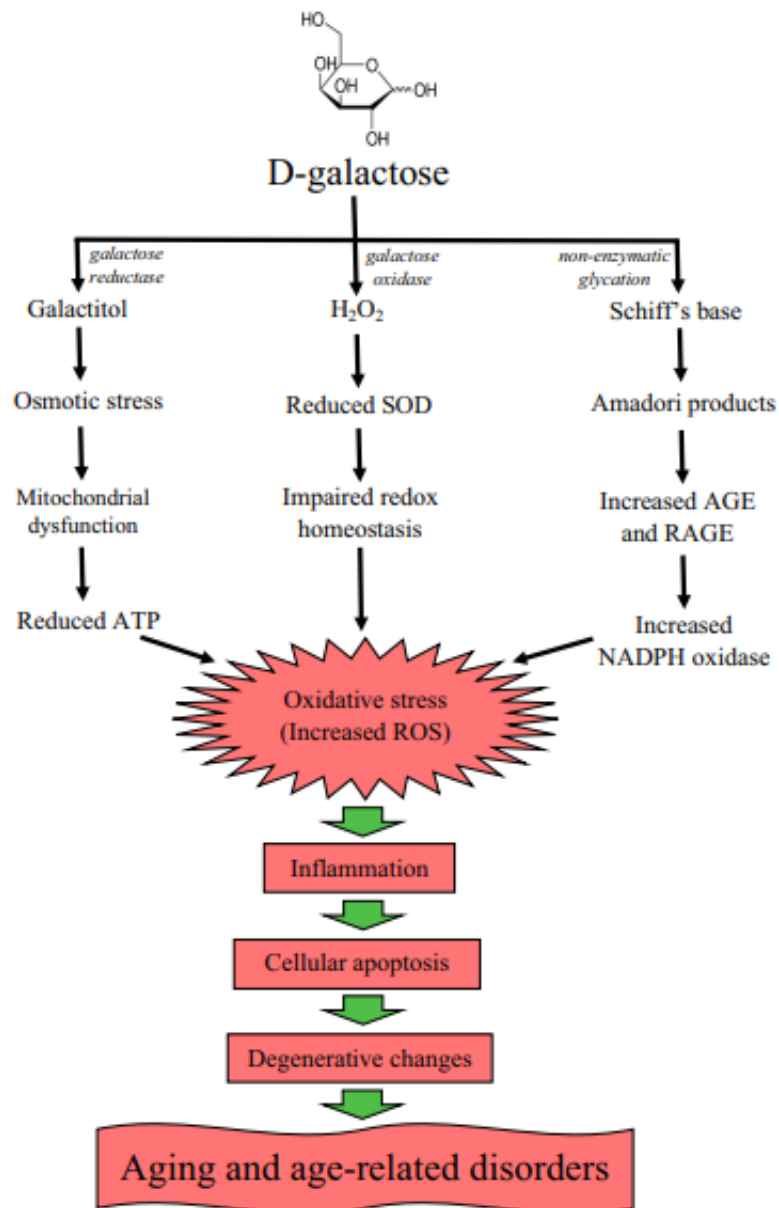
Fonte: (ALMEIDA; RIBEIRO; MEDEIROS, 2017).

2.6 MODELO DE ENVELHECIMENTO ACELERADO POR D-(+)-GALACTOSE

A biologia do envelhecimento como alvo de pesquisa no campo da fisiologia e farmacologia apresenta uma série de desafios éticos e, sobretudo, cronológico. Enquanto alguns organismos vivem dias como *Caenorhabditis Elegans* (14 dias) e *drosophila melanogaster* (~75 dias), outros podem viver anos, como *Heterocephalus glaber* (>30 anos), ratos (~48 meses), camundongos (~48 meses), macacos (~40 anos) e humanos (~100 anos).

Modelos experimentais de envelhecimento acelerado vem sendo propostos para suprir a demanda dos estudos relacionados ao envelhecimento, principalmente para o uso em espécies de alta longevidade. Nesse contexto, destaca-se o modelo acelerado de envelhecimento induzido pelo açúcar D-(+)-galactose (Dgal). Tal modelo baseia-se na teoria do estresse metabólico, o qual é capaz de mimetizar vários aspectos do envelhecimento fisiológico, como disfunção mitocondrial, inflamação sistêmica, disfunção telemétrica, instabilidade gênica e senescência celular. Ademais, o envelhecimento acelerado por Dgal tem por característica a grande produção de EROs, o que explica, pelo menos em parte, o mecanismo pelo qual o Dgal acelera o processo de envelhecimento (Figura 12) (AZMAN; ZAKARIA, 2019).

Figura 12 - Modelo de envelhecimento acelerado por D-(+)-galactose



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. Consequentemente, aumento nos níveis de inflamação, apoptose, senescência, resultando em um fenótipo envelhecido.

Fonte: (AZMAN; ZAKARIA, 2019).

A nível molecular, o efeito do Dgal assemelha aos aspectos encontrados no envelhecimento fisiológico, sobretudo no sistema cardiovascular. YU, H., e seus colegas caracterizaram o efeito do Dgal em células endoteliais, revelando aumento do número de células positivas para SA-β-galactosidase, aumento na expressão das proteínas p53, p16 e p21 (marcadores de parada do ciclo celular), de Tnf-α, IL-6, IL-

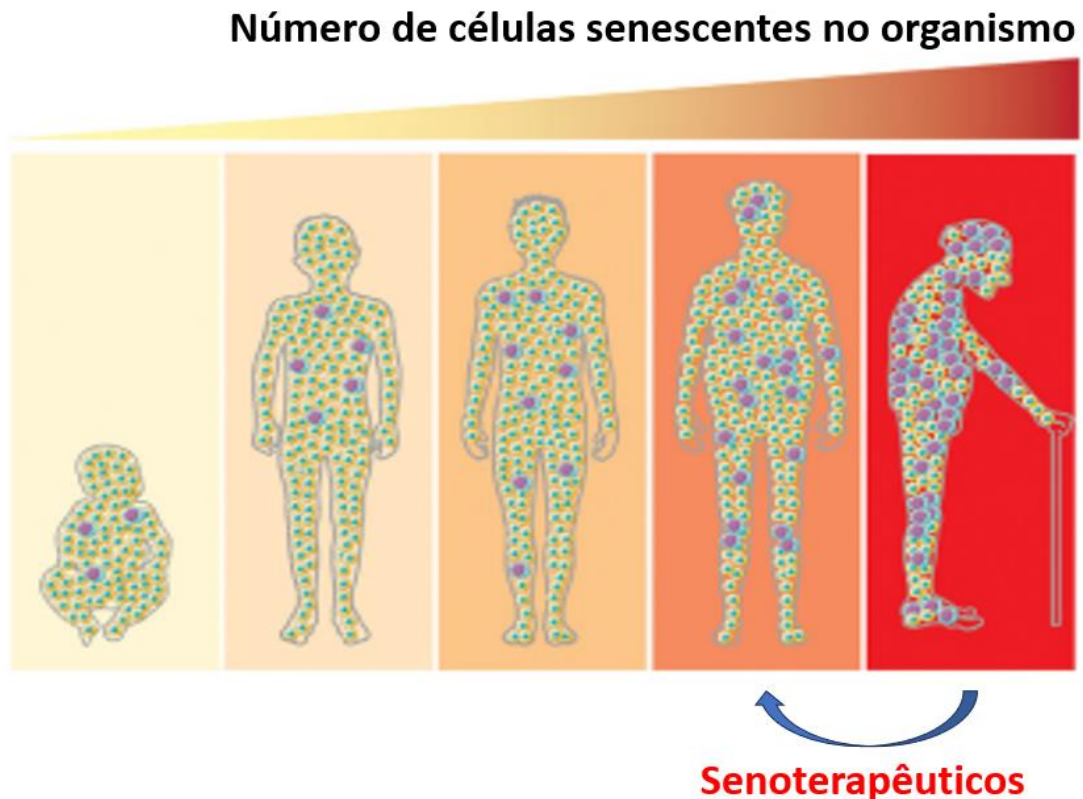
1 β (citocinas pró-inflamatórias), além de diminuir a expressão da eNOS (responsável pela síntese de óxido nítrico) e liberação de NO (óxido nítrico) (YU; LIAO; HU; LV *et al.*, 2022). Resultados semelhantes foram encontrados por LEE e colaboradores, com o aumento dos marcadores de senescência endotelial. Além disso, LEE, G.H., mostrou a capacidade do Dgal em induzir aumento nos níveis de EROs citoplasmáticos e mitocondriais, diminuição da razão entre NAD⁺/NADH e atividade reduzida da família de enzimas Sirtuins (responsável pela proteção do DNA) (LEE; HOANG; JUNG; JUNG *et al.*, 2020).

Sob o sistema cardiovascular, o Dgal é descrito por gerar disfunção endotelial em microvasos, e em artérias de condutância como a aorta. Além disso, é capaz de gerar remodelamento em órgãos vitais como coração, rins e fígado (AZMAN; SAFDAR; ZAKARIA, 2021; EL-FAR; LEBDA; NORELDIN; ATTA *et al.*, 2020; WANG; ZHANG; KE; WEN *et al.*, 2022). Recentemente, Rezende e colaboradores revelou que o tratamento com Dgal por 8 semanas é capaz de gerar disfunção erétil, por aumentar o conteúdo de SA- β -gal no tecido peniano, elevar os níveis de EROs e diminuir o relaxamento frente a acetilcolina (REZENDE; ALMEIDA; GONÇALVES; AZEVEDO *et al.*, 2021).

2.7 O PAPEL DOS TERPENOS COMO GEROPROTETORES

Atualmente, a biologia do envelhecimento vem sendo alvo para terapias a fim de promover o envelhecimento saudável. Tais terapias objetivam a redução no número de células senescentes presentes no organismo, sobretudo em idosos e indivíduos de média idade (Figura 13).

Figura 13 - Senescência e a promessa dos senoterapêuticos

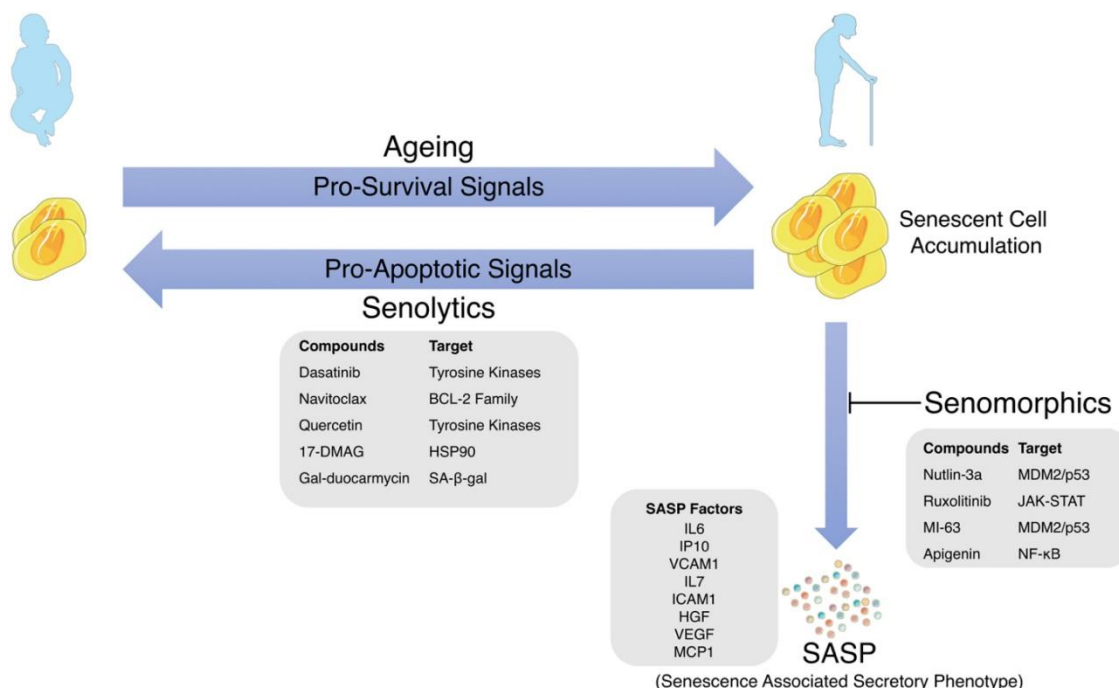


Legenda. Número de células senescentes e o envelhecimento. Células senescentes acumulam ao longo do tempo, tanto senescência replicativa quanto senescência prematura derivada de estresses. Os senoterapêuticos surgem como promessa para reduzir o número dessas células do organismo.

Fonte: Adaptado de (BORGHESAN; HOOGAARS; VARELA-EIRIN; TALMA *et al.*, 2020).

Após a descoberta dos primeiros senolíticos por James Kirkland e seu grupo, na Mayo Clinic, Minesota, EUA (ZHU; TCHKONIA; PIRTSKHALAVA; GOWER *et al.*, 2015), o processo de senescência celular como alvo farmacológico tem atraído atenção, seja eliminando as células senescentes do organismo “senolíticos”, seja atuando na supressão dos fenótipos associados com a senescência sem a eliminação dessas células “senomórficos” (Figura 14) (CHAIB; TCHKONIA; KIRKLAND, 2022; KIRKLAND; TCHKONIA, 2020; TCHKONIA; PALMER; KIRKLAND, 2021). Além disso, os senoterapêuticos têm sido empregadas na prevenção e no tratamento de DCVs associadas ao envelhecimento (WALASZCZYK; DOOKUN; REDGRAVE; TUAL-CHALOT *et al.*, 2019). Enquanto os primeiros senoterapêuticos passam por testes clínicos, como o Desatinib, a Quercetina e o Fisetin, a comunidade científica busca por novos candidatos a senoterapêuticos.

Figura 14 - Mecanismo de ação dos senoterapêuticos



Legenda. Representação esquemática entre senescência celular e envelhecimento. As células senescentes podem ser alvos para duas classes de fármacos, os senolíticos, os quais ativam mecanismos pró-apoptóticos específicos para as células senescentes, e os senomórficos, os quais regulam o secretoma associado ao fenótipo senescente, permitindo a atenuação da inflamação associada.

Fonte: (THOPPIL; RIABOWOL, 2020).

Dentre os produtos naturais, destacam-se os terpenos, grupo de pequenas moléculas presente na dieta mediterrânea, com ampla variedade de ações biológicas (DE SOUSA; DAMASCENO; AMORATI; ELSHABRAWY et al., 2023). Os hidrocarbonetos terpênicos têm uma fórmula molecular de $(C_5H_8)_n$; sendo n , uma unidade de isopreno de cinco carbonos ($CH_2C(CH_3)CHCH_2$), o bloco de construção dos terpenos. Portanto, os hidrocarbonetos terpênicos são classificados de acordo com o número de unidades de isopreno (C_5): hemiterpenos (C_5), monoterpenos (C_{10}), Sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), sesterterpenes (C_{25}), triterpenos (C_{30}) e carotenoides (C_{40}). Em destaque, para os monoterpenos e sesquiterpenos (PERVEEN, 2018).

Os terpenos apresentam efeitos biológicos benéficos, incluindo ações cardioprotectivas, anti-inflamatórias, antitrombóticas e anticâncer (DANTAS; ALMEIDA; GONÇALVES; ARAÚJO et al., 2022; DE SOUSA; DAMASCENO; AMORATI; ELSHABRAWY et al., 2023; GONÇALVES; LIMA; DE ALMEIDA; DE

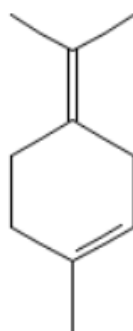
ARRUDA *et al.*, 2023; KHALEEL; TABANCA; BUCHBAUER, 2018; RIBEIRO; PORTO; MENEZES; ANTUNES *et al.*, 2010). Particularmente sob o sistema cardiovascular, os terpenos como carvacrol, geraniol e α -terpineol tem se notabilizado por suas ações protetoras a nível vascular e cardíaca (DANTAS; ALMEIDA; GONÇALVES; ARAÚJO *et al.*, 2022; EL-BASSOSSY; GHALEB; ELBERRY; BALAMASH *et al.*, 2017; GONÇALVES; LIMA; DE ALMEIDA; DE ARRUDA *et al.*, 2023; RIBEIRO; PORTO; MENEZES; ANTUNES *et al.*, 2010).

Os terpenos apresentam características físico-químicas essenciais para o desenvolvimento de novos medicamentos, aromas e fragrâncias, estimulando o recente interesse da indústria farmacêutica, sobretudo com o desenvolvimento de nutracêuticos (DE SOUSA; DAMASCENO; AMORATI; ELSHABRAWY *et al.*, 2023). No entanto, os terpenos são raramente associados como geroprotetores, o que torna imperativo a necessidade de sua investigação como senoterapêuticos (PROSHKINA; PLYUSNIN; BABAK; LASHMANOVA *et al.*, 2020).

2.8 UM NOVO HORIZONTE PARA O TERPINOLENE

O Terpinolene (IUPAC: 1-methyl-4-propan-2-ylidenecyclohexene), é um monotерpeno monocíclico de baixo peso molecular (136,23 g/mol), não oxigenado, de forma molecular: C₁₀H₁₆ (Figura 15). Apresenta-se na forma líquida e incolor, cuja densidade é de 0.861 g/mL (25°C). O Terpinolene possui baixa solubilidade em água (9.5 mg/L a 25°C).

Figura 15 - Estrutura química do Terpinolene



Fonte: PubChem (Terpinolene | C₁₀H₁₆).

Suas características físico-químicas apresentam vantagens para o seu desenvolvimento como ferramenta farmacológica, inclusive por se enquadrar nas regras de Lipinski, e possuir alta biodisponibilidade por via oral (Tabela 1). Além disso, apresenta baixa toxicidade em in vivo, com DL50 em ratos de 4.390 mg/Kg (Terpinolene, 1976).

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas do Terpinolene

Características	Terpinolene
Peso molecular (g/mol)	136,23
Log P	3,40
Número de grupos doadores de hidrogênio	0
Número de grupos aceptores de hidrogênio	0
Violações de Lipinski	0
Administração oral	sim

Legenda. Parâmetros físico-químicos do Terpinolene.

O Terpinolene é encontrado em uma grande variedade de frutos, raízes e vegetais, com destaque para o alecrim (*Rosmarinus officianalis* L), na maçã (*Malus domestica*), da cherovia (*Pastinaca sativa*), além de várias espécies de pinheiros (*Pinus ssp.*) (Figura 16) (MENEZES; SCHERF; MARTINS; RAMOS *et al.*, 2021). Além disso, sua concentração está superior em plantas expostas a estímulos agressores externos, como grandes variações de temperatura, indicando um potencial efeito protetor do Terpinolene para essas plantas (MENEZES; SCHERF; MARTINS; RAMOS *et al.*, 2021). A ingestão de moléculas derivadas de plantas sob estresse está relacionada as ações protetoras, incluindo nos mecanismos da biologia do envelhecimento, conceito denominado de “*xenohormesis*” (BAUR; SINCLAIR, 2008). Interessantemente, o Terpinolene, assim como outros terpenos (ex. carvacrol, α -terpineol, timol), estão presentes na dieta mediterrânea, dieta rica em sementes, leguminosas, folhas e temperos derivados do reino vegetal (SCHWINGSHACKL; MORZE; HOFFMANN, 2020). Ademais, a dieta mediterrânea está relacionada com baixos índices de doenças cardiovasculares e metabólicas, sendo importante para alcançar um envelhecimento saudável (ANDREO-LÓPEZ; CONTRERAS-BOLÍVAR;

MUÑOZ-TORRES; GARCÍA-FONTANA *et al.*, 2023; SCHWINGSHACKL; MORZE; HOFFMANN, 2020).

Figura 16 - Fontes naturais do Terpinolene



Pinus spp.



Malus domestica
(maçã)



Rosmarinus officinalis L.
(Alecrim)



Pastinaca sativa
(Cherovia)

Legenda. Fontes naturais do Terpinolene. O Terpinolene pode ser encontrado na natureza em diversas fontes de origem vegetal, como hortaliças e frutos. Alguns dos exemplos dessas fontes são o alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*), na maçã (*Malus domestica*), da cherovia (*Pastinaca sativa*), além de várias espécies de pinheiros (*Pinus spp.*)

Até o presente momento, os estudos com Terpinolene são pouco robustos, no entanto, promissores (DE CHRISTO SCHERER; MARQUES; FIGUEIRA; PEISINO *et al.*, 2019; MENEZES; SCHERF; MARTINS; RAMOS *et al.*, 2021). Tais estudos se concentram em demonstrar o potencial antioxidante e anti-inflamatório do Terpinolene (DE CHRISTO SCHERER; MARQUES; FIGUEIRA; PEISINO *et al.*, 2019; MENEZES; DA SILVA; PESSOA; RAMOS *et al.*, 2023). Aydin e colaboradores demonstraram o

potencial anticâncer do Terpinolene em linhagem celular de neuroblastoma cerebral de rato (AYDIN; TÜRKEZ; TAŞDEMİR, 2013). Ademais, Grassmann e colegas demonstraram a capacidade do Terpinolene em prevenir a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), evento importante para o tratamento de doenças como aterosclerose e doença arterial coronariana (GRASSMANN; HIPPELI; SPITZENBERGER; ELSTNER, 2005). No entanto, não há evidências do Terpinolene como senoterapêutico.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar o efeito senoterapêutico de 20 terpenos e caracterizar o mecanismo de ação do mais promissor em modelos de envelhecimento cardiovascular *in vitro* e *in vivo*.

3.2 ESPECÍFICOS

Screening da eficácia de 20 terpenos em cultura de células endoteliais saudáveis e em modelo de envelhecimento acelerado:

- Avaliação da ação sobre a viabilidade celular
- Determinar o potencial anti-senescente
- Determinar a ação antioxidante
- Caracterizar o grau de apoptose do terpeno escolhido

Avaliação experimental *in vivo* de ratos submetidos ao modelo de envelhecimento acelerado:

- Avaliação sob o peso corpóreo
- Verificação da pressão arterial sistólica e frequência cardíaca
- Análise bioquímica e hematológica
- Avaliação da reatividade vascular
- Investigação da função e remodelamento cardíaco

Material e métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 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, mantidos no laboratório pré-clínico de envelhecimento do Instituto Paraibano de Envelhecimento da UFPB, sob condições controladas de temperatura (22 ± 1 °C), em um ciclo claro-escuro de 12 horas (6:00-18:00 horas) com livre acesso à água e alimentação (Nuvilab CR1®). Todos os experimentos desenvolvidos nesse estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da UFPB, com certidão N° 6267280422.

4.2 SOLUÇÕES

Quadro 1 - Composição da solução salina tamponada (PBS)

COMPOSIÇÃO	CONCENTRAÇÃO (mM)
NaCl	161,0
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	1,8
Na ₂ HPO ₄	15,8

Fonte: (REZENDE; ALMEIDA; GONÇALVES; AZEVEDO *et al.*, 2021)

Quadro 2 - Composição da solução de X-gal

COMPOSIÇÃO	CONCENTRAÇÃO (mM)
Tampão citrato-fosfato (pH=6,0)	40,0
NaCl	150,0
MgCl ₂	2,0
C ₆ N ₆ FeK ₄	5,0
C ₆ N ₆ FeK ₃	5,0

X-gal	1,0 mg/mL
--------------	-----------

Fonte: (DEBACQ-CHAINIAUX; ERUSALIMSKY; CAMPISI; TOUSSAINT, 2009).

Quadro 3 - Composição da solução para o teste de apoptose celular (pH=7,4)

COMPOSIÇÃO	CONCENTRAÇÃO (mM)
Hepes	10,0
NaCl	140,0
CaCl₂	2,50

Fonte: (VERMES; HAANEN; STEFFENS-NAKKEN; REUTELINGSPERGER, 1995).

Quadro 4 - Composição da solução de Krebs-Ringer para aorta (pH 7,4)

COMPOSIÇÃO	CONCENTRAÇÃO (mM)
NaCl	118,0
KCl	4,60
MgSO₄	5,70
KH₂PO₄	1,10
NaHCO₃	25,0
Glicose	11,0
CaCl₂	2,20

Fonte: (KREBS; HENSELEIT, 1932).

Quadro 5 - Composição da solução de Krebs-Ringer modificado para aorta com KCl 60 mM (pH 7,4)

COMPOSIÇÃO	CONCENTRAÇÃO (mM)
NaCl	58,0
KCl	60,0
MgSO₄	5,70
KH₂PO₄	1,10
NaHCO₃	25,0
Glicose	11,0
CaCl₂	2,20

Fonte: (GUEDES; SILVA; BARBOSA-FILHO; MEDEIROS, 2004).

4.3 ISOLAMENTO, CULTURA E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS AÓRTICA DE RATOS - RAECs

Ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*), com oito a nove semanas de idade, foram utilizados para isolamento de células endoteliais aórticas de ratos (RAECs). Após anestesia, o animal foi colocado em decúbito dorsal e na região do tórax e abdominal foi pulverizado uma solução de iodopovidona (PVPI) e álcool 70% para a assepsia. Em seguida, o abdômen foi incisado na linha média para expor a aorta abdominal e a cavidade torácica para expor o coração e pulmões. A aorta abdominal foi incisada transversalmente para liberar o sangue e o ventrículo esquerdo será submetido a uma injeção contendo uma solução de PBS com 1000 UI/mL de heparina (Hepamax-s®), para perfundir a aorta.

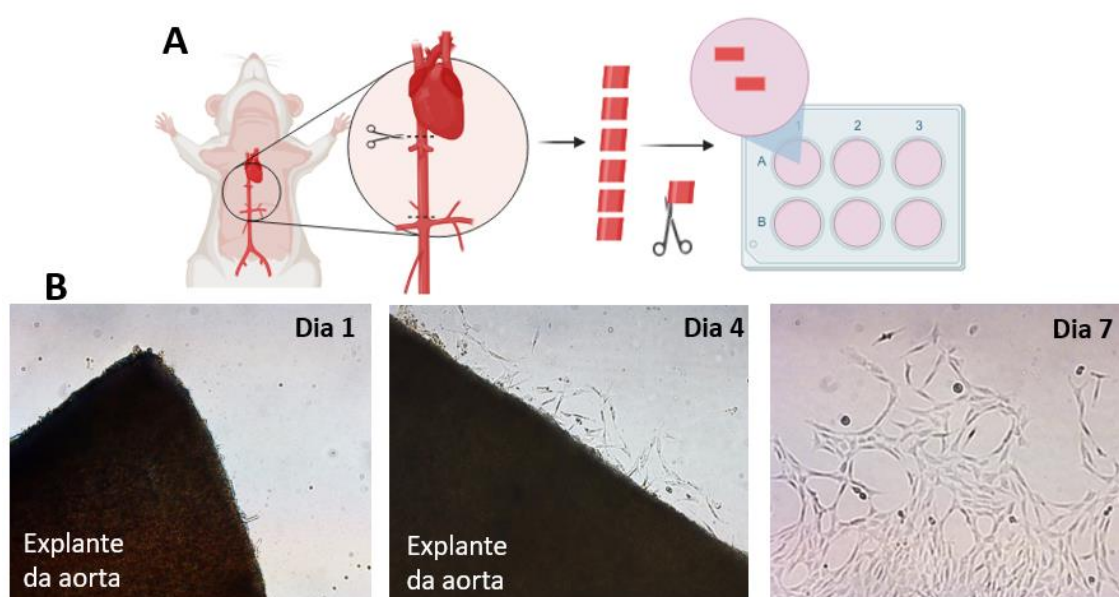
Na sequência, a aorta torácica foi rapidamente removida e colocada em um recipiente com PBS esterilizado gelado, e transportado imediatamente para uma capela de fluxo de ar laminar. Na capela de fluxo laminar, a aorta foi suavemente perfundida com PBS/Heparina gelado para remover o sangue residual e dissecada para remover tecido adiposo e pequenos vasos laterais. Os tecidos aórticos foram então dissecados e seccionados em anéis de 2 a 5 mm de comprimento. Cada anel aórtico foi aberto usando um par de tesoura de microdissecção e imediatamente colocada com o lado do lúmen para baixo em uma placa de seis poços contendo meio de cultura DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) baixa glicose (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), e 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 (Figura 17.A).

Os anéis aórticos foram cultivados em placas de seis poços em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ a 37°C, com inspeção diária do nível médio e adição de meio de cultura, se necessário, para manter os segmentos aórticos úmidos. Após o aparecimento de células brotando do segmento aórtico e o crescimento celular atingir 80% de confluência, conforme inspecionado sob um microscópio de fluorescência (Nikon TS100, Tóquio, Japão), os segmentos aórticos foram removidos suavemente sem interrupção ou toque nas células endoteliais em crescimento. Em seguida, as células foram submetidas a uma digestão enzimática com tripsina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) a 0,05% por quatro minutos e centrifugadas a 1200 rpm

por 5 minutos, 4°C, e ressuspensas para passagem e cultivo em garrafas para cultura celular (Figura 17.B).

Células RAECs, foram cultivadas em meio de cultura DMEN com baixo teor de glicose, sem *Phenol Red*, a 10% de soro bovino fetal, heparina 100UI/ml, 100 UI/mL penicilina, 10 µg/mL estreptomicina. O meio de cultura foi trocado a cada 2-3 dias, e quando as células obtiveram 80% de confluência, foi feita um novo repique. As passagens P2 a P4 foram utilizadas para o presente estudo.

Figura 17 - Isolamento e cultura de RAECs



Legenda. A) Design experimental para cultura primária de RAECs isoladas de ratos whistar (6-8 semanas). B) Dia 1 corresponde a 24 horas do procedimento. Dia 4 - as células endoteliais começam a migrar do explante. Dia 7 - retirada do explante e manutenção das RAECs.

