



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS



MATHANIA SILVA DE ALMEIDA FEITOSA

Atividade protetora do carvacrol na senescência endotelial do corpo cavernoso induzida por D-galactose: investigações *in vitro* e *in silico*

João Pessoa (PB)

2025

MATHANIA SILVA DE ALMEIDA FEITOSA

Atividade protetora do carvacrol na senescência endotelial do corpo cavernoso induzida por D-galactose: investigações *in vitro* e *in silico*

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em produtos naturais e sintéticos bioativos.
Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros

Coorientadora: Profa. Dra. Islania Giselia Albuquerque Gonçalves

João Pessoa (PB)

2025

Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

F311a Feitosa, Mathania Silva de Almeida.

Atividade protetora do carvacrol na senescência
endotelial do corpo cavernoso induzida por D-galactose
: investigações in vitro e in silico / Mathania Silva
de Almeida Feitosa. - João Pessoa, 2025.
189 f. : il.

Orientação: Isac Almeida de Medeiros.

Coorientação: Islania Giselia Albuquerque Gonçalves.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Envelhecimento. 2. Senescência endotelial. 3.
Óxido nítrico. 4. Antioxidante. 5. Carvacrol. I.
Medeiros, Isac Almeida de. II. Gonçalves, Islania
Giselia Albuquerque. III. Título.

UFPB/BC


CDU 612.67(043)

MATHANIA SILVA DE ALMEIDA FEITOSA


Atividade protetora do carvacrol na senescência endotelial do corpo cavernoso induzida por D-galactose: investigações *in vitro* e *in silico*

Aprovada em 07/04/2025


BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **ISAC ALMEIDA DE MEDEIROS**
Data: 15/04/2025 11:50:00-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Dr. Isac Almeida de Medeiros
(Universidade Federal da Paraíba)
Orientador

Documento assinado digitalmente
 **MARIA DO SOCORRO DE FRANCA FALCAO**
Data: 16/04/2025 13:34:23-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Dra. Maria do Socorro França Falcão
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador externo

Documento assinado digitalmente
 **THYAGO MOREIRA DE QUEIROZ**
Data: 15/04/2025 21:53:36-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Thyago Moreira de Queiroz
(Universidade Federal de Pernambuco)
Examinador externo

Documento assinado digitalmente
 **FABIANA DE ANDRADE CAVALCANTE OLIVEIRA**
Data: 16/04/2025 17:00:39-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante Oliveira
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador interno

Documento assinado digitalmente
 **FELIPE QUEIROGA SARMENTO GUERRA**
Data: 22/04/2025 08:44:54-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Felipe Queiroga Sarmento Guerra
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador interno

Dedicatória

Às pessoas que me deram incentivo, suporte
e força ao longo dessa jornada:

À minha mãe, **Railka Maria da Silva** que sempre
foi exemplo de perseverança e coragem. Obrigada por todas
as orações, amor incondicional e cuidado que me impulsionaram
a superar cada desafio para concluir esse trabalho. E ao meu pai,
João Batista de Almeida Rezende por me incentivar e ensinar
o valor do conhecimento, toda a sabedoria transmitida
foi a base para essa conquista.

Dedico ainda ao meu marido, **Yan Rubens de Souza Feitosa** pelo seu
amor constante que me encoraja e me fortalece todos os dias.
Obrigada por estar ao meu lado em todos os momentos,
sendo o meu ponto de paz e equilíbrio, acreditando
em mim até mais do que eu mesma.
Obrigada por sonhar esse sonho junto comigo.

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

A **Deus** e à **Nossa Senhora**, que me fortaleceram e sustentaram em cada passo desta jornada. Foram anos de desafios, aprendizados e crescimento, e em todo esse tempo, pude sentir o quanto estavam presentes e cuidando de cada detalhe. Agradeço-lhes por me manter de pé e permitir viver este sonho – um sonho que, um dia, eu nem imaginava ser capaz de realizar.

À minha mãe, **Railka Maria da Silva**, minha maior inspiração, que sempre acreditou em mim, sem jamais duvidar do que eu poderia alcançar. Nos momentos em que eu dizia que algo era impossível, ela falava com toda a certeza que daria certo. Suas orações foram o meu alicerce, e sem elas, tudo teria sido muito mais difícil.

Ao meu marido, **Yan Rubens de Souza Feitosa**, meu maior incentivador, que me transmite toda a paz e confiança que preciso para seguir em frente. Durante todo esse tempo pude contar com o seu cuidado e amor em cada detalhe. Por ele, tenho mais forças e motivação para ir além. Sou imensamente grata por tê-lo ao meu lado, caminhando comigo na realização dos meus sonhos.