Fonte: do autor, 2023.

4.4 SCREENING DE 20 MONOTERPENOS

Foi realizado um *screening* farmacológico para determinação dos efeitos sobre: 1) Senescência; 2) Viabilidade celular; e 3) Estresse oxidativo. O *screening* consistiu na investigação para 4 grupos de terpenos com similaridades químicas, como: 1) monoterpenos acíclicos (Linalool, Geraniol, Citronellal, β -Citronellol, Citral, Linalyl acetate); 2) monoterpenos monocíclicos (α -terpineol, Carvacrol, Timol, p-cimeno,

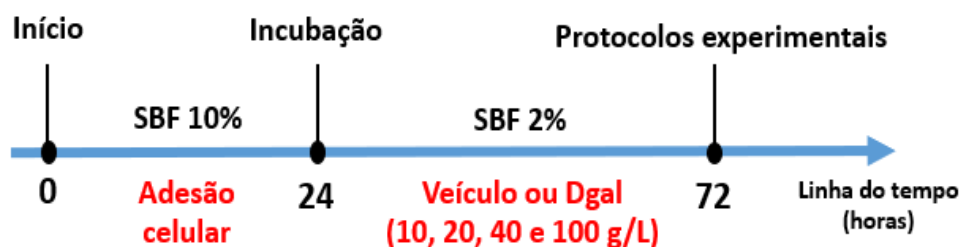
Terpinolene, Carveol, Terpinen-4-ol); 3) monoterpenos bicíclicos (Borneol, Myrtenol, α -pinene); e 4) Sesquiterpenos (Farnesol, Nerolidol, α -Bisabolol, Trans-cariofileno). Todos os terpenos foram cedidos gentilmente pelo professor José Maria Barbosa Filho, do Departamento de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal da Paraíba.

Para cada terpeno, foi realizado uma solução mãe (10^{-1} mol.L $^{-1}$), solubilizada em DMSO (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), e diluída em PBS nas respectivas concentrações teste. Todas as soluções foram preparadas no dia do experimento. A concentração final de DMSO (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) permaneceu abaixo de 0,01%, concentração usada como veículo, na qual não teve efeito sobre os parâmetros analisados quando testado em preparações de controle. A molécula mais promissora foi utilizada para determinação de seu mecanismo de ação.

4.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para o experimento, as RAECs foram plaqueadas em placas de 48 ou 96 poços e incubadas em estufa por 24 horas (5% de CO $_2$ a 37°C). Após o período de adesão celular, foram submetidas a D-(+)-Galactose (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) por 48 horas (Senescência prematura) na concentração de 10, 20, 40 e 100 g/L (para padronização do modelo experimental) (Figura 18).

Figura 18 - Delineamento experimental para padronização do modelo

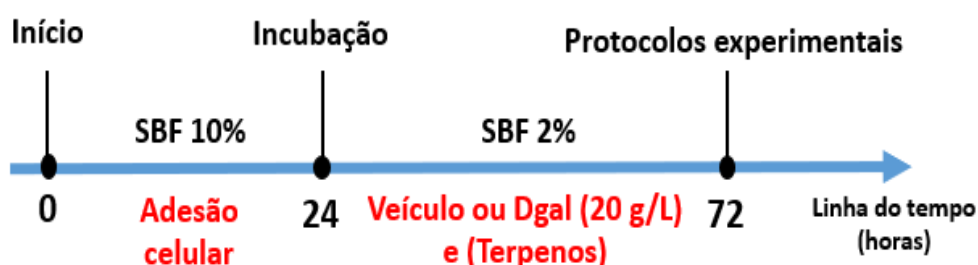


Legenda. Delineamento experimental para padronização do modelo envelhecimento celular em cultura primária de RAECs. Tempo (0) representa o momento do plaqueamento celular e período de adesão de 24 horas com SBF 10%. Tempo (24) representa o momento da substituição do meio de cultura, por meio contendo veículo ou concentrações crescentes de Dgal, com SBF a 2%. Tempo (72) representa

o final do período de incubação e início dos protocolos experimentais. SBF: soro bovino fetal. Dgal: D-(+)-galactose.

Posteriormente, a concentração ideal de D-(+)-Galactose foi utilizada para os respectivos experimentos *in vitro*. Para realização do *screening* com 20 terpenos, foi realizado uma incubação com veículo ou Dgal concomitante aos respectivos terpenos em 4 concentrações diferentes (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} mol.L⁻¹) quando apropriado. Após as 48 horas de incubação em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ a 37°C, as células foram lavadas 3x com PBS e direcionadas a seus respectivos protocolos experimentais (Figura 19).

Figura 19 - Delineamento experimental para o *Screening*



Legenda. Delineamento experimental para realização do *Screening*. Tempo (0) representa o momento do plaqueamento celular, e período de adesão de 24 horas com SBF 10%. Tempo (24) representa o momento da substituição do meio de cultura, por meio contendo veículo ou Dgal 20 g/L com diferentes terpenos, e SBF a 2%. Tempo (72) representa o final do período de incubação e início dos protocolos experimentais. SBF: soro bovino fetal. Dgal: D-(+)-galactose.

4.5.1 Determinação dos níveis de viabilidade celular

A avaliação dos níveis de viabilidade celular foi realizada por meio do ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA). O MTT é um sal tetrazólio solúvel em água de cor amarelada, e após sua metabolização por desidrogenases mitocondriais (ex. NADH), é convertido em cristais de formazan de cor púrpura (insolúveis em água). A formação de cristais formazan são diretamente proporcionais ao número de células viáveis.

Para avaliação da viabilidade celular em modelo de senescência prematura, as RAECs foram semeadas em placas de fundo chato de 96 poços na concentração de

1x10⁴ células/poço e incubadas a 37°C/5% CO₂ por 24 horas para sua adesão. Após esse período, o meio de cultura foi trocado por meio contendo os diferentes grupos experimentais por 48 horas e incubadas a 37°C/5% CO₂. Em sequência, 10 µL da solução do MTT (5 mg/ml) foi adicionado em cada poço (concentração final de 0,45 mg/ml) e novamente incubadas a 37°C/5% CO₂ por 3 horas. Por fim, o meio de cultura foi retirado cautelosamente, e substituído por 100 µL de DMSO por 1 hora afim de solubilizar os cristais de formazan. Após completa solubilização em DMSO, a placa de 96 poços foi levada ao espectrofotômetro (leitor de microplacas BioTek Instruments, Synergy HT, Winooski, VT, EUA), e a absorbância foi mensurada no comprimento de onda de 490 nm (CHEN; ZHANG; ZHU; WANG *et al.*, 2023). A absorbância dos respectivos grupos foi normalizada em relação ao grupo controle. Cada teste foi realizado em triplicata por seis experimentos independentes.

4.5.2 Determinação da senescência associada a atividade da β-galactosidase (S-β-gal)

A Células positivas para β-galactosidase associadas à senescência foram identificadas usando X-gal (Invitrogen™, Waltham, MA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, após 48 horas de tratamento, as células foram lavadas 2x em PBS e então fixadas com uma solução de formaldeído (2%) e glutaraldeído (0,2%), por um período de 1 minuto. Na sequência, as células foram lavadas 3x PBS e incubadas com a solução (Tabela 2) de coloração β-galactosidase (pH 6,0) durante a noite em uma incubadora seca a 37 °C sem CO₂. No dia seguinte, as células foram lavadas 3x com PBS, coradas com DAPI (300 nM) à temperatura ambiente por 5 minutos na ausência de luz para contagem de núcleos. Posteriormente, as células foram lavadas 3x PBS e mantidas em glicerol 20% até análise. As células β-Gal positivas foram observadas em um microscópio de luz Nikon Eclipse TS100 (Tóquio, Japão). Cada protocolo foi avaliado em triplicata, por 3 experimentos independentes. Pelo menos 300 células foram contadas por poço e a porcentagem de senescência foi calculada pela razão entre o número de células positivas pelo número de células totais, multiplicado por 100.

4.5.3 Determinação de Espécie Reativas de Oxigênio (EROs)

Para detectar os níveis de EROs intracelular, foi utilizada a sonda fluorescente sensível às EROs, Dihidroetídeo (DHE; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), excitada no comprimento de onda de 488 nm e com emissão em 515 nm. Em resumo, as RAECs foram semeadas em placas de 24 poços na concentração de 2×10^4 células/poço e incubadas a 37°C/5% CO₂ por 24 horas para sua adesão. Após esse período, o meio de cultura foi trocado por meio contendo os diferentes grupos experimentais por 48 horas e incubadas a 37°C/5% CO₂. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e incubadas com DHE ($5 \mu\text{mol.L}^{-1}$), durante 40 min, em PBS, a 37 °C, no escuro. Ao final da incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS e levadas ao microscópio de fluorescência para análises. Cada teste foi realizado em triplicata por três experimentos independentes. A quantificação da intensidade de fluorescência foi realizada através do software ImageJ® e normalizada em relação ao grupo controle.

4.6 INVESTIGAÇÃO DA TAXA DE APOPTOSE EM RAECs APÓS TRATAMENTO COM TERPINOLENE (TPO) EM MODELO DE SENESCÊNCIA CELULAR INDUZIDO POR D-(+)-GALACTOSE

4.6.1 Delineamento experimental

Para o experimento, as RAECs foram plaqueadas em placas de 24 poços, tratadas com gelatina 0,01%, e incubadas em estufa por 24 horas (5% de CO₂ a 37°C). Após o período de adesão celular, foram divididas em 4 grupos experimentais: 1) CTL (veículo); 2) CTL + TPO ($0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$); 3) DGAL (veículo); e 4) DGAL + TPO ($0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Após as 48 horas de incubação em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ a 37°C, as células foram destinadas seus respectivos protocolos experimentais.

4.6.2 Estudo sobre apoptose celular

A taxa de viabilidade celular, apoptose inicial e tardia foram avaliados pela dupla marcação por Anexina V e 7-AAD. A Anexina V possui alta afinidade com o fosfolípido fosfatidilserina presente na membrana externa de células em apoptose. Já o 7-AAD interage diretamente com o DNA de células que perderam a integridade de membrana, distinguindo assim células em viáveis ou em processo de morte celular (LI; HOU; GUO; ZHOU *et al.*, 2017). Em resumo, as RAECs foram semeadas em placas de 24 poços na concentração de 2×10^4 células/poço e incubadas a 37°C/5% CO₂ por 24 horas para sua adesão. Após esse período, o meio de cultura foi trocado por meio contendo os diferentes grupos experimentais por 48 horas e incubadas a 37°C/5% CO₂. Após o tratamento, as células foram tripsinizadas e coletadas por centrifugação (2.000 rpm, 4°C, 5 min), lavadas em PBS, ressuspensas em um tampão de ligação (Quadro 3). Em sequência, 5 µL Anexina V conjugada com fluoresceína (PE) (Bd Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) e 7-AAD (5 µg/10⁵ células; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) foram adicionados por 15 minutos a temperatura ambiente no abrigo da luz. Após o período de incubação, as RAECs foram lavadas e ressuspensas em 400 µL com o tampão de ligação e levadas ao citômetro de fluxo para leitura. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo (FacsCanto II, BD, EUA), adquirindo-se 10.000 eventos/amostra. Os dados foram obtidos com o programa Flowing Software 2.5.1.

4.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO CRÔNICO COM TERPINOLENE (TPO) EM MODELO DE ENVELHECIMENTO ACELERADO INDUZIDO POR D-(+)-GALACTOSE

4.7.1 Delineamento experimental

Para o modelo de envelhecimento acelerado, os animais foram submetidos, por oito semanas, foi realizada a infusão de D-(+)-Galactose (Sigma-Aldrich, St Louis, MO,

USA) via intraperitoneal (IP) na dose 150 mg/Kg/dia. O grupo controle (salina) recebeu NaCl 0,9% por via intraperitoneal (IP). O tratamento por via oral (VO) seguiu de forma concomitante ao tratamento com D-(+)-galactose via IP. Os grupos Controle e o grupo D-(+)-Galactose recebeu veículo VO. Além disso dois grupos receberam Terpinolene VO, nas doses 5 e 25 mg/Kg, respectivamente. A dose escolhida está baseada em estudos de outros monoterpenos relatados na literatura, permitindo identificar um espectro de ação de doses entre 5-100 mg/kg (DE SOUSA; DAMASCENO; AMORATI; ELSHABRAWY *et al.*, 2023). Além disso, o sistema de nanoemulsão aumenta a biodisponibilidade do terpeno, portanto, iniciamos com a dose mínima de 5 mg/kg, e adicionamos cinco vezes a dose mínima 25 mg/kg.

A administração por via intraperitoneal foi padronizada em volume igual a 2 mL/kg. O tratamento por via oral foi administrado pelo método de gavagem, respeitando o volume máximo de 0,5 mL de solução para cada 100 g de peso corporal do animal. O veículo foi administrado nos grupos CTL e DGAL foi preparado a partir da diluição do Kolliphor®EL (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) em NaCl 0,9%. A proporção utilizada de Kolliphor®EL foi a mesma para solubilização do Terpinolene.

Os animais foram divididos em 4 grupos conforme a ordem apresentada:

- Salina (IP) + Veículo (VO); n=10 (CTL)
- D (+) Galactose 150 mg/Kg/dia (IP) + Veículo (VO); n=10 (DGAL)
- D (+) Galactose 150 mg/Kg/dia (IP) + Terpinolene 5 mg/Kg (VO); n=8 (DGAL + TPO5)
- D (+) Galactose 150 mg/Kg/dia (IP) + Terpinolene 25 mg/Kg (VO); n=10 (DGAL + TPO25)

4.7.2 Avaliação do peso corpóreo dos animais durante o tratamento

O peso corpóreo dos animais foi medido duas vezes por semana, sendo a média semanal o parâmetro de peso adotado por cada animal. Esse processo foi realizado durante as oito semanas de tratamento.

4.7.3 Medida de pressão arterial sistólica (PAS) e frequência cardíaca (FC)

O método de pletismografia de cauda foi usado para detectar a pressão arterial sistólica (PAS) e a frequência cardíaca (FC) ao final de cada tratamento (GONÇALVES; LIMA; DE ALMEIDA; DE ARRUDA *et al.*, 2023). Antes das medições, os animais foram submetidos a 10 minutos para se aclimatar ao ambiente da caixa de acrílico aquecida (28–30°C). Após este período, os animais foram transferidos para um recipiente de acrílico, o sensor piezoelétrico foi conectado à cauda para medições de pulso. Os sinais dos sensores piezoelétricos foram amplificados usando ADInstruments® (Bella Vista, NSW, Austrália) e digitalizados usando seu software (Labchart7®). Além disso, a PAS e os valores de FC foram calculados pela média de três medidas consecutivas.

4.7.4 Coleta e manipulação do sangue

Momentos antes da anestesia, foi coletada uma gota de sangue caudal dos animais por meio de uma pequena incisão, a qual foi rapidamente direcionada para o teste de glicemia. Além disso, após anestesia com cetamina e xilazina (70 mg/kg; 10 mg/kg, i.p), o sangue foi coletado da veia cava inferior usando seringas de 10 mL. O sangue foi dividido em três amostras, sendo um tubo contendo citrato de sódio, um tubo contendo EDTA e um tubo contendo gel separador.

O tubo contendo EDTA foi utilizado para realização do hemograma e da hemoglobina glicada de acordo com as recomendações do fabricante. O tubo contendo gel separador foi utilizado para obtenção do soro, por meio de centrifugação a 1.500×g por 15 minutos a 20°C, o qual foi armazenado a -20°C para os ensaios bioquímicos. Já o tubo contendo citrato de sódio foi utilizado para obtenção do plasma pobre e rico em plaquetas como descrito por De Cuyper e colaboradores (DE CUYPER; MEINDERS; VAN DE VIJVER; DE KORTE *et al.*, 2013). Para isso, o sangue em tubo de citrato de sódio foi levando para centrifugação a 300×g a 25°C por 15 minutos para obtenção de um plasma rico em plaquetas (PRP). Em seguida, um

segundo tubo seguiu para centrifugação a 1.500xg por 15 minutos a 25°C para obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP).

4.7.5 Coleta e manipulação dos órgãos

Após a eutanásia, os quais foram submetidos utilizando três vezes a dose para anestesia da associação de um anestésico dissociativo (cetamina) com um agonista de adrenorreceptores alfa-2, xilazina, administrados por via intraperitoneal, e após ausência dos sinais vitais, o animal foi dissecado para coleta da artéria aorta torácica, além do coração, fígado, rins e a tíbia. A artéria aorta foi limpa de tecidos conectivos e seccionadas em anéis, os quais seguiram para os estudos de reatividade vascular, incorporadas ao OCT para imunofluorescência, armazenadas em formol tamponado a 10% ou destinadas para os ensaios de β -galactosidase. Já os órgãos coração, fígado e rins foram lavados, secos, pesados e armazenados em formol tamponado a 10%.

4.7.6 Ensaio bioquímico

No início, uma amostra de sangue de ratos não anestesiados foi obtida da cauda do animal para determinação dos níveis glicêmicos utilizando um glicosímetro Accu-chek Guide (Roche®, Brasil). Após anestesia do animal, a coleta do sangue foi realizada, na qual a porção do soro foi isolada para os ensaios bioquímicos. Além disso, uma amostra de sangue foi destinada a análise de hemoglobina glicada (HbA1c). Por fim, foram utilizados kits comerciais (Labtest, Brasil) para análise dos parâmetros lipídicos (colesterol total, triglicerídeos, HDL, LDL, VLDL), parâmetros hepáticos (ALT e AST), parâmetros proteicos (proteína total, albumina e globulina), e parâmetros renais (creatinina, ureia e ácido úrico).

4.7.7 Medidas do tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcial ativado

Após coleta e manipulação do sangue conforme descrito no item 3.7.4, plasma pobre em plaquetas (PPP) foi adquirido. Em seguida, foram realizados testes para avaliação do tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativado (TPPA). O TP é o tempo necessário para formação de fibrina após mistura de tromboplastina, plasma e cálcio, avaliando a via extrínseca da cascata de coagulação. Em resumo, o PPP foi aquecido a 37°C e incubado com reagente a base de cloreto de cálcio. Após a mistura, o cronômetro foi disparado, sendo monitorado o tempo para formação do coágulo. Já o TPPA avalia a ativação do mecanismo intrínseco da coagulação sanguínea através da adição de um substituto plaquetário (cefalina) e de cálcio ao plasma a ser analisado. Em resumo, o PPP foi incubado na presença de cefalina a 37°C e após 1 minuto de incubação, foi adicionado o coletor de cálcio pré-aquecido, momento em que o cronômetro foi acionado até a formação do coágulo.

4.7.8 Medidas de agregação plaquetária

Após coleta e manipulação do sangue conforme descrito no item 4.7.4, o PRP foi ajustado para 2×10^7 plaquetas/mL. Posteriormente, as mostras foram incubadas no agregômetro a 37°C por 15 minutos com agitação contínua a 150xg e estimuladas com Difosfato de adenosina (ADP) ($10 \mu\text{mol.L}^{-1}$) por 10 minutos. Mudanças na transmissão da luz foram registradas durante 10 minutos para estimar a agregação máxima em cada amostra. O grau de agregação foi expresso como uma porcentagem da transmissão máxima de luz obtida na amostra. Os valores basais de agregação foram determinados usando uma amostra de plasma pobre em plaquetas (PPP) (CALZERRA; MELO; SANTOS; ASSIS *et al.*, 2022). A agregação plaquetária foi determinada utilizando um agregômetro AgreGO (São Paulo, Brasil).

4.7.9 Reatividade vascular

Para determinar o potencial do TPO em melhorar a disfunção vascular associada ao envelhecimento induzido por D-(+)-Galactose, foram utilizadas artérias aortas torácicas como descrito anteriormente (SILVA-LUIS; DE BRITO ALVES; DE OLIVEIRA; DE SOUSA LUIS *et al.*, 2022). Em resumo, artéria aorta foi isolada, retirado o tecido conectivo e seccionadas em anéis 3 mm. Posteriormente, foi montada em banho de órgãos isolados, suspensos verticalmente, e acoplado a um transdutor de força (MLT020, AD Instruments, Bella Vista, NSW, Austrália). Os tecidos foram mantidos em 10 ml de solução de Krebs a 37 °C e gaseificada com uma mistura carbogênica - 95% de O₂ e 5% de CO₂ - (Carbogen, White Martins, Brasil). Todos os anéis foram submetidos a uma tensão basal de aproximadamente 2,0 g durante um período de estabilização de 60 min, trocando a solução nutritiva a cada 15 min. O endotélio vascular foi considerado intacto quando os anéis aórticos apresentaram relaxamento induzido por ACh maior que 70% após contração com FEN (1×10^{-6} mol.L⁻¹, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). A remoção do endotélio foi confirmada por um relaxamento menor que 10%. Em seguida, curvas isoladas de concentração-resposta para FEN (10^{-10} – 3×10^{-5} mol.L⁻¹), ACh (10^{-10} – 3×10^{-5} mol.L⁻¹, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) e SNP (10^{-12} – 10^{-5} mol.L⁻¹, (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Os dois últimos foram construídos logo após a contração induzida por Phe (1 µmol.L⁻¹).

4.7.10 Análise das EROs vascular em aorta torácica de ratos

Para detectar os níveis de EROs vascular em artéria aorta torácica de ratos tratados, foi utilizada uma sonda fluorescente sensível às EROs, Dihidroetídeo (DHE), excitada no comprimento de onda de 488 nm e com emissão em 515 nm. Em resumo, a aorta isolada foi incorporada em incluído em composto OCT e depois imediatamente congelada em nitrogênio líquido por 5 minutos, antes de ser transferida e armazenada em freezer a -80°C até a próxima etapa de experimentação. A microtomia do tecido no criostato foi realizada a -20°C, na qual foram obtidos cortes com espessura de 10 µm. O tecido fixado em lâminas para fluorescência foi lavado com PBS (tabela 1) e incubados com DHE (5 µmol.L⁻¹) por 40 minutos, a 37°C, em ambiente úmido câmara protegida da luz (GONÇALVES; LIMA; DE ALMEIDA; DE ARRUDA *et al.*, 2023). Posteriormente, os cortes foram lavados 2x com PBS e incorporados a meio de

montagem de fluorescência (DAKO®). As imagens foram obtidas com um microscópio de fluorescência Nikon Eclipse TS100 (Tóquio, Japão). A quantificação (dos níveis de coloração) foi realizada utilizando o software NIS-element1. Os dados foram normalizados usando o grupo CTL e expresso como porcentagem de fluorescência.

4.7.11 Avaliação dos parâmetros eletrocardiográficos (ECG)

Ao término do tratamento, os animais foram anestesiados com cetamina (70 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e mantidos na posição supina com respiração espontânea para os registros eletrocardiográficos, como descrito anteriormente (DAMASCENO; LIMA; MOTTA; FERREIRA *et al.*, 2013). Foram implantados via subcutânea três eletrodos de aço inoxidável, conectados a um amplificador BIOMAP (ADInstruments®, Austrália) para registro na derivação II. Os sinais do ECG foram registrados durante 5 minutos, e avaliados com a utilização de software Labchart (ADInstruments®, Austrália), e armazenados em computador para posterior processamento. Foram medidos os seguintes parâmetros: Intervalo RR, frequência cardíaca (FC), Intervalo PR, duração da onda P, intervalo QRS, intervalo QT, intervalo QT normalizado pela FC (QTc), intervalo do pico para o final da onda T, amplitude das ondas P, Q, R, S e T, além do intervalo ST.

4.7.12 Avaliação do índice de hipertrofia cardíaca

Após coleta do coração e da tíbia conforme descrito no item 4.7.5, seguimos para avaliação da hipertrofia cardíaca, como descrito anteriormente (LOFFREDO; STEINHAUSER; JAY; GANNON *et al.*, 2013). Desse modo, após lavagem e retirada do tecido conectivo do coração, o órgão foi secado e levado à balança analítica para pesagem. Além disso, a tíbia foi coletada e teve sua medida de comprimento mensurada. Para o cálculo do índice de hipertrofia cardíaca, foi realizado pela razão entre o peso do coração em gramas e o comprimento da tíbia em centímetros.

4.8 ANÁLISE DE DADOS

Todos os dados foram expressos como média mais ou menos o erro padrão da média. Para a análise estatística das curvas concentração-resposta foram utilizados os valores de $E_{\text{máx}}$, calculados a partir da regressão não linear das respostas obtidas. Foram realizadas a análise de variância (ANOVA) “*one-way*” ou “*two-way*” com o pós-teste de Tukey quando apropriado. Os dados foram considerados significativos quando $p < 0.05$. Todas as análises realizadas foram calculadas pelo programa estatístico Graph Pad Prism versão 8.0.2®.

Resultados

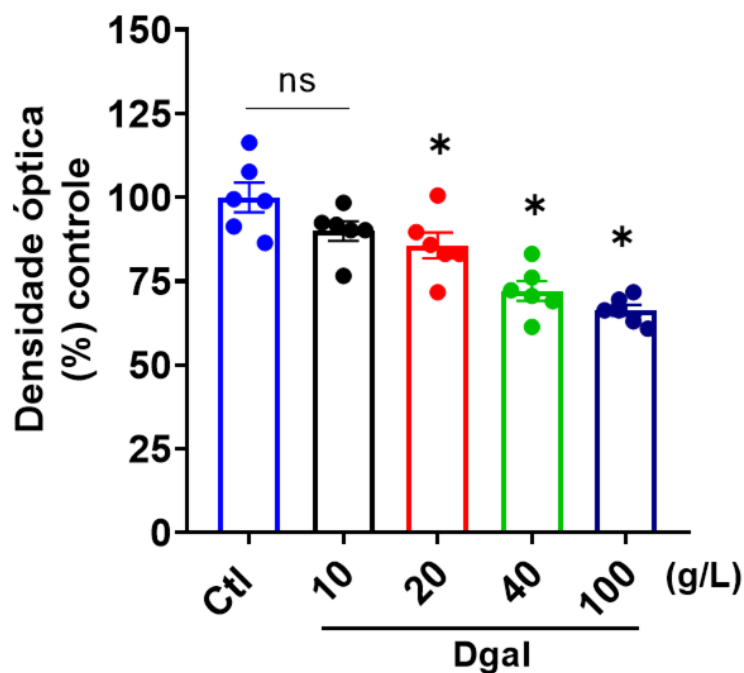
5 RESULTADOS

5.1 PADRONIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL

5.1.1 Ensaio de MTT

De acordo com o ensaio de MTT, o açúcar D-(+)-galactose promoveu redução na viabilidade celular em cultura de RAECs após a exposição de 48 horas. Os resultados foram expressos em porcentagem e normalizados pelo grupo Ctl (100 ± 4.4 ; N=6). Nesse ensaio, o grupo Dgal 10 g/L (89.9 ± 1.6 ; N=6) não apresentou diferença significativa do grupo Ctl. No entanto, os grupos Dgal 20 g/L (85.6 ± 3.8 ; N=6), Dgal 40 g/L (72.1 ± 2.9 ; N=6) e Dgal 100 g/L (66.3 ± 1.6 ; N=6) tiveram redução na viabilidade celular (Figura 20).

Figura 20 - Curva de concentração-resposta frente a D-(+)-galactose



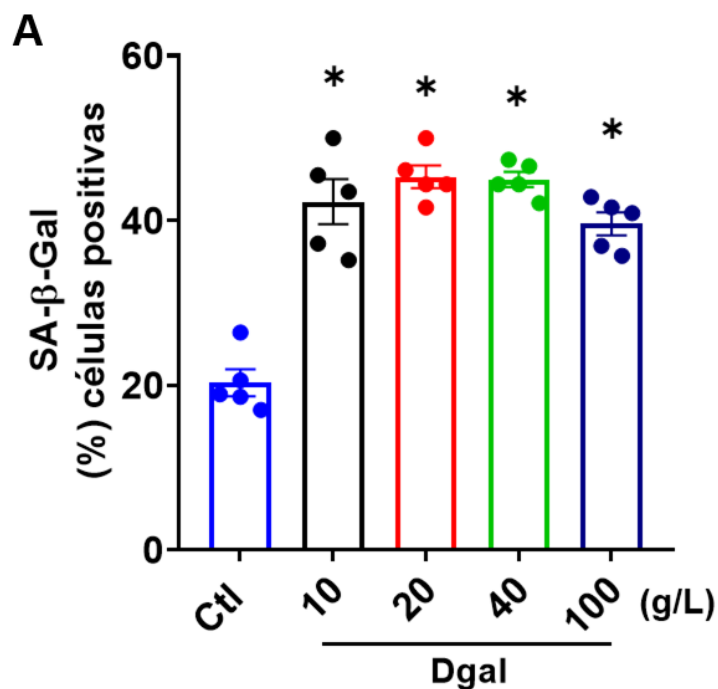
Legenda. Níveis de viabilidade celular pelo ensaio de MTT em concentrações crescentes de D-(+)-Galactose (10, 20, 40 e 100 g/L). Os valores foram normalizados pelo grupo controle (Ctl). Cada barra representa a média de 6 experimentos independentes e expresso pelo erro $\pm$ média. Os dados foram

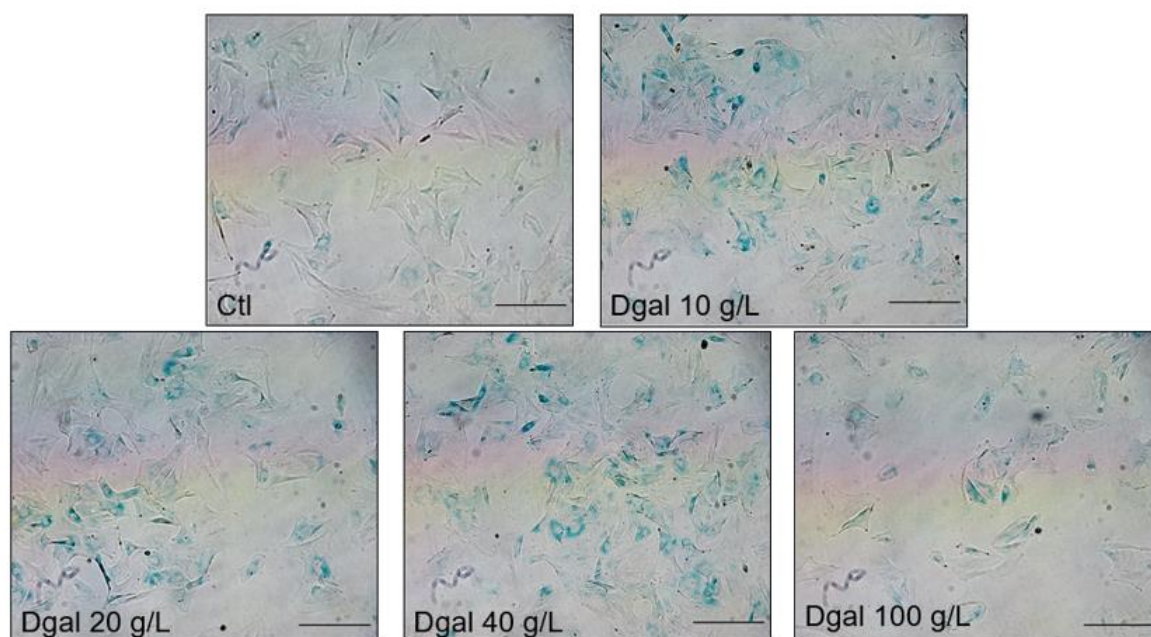
analisados utilizando o teste estatístico ANOVA one way, seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ vs controle.

5.1.2 Ensaio da β -Galactosidase

De acordo com o ensaio da β -galactosidase, o açúcar D-(+)-galactose promoveu aumento na quantidade de células senescentes em cultura de RAECs após a exposição de 48 horas. Os resultados foram expressos em percentual de células senescentes pelo total de células contabilizadas, sendo o grupo Ctl (23.9 ± 1.4 ; N=5). Nesse ensaio, o grupo Dgal 10 g/L (42.2 ± 2.7 ; N=5), Dgal 20 g/L (45.3 ± 1.3 ; N=5), Dgal 40 g/L (44.9 ± 0.9 ; N=5) e Dgal 100 g/L (39.5 ± 1.3 ; N=5) tiveram aumento significativo no número de células senescentes (Figura 21).

Figura 21 - Curva de concentração-resposta frente a D-(+)-galactose



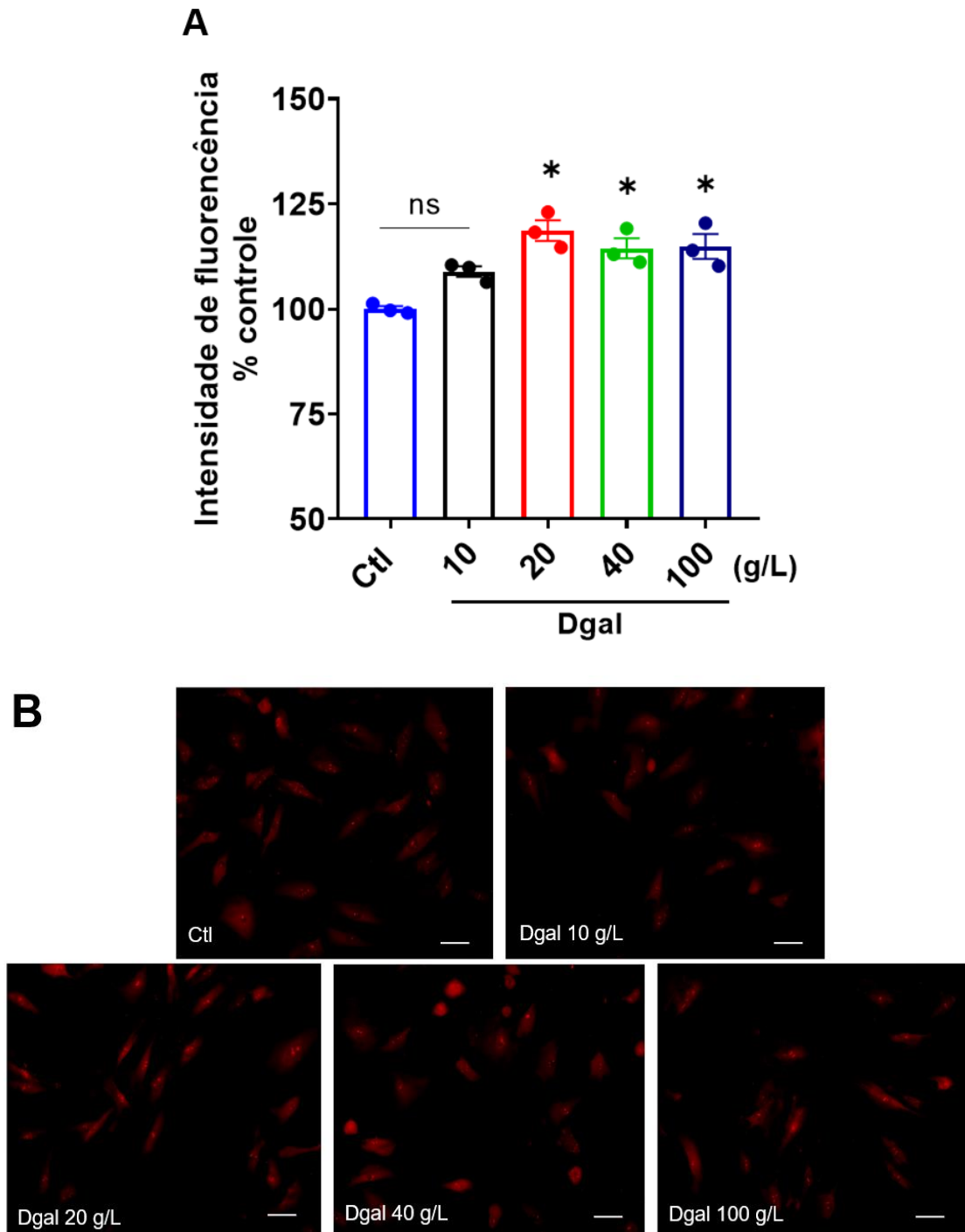
B

Legenda. A) Quantificação de células senescentes frente concentrações crescentes de D-(+)-galactose (10, 20, 40 e 100 g/L). B) Imagens representativas do ensaio da β -galactosidase em RAECs. Os valores foram expressos em porcentagem (células positivas pelo número total de células). Cada teste representa a média de 5 experimentos independentes e expresso pelo erro $\pm$ média. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA one way, seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ vs controle. Cada barra corresponde a 100 μ m.

5.1.3 Ensaio de DHE

De acordo com o ensaio de DHE, o açúcar D-(+)-galactose promoveu aumento no estresse oxidativo em cultura de RAECs após a exposição de 48 horas. Os resultados foram expressos em porcentagem e normalizados pelo grupo Ctl (100 ± 1.4 ; N=7). Nesse ensaio, o grupo Dgal 10 g/L (106.2 ± 1.9 ; N=7) não apresentou diferença significativa do grupo Ctl. No entanto, os grupos Dgal 20 g/L (116.6 ± 2.8 ; N=7), Dgal 40 g/L (109.7 ± 1.2 ; N=8) e Dgal 100 g/L (113.7 ± 1.8 ; N=5) tiveram aumento do estresse oxidativo (Figura 22).

Figura 22 - Curva de concentração-resposta frente a D-(+)-galactose



Legenda. A) Quantificação dos níveis de ânions superóxido pela sonda Dihidroetídeo (DHE) em concentrações crescentes de D-(+)-Galactose (10, 20, 40 e 100 g/L). B) Imagens de fluorescência representativas dos níveis de ânions superóxido. Cada teste representa a média de 3 experimentos independentes e expresso pelo erro $\pm$ média. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA one way, seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ vs controle. Cada barra corresponde a 100 μ m.

5.2 SCREENING DE 20 TERPENOS EM MODELO DE CÉLULA SENESCENTE INDUZIDA POR D-(+)-GALACTOSE

Para seleção de um terpeno promissor com características senoterapêuticas, foi realizada uma triagem farmacológica com 20 terpenos. A concentração de D-(+)-Galactose de 20 g/L (padronização) por 48 horas foi utilizada para indução do modelo de senescência celular. A concentração de D-(+)-Galactose de 20 g/L foi escolhida devido ser a concentração mínima eficaz em promover: 1) aumento dos níveis de senescência celular; 2) redução da viabilidade celular; e 3) aumento do estresse oxidativo.

Apenas um terpeno será escolhido com base na tripla eficácia: 1) redução nos níveis de senescência; 2) melhora da viabilidade celular; e 3) atenuação do estresse oxidativo.

5.2.1 Ensaio de MTT

A exposição de terpenos em condições basais revelou terpenos com características de não alterar a viabilidade de até mesmo de reduzir a viabilidade quando comparados ao grupo controle (figura 23, A). Assim, os terpenos capazes de reduzir viabilidade celular numa condição basal e suas respectivas concentrações (mol.L^{-1}) foram:

- 1) Citral: 10^{-8} ($p=0.0287$), 10^{-7} ($p=0.0180$), 10^{-6} ($p=0.0047$).
- 2) Linalyl acetate: 10^{-6} ($p=0.0420$).
- 3) Carveol: 10^{-6} ($p=0.0321$).
- 4) Terpinen-4-ol: 10^{-6} ($p=0.0309$).
- 5) Pinene: 10^{-6} ($p=0.0396$).

Além disso, o *screening* de 20 terpenos para avaliação dos níveis de viabilidade celular revelou alguns terpenos promissores em melhorar a saúde das RAECs quando comparadas ao grupo Dgal (Figura 22, B). Assim, os terpenos com melhora significativa e suas respectivas concentrações (mol.L^{-1}) foram:

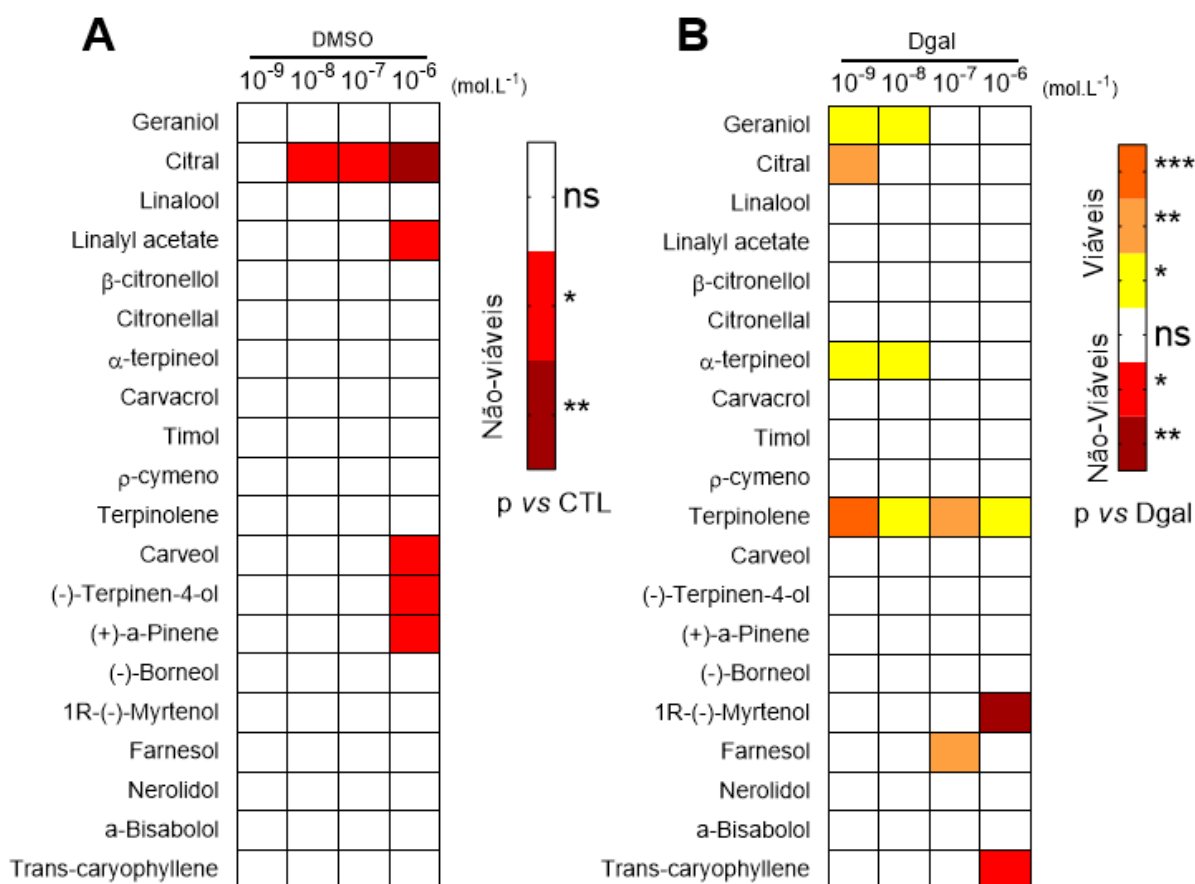
- 1) Geraniol: 10^{-9} ($p=0.0121$) e 10^{-8} ($p=0.0109$);
- 2) Citral: 10^{-9} ($p=0.0031$);
- 3) α -terpineol: 10^{-9} ($p=0.0100$) e 10^{-8} ($p=0.0433$);
- 4) Terpinolene: 10^{-9} ($p=0.0006$), 10^{-8} ($p=0.0222$), 10^{-7} ($p=0.0051$) e 10^{-6} ($p=0.0368$);
- 5) Farnesol: 10^{-7} ($p=0.0017$).

Por outro lado, dois terpenos foram capazes de reduzir a viabilidade além dos níveis do grupo Dgal:

- 1) Myrtenol: 10^{-6} ($p=0.0017$);
- 2) Trans-cariofileno: 10^{-6} ($p=0.0103$).

Além disso, a exposição de terpenos em condições basais revelou terpenos com características de não alterar a viabilidade de até mesmo de reduzir a viabilidade quando comparados ao grupo controle (figura 23, B). Assim, os terpenos capazes de reduzir viabilidade celular numa condição basal e suas respectivas concentrações (mol.L^{-1}) foram:

- 1) Citral: 10^{-9} ($p=0.0287$), 10^{-8} ($p=0.0180$), 10^{-7} ($p=0.0047$).
- 2) Linalyl acetate: 10^{-6} ($p=0.0420$).
- 3) Carveol: 10^{-6} ($p=0.0321$).
- 4) Terpinen-4-ol: 10^{-6} ($p=0.0309$).
- 5) Pinene: 10^{-6} ($p=0.0396$).

Figura 23 - Heatmap de significância para os níveis de viabilidade celular

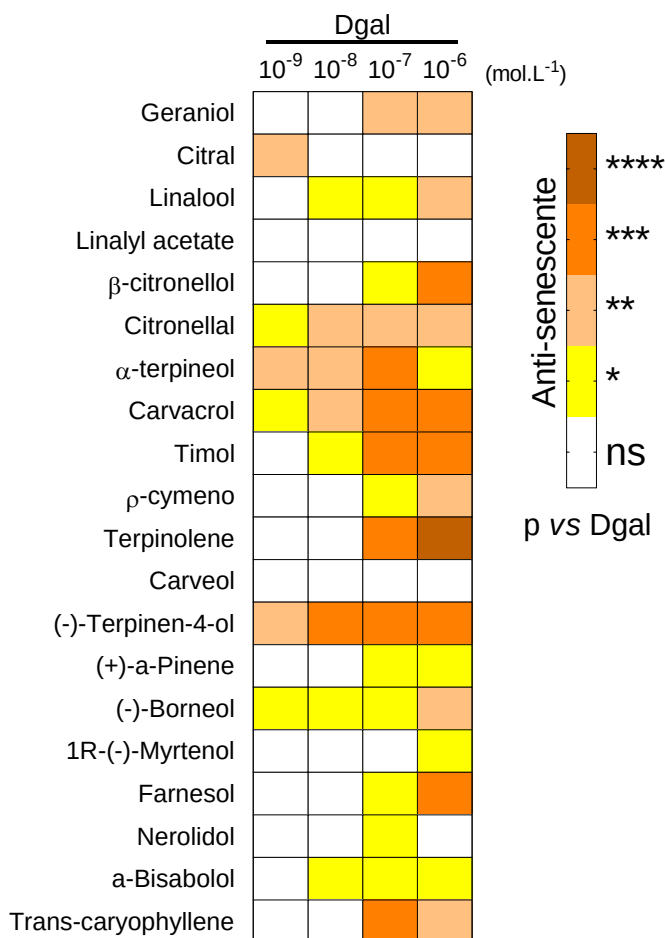
Legenda. Heatmap de significância para os níveis de viabilidade celular e o efeito de 20 terpenos nos diferentes grupos experimentais. A) Valores em relação ao grupo controle (DMSO). B) Valores em relação ao grupo D-(+)-Galactose (20 g/L). Cada teste representa a média de seis experimentos independentes (n=6). As linhas correspondem aos terpenos. As colunas representam as diferentes condições experimentais. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA one way, seguido do pós-teste de Tukey.

5.2.2 Ensaio da β -Galactosidase

O screening de 20 terpenos para avaliação da atividade da enzima lisossomal β -galactosidase associada a senescência revelou alguns terpenos promissores em diminuir o número de células senescentes quando comparados ao grupo Dgal (Figura 24). Assim, os terpenos com melhora significativa em relação ao grupo Dgal e suas respectivas concentrações em mol.L⁻¹ foram:

- 1) Geraniol: 10^{-7} (p=0.0098) e 10^{-6} (p=0.0025).

- 2) Citral: 10^{-9} ($p=0.0030$).
- 3) Linalool: 10^{-8} ($p=0.0136$), 10^{-7} ($p=0.0422$) e 10^{-6} ($p=0.0057$).
- 4) β -Citronellol: 10^{-7} ($p=0.0075$) e 10^{-6} ($p=0.0004$).
- 5) Citronellal: 10^{-9} ($p=0.0254$), 10^{-8} ($p=0.0016$), 10^{-7} ($p=0.0038$) e 10^{-6} ($p=0.0086$).
- 6) α -terpineol: 10^{-9} ($p=0.0002$), 10^{-8} ($p=0.0046$), 10^{-7} ($p=0.0002$) e 10^{-6} ($p=0.0120$).
- 7) Carvacrol: 10^{-9} ($p=0.0135$), 10^{-8} ($p=0.0034$), 10^{-7} ($p=0.0004$) e 10^{-6} ($p<0.0001$).
- 8) Timol: 10^{-8} ($p=0.0487$), 10^{-7} ($p=0.0002$) e 10^{-6} ($p=0.0007$).
- 9) p -cimeno: 10^{-7} ($p=0.0479$) e 10^{-6} ($p=0.0022$).
- 10) Terpinolene: 10^{-7} ($p=0.0002$) e 10^{-6} ($p<0001$).
- 11) (-)-Terpinen-4-ol: 10^{-9} ($p=0.0020$), 10^{-8} ($p=0.0004$), 10^{-7} ($p=0.0001$) e 10^{-6} ($p=0.0002$).
- 12) (-)-Borneol: 10^{-9} ($p=0.0391$), 10^{-8} ($p=0.0120$), 10^{-7} ($p=0.0179$) e 10^{-6} ($p=0.0023$).
- 13) (+)- α -pinene: 10^{-7} ($p=0.0460$) e 10^{-6} ($p=0.0467$);
- 14) 1R-(-)-Myrtenol: 10^{-6} ($p=0.0209$).
- 15) Farnesol: 10^{-7} ($p=0.0125$) e 10^{-6} ($p=0002$).
- 16) Nerolidol: 10^{-7} ($p=0.0275$).
- 17) α -bisabolol; 10^{-8} ($p=0.0331$), 10^{-7} ($p=0.0232$) e 10^{-6} ($p=0.0281$).
- 18) Trans-cariofileno: 10^{-7} ($p=0.0017$) e 10^{-6} ($p=0.0043$).

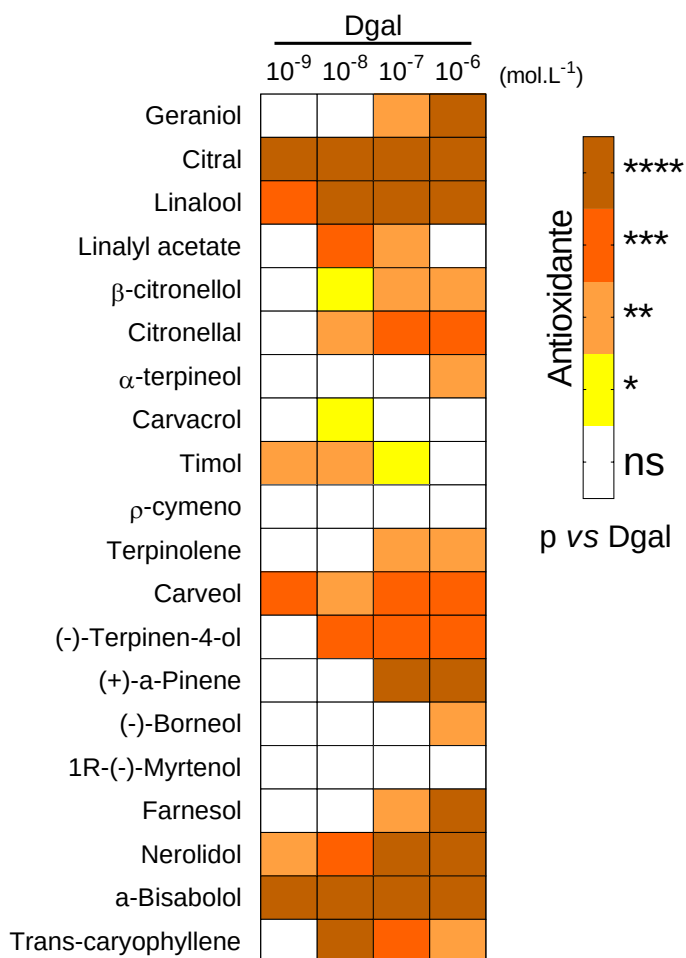
Figura 24 - Heatmap de significância para os níveis de senescência celular

Legenda. Heatmap de significância para os níveis de senescência celular e o efeito de 20 terpenos nos diferentes grupos experimentais. Os valores foram expressos de acordo com o grau de significância em relação ao grupo Dgal. Cada teste representa a média de três experimentos independentes (n=3). As linhas correspondem aos terpenos. As colunas representam as diferentes condições experimentais. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA one way, seguido do pós-teste de Tukey.

5.2.3 Ensaio de DHE

O *screening* de 20 terpenos para avaliação dos níveis de ânions superóxido revelou alguns terpenos como antioxidantes promissores (Figura 25). Assim, os terpenos com melhora significativa em relação ao grupo Dgal e suas respectivas concentrações foram:

- 1) Geraniol: 10^{-7} ($p=0.0012$) e 10^{-6} ($p<0.0001$);
- 2) Citral: 10^{-9} ($p<0.0001$), 10^{-8} ($p<0.0001$), 10^{-7} ($p<0.0001$) e 10^{-6} ($p<0.0001$);
- 3) Linalool: 10^{-9} ($p=0.0004$), 10^{-8} ($p<0.0001$), 10^{-7} ($p<0.0001$) e 10^{-6} ($p<0.0001$);
- 4) Linalyl acetate: 10^{-8} ($p=0.0005$) e 10^{-7} ($p=0.0061$);
- 5) β -Citronellol: 10^{-8} ($p=0.0166$), 10^{-7} ($p=0.0015$) e 10^{-6} ($p=0.0032$);
- 6) Citronellal: 10^{-8} ($p=0.0011$), 10^{-7} ($p=0.0008$) e 10^{-6} ($p=0.0004$);
- 7) α -terpineol: 10^{-6} ($p=0.0060$);
- 8) Carvacrol: 10^{-8} ($p=0.0231$);
- 9) Timol: 10^{-9} ($p=0.0084$), 10^{-8} ($p=0.0081$) e 10^{-7} ($p=0.0164$);
- 10) Terpinolene: 10^{-7} ($p=0.0028$) e 10^{-6} ($p=0.0068$);
- 11) Carveol: 10^{-9} ($p=0.0005$), 10^{-8} ($p=0.0035$), 10^{-7} ($p=0.0005$) e 10^{-6} ($p=0.0003$);
- 12) (-)-Terpinen-4-ol: 10^{-8} ($p=0.0002$), 10^{-7} ($p=0.0004$) e 10^{-6} ($p=0.0002$);
- 13) (+)- α -pinene: 10^{-7} ($p<0.0001$) e 10^{-6} ($p<0.0001$);
- 14) (-)-Borneol: 10^{-6} ($p=0.0022$);
- 15) Farnesol: 10^{-7} ($p=0.0029$) e 10^{-6} ($p<0.0001$);
- 16) Nerolidol: 10^{-9} ($p=0.0071$), 10^{-8} ($p=0.0001$), 10^{-7} ($p<0.0001$) e 10^{-6} ($p<0.0001$);
- 17) α -bisabolol: 10^{-9} ($p<0.0001$), 10^{-8} ($p<0.0001$), 10^{-7} ($p<0.0001$) e 10^{-6} ($p<0.0001$);
- 18) Trans-cariofileno: 10^{-8} ($p<0.0001$), 10^{-7} ($p=0.0005$) e 10^{-6} ($p=0.0032$).

Figura 25 - Heatmap de significância para os níveis de ânions superóxido

Legenda. Heatmap de significância para os níveis de ânions superóxido e o efeito de 20 terpenos nos diferentes grupos experimentais. Os valores foram expressos de acordo com o grau de significância em relação ao grupo Dgal. Cada teste representa a média de três experimentos independentes (n=3). As linhas correspondem aos terpenos. As colunas representam as diferentes condições experimentais. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA one way, seguido do pós-teste de Tukey.

No entanto, para a intercessão da ação benéfica em atenuar os níveis de células senescentes, em melhorar a viabilidade celular e produzir ação antioxidante, apenas os terpenos: 1) Geraniol; 2) Citral; 3) α-terpineol; 4) Terpinolene; e 5) Farnesol. No entanto, quando consideramos a concentração no qual o terpeno exerceu efeito positivo, apenas o Citral 10⁻⁹ mol.L⁻¹, Terpinolene 10⁻⁷ e 10⁻⁶ mol.L⁻¹ e Farnesol 10⁻⁷ mol.L⁻¹ apresentaram o triplo efeito positivo, caracterizando-os como potenciais senoterapêuticos. Além disso, as concentrações de Terpinolene 10⁻⁷ e 10⁻⁶ (mol.L⁻¹) foram dependentes de concentração para eficácia comparado ao Citral e

ao Farnesol no ensaio de SA- β -Gal, portanto, o Terpinolene foi o candidato a senoterapêutico selecionado pelo *Screening*.

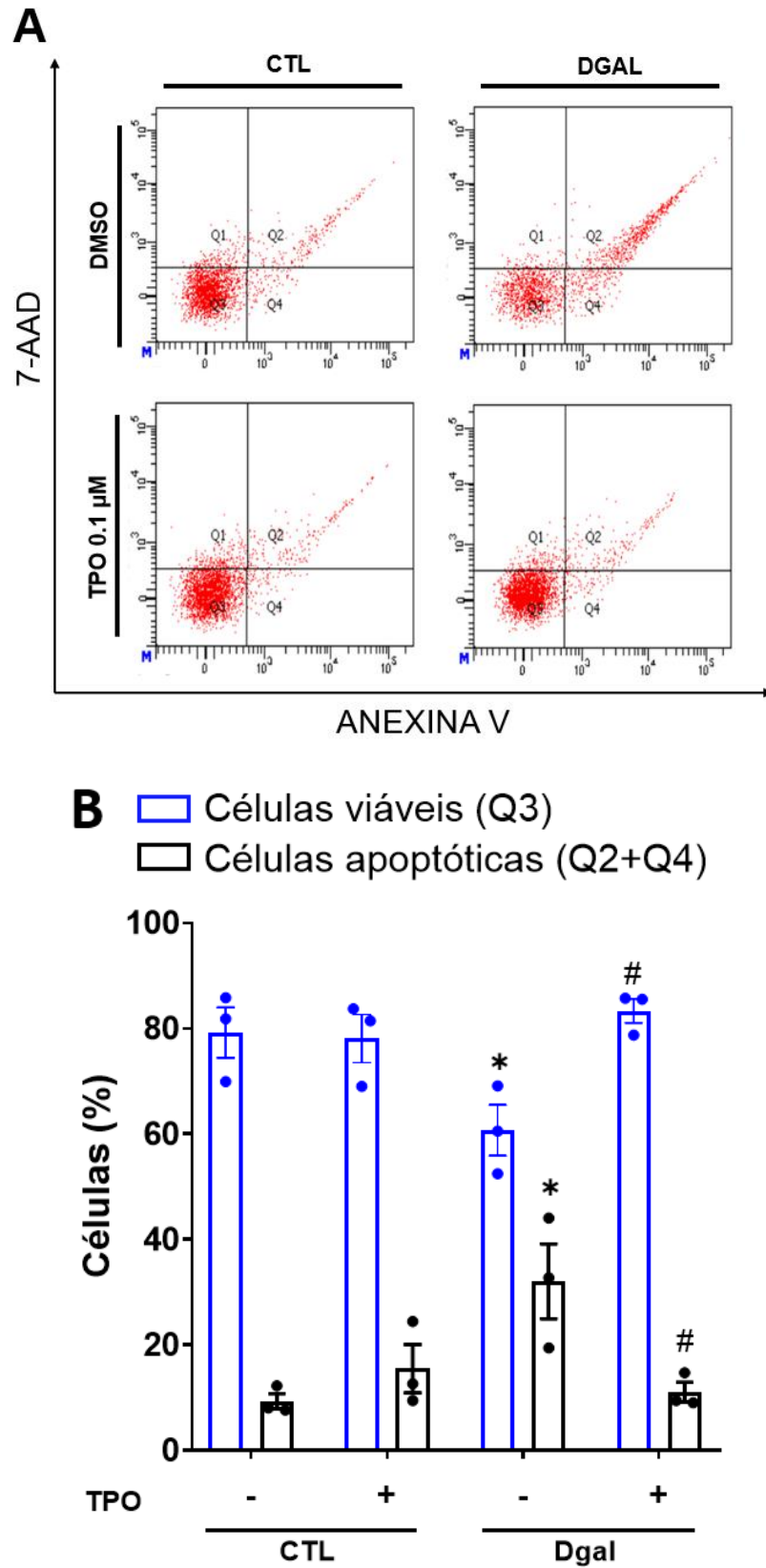
5.3 INVESTIGAÇÃO DA TAXA DE APOPTOSE EM RAECS PELO TERPINOLENE (TPO)

Após *screening* de 20 terpenos, foi selecionado o Terpinolene como candidato a senoterapêutico.

5.3.1 Análise da taxa de apoptose

De acordo com o ensaio, o açúcar D-(+)-galactose promoveu um aumento na taxa de apoptose (32.03 ± 7.11 ; N=3) quando comparado com o grupo Ctl (9.27 ± 1.47 ; N=3). Por outro lado, o grupo Dgal (60.67 ± 4.82 ; N=3) apresentou uma diminuição nas células viáveis quando comparado com o grupo Ctl (79.17 ± 4.78 ; N=3). Já o TPO ($0.1 \mu\text{M}$), em uma condição basal, manteve os níveis de viabilidade celular (78.03 ± 4.57 ; n=3) e apoptose (15.47 ± 4.56 ; n=3) próximo aos níveis basais. No entanto, as células na presença de Dgal + TPO $0.1 \mu\text{M}$ teve os níveis de viabilidade (83.30 ± 2.30 ; n=3) e apoptose (11.03 ± 1.84 ; n=3) restaurados para os padrões basais (Figura 26).

Figura 26 - Quantificação da viabilidade e apoptose celular



Legenda. Avaliação da taxa de apoptose celular em RAECs. Grupos: CTL (n=3), Dgal (n=3), Dgal + TPO 0,1 μ M (n=3) e Dgal + TPO 0,1 μ M (n=3). Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão

da média. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA *one way*, seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ vs Ctl; # $p < 0,05$ vs Dgal.

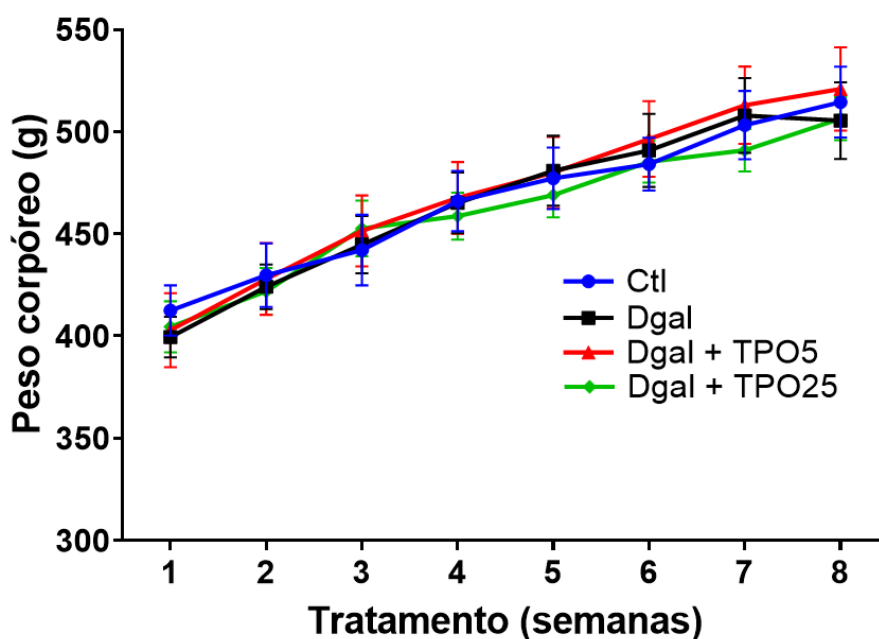
5.4 CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DO TERPINOLENE (TPO) EM RATOS TRATADOS POR OITO SEMANAS EM MODELO DE ENVELHECIMENTO ACELERADO PELO AÇÚCAR D-(+)-GALACTOSE

Após a seleção do TPO pelo *screening* e a investigação, pelo menos em parte, do mecanismo de ação pelo qual o TPO exerce seu efeito senoterapêutico, iniciamos os estudos *in vivo*.

5.4.1 Avaliação do peso corpóreo, pressão arterial sistólica e frequência cardíaca

Durante o período de tratamento, o peso corpóreo dos animais foi medido duas vezes por semana e realizado a média semanal (Figura 27). A variação de peso durante o tratamento foi proporcional nos quatro grupos experimentais.

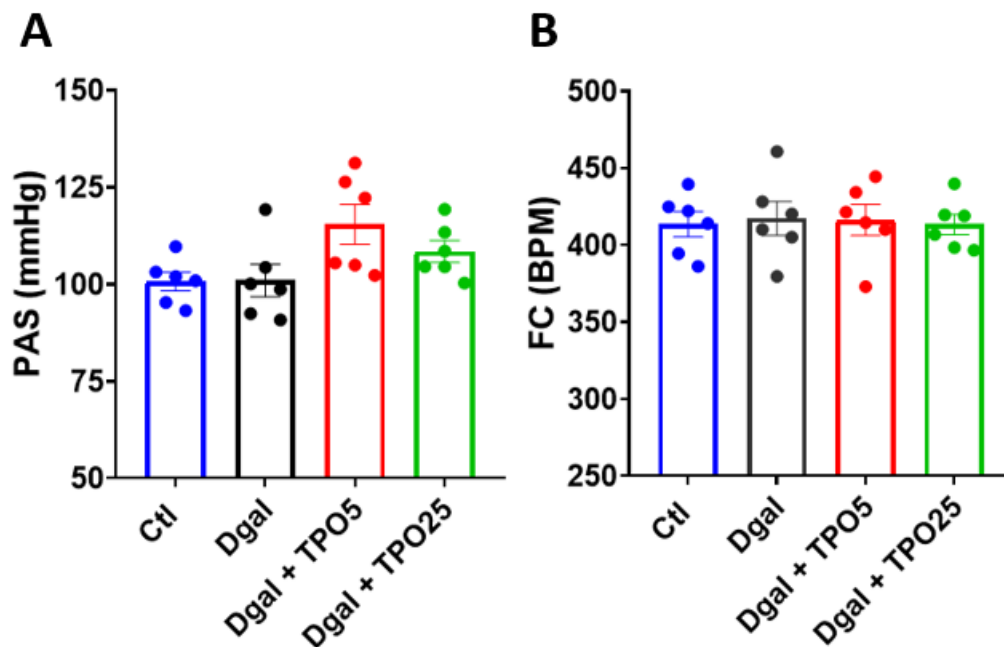
Figura 27 - Monitoramento do peso corpóreo



Legenda. Evolução do peso corpóreo durante o período experimental. Grupos: CTL (n=10), Dgal (n=10), Dgal + TPO5 (n=8) e Dgal + TPO25 (n=10). Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

Além disso, no dia da eutanásia, a pressão arterial sistólica (PAS) (Figura 28.A) e frequência cardíaca (FC) (Figura 28.B) foram avaliados. Não houve diferença entre os grupos para os parâmetros da PAS: CTL (100.7 ± 2.4 , n=6), Dgal (100.9 ± 4.1 , n=6), Dgal + TPO5 (115.4 ± 5.1 , n=6) e Dgal + TPO25 (108.4 ± 2.8 , n=6); e da FC: CTL (413.5 ± 8.1 , n=6), Dgal (417.4 ± 10.9 , n=6), Dgal + TPO5 (416.3 ± 10.0 , n=6) e Dgal + TPO25 (413.4 ± 6.6 , n=6).

Figura 28 - Monitoramento da pressão arterial sistólica e frequência cardíaca



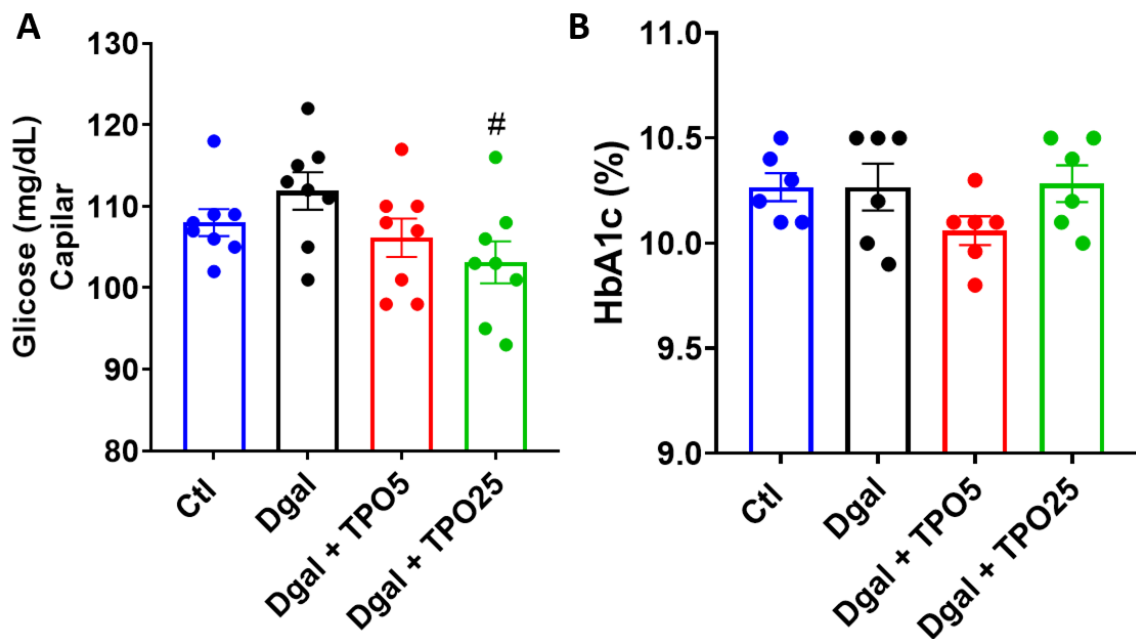
Legenda. A) Avaliação da pressão arterial sistólica (PAS). B) Frequência cardíaca (FC). Grupos: CTL (n=6), Dgal (n=6), Dgal + TPO5 (n=6) e Dgal + TPO25 (n=6). Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA one way, seguido do pós-teste de Tukey.

5.4.2 Avaliação do perfil bioquímico

Para o teste glicêmico do sangue capilar caudal dos animais não anestesiados, os níveis de glicose entre os grupos: CTL (108.00 ± 1.64 ; n=8), Dgal (111.87 ± 2.30 ;

n=8) e Dgal + TPO5 (106.12 ± 2.35 ; n=8) não apresentaram diferenças. No entanto, o grupo Dgal + TPO25 (103.12 ± 2.57 ; n=8) teve redução significativa nos níveis glicêmicos quando comparado aos níveis do grupo Dgal (Figura 29.A). Para o teste da hemoglobina glicada (HbA1c) não houve alterações entre os grupos CTL (10.26 ± 0.06 ; n=6), Dgal (10.26 ± 0.12 ; n=6), Dgal + TPO5 (10.06 ± 0.06 ; n=6) e Dgal + TPO25 (10.28 ± 0.09 ; n=6) (Figura 29.B).

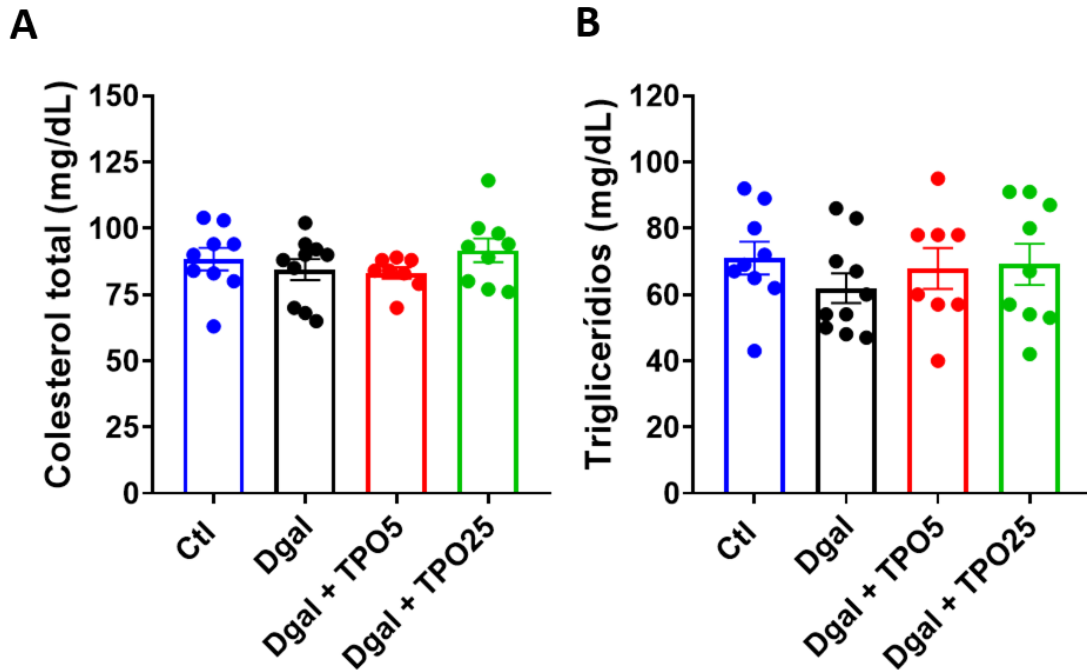
Figura 29 - Avaliação dos parâmetros glicêmicos



Legenda. Avaliação bioquímica de parâmetros glicêmicos. A) glicemia do sangue capilar caudal. Grupos: CTL (n=8), Dgal (n=8), Dgal + TPO5 (n=8) e Dgal + TPO25 (n=8). B) HbA1c (hemoglobina glicada). Grupos: CTL (n=6), Dgal (n=6), Dgal + TPO5 (n=6) e Dgal + TPO25 (n=6). Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA *one way*, seguido do pós-teste de Tukey. [#]p < 0,05 vs Dgal.

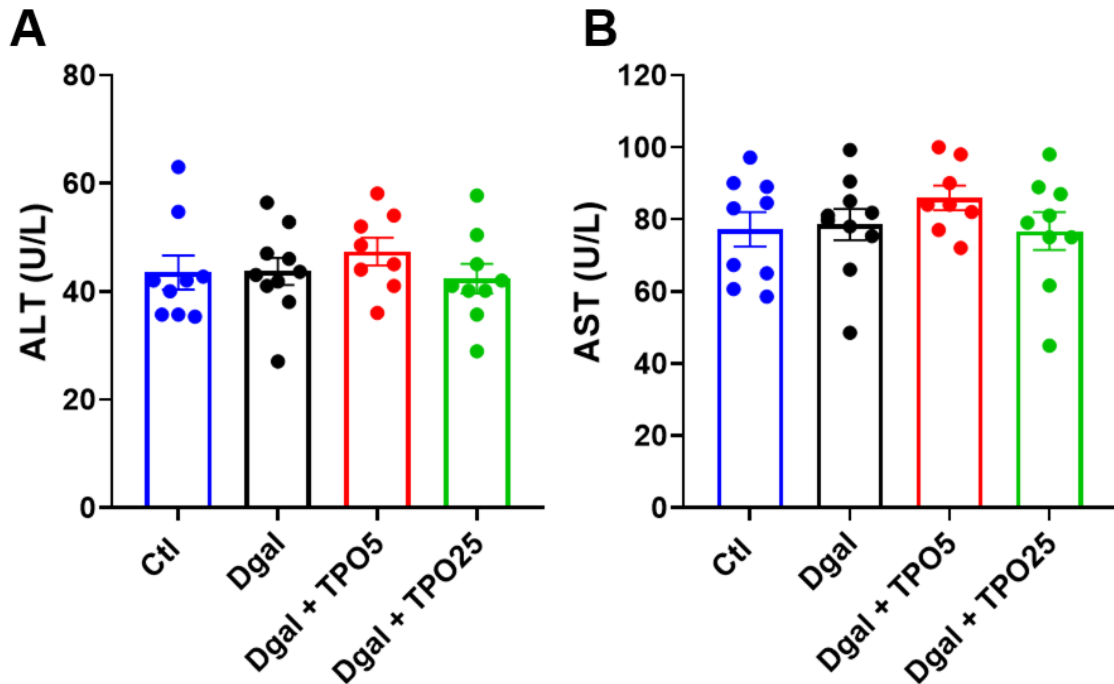
Para o doseamento do colesterol total não houve alterações entre os grupos CTL (88.33 ± 4.22 ; n=9), Dgal (84.40 ± 3.92 ; n=10), Dgal + TPO5 (83.12 ± 2.20 ; n=8) e Dgal + TPO25 (91.66 ± 4.43 ; n=9) (Figura 30.A). De forma semelhante ocorreu com os níveis de triglicerídeos, os quais os grupos CTL (71.00 ± 4.95 ; n=9), Dgal (61.90 ± 4.47 ; n=10), Dgal + TPO5 (67.87 ± 6.15 ; n=8) e Dgal + TPO25 (69.11 ± 6.20 ; n=9) permaneceu sem alterações (Figura 30.B).

Figura 30 - Avaliação dos parâmetros lipídicos obtidos do soro



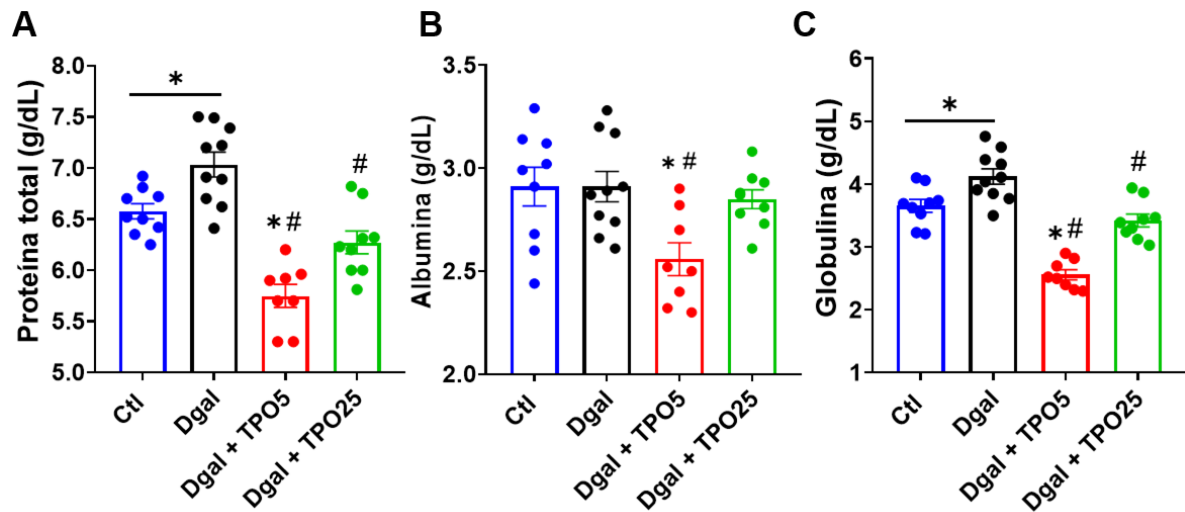
Legenda. Avaliação bioquímica de parâmetros lipídicos obtidos de soro. A) Colesterol total. B) Triglicerídeos. Grupos: CTL (n=9), Dgal (n=10), Dgal + TPO5 (n=8) e Dgal + TPO25 (n=9). Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média.

Para avaliação das enzimas hepáticas, os níveis de ALT e AST foram analisados. Para enzima ALT não houve alterações entre os grupos CTL (43.45 ± 3.14 ; n=9), Dgal (43.66 ± 2.54 ; n=10), Dgal + TPO5 (47.32 ± 2.56 ; n=8) e Dgal + TPO25 (42.32 ± 2.75 ; n=9) (Figura 31.A). De forma semelhante ocorreu com os níveis de AST, os quais os grupos CTL (77.22 ± 4.79 , n=9), Dgal (78.50 ± 4.34 , n=10), Dgal + TPO5 (85.87 ± 3.42 , n=8) e Dgal + TPO25 (76.71 ± 5.24 , n=9) permaneceu sem alterações significativas (Figura 31.B).

Figura 31 - Avaliação dos parâmetros hepáticos obtidos do soro

Legenda. Avaliação bioquímica de parâmetros hepáticos obtidos de soro. A) ALT (alanina aminotransferase). B) AST (aspartato aminotransferase). Grupos: CTL (n=9), Dgal (n=10), Dgal + TPO5 (n=8) e Dgal + TPO25 (n=9). Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA one way, seguido do pós-teste de Tukey.

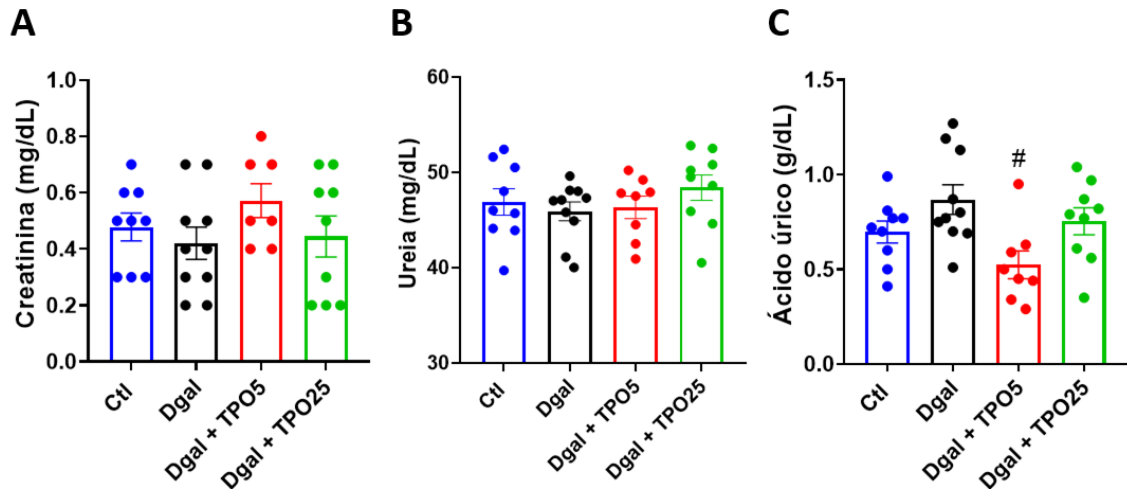
A avaliação dos níveis de proteína total revelou um aumento significativo no grupo Dgal (7.03 ± 0.12 , n=10) quando comparado com o grupo CTL (6.57 ± 0.07 , n=9). No entanto, o tratamento com TPO na dose de 25 mg/kg foi capaz de restaurar para os níveis basais: Dgal + TPO25 (6.27 ± 0.11 , n=9). Além disso, de forma surpreendente, o grupo Dgal + TPO5 reduziu além das condições basais (5.74 ± 0.11 , n=8) (Figura 32.A). Para os níveis de albumina presente no soro, não houve diferenças entre os grupos: CTL (2.91 ± 0.09 , n=9), Dgal (2.91 ± 0.07 , n=10) e Dgal + TPO25 (2.84 ± 0.04). Contudo, o grupo Dgal + TPO5 (2.558 ± 0.08 , n=8) apresentou redução nos níveis de albumina quando comprados com o grupo CTL e Dgal (Figura 32.B). Já os níveis de globulinas apresentaram aumento significativo no grupo Dgal (4.12 ± 0.12 , n=10) quando comparado com o grupo CTL (3.65 ± 0.10 , n=9). Por outro lado, o tratamento com TPO na dose de 25 mg/kg foi capaz de restaurar para os níveis basais: Dgal + TPO25 (3.42 ± 0.10 , n=9). No entanto, de forma surpreendente, o grupo Dgal + TPO5 reduziu além das condições basais (3.42 ± 0.10 , n=9) (Figura 32.C).

Figura 32 - Avaliação dos parâmetros proteicos obtidos do soro

Legenda. Avaliação bioquímica de parâmetros proteicos obtidos de soro. A) Proteína total. B) Albumina. C) Globulina. Grupos: CTL (n=9), Dgal (n=10), Dgal + TPO5 (n=8) e Dgal + TPO25 (n=9). Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA *one way*, seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05 vs Ctl; #p < 0,05 vs Dgal.

Para o doseamento dos parâmetros renais, o doseamento de creatinina não mostrou alterações entre os grupos CTL (0.47 ± 0.04 , n=9), Dgal (0.42 ± 0.05 , n=10), Dgal + TPO5 (0.57 ± 0.06 , n=7) e Dgal + TPO25 (0.44 ± 0.07 , n=9) (Figura 33.A). De forma semelhante ocorreu com os níveis de ureia, os quais os grupos CTL (46.87 ± 1.38 , n=9), Dgal (45.89 ± 0.98 , n=10), Dgal + TPO5 (46.31 ± 1.17 , n=8) e Dgal + TPO25 (48.37 ± 1.34 , n=9) permaneceu sem alterações significativas (Figura 33.B). Já os níveis de ácido úrico, o grupo CTL (0.69 ± 0.05 , n=9), Dgal (0.86 ± 0.07 , n=10) e Dgal + TPO25 (0.75 ± 0.07 , n=9) não apresentaram diferenças entre si. No entanto, de forma surpreendente, a menor dose de TPO foi capaz de reduzir os níveis de ácido úrico (0.52 ± 0.07 , n=8) quando comparado com o grupo Dgal (Figura 33.C).

Figura 33 - Avaliação dos parâmetros renais obtidos do soro



Legenda. Avaliação bioquímica de parâmetros renais obtidos de soro. Grupos: A) Creatinina. B) Ureia. C) Ácido úrico. CTL (n=9), Dgal (n=10), Dgal + TPO5 (n=8) e Dgal + TPO25 (n=9). Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA *one way*, seguido do pós-teste de Tukey. #p < 0,05 vs Dgal.

5.4.3 Avaliação do perfil hematológico

O hemograma dos diferentes grupos experimentais foi realizado (Tabela 7). Com exceção da diferença encontrada para o RDW-SD entre os grupos Dgal (34.063 ± 0.366 ; n=8) e Dgal + TPO25 (32.100 ± 0.271 ; n=8), os demais parâmetros não obtiveram diferenças significativas.

Tabela 2 - Avaliação dos parâmetros hematológicos: eritrograma, leucograma e plaquetograma

HEMOGRAMA				
	Ctl	Dgal	Dgal + TPO5	Dgal + TPO25
ERITROGRAMA	RBC ($\times 10^{12}.L^{-1}$)	8,190 $\pm$ 0,147	7,985 $\pm$ 0,235	7,773 $\pm$ 0,216
	HGB (g.dL ⁻¹)	14,217 $\pm$ 0,310	14,063 $\pm$ 0,353	13,767 $\pm$ 0,262
	HCT (%)	40,650 $\pm$ 0,961	40,688 $\pm$ 1,153	38,767 $\pm$ 0,998
	MCV (fL)	49,667 $\pm$ 0,512	51,038 $\pm$ 0,632	50,317 $\pm$ 0,808
	MCH (pg)	17,300 $\pm$ 0,338	17,588 $\pm$ 0,169	17,817 $\pm$ 0,241
	MCHC (g.dL ⁻¹)	34,950 $\pm$ 0,650	34,550 $\pm$ 0,282	35,500 $\pm$ 0,501
	RDW – CV (%)	14,317 $\pm$ 0,359	14,063 $\pm$ 0,374	14,933 $\pm$ 0,436
LEUCOGRAMA	WBC ($\times 10^9.L^{-1}$)	5,083 $\pm$ 0,499	6,788 $\pm$ 0,688	4,900 $\pm$ 0,339
	LYM ($\times 10^9.L^{-1}$)	2,550 $\pm$ 0,211	3,050 $\pm$ 0,319	2,233 $\pm$ 0,238
	MID ($\times 10^9.L^{-1}$)	0,500 $\pm$ 0,058	0,638 $\pm$ 0,082	0,483 $\pm$ 0,060
	GRAN ($\times 10^9.L^{-1}$)	2,033 $\pm$ 0,312	3,100 $\pm$ 0,390	2,183 $\pm$ 0,189
	LYM (%)	51,717 $\pm$ 2,402	46,450 $\pm$ 2,527	46,383 $\pm$ 3,102
	MID (%)	10,700 $\pm$ 0,474	10,425 $\pm$ 0,523	11,017 $\pm$ 0,655
	GRAN (%)	37,583 $\pm$ 2,773	43,500 $\pm$ 3,020	42,600 $\pm$ 3,624
PLAQUETGRAMA	PLT ($\times 10^9.L^{-1}$)	1.024,833 $\pm$ 24,953	1.074,875 $\pm$ 36,159	981,500 $\pm$ 49,931
	MPV (fL)	5,583 $\pm$ 0,114	5,650 $\pm$ 0,136	5,733 $\pm$ 0,109
	PDW (fL)	6,950 $\pm$ 0,201	7,200 $\pm$ 0,195	7,300 $\pm$ 0,148
	PCT (%)	0,568 $\pm$ 0,021	0,604 $\pm$ 0,025	0,530 $\pm$ 0,033
	P – LCR (%)	3,917 $\pm$ 0,350	3,988 $\pm$ 0,483	4,217 $\pm$ 0,436

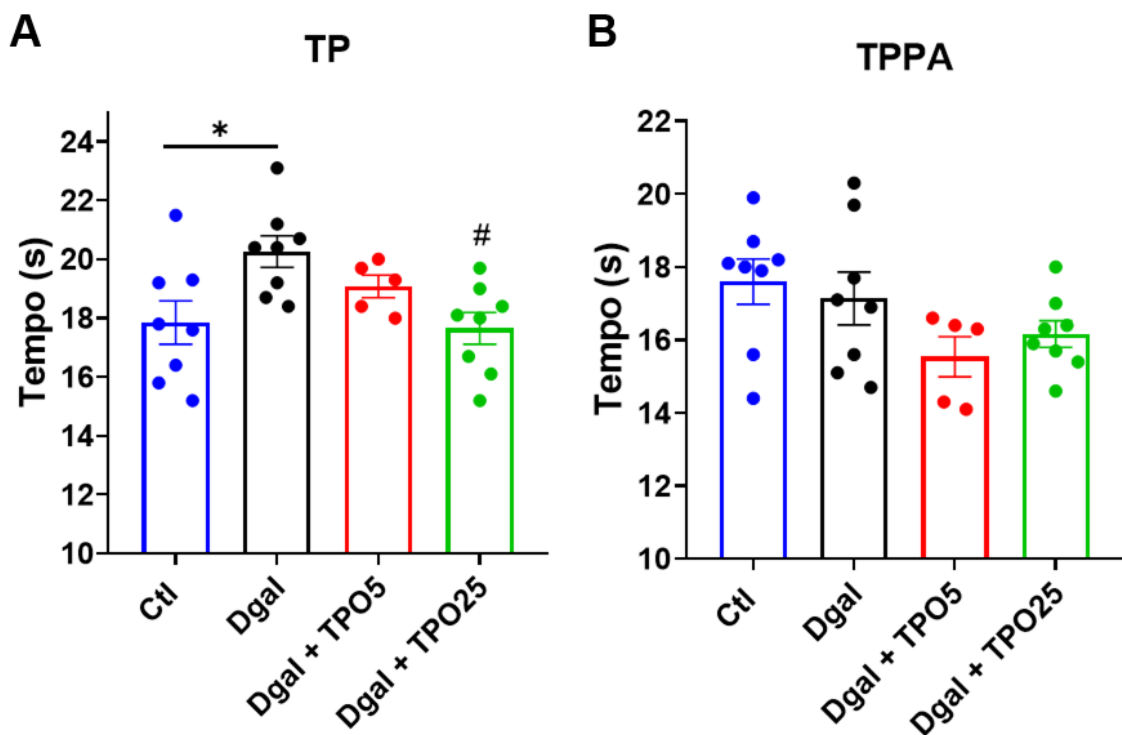
Legenda. Avaliação dos parâmetros hematológicos. Grupos: CTL (n=6), Dgal (n=8), Dgal + TPO5 (n=6) e Dgal + TPO25 (n=8). Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Abreviações traduzidas do inglês: RBC (eritrócitos); HGB (hemoglobina); HCT (hematócrito); MCV (volume corpuscular médio); MCH (hemoglobina corpuscular média); MCHC (concentração de hemoglobina corpuscular média); RDW-CV (Amplitude de Distribuição dos Eritrócitos medido como Coeficiente de Variação); WBC (leucócitos); LYM (linfócitos); MID (células intermediárias); GRAN (granulócitos); PLT (plaquetas); MPV (volume plaquetário médio); PDW (largura de distribuição do volume plaquetário); PCT (Plaquetócrito); P-LCR (percentual de plaquetas grandes, com volume maior que 12 fL). Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA one way, seguido do pós-teste de Tukey.

5.4.4 Avaliação sobre a coagulação e função plaquetária

Para avaliação da ação do tratamento com TPO sobre os fatores de coagulação e reatividade plaquetária, foram realizados os testes para medição de TP e TPPA, além do efeito do ADP sob a agregação plaquetária.

A avaliação do TP revelou o grupo Dgal (20.2 ± 0.5 , $n=8$) significativamente maior comparado ao grupo Ctl (17.8 ± 0.7 , $n=8$). Além disso, o grupo Dgal + TPO5 (19.0 ± 0.3 , $n=5$) permaneceu semelhante ao grupo Dgal. No entanto, o grupo Dgal + TPO25 (17.6 ± 0.5 , $n=8$) reduziu significativamente o TP (Figura 34.A). Para o ensaio de TPPA, não houve alterações significativas entre os grupos CTL (17.6 ± 0.6 , $n=8$), Dgal (17.1 ± 0.7 , $n=8$), Dgal + TPO5 (15.5 ± 0.5 , $n=5$) e Dgal + TPO25 (16.1 ± 0.3 , $n=8$) (Figura 34.B).

Figura 34 - Avaliação do tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcialmente ativada

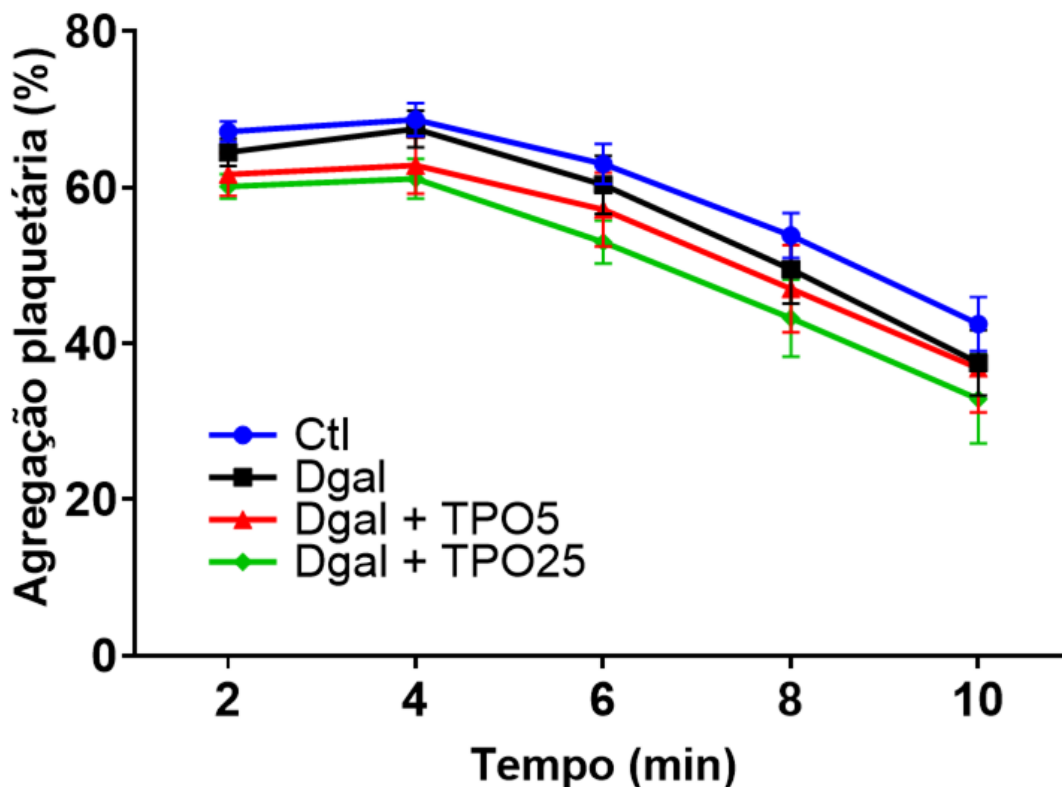


Legenda. Avaliação hematológica para os parâmetros TP e TPPA. A) TP (tempo de protrombina). B) TPPA (tempo de tromboplastina parcialmente ativada). Grupos: CTL ($n=8$), Dgal ($n=8$), Dgal + TPO5 ($n=5$) e Dgal + TPO25 ($n=8$). Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA *one way*, seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ vs Ctl; # $p < 0,05$ vs Dgal.

Para avaliação da função plaquetária, foi observado o perfil de agregação frente ao estímulo a adenosina difosfato (ADP), um potente agregador de plaquetas. Não foi verificado mudanças no perfil de agregação plaquetária nos diferentes grupos experimentais (Figura 35). A agregação máxima ocorreu no tempo de quatro minutos

após o estímulo com ADP: CTL (68.66 ± 2.12 ; $n=6$), Dgal (67.50 ± 2.34 ; $n=6$), Dgal + TPO5 (62.83 ± 3.62 ; $n=6$) e Dgal + TPO25 (61.12 ± 2.56 ; $n=6$).

Figura 35 - Avaliação da reatividade plaquetária frente a Difosfato de adenosina

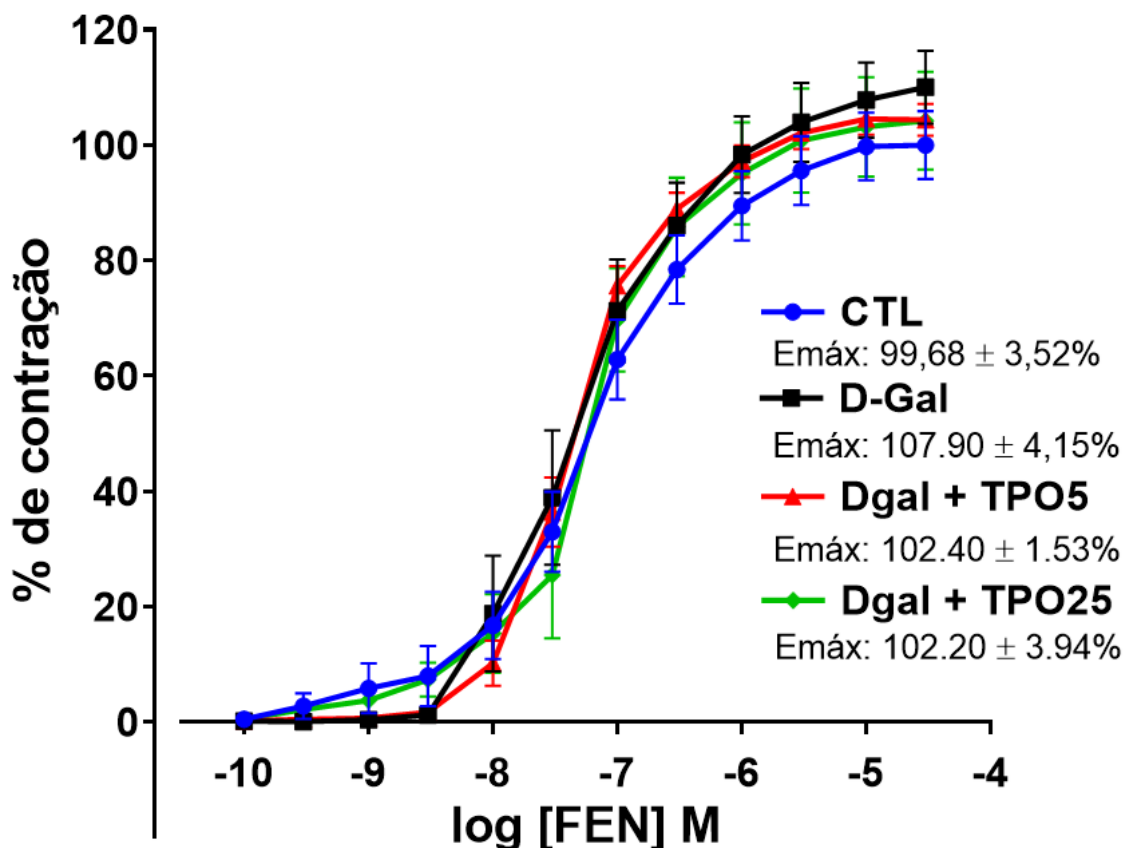


Legenda. Percentual de agregação plaquetária frente a adenosina difosfato (ADP) nos diversos tempos (2, 4, 6, 8 e 10 min). Grupos: CTL ($n=6$), Dgal ($n=6$), Dgal + TPO5 ($n=6$) e Dgal + TPO25 ($n=8$). Os valores foram expressos como erro $\pm$ padrão da média.

5.4.5 Avaliação sobre a reatividade vascular

A adição cumulativa de FEN (10^{-10} – 3×10^{-5} mol.L⁻¹), um agonista α_1 -adrenérgico, induziu contração dependente de concentração nos quatro grupos experimentais. A resposta contrátil máxima ($E_{m\acute{a}x}$) em todos os grupos experimentais apresentou efeito máximo semelhante, sem diferença significativa entre os grupos: Ctl ($E_{m\acute{a}x}$: $99.68 \pm 3.52\%$; $n=7$), Dgal ($E_{m\acute{a}x}$: $107.90 \pm 4.15\%$; $n=7$), Dgal + TPO5 ($E_{m\acute{a}x}$: $102.40 \pm 1.53\%$; $n=6$) e Dgal + TPO25 ($E_{m\acute{a}x}$: $102.20 \pm 3.94\%$; $n=6$) (Figura 36).

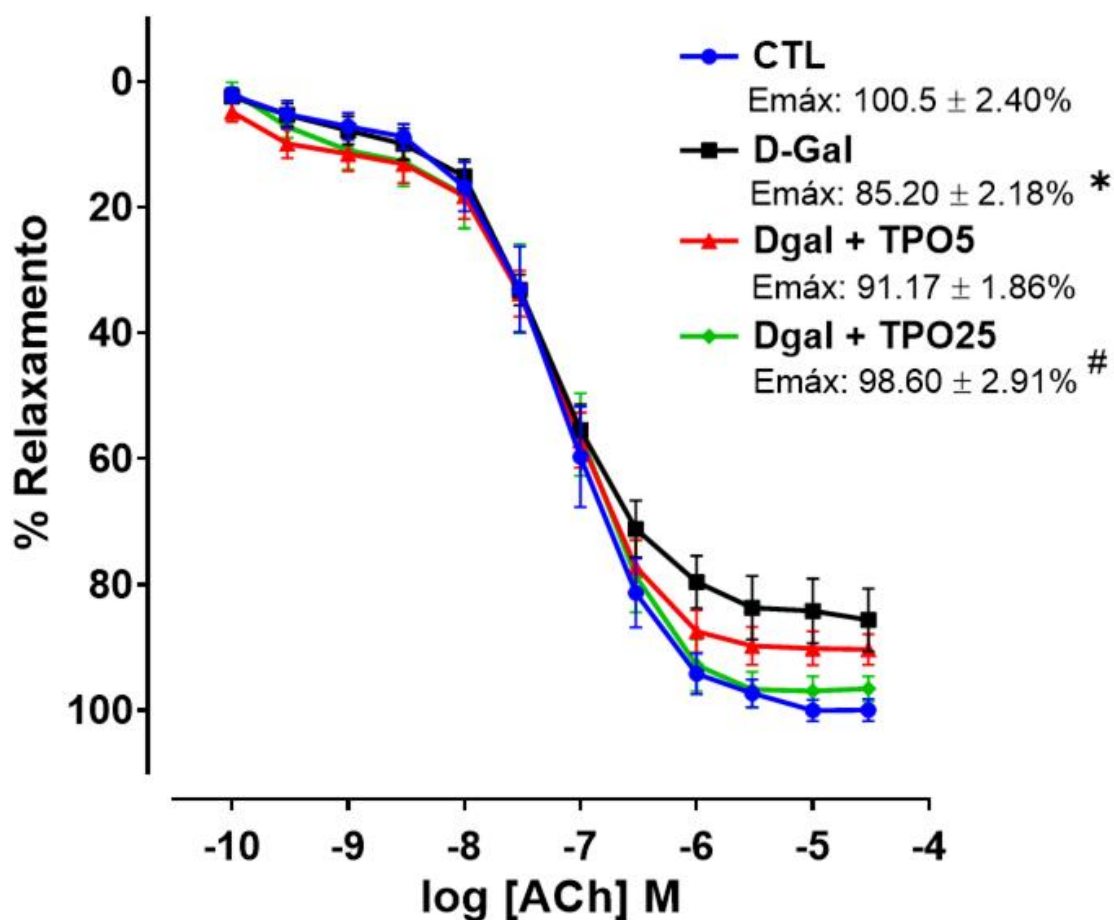
Figura 36 - Avaliação da resposta contrátil à Fenilefrina em anéis de artéria aorta



Legenda. Curva de concentração-resposta para a Fenilefrina (FEN) (10^{10} – 3×10^{-5} mol.L⁻¹). Grupos: CTL (n=7), Dgal (n=7), Dgal + TPO5 (n=6) e Dgal + TPO25 (n=6). Os valores foram expressos como erro ± padrão da média. O Emax foi utilizando o teste estatístico ANOVA one way, seguido do pós-teste de Tukey.

Para a resposta relaxante frente à Acetilcolina (ACh), grupo Dgal ($E_{\text{máx}}$: 85.20 ± 2.18; n=8) apresentou perca no efeito máximo, sendo significante menor comparado ao grupo Ctl ($E_{\text{máx}}$: 100.5 ± 2.40; n=6). A dose de 5 mg/kg não reverteu o dano frente a ação da ACh ($E_{\text{máx}}$: 91.17 ± 1.86; n=7). Por outro lado, a dose de 25 mg/kg restaurou a responsividade da artéria aorta ao agonista ACh ($E_{\text{máx}}$: 98.60 ± 2.91; n=7) (Figura 37).

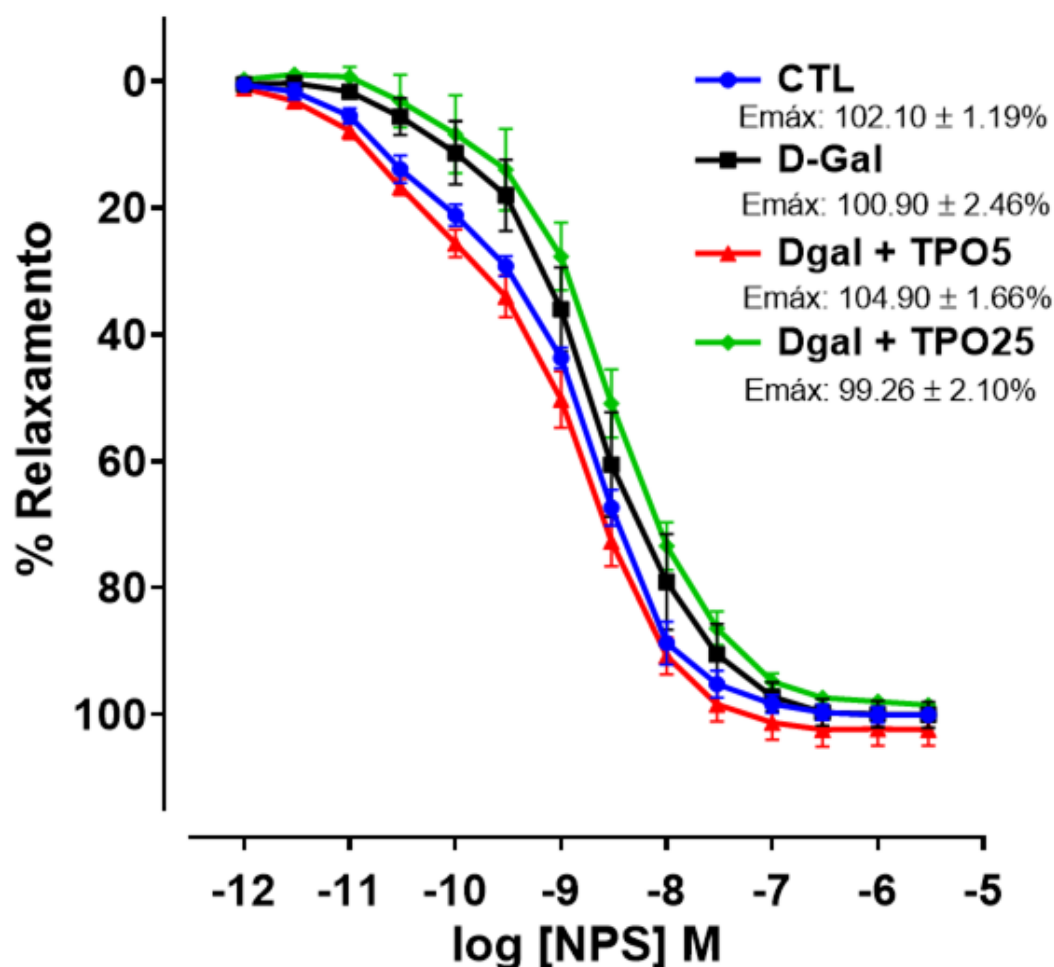
Figura 37 - Avaliação da resposta relaxante à Acetilcolina em anéis de artéria aorta



Legenda. Curva de concentração-resposta para à Acetilcolina (ACh) ($10^{10} - 3 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) em anéis de artéria aorta pré contraídos com FEN $10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$. Grupos: CTL (n=6), Dgal (n=8), Dgal + TPO5 (n=7) e Dgal + TPO25 (n=7). Os valores foram expressos como erro $\pm$ padrão da média. O $E_{\text{máx}}$ foi utilizando o teste estatístico ANOVA one way, seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0.05 vs Ctl; #p < 0.05 vs Dgal.

Para a resposta relaxante frente ao NPS, todos os grupos experimentais apresentaram efeito máximo semelhante, sem diferença entre os grupos: Ctl ($E_{\text{máx}}: 102.10 \pm 1.19\%$; n=8), Dgal ($E_{\text{máx}}: 100.90 \pm 2.46\%$; n=6), Dgal + TPO5 ($E_{\text{máx}}: 104.90 \pm 1.66\%$, n=6) e Dgal + TPO25 ($E_{\text{máx}}: 99.26 \pm 2.10\%$, n=6) (Figura 38).

Figura 38 - Avaliação da resposta relaxante ao Nitroprussiato de Sódio em anéis de artéria aorta



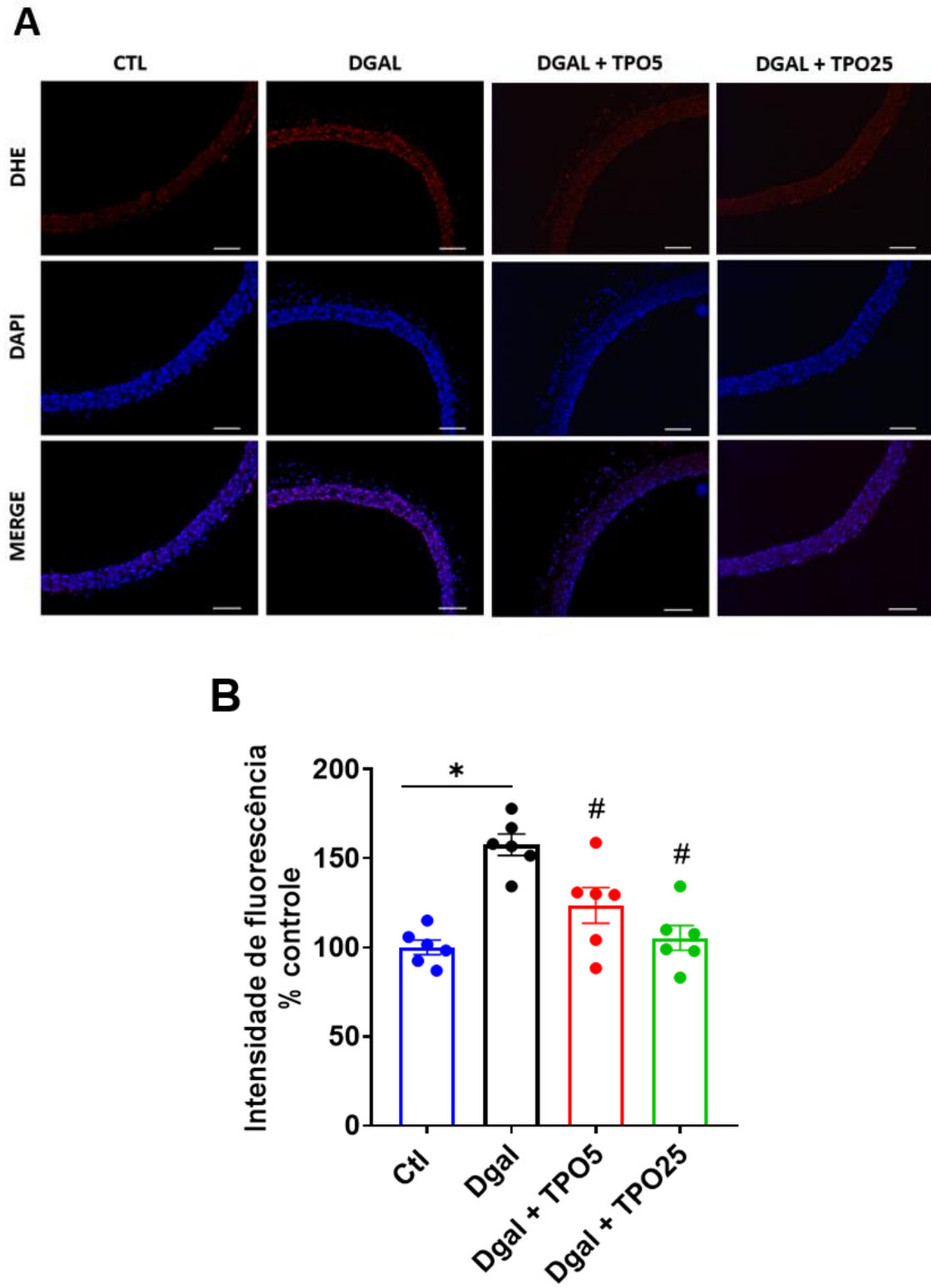
Legenda. Curva de concentração-resposta para o Nitroprussiato de Sódio (NPS) (10^{12} – 3×10^{-6} mol.L⁻¹) em anéis de artéria aorta pré contraídos com Fenilefrina (FEN) 10^{-6} mol.L⁻¹. Grupos: CTL (n=8), Dgal (n=6), Dgal + TPO5 (n=6) e Dgal + TPO25 (n=6). Os valores foram expressos como erro ± padrão da média. O Emáx foi utilizando o teste estatístico ANOVA one way, seguido do pós-teste de Tukey.

5.4.6 Quantificação de EROs em artérias de aorta

Os níveis de EROs, os quais estão associados com o estresse oxidativo, foram quantificados pela sonda DHE. O grupo Dgal (157.59 ± 6.01) apresentou intensidade de fluorescência para o DHE elevada quando comparada com o grupo Ctl (100.00 ± 4.05 ; n=6). Por outro lado, o tratamento com TPO nas duas doses experimentais

reduziram os níveis de EROS de forma significativamente: Dgal + TPO5 (123.61 ± 9.98 ; n=6) e Dgal + TPO25 (105.28 ± 6.96 ; n=6) (Figura 39).

Figura 39 - Avaliação do estresse oxidativo em anéis de aorta



Legenda. Avaliação de EROs em artéria aorta de ratos pela sonda DHE. A) imagens representativas. B) Intensidade de fluorescência para sonda DHE nos diferentes grupos experimentais. Grupos: CTL (n=6), Dgal (n=6), Dgal + TPO5 (n=6) e Dgal + TPO25 (n=6). Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA *one way*, seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05 vs Ctl; #p < 0,05 vs Dgal. Cada barra representa 100 μ m.

5.4.7 Avaliação da função cardíaca pelo eletrocardiograma (ECG)

Para avaliação da ação do tratamento com TPO sobre a função elétrica cardíaca, medidas eletrocardiográficas foram realizadas nos diferentes grupos experimentais (Tabela 8). Com exceção da diferença encontrada para a amplitude da onda P entre os grupos Dgal (0.079 ± 0.010 ; n=7) e Dgal + TPO5 (0.034 ± 0.010 ; n=4), os demais parâmetros não obtiveram diferenças.

Tabela 3 - Avaliação dos parâmetros eletrocardiográficos

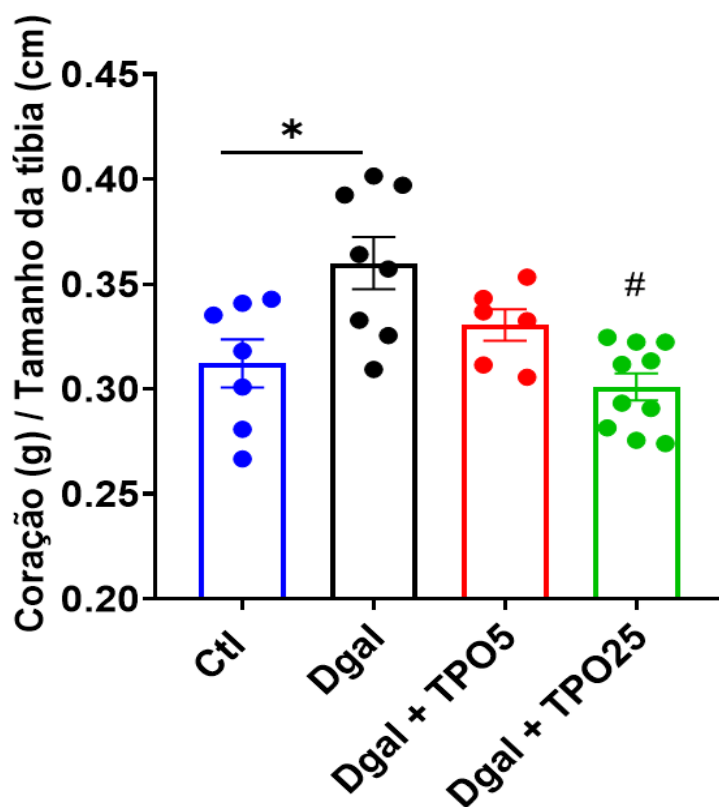
ELETROCARDIOGRAMA				
	Ctl	Dgal	Dgal + TPO5	Dgal + TPO25
Intervalo RR (ms)	259.743 $\pm$ 4.285	257.429 $\pm$ 4.079	268.050 $\pm$ 14.529	258.886 $\pm$ 7.046
FC (BPM)	231.814 $\pm$ 3.541	233.943 $\pm$ 3.970	225.750 $\pm$ 11.629	232.814 $\pm$ 6.348
Intervalo PR (ms)	59.171 $\pm$ 2.035	60.753 $\pm$ 0.233	57.148 $\pm$ 2.887	55.771 $\pm$ 1.659
Duração P (ms)	15.336 $\pm$ 1.205	18.687 $\pm$ 0.804	16.198 $\pm$ 2.834	15.234 $\pm$ 1.295
Intervalo QRS (ms)	18.071 $\pm$ 0.818	18.786 $\pm$ 0.644	18.013 $\pm$ 0.377	18.989 $\pm$ 0.486
Intervalo QT (ms)	85.586 $\pm$ 2.921	92.843 $\pm$ 3.594	83.475 $\pm$ 3.263	85.060 $\pm$ 2.951
QTc (ms)	168.286 $\pm$ 6.003	183.029 $\pm$ 6.434	162.000 $\pm$ 9.089	167.129 $\pm$ 4.812
Intervalo de tendência de pico T (ms)	52.090 $\pm$ 2.502	58.984 $\pm$ 2.518	51.325 $\pm$ 2.599	51.841 $\pm$ 3.869
Amplitude P (mV)	0.052 $\pm$ 0.010	0.079 $\pm$ 0.010	0.034 $\pm$ 0.010 #	0.050 $\pm$ 0.009
Amplitude Q (mV)	0.011 $\pm$ 0.002	0.011 $\pm$ 0.002	0.016 $\pm$ 0.001	0.009 $\pm$ 0.002
Amplitude R (mV)	0.591 $\pm$ 0.040	0.516 $\pm$ 0.033	0.612 $\pm$ 0.038	0.606 $\pm$ 0.052
Amplitude S (mV)	-0.271 $\pm$ 0.035	-0.215 $\pm$ 0.043	-0.190 $\pm$ 0.078	-0.249 $\pm$ 0.047
Altura ST (mV)	0.047 $\pm$ 0.014	0.045 $\pm$ 0.018	0.053 $\pm$ 0.009	0.044 $\pm$ 0.011
Amplitude T (mV)	0.125 $\pm$ 0.011	0.114 $\pm$ 0.015	0.123 $\pm$ 0.009	0.107 $\pm$ 0.009

Legenda. Avaliação dos parâmetros eletrocardiográficos. Grupos: CTL (n=7), Dgal (n=7), Dgal + TPO5 (n=4) e Dgal + TPO25 (n=7). Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA *one way*, seguido do pós-teste de Tukey. #p < 0,05 vs Dgal. Abreviações: FC: frequência cardíaca.

5.4.8 Avaliação do índice de hipertrofia cardíaca

O índice de hipertrofia cardíaca, calculado a partir da razão entre o peso do coração em gramas (g) e o tamanho da tíbia em centímetros (cm), foi determinado nos diferentes grupos experimentais. O grupo Dgal (0.360 ± 0.012 , n=8) apresentou índice de hipertrofia cardíaca maior comparado ao grupo Ctl (0.312 ± 0.011 , n=7). O grupo Dgal + TPO5 (0.330 ± 0.008 n=6) permaneceu semelhante ao grupo Dgal. No entanto, o grupo Dgal + TPO25 (0.301 ± 0.006 , n=10) reduziu significativamente o índice de hipertrofia cardíaca quando comparado ao grupo Dgal (Figura 40).

Figura 40 - Avaliação do índice de hipertrofia cardíaca



Legenda. Avaliação da relação coração (g) pela tibia (cm). Grupos: CTL (n=7), Dgal (n=8), Dgal + TPO5 (n=6) e Dgal + TPO25 (n=10). Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA *one way*, seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05 vs Ctl; #p < 0,05 vs Dgal.

Discussão

6 DISCUSSÃO

O envelhecimento é o principal fator de risco para várias doenças crônicas e degenerativas, como as doenças cardiovasculares (DE ALMEIDA; REZENDE; DANTAS; SILVA *et al.*, 2020; UNGVARI; TARANTINI; DONATO; GALVAN *et al.*, 2018). Tal fato deve-se às mudanças que acometem o organismo em nível molecular, celular e tecidual, deixando o indivíduo mais susceptível ao desenvolvimento e agravamento dessas doenças (ALMEIDA; RIBEIRO; MEDEIROS, 2017; LAZZERONI; VILLATORE; SOURYAL; PILI *et al.*, 2022). Após a descoberta que o envelhecimento biológico é um processo dinâmico e manipulável, podendo ser desacelerado e até mesmo revertido, vários mecanismos vêm sendo propostos para essa finalidade. Em 2013, López-Otin e colaboradores elencaram nove mecanismos, que quando manipulados poderiam acelerar ou reverter o processo de envelhecimento, comumente conhecidos como, os pontos chaves do envelhecimento, do inglês “Hallmarks of aging” (LÓPEZ-OTÍN; BLASCO; PARTRIDGE; SERRANO *et al.*, 2013). Recentemente, tais mecanismos foram atualizados para um total de doze (LÓPEZ-OTÍN; BLASCO; PARTRIDGE; SERRANO *et al.*, 2023). A nível celular, podemos destacar o processo de senescência celular (CAMPISI, 2020; DI MICCO; KRIZHANOVSKY; BAKER; D'ADDA DI FAGAGNA, 2021), processo comumente chamado de envelhecimento a nível celular.

Vários modelos experimentais *in vitro* foram propostos para estudos da senescência celular (GONZÁLEZ-GUALDA; BAKER; FRUK; MUÑOZ-ESPÍN, 2021). Nesse contexto, destaca-se o modelo acelerado de envelhecimento induzido pelo açúcar D-(+)-galactose (Dgal). Tal modelo baseia-se na teoria do estresse metabólico, com aumento na produção de EROs, mediadores inflamatórios, apoptose e parada do ciclo celular. De fato, terapias vêm sendo propostas para atenuação desse processo, seja eliminando as células senescentes do organismo “senolíticos”, seja atuando na supressão dos fenótipos associados com a senescência sem a eliminação dessas células “senomórficos” (TCHKONIA; PALMER; KIRKLAND, 2021). Em ambos os casos, os resultados têm sido bastante promissores em modelos animais, resultando numa extensão dos anos saudáveis de vida (FIELDER; WAN; ALIMOHAMMADIHA; ISHAQ *et al.*, 2022; KIRKLAND; TCHKONIA, 2020; ROBBINS; JURK; KHOSLA; KIRKLAND *et al.*, 2021).

Dentre os senolíticos, podemos destacar Desatinib, Quercetina, Fisetin e Navitoclax (CHAIB; TCHKONIA; KIRKLAND, 2022; ROBBINS; JURK; KHOSLA; KIRKLAND *et al.*, 2021). No entanto, os efeitos adversos são o principal entrave para o uso em humanos. Em estudos clínicos de fase II do Navitoclax demonstrou causar trombocitopenia e neutropenia nos pacientes (RUDIN; HANN; GARON; RIBEIRO DE OLIVEIRA *et al.*, 2012). Já o Fisetin mostrou baixa biodisponibilidade em doses seguras (SZYMCZAK; CIELECKA-PIONTEK, 2023).

Por outro lado, os senomórficos atuam por mecanismos reguladores das SASP (do inglês; *senescence-associated secretory phenotype*), sendo nesse caso, requerido um tratamento contínuo ao longo da vida do indivíduo. No entanto, o grande dilema para os senomórficos são seus efeitos adversos, como acontece com a rapamicina, que pode causar nefrotoxicidade, disfunção metabólica e imunossupressão (CHAIB; TCHKONIA; KIRKLAND, 2022). Portanto, o descobrimento de novos senoterapêuticos é fundamental para o desenvolvimento de uma terapia segura e eficaz em humanos (KIRKLAND; TCHKONIA; ZHU; NIEDERNHOFER *et al.*, 2017; TCHKONIA; PALMER; KIRKLAND, 2021). Várias estratégias vêm sendo desenvolvidas para descoberta de novos senoterapêuticos (BARRERA-VÁZQUEZ; GÓMEZ-VERJAN; MAGOS-GUERRERO, 2021; SMER-BARRETO; QUINTANILLA; ELLIOTT; DAWSON *et al.*, 2023).

Em destaque, Felix Wong e colaboradores, utilizando de redes neurais profundas “*deep neural networks*” identificou 2.352 possíveis compostos com atividade senolíticas dentre os >800.000 testados, sendo o mais promissor, BRD-k56819078 (inibidor da proteína Bcl-2), capaz de reduzir os marcadores de senescência nos rins de ratos idosos (WONG; OMORI; DONGHIA; ZHENG *et al.*, 2023). Já Fuhrmann-Stroissnigg e colaboradores desenvolveram um *screening* com 95 moléculas de 35 diferentes alvos envolvidos na regulação da autofagia, identificando dois inibidores da família de proteínas HSP90 com atividade senolíticas em células de camundongos e humanas. Além disso, o inibidor de HSP90, 17-MAG, mostrou eficaz em modelo de síndrome progeroide, reduzindo marcadores de senescência e atrasando o início de vários sintomas relacionados à idade (FUHRMANN-STROISSNIGG; LING; ZHAO; MCGOWAN *et al.*, 2017). Recentemente, Triana-Martínez e colaboradores identificaram e caracterizaram glicosídeos cardíacos como senolíticos, através de *Screening* de três bibliotecas independentes, sendo Proscillaridina A, Ouabaína e Digoxina candidatos promissores

(TRIANA-MARTÍNEZ; PICALLOS-RABINA; DA SILVA-ÁLVAREZ; PIETROCOLA *et al.*, 2019). Interessantemente, o *Screening* realizado por Qixia Xu e colaboradores demonstraram que o extrato de semente de uva (GSE) e seu principal constituinte, o flavonoide Procianidida C1, apresentam efeitos senomórficos em baixas concentrações e efeito senolíticos em concentrações elevadas (XU; FU; LI; LIU *et al.*, 2021).

Nesse contexto, realizamos um triplo *Screening* com um grupo de 20 terpenos, incluindo monoterpenos acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, além de Sesquiterpenos. Os terpenos apresentam grande potencial terapêutico por suas ações antioxidantes, anti-inflamatórias e antiproliferativas (DE SOUSA; DAMASCENO; AMORATI; ELSHABRAWY *et al.*, 2023), no entanto, são escassos seus estudos como “geroprotetores” (PROSHKINA; PLYUSNIN; BABAK; LASHMANOVA *et al.*, 2020). A estratégia adotada no *Screening* baseia na busca por moléculas capazes de 1) reduzir os níveis de células senescentes; 2) melhorar a viabilidade celular; e 3) possuir um efeito antioxidante. Nota-se que tal estratégia direciona os estudos para busca de um efeito senomórfico, visto que os senolíticos diminuem a viabilidade celular no grupo contendo maior número de células senescentes, além de aumentar o estresse oxidativo, mecanismo pelo qual pode desencadear apoptose celular (GASEK; KUCHEL; KIRKLAND; XU, 2021).

Desse modo, identificamos, em pelo menos uma concentração experimental, 18 terpenos promissores em reduzir os níveis de células senescentes e 5 foram capazes de melhorar a viabilidade celular. Além disso, 18 terpenos possuíam atividade antioxidante. No entanto, apenas os terpenos: 1) Geraniol; 2) Citral; 3) α -terpineol; 4) Terpinolene apresentaram triplo efeito. Ademais, quando levamos em consideração a concentração eficaz para o triplo efeito, apenas o Citral na concentração de 1 nM e o Terpinolene na concentração de 100 e 1000 nM permaneceram dentro dos critérios. Por outro lado, o Citral reduziu viabilidade celular na condição basal, em concentrações a partir de 10 nM. Por fim, levando em consideração a eficácia para a ação de diminuição o biomarcador para senescência aliada à sua melhora da viabilidade celular em múltiplas concentrações, optamos pelo Terpinolene (TPO).

O TPO, monoterpeno encontrado no alecrim e na maçã, além de espécies expostas a estímulos agressores externos, como grande variações de temperatura, indicando um potencial efeito protetor do Terpinolene para essas plantas (MENEZES;

SCHERF; MARTINS; RAMOS *et al.*, 2021). A ingestão de moléculas derivadas de plantas sob estresse está relacionada as ações protetoras, incluindo nos mecanismos da biologia do envelhecimento, conceito denominado de “*xenohormesis*” (BAUR; SINCLAIR, 2008). De fato, o Terpinolene, assim como outros terpenos (ex. carvacrol, α -terpineol, timol), estão presente na dieta mediterrânea, dieta rica em sementes, leguminosas, folhas e temperos derivados do reino vegetal (SCHWINGSHACKL; MORZE; HOFFMANN, 2020). Ademais, a dieta mediterrânea está relacionada com baixos índices de doenças cardiovasculares e metabólicas, sendo importante para alcançar um envelhecimento saudável (ANDREO-LÓPEZ; CONTRERAS-BOLÍVAR; MUÑOZ-TORRES; GARCÍA-FONTANA *et al.*, 2023; SCHWINGSHACKL; MORZE; HOFFMANN, 2020). No entanto, surpreendentemente, os estudos com o TPO encontrados na literatura são escassos, sobretudo envolvendo o sistema cardiovascular. Além disso, não há descrições até o presente momento dos benefícios do TPO no processo de envelhecimento. Contudo, em 2005, Grassmann e colaboradores demonstraram a capacidade do TPO em prevenir a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), evento importante para o tratamento de doenças como aterosclerose e doença arterial coronariana (GRASSMANN; HIPPELI; SPITZENBERGER; ELSTNER, 2005).

A fim de comprovar a ação do TPO em possuir características senomórficas, realizamos um ensaio para quantificar o perfil apoptótico frente a ação desse terpeno, e identificamos que o TPO é capaz de reduzir a taxa de apoptose e aumentar os níveis de células viáveis no grupo de senescência induzido por D-(+)-galactose (Dgal). Esse resultado confirma a melhora sobre a viabilidade celular do TPO identificado pelo *Screening*. Além disso, restaurar os níveis de viabilidade é uma característica dos senomórficos.

Sabendo do potencial promissor do TPO como senomórfico, seguimos os estudos *in vivo* para avaliação do seus efeitos, sobretudo inerentes ao sistema cardiovascular. Para isso, foi realizado um tratamento de oito semanas com o açúcar D-(+)-Galactose (Dgal), via intraperitoneal. Assim como ocorre *in vitro*, a Dgal é descrita na literatura por ser um modelo *in vivo* que acelera o processo de envelhecimento, sendo capaz de apresentar vários aspectos do envelhecimento natural, como disfunção erétil, hipertrofia ventricular e aumento no estresse oxidativo (DANTAS; ALMEIDA; GONÇALVES; ARAÚJO *et al.*, 2022; REZENDE; ALMEIDA; GONÇALVES; AZEVEDO *et al.*, 2021; SHAHIDI; RAMEZANI-ALIAKBARI; KOMAKI;

SALEHI *et al.*, 2023). Tal modelo baseia-se na teoria do estresse metabólico, o qual é capaz de mimetizar vários aspectos do envelhecimento fisiológico, como disfunção mitocondrial, inflamação sistêmica, disfunção telemétrica, instabilidade gênica e senescência celular (BO-HTAY; PALEE; APAIJAI; CHATTIPAKORN *et al.*, 2018; LEE; HOANG; JUNG; JUNG *et al.*, 2020; WANG; ZHANG; KE; WEN *et al.*, 2022). Ademais, o envelhecimento acelerado por Dgal tem por característica a grande produção de EROs, o que explica, pelo menos em parte, o mecanismo pelo qual o Dgal acelera o processo de envelhecimento (AZMAN; ZAKARIA, 2019). Assim como no envelhecimento do sistema cardiovascular fisiológico, o Dgal promove disfunção endotelial por aumento do número de células positivas para SA- β -galactosidase, aumento na expressão das proteínas p53, p16 e p21 (marcadores de parada do ciclo celular), de Tnf- α , IL-6, IL-1 β (citocinas pró-inflamatórias), além de diminuir a expressão da eNOS (responsável pela síntese de óxido nítrico) e liberação de NO (óxido nítrico) (WANG; ZHANG; KE; WEN *et al.*, 2022; YU; LIAO; HU; LV *et al.*, 2022).

A influência do envelhecimento acelerado por Dgal no peso corporal durante o tratamento com TPO foi avaliado semanalmente, sem diferenças entre os grupos experimentais. Tal achado para o tratamento com Dgal na dose de 150 mg/kg está em conformidade com a literatura, a qual demonstra que o Dgal não seja capaz de gerar diminuição no peso corpóreo, inclusive em experimentos realizados previamente em nosso laboratório (REZENDE; ALMEIDA; GONÇALVES; AZEVEDO *et al.*, 2021; SONG; SANGPREECHA; CHANMUANG; PARK *et al.*, 2023).

Ademais, no dia anterior a eutanásia, a pressão arterial sistólica e a frequência cardíaca foram mensuradas, no entanto, sem alterações sob tais parâmetros. No entanto, a literatura relata que a pressão arterial sistólica, média e diastólica pode estar aumentada no modelo de envelhecimento acelerado com Dgal (BO-HTAY; SHWE; HIGGINS; PALEE *et al.*, 2020). No entanto, tal aumento é apenas observado em doses elevadas, como as de 200 mg/kg (DANTAS; ALMEIDA; GONÇALVES; ARAÚJO *et al.*, 2022) e 250 mg/kg (YU; YU; MI; WANG *et al.*, 2023).

No dia da eutanásia, uma gota de sangue caudal do animal foi coletado para realização da glicemia minutos antes da anestesia. O controle nos níveis glicêmicos é uma das principais características de um envelhecimento saudável, sobretudo seu efeito cumulativo ao longo do processo de envelhecimento (DE CABO; MATTSON, 2019; LI; PLONER; WANG; ZHAN *et al.*, 2021). Embora não tenha acontecido diferenças entre o grupo CTL e Dgal, a dose de 25 mg/kg do TPO foi capaz de reduzir

o nível glicêmico em relação ao grupo Dgal. A hipótese para tal achado pode ser devido a uma melhora na resistência à insulina ou maior metabolização da glicose. Porém, não realizamos nenhum protocolo experimental para comprovar essa teoria, a qual precisa ser futuramente investigada. Já os níveis de hemoglobina glicada dos animais obtidas não apresentaram diferenças entre os grupos, o que pode ser explicado pelo período curto de tratamento (56 dias), visto que no envelhecimento fisiológico esse parâmetro está aumentado.

Além do perfil glicêmico, outros parâmetros bioquímicos envolvidos no metabolismo lipídico e proteico, enzimas associadas a função hepática e renal foram avaliadas. Para o perfil lipídico, realizamos análises obtidas do soro para os parâmetros: colesterol total e triglicerídeos. A manutenção dos níveis desses marcadores está associada a menor risco de DCVs, permitindo bom prognóstico, sobretudo no idoso. No presente estudo, não houve alterações entre os grupos no colesterol total e triglicerídeos, seguindo o perfil encontrado em diversos grupos (BO-HTAY; SHWE; HIGGINS; PALEE *et al.*, 2020; BO-HTAY; SHWE; JAIWONGKAM; KERDPHOO *et al.*, 2021).

Já os níveis de proteínas totais foram aumentados no grupo Dgal em relação ao grupo controle durante o tratamento. No entanto, o TPO foi capaz de restaurar esse aumento para os níveis basais. De forma semelhante, os níveis de globulinas seguiram o perfil dos achados para proteínas totais. Por outro lado, os níveis de albumina não foram alterados entre o grupo Ctl e Dgal, porém o grupo Dgal+TPO5 resultou numa diminuição nos níveis séricos de albumina. Tais resultados sugerem a participação do TPO no metabolismo proteico.

Para os parâmetros hepáticos (AST e ALT) não houve alterações entre os grupos, evidenciando uma segurança para o tratamento com o TPO. De modo semelhante, os parâmetros renais, como a creatinina e ureia não alteraram suas concentrações séricas devido ao tratamento. Por outro lado, os níveis de ácido úrico mostraram reduzido na menor dose experimental (TPO5) comparado com o grupo Dgal. Uma explicação para esse achado pode estar no desbalanço encontrado para os parâmetros proteicos séricos. Além disso, dados sugerem a não alteração nesses parâmetros durante o processo de envelhecimento acelerado por Dgal (EL-FAR; ELEWA; ABDELFAHATTAH; ALSENOSY *et al.*, 2021).

Os parâmetros hematológicos são de grande importância na bioprospecção de novos fármacos. Alguns senoterapêuticos tem falhado na manutenção desses

parâmetros, sobretudo evidenciado pela toxicidade para os eritrócitos e plaquetas (RUDIN; HANN; GARON; RIBEIRO DE OLIVEIRA *et al.*, 2012). Desse modo, investigamos o efeito do TPO nos principais parâmetros envolvidos no eritrograma, leucograma e plaquetograma. Os resultados não revelaram alterações para os parâmetros eritrocitários assim como os plaquetários, indicando que o tratamento não altera o número nem suas características. No entanto, para o leucograma, foi observado um aumento de 33% no número de leucócitos no grupo Dgal comparado ao grupo Ctl, sendo esse aumento restaurado pelo tratamento com TPO. O principal grupo de células envolvidos nesse aumento foram os granulócitos, correspondendo a um aumento de 52% em termos absolutos no grupo Dgal quando comparado ao grupo Ctl, o que foi restaurado pelo TPO. De fato, durante o envelhecimento, há um aumento de senescência e do processo inflamatório na medula óssea, sendo liberadas numerosas citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento, incluindo fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), interleucina (IL) - 1, IL-6 e Tnf- α , as quais promovem a diferenciação de células-tronco/progenitoras hematopoiéticas (HSPCs) em direção a células mieloides em vez de células linfoides (LI; LI; ZHANG; WANG *et al.*, 2023; VAN AVONDT; STRECKER; TULOTTA; MINNERUP *et al.*, 2023). Além disso, vários os estímulos podem estar atrelados ao aumento de granulócitos durante o envelhecimento, como as próprias células senescentes, além da disbiose (KALE; SHARMA; STOLZING; DESPREZ *et al.*, 2020; RAGONNAUD; BIRAGYN, 2021). No entanto, tais células podem não estar funcionais devido ao processo de imunosenescência, estando aumentadas apenas em número (LIU; LIANG; REN; GUO *et al.*, 2023).

Além disso, realizando experimentos adicionais para investigação do perfil de coagulação e reatividade plaquetária, foi observado uma mudança de perfil para o tempo de trombina (TP) nos grupos experimentais. O grupo Dgal mostrou aumento no TP quando comparado ao grupo Ctl. Ademais, o grupo tratado com a dose de 25 mg/kg foi restaurado aos níveis basais. Já para o tempo de tromboplastina parcial ativado (TPPA) não houve alterações entre os grupos experimentais. A evidência de alterações para o teste de TP pode ser devido a fatores como uso de anticoagulantes, lesões hepáticas e deficiência no metabolismo da vitamina K. Ademais, a reatividade plaquetária frente ao ADP mostrou sem alterações significativas nos grupos experimentais. Em casos de números de plaquetas normais com TPPA normal, com

TP elevado, na clínica, é sugestivo de distúrbio no fator VII da cascata de coagulação. O fator VII é uma glicoproteína sintetizada no fígado, porém não houve lesões hepáticas aparentes, visto que as enzimas AST e ALT não mudaram significativamente frente ao Dgal, necessitando de futuras investigações para esse achado.

Em sequência, analisamos os efeitos do tratamento na capacidade em responder a estímulos em artéria aorta. Para isso, a funcionalidade do vaso foi verificada pela responsividade aos estímulos contracturantes como a Fenilefrina (FEN), e relaxantes como a Acetilcolina (ACh) e o Nitroprussiato de Sódio (NPS). Para a contração frente a FEN, em artéria aorta sem a presença de endotélio, não houve diferença entre os grupos experimentais. Para esse ensaio, a literatura mostra não haver alteração no perfil de contratilidade, mesmo em doses elevadas de Dgal (200 mg/kg) (DANTAS; ALMEIDA; GONÇALVES; ARAÚJO *et al.*, 2022). Por outro lado, para a responsividade a ACh, houve uma diminuição do percentual de relaxamento no grupo Dgal de 15%, o qual foi restaurado pelo TPO na dose de 25 mg/kg. Animais idosos apresentam uma perda na responsividade a ACh devido a uma disfunção endotelial inerente ao processo e envelhecimento (BLOOM; ISLAM; LESNIEWSKI; DONATO, 2023; DONATO; MORGAN; WALKER; LESNIEWSKI, 2015). A fim de determinar a capacidade de relaxamento do músculo, realizamos uma curva de concentração-resposta para o NPS, um potente doador de óxido nítrico. Para o NPS, não foi observado mudanças no perfil de relaxamento entre os grupos, sugerindo que em nosso modelo de envelhecimento ocorre uma disfunção endotelial com a preservação da função da camada muscular vascular.

Além da funcionalidade da aorta, verificamos a presença de EROs no tecido vascular. Tais moléculas, quando aumentadas de forma persistente, gera danos oxidativos e estimula vias características do processo de remodelamento vascular, além de culminar com a perda funcional da artéria (HIGASHI, 2022; SENA; LEANDRO; AZUL; SEIÇA *et al.*, 2018). O grupo Dgal apresentou aumento nos níveis de EROs vascular quando comparado com o grupo Ctl. Tal aumento está descrito amplamente na literatura, e acontece tanto no envelhecimento acelerado quanto no fisiológico (DANTAS; ALMEIDA; GONÇALVES; ARAÚJO *et al.*, 2022; LEE; HOANG; JUNG; JUNG *et al.*, 2020). Por outro lado, o tratamento com TPO na dose de 25 mg/kg resultou numa diminuição nos níveis de EROs vascular para os níveis do grupo Ctl. Contudo, o efeito antioxidante final do TPO pode ser derivado de uma ação

antioxidante direta, uma estimulação do sistema antioxidante ou pela manutenção da saúde vascular por mecanismos adjacentes (ex. saúde mitocondrial). Para isso, tais mecanismos precisam ser futuramente investigados.

Para avaliação da função cardíaca após o período de tratamento, foi realizado o eletrocardiograma (ECG). O ECG não evidenciou alterações significativas no perfil elétrico do coração, embora tenha tido mudanças no perfil do ECG. Na literatura, animais idosos apresentam uma disfunção atrial e aumento da hipertrofia ventricular esquerda com a fração de ejeção preservada (PANENI; DIAZ CAÑESTRO; LIBBY; LÜSCHER *et al.*, 2017). Tais características aumentam a susceptibilidade a arritmias, fibrilação atrial e insuficiência cardíaca, eventos com maior prevalência nos idosos (DAI; CHEN; JOHNSON; SZETO *et al.*, 2012; PANENI; DIAZ CAÑESTRO; LIBBY; LÜSCHER *et al.*, 2017). De fato, a duração da onda P está 21% maior no grupo Dgal em relação ao Ctl. Para amplitude da onda P, a média encontra-se 52% maior no Dgal comparado ao grupo Ctl, indicando um tempo maior para completa ativação dos átrios, o que foi restabelecido pelo TPO em ambas as doses. Embora não tenha ocorrido alterações no intervalo QRS, o intervalo QT, o intervalo QTc, e o intervalo do pico T estavam 8%, 8% e 13% respectivamente aumentados no grupo Dgal em relação ao Ctl. Para os três parâmetros, as duas doses de TPO normalizou esses valores para os níveis do Ctl. Além disso, a amplitude da onda T estava diminuída 13% no grupo Dgal comparada ao grupo Ctl, sendo normalizado pelo tratamento com TPO. Em conjunto, tais achados eletrocardiográficos indica aumento no risco para fibrilação atrial, arritmias ventriculares e distúrbios na condução elétrica.

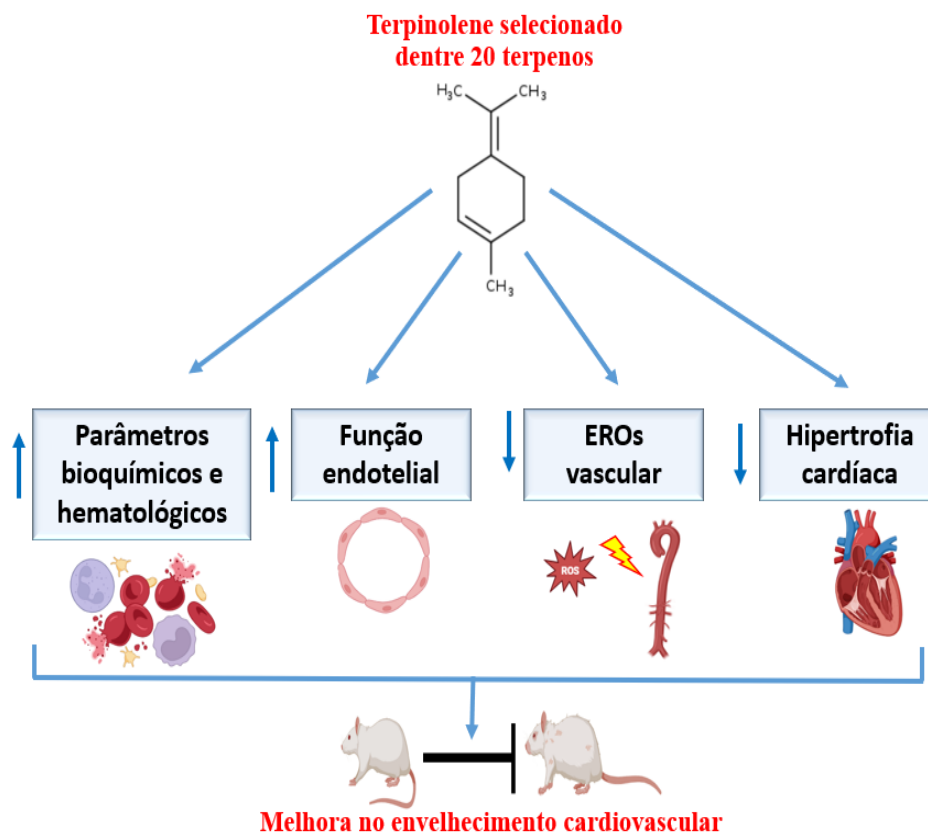
Estruturalmente, o coração sofre processos de remodelamento durante o envelhecimento (DE ALMEIDA; REZENDE; DANTAS; SILVA *et al.*, 2020; NORTH; SINCLAIR, 2012). De fato, o envelhecimento acelerado com Dgal apresenta aumento na expressão de proteínas pro-fibróticas, como TGF-1 β , p38, MMPs (CHENG; REN; CHENG; LI *et al.*, 2021). Além disso, a principal consequência desse processo é observada pelo aumento do índice de hipertrofia cardíaca, o qual foi mensurado pela razão do peso dos corações isolados pelo comprimento da tíbia, evidenciando um aumento no índice de hipertrofia de 15% no grupo Dgal em relação ao grupo Ctl. Interessantemente, o grupo Dgal + TPO25 teve o índice de hipertrofia restaurados aos níveis do grupo Ctl, indicando benefício do TPO nesse processo.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

Os terpenos apresentaram boa atividade antioxidante e anti-senescente, destacando-se como bons candidatos a senoterapêuticos. O Terpinolene, selecionado a partir de um triplo *screening*, apresentou ainda a capacidade de melhorar a viabilidade celular em células endoteliais de artéria aorta de ratos. Além disso, seus efeitos benéficos também são aplicados em modelos *in vivo*, sendo mediador para reverter os efeitos deletérios em modelo de envelhecimento acelerado por D-(+)-Galactose, tais como a disfunção endotelial vascular em tiras de anéis de aorta, redução dos níveis de estresse oxidativo vascular, melhora nos parâmetros bioquímicos e hematológicos, além de exercer efeitos benéficos sobre hipertrofia cardíaca. Portanto, propomos um novo horizonte para o Terpinolene, como potencial agente senoterapêutico.

Figura 41 - Terpinolene e caracterização de seus efeitos em modelo animal de envelhecimento acelerado por D-(+)-galactose



Legenda. Terpinolene, um novo candidato a senoterapêutico. Terpinolene selecionado entre vinte terpenos, apresentou em modelo de envelhecimento acelerado com D-(+)-galactose, capacidade de

melhorar parâmetros bioquímicos e hematológicos. Além disso, foi capaz de melhorar a função endotelial e atenuar os níveis de EROs , ambos em artéria aorta de ratos. Por fim, o Terpinolene foi capaz de atenuar o índice de hipertrofia cardíaca característico do envelhecimento. Portanto, o Terpinolene apresenta efeitos benéficos no combate ao envelhecimento cardiovascular.

Perspectivas

8 PERSPECTIVAS

O Terpinolene surge como alternativa na busca pelos senoterapêuticos, visto seu repertório benéfico aplicado ao sistema cardiovascular, como a melhora da função endotelial e redução da hipertrofia cardíaca. No entanto, experimentos adicionais precisam ser realizados a fim de consolidar esse monoterpeno como ferramenta farmacológica, sobretudo para os idosos. Dessa forma, é necessário a investigação do mecanismo de ação pelos quais resultam nos efeitos senoterapêuticos encontrados *in vitro* e que possivelmente foram replicados *in vivo*.

Referências

REFERÊNCIAS

ALGHATRIF, M.; LAKATTA, E. G. The conundrum of arterial stiffness, elevated blood pressure, and aging. **Curr Hypertens Rep**, 17, n. 2, p. 12, Feb 2015.

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.

ANDERSON, R.; RICHARDSON, G. D.; PASSOS, J. F. Mechanisms driving the ageing heart. **Experimental Gerontology**, 109, p. 5-15, 2018/08/01/ 2018.

ANDREO-LÓPEZ, M. C.; CONTRERAS-BOLÍVAR, V.; MUÑOZ-TORRES, M.; GARCÍA-FONTANA, B. *et al.* Influence of the Mediterranean Diet on Healthy Aging. 24, n. 5, p. 4491, 2023.

AYDIN, E.; TÜRKEZ, H.; TAŞDEMİR, S. Anticancer and antioxidant properties of terpinolene in rat brain cells. **Arh Hig Rada Toksikol**, 64, n. 3, p. 415-424, Sep 2013.

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.; CHILDS, B. G.; DURIK, M.; WIJERS, M. E. *et al.* Naturally occurring p16Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. **Nature**, 530, n. 7589, p. 184-189, 02/11/print 2016. Article.

BARRERA-VÁZQUEZ, O. S.; GÓMEZ-VERJAN, J. C.; MAGOS-GUERRERO, G. A. Chemoinformatic Screening for the Selection of Potential Senolytic Compounds from Natural Products. 11, n. 3, p. 467, 2021.

BAUR, J. A.; SINCLAIR, D. A. What is Xenohormesis? **Am J Pharmacol Toxicol**, 3, n. 1, p. 152-159, Mar 31 2008.

BELLO, H.; NORTON, G. R.; PETERSON, V. R.; MMOPI, K. N. *et al.* Hemodynamic Determinants of Age Versus Left Ventricular Diastolic Function Relations Across the Full Adult Age Range. 75, n. 6, p. 1574-1583, 2020.

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.

BO-HTAY, C.; PALEE, S.; APAIJAI, N.; CHATTIPAKORN, S. C. *et al.* Effects of d-galactose-induced ageing on the heart and its potential interventions. 22, n. 3, p. 1392-1410, 2018.

BO-HTAY, C.; SHWE, T.; HIGGINS, L.; PALEE, S. *et al.* Aging induced by D-galactose aggravates cardiac dysfunction via exacerbating mitochondrial dysfunction in obese insulin-resistant rats. **Geroscience**, 42, n. 1, p. 233-249, Feb 2020.

BO-HTAY, C.; SHWE, T.; JAIWONGKAM, T.; KERDPHOO, S. *et al.* Hyperbaric oxygen therapy effectively alleviates D-galactose-induced-age-related cardiac dysfunction via attenuating mitochondrial dysfunction in pre-diabetic rats. **Aging (Albany NY)**, 13, n. 8, p. 10955-10972, Apr 16 2021.

BORGHESAN, M.; HOOGAARS, W. M. H.; VARELA-EIRIN, M.; TALMA, N. *et al.* A Senescence-Centric View of Aging: Implications for Longevity and Disease. **Trends Cell Biol**, 30, n. 10, p. 777-791, Oct 2020.

BURTON, D. G.; KRIZHANOVSKY, V. Physiological and pathological consequences of cellular senescence. **Cell Mol Life Sci**, 71, n. 22, p. 4373-4386, Nov 2014.

CALZERRA, N. T. M.; MELO, M. P.; SANTOS, P. F.; ASSIS, K. S. *et al.* Cardiovascular protection effect of a Northeastern Brazilian lyophilized red wine in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Functional Foods**, 88, p. 104868, 2022/01/01/ 2022.

CAMPISI, J. Aging, Cellular Senescence, and Cancer. **Annual Review of Physiology**, 75, n. 1, p. 685-705, 2013/02/10 2013.

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.

CERVANTES GRACIA, K.; LLANAS-CORNEJO, D.; HUSI, H. CVD and Oxidative Stress. **Journal of clinical medicine**, 6, n. 2, p. 22, 2017.

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.

CHEN, R.; ZHANG, X.; ZHU, X.; WANG, C. *et al.* Myricetin alleviated hydrogen peroxide-induced cellular senescence of nucleus pulposus cell through regulating SERPINE1. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, 18, n. 1, p. 143, 2023/02/27 2023.

CHENG, J.; REN, C.; CHENG, R.; LI, Y. *et al.* Mangiferin ameliorates cardiac fibrosis in D-galactose-induced aging rats by inhibiting TGF- β /p38/MK2 signaling pathway. **Korean J Physiol Pharmacol**, 25, n. 2, p. 131-137, Mar 1 2021.

CHIAO, Y. A.; RABINOVITCH, P. S. The Aging Heart. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, 5, n. 9, September 1, 2015 2015.

CHILDS, B. G.; BAKER, D. J.; WIJSHAKE, T.; CONOVER, C. A. *et al.* Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis. **Science (New York, N.Y.)**, 354, n. 6311, p. 472-477, 2016.

CLAYTON, Z. S.; HUTTON, D. A.; BRUNT, V. E.; VANDONGEN, N. S. *et al.* Apigenin restores endothelial function by ameliorating oxidative stress, reverses aortic stiffening, and mitigates vascular inflammation with aging. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 321, n. 1, p. H185-h196, Jul 1 2021.

CONTI, V.; IZZO, V.; CORBI, G.; RUSSOMANNO, G. *et al.* Antioxidant Supplementation in the Treatment of Aging-Associated Diseases. **Frontiers in Pharmacology**, 7, n. 24, 2016-February-12 2016. Review.

DAI, D. F.; CHEN, T.; JOHNSON, S. C.; SZETO, H. *et al.* Cardiac aging: from molecular mechanisms to significance in human health and disease. **Antioxid Redox Signal**, 16, n. 12, p. 1492-1526, Jun 15 2012.

DAMASCENO, D. D.; LIMA, M. P.; MOTTA, D. F.; FERREIRA, A. J. *et al.* Cardiovascular and eletrocardiographic parameters after tonin administration in Wistar rats. **Regulatory Peptides**, 181, p. 30-36, 2013/02/10/ 2013.

DANTAS, S. H.; ALMEIDA, A. J. P. d.; GONÇALVES, T. A. F.; ARAÚJO, I. G. A. *et al.* Evaluation of Cardiovascular Effects of Carvacrol in a D-(+)-Galactose-Induced aging Model. **Journal of Applied Life Sciences International**, 25, n. 6, p. 18-27, 10/18 2022.

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 CABO, R.; MATTSON, M. P. Effects of Intermittent Fasting on Health, Aging, and Disease. **N Engl J Med**, 381, n. 26, p. 2541-2551, Dec 26 2019.

DE CHRISTO SCHERER, M. M.; MARQUES, F. M.; FIGUEIRA, M. M.; PEISINO, M. C. O. *et al.* Wound healing activity of terpinolene and α -phellandrene by attenuating inflammation and oxidative stress in vitro. **J Tissue Viability**, 28, n. 2, p. 94-99, May 2019.

DE CUYPER, I. M.; MEINDERS, M.; VAN DE VIJVER, E.; DE KORTE, D. *et al.* A novel flow cytometry-based platelet aggregation assay. **Blood**, 121, n. 10, p. e70-80, Mar 7 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.

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.

DIKIC, I.; ELAZAR, Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 19, n. 6, p. 349-364, Jun 2018.

DIMRI, G. P.; LEE, X.; BASILE, G.; ACOSTA, M. *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 92, n. 20, p. 9363-9367, September 26, 1995 1995.

DONATO, A. J.; MACHIN, D. R.; LESNIEWSKI, L. A. Mechanisms of Dysfunction in the Aging Vasculature and Role in Age-Related Disease. **Circ Res**, 123, n. 7, p. 825-848, Sep 14 2018.

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.

DOOKUN, E.; WALASZCZYK, A.; REDGRAVE, R.; PALMOWSKI, P. *et al.* Clearance of senescent cells during cardiac ischemia–reperfusion injury improves recovery. 19, n. 10, p. e13249, 2020.

EL-BASSOSSY, H. M.; GHALEB, H.; ELBERRY, A. A.; BALAMASH, K. S. *et al.* Geraniol alleviates diabetic cardiac complications: Effect on cardiac ischemia and oxidative stress. **Biomed Pharmacother**, 88, p. 1025-1030, Apr 2017.

EL-FAR, A. H.; ELEWA, Y. H. A.; ABDELFAH, E.-Z. A.; ALSENOSY, A.-W. A. *et al.* Thymoquinone and Curcumin Defeat Aging-Associated Oxidative Alterations Induced by D-Galactose in Rats' Brain and Heart. 22, n. 13, p. 6839, 2021.

EL-FAR, A. H.; LEBDA, M. A.; NORELDIN, A. E.; ATTA, M. S. *et al.* Quercetin Attenuates Pancreatic and Renal D-Galactose-Induced Aging-Related Oxidative Alterations in Rats. **Int J Mol Sci**, 21, n. 12, Jun 18 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.

FIELDER, E.; WAN, T.; ALIMOHAMMADIHA, G.; ISHAQ, A. *et al.* Short senolytic or senostatic interventions rescue progression of radiation-induced frailty and premature ageing in mice. **eLife**, 11, p. e75492, 2022/05/04 2022.

FORMAN, H. J.; ZHANG, H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, 20, n. 9, p. 689-709, 2021/09/01 2021.

FUHRMANN-STROISSNIGG, H.; LING, Y. Y.; ZHAO, J.; MCGOWAN, S. J. *et al.* Identification of HSP90 inhibitors as a novel class of senolytics. **Nature Communications**, 8, n. 1, p. 422, 2017/09/04 2017.

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.

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.

GONZÁLEZ-GUALDA, E.; BAKER, A. G.; FRUK, L.; MUÑOZ-ESPÍN, D. A guide to assessing cellular senescence in vitro and in vivo. 288, n. 1, p. 56-80, 2021.

GRASSMANN, J.; HIPPELI, S.; SPITZENBERGER, R.; ELSTNER, E. F. The monoterpene terpinolene from the oil of *Pinus mugo* L. in concert with alpha-tocopherol and beta-carotene effectively prevents oxidation of LDL. **Phytomedicine**, 12, n. 6-7, p. 416-423, Jun 2005.

GUEDES, D. N.; SILVA, D. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MEDEIROS, I. A. Calcium antagonism and the vasorelaxation of the rat aorta induced by rotundifolone. **Braz J Med Biol Res**, 37, n. 12, p. 1881-1887, Dec 2004.

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.

HALLIWELL, B. Understanding mechanisms of antioxidant action in health and disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 25, n. 1, p. 13-33, 2024/01/01 2024.

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.

HARMAN, D. Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. **Journal of Gerontology**, 11, n. 3, p. 298-300, 1956.

HEKIMI, S.; LAPOINTE, J.; WEN, Y. Taking a "good" look at free radicals in the aging process. **Trends in cell biology**, 21, n. 10, p. 569-576, 2011.

HERRANZ, N.; GIL, J. Mechanisms and functions of cellular senescence. **The Journal of Clinical Investigation**, 128, n. 4, p. 1238-1246, 04/02/ 2018.

HIGASHI, Y. Roles of Oxidative Stress and Inflammation in Vascular Endothelial Dysfunction-Related Disease. 11, n. 10, p. 1958, 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.

KALE, A.; SHARMA, A.; STOLZING, A.; DESPREZ, P.-Y. *et al.* Role of immune cells in the removal of deleterious senescent cells. **Immunity & Ageing**, 17, n. 1, p. 16, 2020/06/03 2020.

KHALEEL, C.; TABANCA, N.; BUCHBAUER, G. α -Terpineol, a natural monoterpene: A review of its biological properties. **Open Chemistry**. 16: 349 p. 2018.

KIRKLAND, J. L.; TCHKONIA, T. Senolytic drugs: from discovery to translation. **J Intern Med**, 288, n. 5, p. 518-536, Nov 2020.

KIRKLAND, J. L.; TCHKONIA, T.; ZHU, Y.; NIEDERNHOFER, L. J. *et al.* The Clinical Potential of Senolytic Drugs. 65, n. 10, p. 2297-2301, 2017.

KREBS, H. A.; HENSELEIT, K. Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. 210, n. 1-2, p. 33-66, 1932.

LANIGAN, F.; GERAGHTY, J. G.; BRACKEN, A. P. Transcriptional regulation of cellular senescence. **Oncogene**, 30, n. 26, p. 2901-2911, 06/30/print 2011.

LAPOINTE, J.; HEKIMI, S. When a theory of aging ages badly. **Cell Mol Life Sci**, 67, n. 1, p. 1-8, Jan 2010.

LAZZERONI, D.; VILLATORE, A.; SOURYAL, G.; PILI, G. *et al.* The Aging Heart: A Molecular and Clinical Challenge. 23, n. 24, p. 16033, 2022.

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. **Aging Cell**, 19, n. 12, p. e13279, Dec 2020.

LENNICKE, C.; COCHEMÉ, H. M. Redox metabolism: ROS as specific molecular regulators of cell signaling and function. **Molecular Cell**, 81, n. 18, p. 3691-3707, 2021/09/16/ 2021.

LI, B.; HOU, D.; GUO, H.; ZHOU, H. *et al.* Resveratrol sequentially induces replication and oxidative stresses to drive p53-CXCR2 mediated cellular senescence in cancer cells. **Scientific Reports**, 7, n. 1, p. 208, 2017/03/16 2017.

LI, X.; LI, C.; ZHANG, W.; WANG, Y. *et al.* Inflammation and aging: signaling pathways and intervention therapies. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, 8, n. 1, p. 239, 2023/06/08 2023.

LI, X.; PLONER, A.; WANG, Y.; ZHAN, Y. *et al.* Clinical biomarkers and associations with healthspan and lifespan: Evidence from observational and genetic data. **EBioMedicine**, 66, p. 103318, Apr 2021.

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.

LOFFREDO, F. S.; STEINHAUSER, M. L.; JAY, S. M.; GANNON, J. *et al.* Growth Differentiation Factor 11 Is a Circulating Factor that Reverses Age-Related Cardiac Hypertrophy. **Cell**, 153, n. 4, p. 828-839, 2013/05/09/ 2013.

LÓPEZ-OTÍN, C.; BLASCO, M. A.; PARTRIDGE, L.; SERRANO, M. *et al.* The hallmarks of aging. **Cell**, 153, n. 6, p. 1194-1217, 2013.

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.

MENEZES, I. O.; DA SILVA, L. Y. S.; PESSOA, R. T.; RAMOS, A. G. B. *et al.* Terpinolene inhibits acute responses triggered by different inflammatory agents in vivo models of mouse. **Food Bioscience**, 53, p. 102621, 2023/06/01/ 2023.

MENEZES, I. O.; SCHERF, J. R.; MARTINS, A.; RAMOS, A. G. B. *et al.* Biological properties of terpinolene evidenced by in silico, in vitro and in vivo studies: A systematic review. **Phytomedicine**, 93, p. 153768, Dec 2021.

MESQUITA, T. R. R.; ZHANG, R.; DE COUTO, G.; VALLE, J. *et al.* Mechanisms of atrial fibrillation in aged rats with heart failure with preserved ejection fraction. **Heart Rhythm**, 17, n. 6, p. 1025-1033, Jun 2020.

MIJIT, M.; CARACCIOLO, V.; MELILLO, A.; AMICARELLI, F. *et al.* Role of p53 in the Regulation of Cellular Senescence. 10, n. 3, p. 420, 2020.

MYLONAS, A.; O'LOGHLEN, A. Cellular Senescence and Ageing: Mechanisms and Interventions. **Front Aging**, 3, p. 866718, 2022.

NORTH, B. J.; SINCLAIR, D. A. The intersection between aging and cardiovascular disease. **Circulation research**, 110, n. 8, p. 1097-1108, 2012.

OKURA, H.; TAKADA, Y.; YAMABE, A.; KUBO, T. *et al.* Age- and Gender-Specific Changes in the Left Ventricular Relaxation. 2, n. 1, p. 41-46, 2009.

OWENS, W. A.; WALASZCZYK, A.; SPYRIDOPOULOS, I.; DOOKUN, E. *et al.* Senescence and senolytics in cardiovascular disease: Promise and potential pitfalls. **Mechanisms of ageing and development**, 198, p. 111540-111540, 2021.

PANENI, F.; DIAZ CAÑESTRO, C.; LIBBY, P.; LÜSCHER, T. F. *et al.* The Aging Cardiovascular System: Understanding It at the Cellular and Clinical Levels. **Journal of the American College of Cardiology**, 69, n. 15, p. 1952-1967, 2017/04/18/ 2017.

PARIKH, J. D.; HOLLINGSWORTH, K. G.; WALLACE, D.; BLAMIRE, A. M. *et al.* Normal age-related changes in left ventricular function: Role of afterload and subendocardial dysfunction. **Int J Cardiol**, 223, p. 306-312, Nov 15 2016.

PERVEEN, S. Introductory Chapter: Terpenes and Terpenoids. *In*, 2018.

PIERCE, G. L.; COUTINHO, T. A.; DUBOSE, L. E.; DONATO, A. J. Is It Good to Have a Stiff Aorta with Aging? Causes and Consequences. **Physiology (Bethesda)**, 37, n. 3, p. 154-173, May 1 2022.

POGANIK, J. R.; GLADYSHEV, V. N. We need to shift the focus of aging research to aging itself. 120, n. 37, p. e2307449120, 2023.

POURBAGHER-SHAHRI, A. M.; FARKHONDEH, T.; TALEBI, M.; KOPUSTINSKIENE, D. M. *et al.* An Overview of NO Signaling Pathways in Aging. **Molecules**, 26, n. 15, Jul 27 2021.

PROSHKINA, E.; PLYUSNIN, S.; BABAK, T.; LASHMANOVA, E. *et al.* Terpenoids as Potential Geroprotectors. **Antioxidants (Basel)**, 9, n. 6, Jun 17 2020.

RADI, R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 115, n. 23, p. 5839-5848, 2018.

RAGONNAUD, E.; BIRAGYN, A. Gut microbiota as the key controllers of “healthy” aging of elderly people. **Immunity & Ageing**, 18, n. 1, p. 2, 2021/01/05 2021.

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.

RIBEIRO, T. P.; PORTO, D. L.; MENEZES, C. P.; ANTUNES, A. A. *et al.* Unravelling the cardiovascular effects induced by α -terpineol: A role for the nitric oxide–cGMP pathway. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 37, n. 8, p. 811-816, 2010.

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.

ROSER, M. Causes of death globally: what do people die from. Disponível em: <https://ourworldindata.org/causes-of-death-treemap>. Acesso em: 15/01/2024.

RUDIN, C. M.; HANN, C. L.; GARON, E. B.; RIBEIRO DE OLIVEIRA, M. *et al.* Phase II study of single-agent navitoclax (ABT-263) and biomarker correlates in patients with relapsed small cell lung cancer. **Clin Cancer Res**, 18, n. 11, p. 3163-3169, Jun 1 2012.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. **Current biology : CB**, 24, n. 10, p. R453-R462, 2014.

SCHWINGSHACKL, L.; MORZE, J.; HOFFMANN, G. Mediterranean diet and health status: Active ingredients and pharmacological mechanisms. 177, n. 6, p. 1241-1257, 2020.

SCIALÒ, F.; SRIRAM, A.; FERNÁNDEZ-AYALA, D.; GUBINA, N. *et al.* Mitochondrial ROS Produced via Reverse Electron Transport Extend Animal Lifespan. **Cell Metab**, 23, n. 4, p. 725-734, Apr 12 2016.

SENA, C. M.; LEANDRO, A.; AZUL, L.; SEIÇA, R. *et al.* Vascular Oxidative Stress: Impact and Therapeutic Approaches. 9, n. 1668, 2018-December-04 2018. Mini Review.

SHAHIDI, S.; RAMEZANI-ALIAKBARI, K.; KOMAKI, A.; SALEHI, I. *et al.* Effect of vitamin D on cardiac hypertrophy in D-galactose-induced aging model through cardiac mitophagy. **Molecular Biology Reports**, 50, n. 12, p. 10147-10155, 2023/12/01 2023.

SHIELDS, H. J.; TRAA, A.; VAN RAAMSDONK, J. M. Beneficial and Detrimental Effects of Reactive Oxygen Species on Lifespan: A Comprehensive Review of Comparative and Experimental Studies. **Front Cell Dev Biol**, 9, p. 628157, 2021.

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-LUIS, C. C.; DE BRITO ALVES, J. L.; DE OLIVEIRA, J.; DE SOUSA LUIS, J. A. *et al.* Effects of Baru Almond Oil (*Dipteryx alata* Vog.) Treatment on Thrombotic Processes, Platelet Aggregation, and Vascular Function in Aorta Arteries. **Nutrients**, 14, n. 10, May 18 2022.

SMER-BARRETO, V.; QUINTANILLA, A.; ELLIOTT, R. J. R.; DAWSON, J. C. *et al.* Discovery of senolytics using machine learning. **Nature Communications**, 14, n. 1, p. 3445, 2023/06/10 2023.

SONG, D.; SANGPREECHA, N.; CHANMUANG, S.; PARK, Y.-K. *et al.* Protective Effects of Fermented Glasswort (*Salicornia herbacea* L.) on Aged Gut Induced by D-Galactose in Rats. 13, n. 14, p. 8386, 2023.

STEINHUBL, S. R. Why Have Antioxidants Failed in Clinical Trials? **The American Journal of Cardiology**, 101, n. 10, Supplement, p. S14-S19, 2008/05/22/ 2008.

SZYMCZAK, J.; CIELECKA-PIONTEK, J. Fisetin—In Search of Better Bioavailability—From Macro to Nano Modifications: A Review. 24, n. 18, p. 14158, 2023.

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.

Terpinolene. **Food and Cosmetics Toxicology**, 14, p. 877-878, 1976/01/01/ 1976.

THOPPIL, H.; RIABOWOL, K. Senolytics: A Translational Bridge Between Cellular Senescence and Organismal Aging. 7, 2020-January-22 2020. Mini Review.

TRIANA-MARTÍNEZ, F.; PICALLOS-RABINA, P.; DA SILVA-ÁLVAREZ, S.; PIETROCOLA, F. *et al.* Identification and characterization of Cardiac Glycosides as senolytic compounds. **Nature Communications**, 10, n. 1, p. 4731, 2019/10/21 2019.

TRIPOSKIADIS, F.; XANTHOPOULOS, A.; BUTLER, J. Cardiovascular Aging and Heart Failure: JACC Review Topic of the Week. **Journal of the American College of Cardiology**, 74, n. 6, p. 804-813, 2019/08/13/ 2019.

TRIPOSKIADIS, F.; XANTHOPOULOS, A.; LAMPROPOULOS, K.; BRIASOULIS, A. *et al.* Aortic Stiffness: A Major Risk Factor for Multimorbidity in the Elderly. **J Clin Med**, 12, n. 6, Mar 16 2023.

UN. **UNDESA Population Division, World population prospects: the 2015 revision.** 2015.

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 AVONDT, K.; STRECKER, J.-K.; TULOTTA, C.; MINNERUP, J. *et al.* Neutrophils in aging and aging-related pathologies. 314, n. 1, p. 357-375, 2023.

VERMES, I.; HAANEN, C.; STEFFENS-NAKKEN, H.; REUTELINGSPERGER, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **J Immunol Methods**, 184, n. 1, p. 39-51, Jul 17 1995.

WALASZCZYK, A.; DOOKUN, E.; REDGRAVE, R.; TUAL-CHALOT, S. *et al.* Pharmacological clearance of senescent cells improves survival and recovery in aged mice following acute myocardial infarction. **Aging Cell**, 18, n. 3, p. e12945, Jun 2019.

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.

WHO. **10 facts on ageing and health.** http://www.who.int/features/factfiles/ageing/ageing_facts/en/, 2015. Disponível em: http://www.who.int/features/factfiles/ageing/ageing_facts/en/. Acesso em: 12/03/2017.

WHO. Death rate from cardiovascular diseases by age group, Brazil, 2019. : WHO Mortality Database – processed by Our World in Data 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.

XIE, N.; ZHANG, L.; GAO, W.; HUANG, C. *et al.* NAD⁺ metabolism: pathophysiologic mechanisms and therapeutic potential. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, 5, n. 1, p. 227, 2020/10/07 2020.

XIE, S.; XU, S.-C.; DENG, W.; TANG, Q. Metabolic landscape in cardiac aging: insights into molecular biology and therapeutic implications. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, 8, n. 1, p. 114, 2023/03/14 2023.

XIE, Y.; LOU, D.; ZHANG, D. Melatonin Alleviates Age-Associated Endothelial Injury of Atherosclerosis via Regulating Telomere Function. **Journal of inflammation research**, 14, p. 6799-6812, 2021.

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.

XU XIANGLAI, W. B., Ren Changhong, Hu Jiangnan, Greenberg David A., Chen Tianxiang, Xie Liping, Jin Kunlin. Age-related Impairment of Vascular Structure and Functions. 8, n. 5, p. 590-610, 2017-10-01 2017.

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.

YU, H.; YU, Q.; MI, Y.; WANG, P. *et al.* Hydrogen Sulfide Inhibited Sympathetic Activation in D-Galactose-Induced Aging Rats by Upregulating Klotho and Inhibiting Inflammation in the Paraventricular Nucleus. 11, n. 2, p. 566, 2023.

ZHU, Y.; TCHKONIA, T.; PIRTSKHALAVA, T.; GOWER, A. C. *et al.* The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. **Aging Cell**, 14, n. 4, p. 644-658, Aug 2015.

Anexos

ANEXO I

Certificado do CEUA



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais

Reitoria



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITO DOS MONOTERPENOS SOBRE O ENVELHECIMENTO CARDIOVASCULAR: O PAPEL DA SENESCÊNCIA E SUAS VIAS DE SINALIZAÇÃO", protocolada sob o CEUA nº 6267280422 (ID 001698), sob a responsabilidade de **Isac Almeida de Medeiros e equipe; Arthur José Pontes Oliveira de Almeida** - 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/UFPB) na reunião de 22/06/2022.

We certify that the proposal "Monoterpenes' effects on the cardiovascular system: Role of senescence and its signaling", utilizing 110 Heterogenics rats (110 males), protocol number CEUA 6267280422 (ID 001698), under the responsibility of **Isac Almeida de Medeiros and team; Arthur José Pontes Oliveira de Almeida** - 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/UFPB) in the meeting of 06/22/2022.

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

Vigência da Proposta: de **08/2022** a **03/2023**

Área: **Ciências Farmacêuticas**

Origem: **Biotério José Paulino**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **8 a 8 semanas**

N: **110**

Linhagem: **Rattus Norvegicus - Wistar**

Peso: **250 a 300 g**

Local do experimento: : Laboratório de Farmacologia Cardiovascular/IPeFarM/UFPB

João Pessoa, 20 de julho de 2022

Profa. Dra. Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Ivã Carmem Talieri
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

ANEXO II

Artigos publicados como primeiro autor

Artigo 1 – 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 ,¹ Júlio César Pinheiro Lúcio de Oliveira,¹
Larisse Virgolino da Silva Pontes,¹ Javanyr Frederico de Souza Júnior,¹
Tays Amanda Felisberto Gonçalves,¹ Sabine Helena Dantas,¹
Mathania Silva de Almeida Feitosa,¹ Antonia Oliveira Silva,²
and Isac Almeida de Medeiros ¹

¹Departamento 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

²Programa 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@lff.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.

Artigo 2 – fator de impacto: 7.310

Hindawi
Oxidative Medicine and Cellular Longevity
Volume 2020, Article ID 1954398, 20 pages
<https://doi.org/10.1155/2020/1954398>



Review Article

Unveiling the Role of Inflammation and Oxidative Stress on Age-Related Cardiovascular Diseases

Arthur José Pontes Oliveira de Almeida ,¹ Mathania Silva de Almeida Rezende ,¹
Sabine Helena Dantas ,¹ Sonaly de Lima Silva ,¹ Júlio César Pinheiro Lúcio de Oliveira ,¹
Fátima de Lourdes Assunção Araújo de Azevedo,¹ Rayanne Maira Felix Ribeiro Alves ,¹
Geovânia Maria Sales de Menezes,¹ Pablo Ferreira dos Santos,¹
Tays Amanda Felisberto Gonçalves ,¹ Valérie B. Schini-Kerth ,²
and Isac Almeida de Medeiros ,¹

¹Departamento de Ciências Farmacêuticas/Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária-Campus I, Caixa Postal 5009, 58.051-970 João Pessoa, PB, Brazil

²INSERM (French National Institute of Health and Medical Research), UMR 1260, Regenerative Nanomedicine, Faculty of Pharmacy, University of Strasbourg, 67000 Strasbourg, France

Correspondence should be addressed to Isac Almeida de Medeiros; isac@ltf.ufpb.br

Received 20 December 2019; Revised 12 March 2020; Accepted 3 April 2020; Published 9 May 2020

Guest Editor: Adam P. Lightfoot

Copyright © 2020 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.

The global population above 60 years has been growing exponentially in the last decades, which is accompanied by an increase in the prevalence of age-related chronic diseases, highlighting cardiovascular diseases (CVDs), such as hypertension, atherosclerosis, and heart failure. Aging is the main risk factor for these diseases. Such susceptibility to disease is explained, at least in part, by the increase of oxidative stress, in which it damages cellular components such as proteins, DNA, and lipids. In addition, the chronic inflammatory process in aging “inflammaging” also contributes to cell damage, creating a stressful environment which drives to the development of CVDs. Taken together, it is possible to identify the molecular connection between oxidative stress and the inflammatory process, especially by the crosstalk between the transcription factors Nrf-2 and NF- κ B which are mediated by redox signalling and are involved in aging. Therapies that control this process are key targets in the prevention/combate of age-related CVDs. In this review, we show the basics of inflammation and oxidative stress, including the crosstalk between them, and the implications on age-related CVDs.

Artigos publicados como co-autor

Artigo 3 – Fator de impacto – 5.9



Article

Carvacrol Improves Vascular Function in Hypertensive Animals by Modulating Endothelial Progenitor Cells

Tays Amanda Felisberto Gonçalves , Viviane Silva Lima, Arthur José Pontes Oliveira de Almeida , Alinne Villar de Arruda, Ana Caroline Meneses Ferreira Veras, Thaís Trajano Lima, Evelylen Myllena Cardoso Soares, Adhonia Correia dos Santos, Maria Eduarda Costa de Vasconcelos, Mathania Silva de Almeida Feitosa, Robson Cavalcante Veras and Isac Almeida de Medeiros *

Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58059-900, PB, Brazil; taysamanda@ltf.ufpb.br (T.A.F.G.); vivianelima@ltf.ufpb.br (V.S.L.); arthur-jp@hotmail.com (A.J.P.O.d.A.); alinnevillar@ltf.ufpb.br (A.V.d.A.); carolmeneses@ltf.ufpb.br (A.C.M.F.V.); thais.trajano@academico.ufpb.br (T.T.L.); evelylen.cardoso@academico.ufpb.br (E.M.C.S.); adhonia.correia@academico.ufpb.br (A.C.d.S.); mecv@academico.ufpb.br (M.E.C.d.V.); mathaniarez@ltf.ufpb.br (M.S.d.A.F.); robsonveras@ccs.ufpb.br (R.C.V.)

* Correspondence: isac.medeiros@academico.ufpb.br; Tel.: +55-(83)-3209-8787

Nutrients **2023**, *15*(13), 3032; <https://doi.org/10.3390/nu15133032>

Submission received: 31 May 2023 / Revised: 29 June 2023 / Accepted: 29 June 2023 / Published: 4 July 2023

Artigo 4 - Fator de impacto – SN



Journal of Applied Life Sciences International

25(6): 18-27, 2022; Article no.JALSI.92463

ISSN: 2394-1103

Evaluation of Cardiovascular Effects of Carvacrol in a D-(+)-Galactose-Induced aging Model

Sabine Helena Dantas ^a, Arthur José Pontes de Almeida ^b,
Tays Amanda Felisberto Gonçalves ^c, Islania Gisélia Albuquerque Araújo ^a,
Mathania Silva de Almeida Rezende ^c, Robson Cavalcante Veras ^c,
Antônia Lêda Silva ^a and Isac Almeida de Medeiros ^{a,b,c}

^a Programa de Mestrado Profissional em Gerontologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil.

^b Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil.

^c Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil.

Artigo 5 – fator de impacto: 6.317

Issue 9, 2022

[Previous Article](#)[Next Article](#)

From the journal:

Food & Function

Yeast carboxymethyl-glucan improves endothelial function and inhibits platelet aggregation in spontaneously hypertensive rats



[Lorena Soares Bezerra](#),^a [Marciane Magnani](#),  ^{*ab} [Tatiana Colombo Pimentel](#),^c [Júlio César Pinheiro](#)
[Lúcio de Oliveira](#),^d [Francisca Manuela de Souza Freire](#),^d [Arthur José Pontes Oliveira de Almeida](#),^e
[Mathania Silva de Almeida Rezende](#),^f [Islânia Giselia Albuquerque Gonçalves](#),^d [Isac Almeida de](#)
[Medeiros](#)^{df} and [Robson Cavalcante Veras](#)^{ad}

Artigo 6 – fator de impacto: 3.572

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

D-(+)-Galactose-induced aging: A novel experimental model of erectile dysfunction

Mathania Silva de Almeida Rezende¹, Arthur José Pontes Oliveira de Almeida², Tays Amanda Fellsberto Gonçalves¹, Fátima de Lourdes Assunção Araújo de Azevedo¹, Sabine Helena Dantas³, Sonaly de Lima Silva², Evyllen Myllena Cardoso Soares⁴, Hayaly Felinto Alves⁴, Thais Trajano Lima⁴, Javanir Frederico de Souza Júnior⁴, Ricardo Romão Guerra⁵, Islania Gisella Albuquerque Araújo³, Isac Almeida de Medeiros^{1*}

1 Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil, **2** Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil, **3** Programa de Mestrado Profissional em Gerontologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil, **4** Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil, **5** Departamento de Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, Paraíba, Brazil

* isac.ufpb@gmail.com



OPEN ACCESS

Citation: de Almeida Rezende MS, Oliveira de Almeida AJ, Gonçalves TAF, de Azevedo FdLAA, Dantas SH, Silva SdL, et al. (2021) D-(+)-Galactose-induced aging: A novel experimental model of erectile dysfunction. PLoS ONE 16(4): e0249487. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249487>

Editor: Michael Bader, Max Delbrück Centrum für Molekulare Medizin Berlin Buch, GERMANY

Received: October 26, 2020

Accepted: March 18, 2021

Published: April 15, 2021

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249487>

Abstract

Erectile dysfunction (ED) is defined as the inability to achieve and/or maintain penile erection sufficient for satisfactory sexual relations, and aging is one of the main risk factors involved. The D-(+)-Galactose aging model is a consolidated methodology for studies of cardiovascular aging; however, its potential for use with ED remain unexplored. The present study proposed to characterize a new experimental model for ED, using the D-(+)-Galactose aging model. For the experiments, the animals were randomly divided into three groups receiving: vehicle (CTL), D-galactose 150 mg/kg (DGAL), and D-(+)-galactose 150 mg/Kg + sildenafil 1.5 mg/Kg (DGAL+SD1.5) being administered daily for a period of eight weeks. All of the experimental protocols were previously approved by the Ethics Committee on the Use of Animals at the Federal University of Paraíba n° 9706070319. During the treatment, we analyzed physical, molecular, and physiological aspects related to the aging process and implicated in the development of ED. Our findings demonstrate for the first time that D-(+)-Galactose-induced aging represents a suitable experimental model for ED assessment. This was evidenced by an observed hyper-contraction in corpora cavernosa, significant endothelial dysfunction, increased ROS levels, an increase in cavernous tissue senescence, and the loss of essential penile erectile components.

ANEXO III

Deposito de Patente



**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2021 023095 9

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24098477000110

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Cidade Universitária

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58059-900

País: Brasil

Telefone: (83) 32167558

Fax:

Email: inova@reitoria.ufpb.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PREPARAÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO CARVACROL PARA O TRATAMENTO DA DISFUNÇÃO ERÉTIL

Resumo: A presente invenção está inserida no campo da indústria farmacêutica e trata de uma nova formulação farmacêutica contendo carvacrol apresentado na forma de emulsão e solução a ser administrada por via oral. A formulação contém como princípio ativo o carvacrol, apresentando diferentes composições de acordo com a forma farmacêutica a ser preparada e destina-se ao uso terapêutico para o tratamento e prevenção da disfunção erétil, tendo em vista as suas propriedades antioxidante, anti-senescente e de reversão de disfunção endotelial (dois vasos sanguíneos: artéria mesentérica superior e corpo cavernoso, isolados de rato).

Figura a publicar: 2

APENDICE I

Tabela 4 - Screening de vinte terpenos para o ensaio de MTT em condição basal

Terpenos	Ctl	-9	-8	-7	-6
Geraniol	100 ± 3.42	98.64 ± 2.35	99.73 ± 2.98	98.10 ± 4.89	98.64 ± 2.70
Citral	100 ± 3.57	97.79 ± 1.67	84.65 ± 3.80 *	83.68 ± 2.04 *	81.05 ± 4.72 *
Linalool	100 ± 1.84	98.74 ± 2.33	100 ± 3.88	90.54 ± 1.36	90.70 ± 0.74
Linalyl acetate	100 ± 1.84	94.72 ± 1.86	92.80 ± 2.20	91.62 ± 3.21	89.61 ± 2.76 *
β-citronellol	100 ± 2.23	98.42 ± 4.07	102.99 ± 3.51	99.34 ± 3.05	96.02 ± 3.97
Citronellal	100 ± 1.09	98.38 ± 3.22	99.07 ± 2.60	99.07 ± 3.49	99.81 ± 2.93
α-terpineol	100 ± 1.45	98.98 ± 1.67	99.43 ± 4.82	99.74 ± 5.90	93.10 ± 3.02
Carvacrol	100 ± 5.53	98.99 ± 2.78	97.32 ± 1.33	98.27 ± 2.58	99.72 ± 5.56
Timol	100 ± 1.63	99.15 ± 6.08	96.96 ± 5.03	95.44 ± 7.92	93.52 ± 8.34
p-cimeno	100 ± 2.16	95.53 ± 2.35	96.24 ± 5.80	97.56 ± 4.48	93.09 ± 4.20
Terpinolene	100 ± 5.18	97.63 ± 3.32	97.48 ± 1.21	98.07 ± 3.77	94.22 ± 3.06
Carveol	100 ± 3.91	102.27 ± 2.63	98.90 ± 5.36	86.02 ± 2.16	84.30 ± 2.75 *
Terpinen-4-ol	100 ± 1.63	102.23 ± 5.43	96.07 ± 4.15	90.34 ± 1.47	85.46 ± 1.77 *
α-pinene	100 ± 3.53	92.59 ± 2.45	87.56 ± 2.97	89.70 ± 2.35	85.56 ± 4.90 *
Borneol	100 ± 2.42	98.57 ± 3.82	104.37 ± 7.00	99.29 ± 6.87	98.41 ± 3.86
Myrtenol	100 ± 2.14	96.84 ± 2.06	101.86 ± 4.36	98.79 ± 7.81	95.87 ± 7.89
Farnesol	100 ± 2.23	95.11 ± 3.42	98.76 ± 2.30	106.30 ± 3.10	100.08 ± 4.14
Nerolidol	100 ± 5.86	97.73 ± 13.62	94.11 ± 10.31	96.13 ± 8.75	93.01 ± 11.36
α-bisabolol	100 ± 2.23	94.86 ± 4.06	96.85 ± 5.40	94.03 ± 4.97	91.63 ± 3.74
Trans-cariofileno	100 ± 2.08	97.82 ± 5.78	94.01 ± 3.56	98.06 ± 4.39	97.33 ± 2.66

Legenda. Quantificação da viabilidade celular pelo ensaio de (MTT) em células endoteliais de arteria de rato. Cada linha representa um terpeno. Cada coluna seus respectivos grupos experimentais, sendo o Ctl (apenas veiculo). Cada concentração dos respectivos terpenos estão representados pelo log da concentração em mol.L⁻¹. Cada teste representa a média de 6 experimentos independentes e expresso pelo erro ± média. *p<0,05 vs controle. #p<0.05 vs Dgal.

APENDICE II

Tabela 5 - *Screening* de vinte terpenos para o ensaio de MTT em modelo de senescência endotelial

Terpenos	Ctl	0	-9	-8	-7	-6
Geraniol	100 ± 3.85	76.12 ± 2.95 *	99.34 ± 4.91 #	99.61 ± 7.12 #	87.14 ± 4.57	85.70 ± 1.86
Citral	100 ± 2.55	83.81 ± 2.72 *	96.84 ± 0.99 #	75.86 ± 1.72 *	78.35 ± 1.13 *	78.64 ± 3.23 *
Linalool	100 ± 3.28	79.88 ± 3.55 *	89.40 ± 2.41	90.83 ± 3.77	86.43 ± 1.73 *	78.45 ± 3.48 *
Linalyl acetate	100 ± 4.68	84.00 ± 2.52 *	83.66 ± 7.98 *	78.59 ± 5.84 *	76.60 ± 6.90 *	67.88 ± 4.49 *
β-citronellol	100 ± 3.28	79.88 ± 3.55 *	82.74 ± 6.27 *	81.44 ± 2.61 *	92.98 ± 3.02	84.88 ± 4.20
Citronellal	100 ± 3.28	79.88 ± 3.55 *	84.05 ± 1.47 *	92.26 ± 3.41	79.88 ± 2.25 *	86.67 ± 3.61 *
α-terpineol	100 ± 3.85	76.12 ± 2.95 *	99.61 ± 4.43 #	95.80 ± 7.12 #	82.81 ± 3.42	92.65 ± 3.88
Carvacrol	100 ± 2.32	78.27 ± 2.09 *	90.99 ± 2.95	82.55 ± 1.42 *	82.43 ± 5.91 *	87.61 ± 0.67
Timol	100 ± 2.77	74.13 ± 5.09 *	75.22 ± 3.71 *	77.27 ± 5.67 *	74.78 ± 4.29 *	74.78 ± 2.30 *
p-cimeno	100 ± 2.32	78.27 ± 2.09 *	76.69 ± 5.77 *	83.90 ± 1.92 *	89.86 ± 1.22	90.77 ± 1.58
Terpinolene	100 ± 3.85	76.12 ± 2.95 *	99.74 ± 3.74 #	92.91 ± 4.79 #	95.80 ± 3.00 #	91.86 ± 2.09 #
Carveol	100 ± 2.77	74.13 ± 5.09 *	76.62 ± 4.81 *	76.73 ± 3.76 *	75.97 ± 4.70 *	68.40 ± 2.62 *
Terpinen-4-ol	100 ± 1.05	80.73 ± 3.05 *	85.45 ± 2.53	74.28 ± 3.95 *	74.18 ± 6.32 *	74.95 ± 5.08 *
α-pinene	100 ± 2.37	83.33 ± 0.54 *	87.59 ± 2.98	88.68 ± 4.84	88.04 ± 4.81	76.00 ± 4.41 *
Borneol	100 ± 2.32	78.27 ± 2.09 *	85.25 ± 3.59 *	83.90 ± 5.15 *	80.63 ± 3.25 *	81.87 ± 2.47 *
Myrtenol	100 ± 2.37	83.33 ± 0.54 *	82.61 ± 2.87 *	72.28 ± 4.11 *	74.82 ± 2.45 *	65.85 ± 3.26 *#
Farnesol	100 ± 2.86	81.33 ± 1.34 *	82.29 ± 2.60 *	90.19 ± 2.25	96.76 ± 2.91 #	85.62 ± 2.64 *
Nerolidol	100 ± 3.94	83.73 ± 1.38 *	86.76 ± 4.52	83.24 ± 2.89 *	79.31 ± 3.98 *	81.67 ± 3.52 *
α-bisabolol	100 ± 2.43	82.00 ± 0.53 *	77.72 ± 1.58 *	84.94 ± 2.96 *	82.98 ± 2.22 *	87.79 ± 2.80 *
Trans-cariofileno	100 ± 2.86	81.33 ± 1.34 *	82.29 ± 4.23 *	82.57 ± 2.72 *	85.14 ± 1.63 *	65.71 ± 3.96 *#

Legenda. Quantificação da viabilidade celular pelo ensaio de (MTT) em células endoteliais de arteria de rato. Cada linha representa um terpeno. Cada coluna seus respectivos grupos experimentais, sendo o Ctl (apenas veiculo), e todos os demais na presença de Dgal 20 g/L. Cada concentração dos respectivos terpenos estão representados pelo log da concentração em mol.L⁻¹. Cada teste representa a média de 6 experimentos independentes e expresso pelo erro ± média. *p<0,05 vs controle. #p<0.05 vs Dgal.

APENDICE III

Tabela 6 - *Screening* de vinte terpenos para o ensaio de MTT em modelo de senescência endotelial

Terpenos	Ctl	0	-9	-8	-7	-6
Geraniol	15.07 ± 0.80	29.96 ± 0.40 *	28.00 ± 0.59 *	28.97 ± 2.20 *	23.61 ± 0.34 **	22.39 ± 0.61 **
Citral	14.93 ± 1.24	29.94 ± 0.56 *	20.08 ± 1.86 #	26.77 ± 1.86 *	26.82 ± 1.23 *	28.27 ± 1.10 *
Linalool	14.93 ± 1.24	29.94 ± 0.56 *	31.09 ± 1.11 *	24.65 ± 0.95 **	25.51 ± 0.71 **	23.98 ± 0.64 **
Linalyl acetate	16.81 ± 0.44	29.96 ± 0.40 *	30.39 ± 1.42 *	27.86 ± 1.43 *	26.21 ± 2.03 *	25.39 ± 1.59 *
β-citronellol	18.82 ± 0.68	36.67 ± 0.67 *	32.37 ± 1.42 *	32.41 ± 0.38 *	30.19 ± 0.89 **	27.49 ± 1.55 **
Citronellal	12.21 ± 1.80	21.86 ± 1.41 *	14.64 ± 1.19 #	11.40 ± 1.20 #	12.46 ± 0.99 #	13.41 ± 1.41 #
α-terpineol	21.05 ± 0.37	39.48 ± 0.56 *	26.04 ± 1.77 **	30.26 ± 2.22 #	26.41 ± 1.20 **	31.39 ± 1.09 #
Carvacrol	17.93 ± 0.42	31.67 ± 0.99 *	26.36 ± 1.03 **	25.30 ± 1.36 **	23.52 ± 0.54 **	22.46 ± 0.78 **
Timol	19.02 ± 0.37	32.17 ± 0.73 *	27.09 ± 1.36 *	25.91 ± 1.26 **	19.53 ± 1.36 #	21.01 ± 2.08 #
p-cimeno	12.30 ± 0.75	23.75 ± 1.82 *	20.58 ± 1.58 *	20.24 ± 1.40 *	17.27 ± 1.29 #	13.71 ± 1.00 #
Terpinolene	16.81 ± 0.44	29.96 ± 0.40 *	28.84 ± 0.91 *	28.18 ± 1.41 *	22.23 ± 0.61 **	18.46 ± 0.62 #
Carveol	11.28 ± 0.83	22.28 ± 0.35 *	22.98 ± 1.27 *	18.06 ± 0.65 *	21.46 ± 0.43 *	20.26 ± 2.22 *
Terpinen-4-ol	11.28 ± 0.83	22.13 ± 0.27 *	14.06 ± 1.59 #	12.47 ± 1.04 #	11.16 ± 1.50 #	11.79 ± 0.54 #
α-pinene	11.44 ± 0.70	22.32 ± 1.37 *	19.53 ± 2.01 *	19.03 ± 1.32 *	15.49 ± 0.98 #	15.51 ± 1.71 #
Borneol	11.44 ± 0.70	22.32 ± 1.37 *	15.55 ± 1.27 #	14.19 ± 1.49 #	14.65 ± 0.78 #	12.25 ± 2.10 #
Myrtenol	12.30 ± 0.75	23.75 ± 1.82 *	18.35 ± 1.05	21.31 ± 1.06 *	20.86 ± 1.86 *	16.76 ± 0.42 #
Farnesol	12.21 ± 1.80	21.86 ± 1.41 *	17.47 ± 0.23	17.30 ± 1.12	14.90 ± 0.97 #	10.41 ± 0.92 #
Nerolidol	12.21 ± 1.80	21.86 ± 1.41 *	18.14 ± 1.79	15.27 ± 1.25	13.28 ± 2.24 #	16.08 ± 1.02
α-bisabolol	12.30 ± 0.75	23.75 ± 1.82 *	19.20 ± 1.95 *	16.73 ± 1.50 #	16.32 ± 0.51 #	16.54 ± 1.11 #
Trans-cariofileno	12.21 ± 1.80	21.86 ± 1.41 *	19.36 ± 0.55 *	16.45 ± 1.35	12.88 ± 0.58 #	13.84 ± 0.79 #

Legenda. Quantificação dos níveis de senescencia pela atividade da enzima β-galactosidase (SA-β-Gal) em células endoteliais de arteria de rato. Cada linha representa um terpeno. Cada coluna seus respectivos grupos experimentais, sendo o Ctl (apenas veiculo), e todos os demais na presença de Dgal 20 g/L. Cada concentração dos respectivos terpenos estão representados pelo log da concentração em mol.L⁻¹. Cada teste representa a média de 3 experimentos independentes e expesso pelo erro ± média. *p<0,05 vs controle. #p<0.05 vs Dgal.

APENDICE IV

Tabela 7 - Screening de vinte terpenos para o ensaio de DHE em modelo de senescência endotelial

Terpenos	Ctl	0	-9	-8	-7	-6
Geraniol	100 ± 0.39	111.83 ± 0.91 *	110.58 ± 1.08 *	110.90 ± 1.65 *	104.30 ± 0.68 #	101.28 ± 0.30 #
Citral	100 ± 0.06	114.35 ± 0.92 *	99.18 ± 0.57 #	98.81 ± 0.24 #	100.50 ± 0.48 #	96.30 ± 1.01 #
Linalool	100 ± 0.38	117.60 ± 0.94 *	108.22 ± 1.64 *#	102.62 ± 1.17 #	102.29 ± 1.22 #	103.05 ± 0.35 #
Linalyl acetate	100 ± 1.97	114.97 ± 0.50 *	114.38 ± 0.41 *	101.13 ± 0.27 #	104.72 ± 2.64 #	111.66 ± 1.86 *
β-citronellol	100 ± 2.03	117.77 ± 2.61 *	110.33 ± 1.66	105.40 ± 1.53 #	100.89 ± 2.63 #	102.32 ± 2.36 #
Citronellal	100 ± 2.49	119.46 ± 1.89 *	112.24 ± 1.93 *	102.55 ± 2.95 #	102.00 ± 1.20 #	100.47 ± 1.67 #
α-terpineol	100 ± 0.39	110.90 ± 0.88 *	110.37 ± 0.81 *	108.22 ± 1.77 *	106.02 ± 2.69	101.63 ± 0.35 #
Carvacrol	100 ± 1.27	119.18 ± 2.80 *	115.54 ± 1.09 *	107.56 ± 1.48 #	117.04 ± 3.49 *	124.84 ± 1.69 *
Timol	100 ± 0.72	120.64 ± 2.03 *	106.11 ± 0.87 #	106.04 ± 1.33 #	107.43 ± 4.31 #	110.16 ± 2.59
p-cimeno	100 ± 3.19	117.89 ± 2.77 *	109.41 ± 3.75	116.47 ± 4.24	109.81 ± 3.57	107.46 ± 4.70
Terpinolene	100 ± 2.49	119.46 ± 1.89 *	111.44 ± 3.18	111.59 ± 3.15	101.28 ± 1.49 #	103.26 ± 2.48 #
Carveol	100 ± 0.72	120.64 ± 2.03 *	103.21 ± 2.18 #	106.89 ± 0.87 #	103.51 ± 0.67 #	102.45 ± 3.53 #
Terpinen-4-ol	100 ± 0.20	111.61 ± 0.25 *	107.80 ± 0.43 *	102.61 ± 0.40 #	103.39 ± 0.69 #	102.83 ± 2.03 #
α-pinene	100 ± 0.20	111.61 ± 0.25 *	108.74 ± 0.86 *	109.32 ± 1.06 *	101.84 ± 1.50 #	100.81 ± 1.00 #
Borneol	100 ± 1.27	119.18 ± 2.80 *	119.73 ± 1.61 *	116.63 ± 2.62 *	110.48 ± 3.42	102.06 ± 1.16 #
Myrtenol	100 ± 2.12	126.67 ± 1.81 *	121.26 ± 3.82 *	131.22 ± 2.11 *	124.08 ± 2.07 *	123.28 ± 3.58 *
Farnesol	100 ± 0.48	116.19 ± 0.49 *	115.79 ± 1.20 *	113.26 ± 1.70 *	106.18 ± 2.44 #	100.94 ± 0.96 #
Nerolidol	100 ± 1.14	127.30 ± 0.56 *	119.28 ± 1.90 *#	114.54 ± 1.21 *#	112.91 ± 1.39 *#	105.64 ± 0.91 #
α-bisabolol	100 ± 0.48	116.19 ± 0.49 *	91.86 ± 1.20 #	90.55 ± 2.34 *#	92.46 ± 2.83 #	89.98 ± 2.26 *#
Trans-cariofileno	100 ± 2.12	122.98 ± 1.40 *	119.54 ± 1.19 *	97.14 ± 1.62 #	105.12 ± 2.26 #	108.66 ± 3.00 #

Legenda. Quantificação dos níveis de ânions superóxido pela sonda Dihidroetídeo (DHE) em células endoteliais de arteria de rato. Cada linha representa um terpeno. Cada coluna seus respectivos grupos experimentais, sendo o Ctl (apenas veículo), e todos os demais na presença de Dgal 20 g/L. Cada concentração dos respectivos terpenos estão representados pelo log da concentração em mol.L⁻¹. Cada teste representa a média de 3 experimentos independentes e expresso pelo erro ± média. *p<0,05 vs controle. #p<0.05 vs Dgal.