Ao meu pai, **João Batista de Almeida Rezende**, por todo o apoio, conselhos e orientação que sempre recebi. Agradeço por todo o suporte incondicional e por me proporcionar o melhor, garantindo que nada falte à minha educação.

À minha irmã, **Elcana Silva de Almeida Rezende Félix**, ao meu cunhado, **Anderson Félix**, e à minha afilhada, **Mayrá de Almeida Rezende Félix**, por estarem sempre presente em cada fase da minha vida. Sou imensamente grata pelas orações, apoio e incentivo constante, que foram fontes de força e motivação ao longo dessa jornada.

À toda a minha família, pelo apoio incondicional, pelo amor e por sempre estar ao meu lado em todos os momentos. Cada um tem um lugar especial no meu coração. Todo o carinho e força transmitida foi essencial para a concretização deste sonho.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros**, por sua dedicação, paciência e orientação ao longo desses anos. Seu exemplo de competência profissional e incentivo constante foram fundamentais para minha jornada. Sou imensamente grata

por todos os ensinamentos e experiências compartilhadas, que foram essenciais para o meu crescimento profissional.

À minha coorientadora, **Profa. Dra. Islania Giselia Albuquerque Araújo**, por me acolher com tanto carinho, confiar no meu potencial e me guiar ao longo de todos esses anos. Agradeço pela oportunidade, confiança e dedicação constante durante essa jornada.

Aos membros titulares da banca examinadora, **Profa. Dra. Maria do Socorro França Falcão**, **Prof. Dr. Thyago Moreira de Queiroz**, **Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante Oliveira** e **Prof. Dr. Felipe Queiroga Sarmiento Guerra**, e aos suplentes **Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras** e **Profa. Dra. Karina Carla de Paula Medeiros**, que aceitaram de forma muito solícita ao pedido para contribuir com este trabalho.

À **Natália de Sousa** e ao **prof. Dr. Marcus Tullius** pela valiosa colaboração nas análises de *docking* e dinâmica molecular. Essa parceria foi fundamental para a complementação do nosso trabalho, tornando-o ainda mais robusto e completo.

Aos meus amigos que a graduação me presenteou, **Larisse Pontes**, **Arthur Pontes**, **Javanyr Júnior**, por toda a parceria e amizade ao longo desse tempo. Agradeço por todo suporte nos experimentos e por compartilhar bons momentos nessa trajetória.

Aos alunos de iniciação científica, **Milena Nóbrega**, **Camilly Cristine**, **Maria Eduarda**, **Adhonias Correia** e **Evyllen Myllena**, por toda a ajuda e suporte nos experimentos.

À toda a equipe do Laboratório Farmacologia Cardiovascular, **Viviane Lima**, **Júlio Oliveira**, **Carol Menezes**, **Danilo Duarte**, **Rayane Maria**, **Alynne**, **Tays Amanda**, **Eraldo Farias**, **Myllena**, **Guilherme Marques**, **Itamar Lúcio**, **Maria Eduarda Vasconcelos**, **Hayaly Felinto**, **Ricardo Cartaxo** e **Gabriel Felipe**, por todo apoio, colaboração e parceria ao longo dessa jornada. Cada um contribuiu de forma fundamental para o desenvolvimento deste trabalho, seja com ideais, discussões ou suporte técnico.

À **Comunidade Missionária Consolação Misericordiosa**, em especial à minha formadora **Kellyane Alves**, e as minhas irmãs, por todo o apoio e orações durante

esse período da minha vida. Agradeço pela amizade e por ser esse canal de bençãos na minha vida.

Aos professores e servidores do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do CCS/UFPB, especialmente ao servidor **José Crispim Duarte**, *in memoriam*, por todo o suporte e apoio dedicados ao longo dessa trajetória.

Mathania Silva de Almeida Feitosa

“Nada te perturbe, nada te espante, tudo passa. Deus não muda. A paciência tudo alcança. Quem a Deus tem, nada lhe falta: Só Deus basta.”

Santa Teresa d'Ávila

Resumo

Atividade protetora do carvacrol na senescência endotelial do corpo cavernoso induzida por D-galactose: investigações *in vitro* e *in silico*

FEITOSA, M. S. A.

Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos

Tese de doutorado, CCS/UFPB, 2025

RESUMO

O envelhecimento é um fenômeno natural, complexo e multifatorial marcado pelo declínio das funções fisiológicas em nível molecular e celular ao longo do tempo. No sistema cardiovascular, esse processo resulta no acúmulo progressivo de células senescentes endoteliais, que apresentam função anormal e perda da capacidade proliferativa, levando à disfunção endotelial, mecanismo-chave na origem de diversos distúrbios, incluindo a disfunção erétil (DE). A DE é a incapacidade de obter e/ou manter uma ereção peniana adequada para uma relação sexual satisfatória. Evidências crescentes sugerem que o estresse oxidativo é um dos principais mecanismos responsáveis pela senescência endotelial. Assim, a redução dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) pode ser um fator importante para reverter os danos oxidativos e recuperar a função endotelial. Compostos antioxidantes como o carvacrol, limitam esses danos e, portanto, apresentam benefícios para a senescência endotelial. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade senoprotetora do carvacrol na senescência endotelial cavernosa induzida por D-galactose, através de investigações *in vitro* e *in silico*. Para isso, células endoteliais cavernosas de ratos (RCEC) foram cultivadas e tratadas por 48 horas, na ausência e na presença da D-galactose, agente indutor da senescência prematura, e do carvacrol. Inicialmente, foi avaliada a viabilidade celular, senescência associada a β -galactosidase (SA- β -galactosidase) e atividade antioxidante do carvacrol. No modelo D-galactose, o tratamento com o carvacrol restaurou a viabilidade celular e, em condições basais, não apresentou efeitos tóxicos. Quanto a SA- β -galactosidase, tanto na presença quanto na ausência, o carvacrol reduziu a senescência. Além disso, o carvacrol, em modelo de senescência, atenuou o estresse oxidativo. O estresse oxidativo é frequentemente acompanhado de uma menor produção de óxido nítrico (NO), o que pode enfraquecer o seu efeito protetor. Por isso, avaliamos se a diminuição do estresse oxidativo causada pelo carvacrol poderia estar aumentando a biodisponibilidade de NO. Essa análise demonstrou que o carvacrol, na presença da D-galactose, aumenta a biodisponibilidade de NO, indicando uma melhora na saúde endotelial. A apoptose também foi avaliada, revelando que o carvacrol aumentou a sobrevivência celular e diminuiu a apoptose inicial e tardia na presença da D-galactose, sugerindo que, por atuar como antioxidante e aumentar a biodisponibilidade NO, ele poderia estar reduzindo os danos oxidativos induzidos. Geralmente, considera-se que as células senescentes estão permanentemente paradas na fase G0/G1 do ciclo celular, portanto, avaliamos a proporção de RCEC em cada fase do ciclo. O carvacrol, na presença da D-galactose, reduziu a proporção dessas células na fase G0/G1 e aumentou nas fases S e G2/M, provavelmente por atuar como antioxidante, uma vez que o dano oxidativo é um dos principais mecanismos responsáveis pela parada do ciclo celular em células senescentes. Por fim, em busca de compreender ainda mais os mecanismos envolvidos nesses efeitos, os principais alvos moleculares das vias de senescência foram selecionados para a investigação de interação com o carvacrol, através de análises *in silico*. Esses estudos revelaram interações com os sete alvos avaliados, com destaque para o p53 e a NADPH oxidase que apresentaram interações de alta estabilidade, podendo ser até melhor do que o ligante padrão. Assim, a atividade antioxidante e a redução da parada do ciclo celular na fase G0/G1 do carvacrol, podem estar relacionadas com a modulação negativa da NADPH oxidase e p53, respectivamente.

Palavras-chave: 1. Envelhecimento. 2. Senescência endotelial. 3. Óxido nítrico. 4. Antioxidante. 5. Carvacrol.

Abstract

Protective activity of carvacrol in D-galactose-induced corpus cavernosum endothelial senescence: *in vitro* and *in silico* investigations

FEITOSA, M. S. A.

Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
Tese de doutorado, CCS/UFPB, 2025

ABSTRACT

Aging is a natural, complex, and multifactorial phenomenon characterized by the decline of physiological functions at the molecular and cellular levels over time. In the cardiovascular system, this process results in the progressive accumulation of senescent endothelial cells, which exhibit abnormal function and a loss of proliferative capacity, leading to endothelial dysfunction — a key mechanism in the development of various disorders, including erectile dysfunction (ED). The ED is the inability to achieve and/or maintain a penile erection sufficient for satisfactory sexual intercourse. Increasing evidence suggests that oxidative stress is one of the main mechanisms responsible for endothelial senescence. Thus, reducing the levels of reactive oxygen species (ROS) may be an important factor in reversing oxidative damage and restoring endothelial function. Antioxidant compounds, such as carvacrol, limit this damage and therefore offer benefits in preventing endothelial senescence. Therefore, the aim of this study was to evaluate the senoprotective activity of carvacrol in cavernous endothelial senescence induced by D-galactose, through *in vitro* and *in silico* investigations. For this, rat cavernous endothelial cells (RCEC) were cultured and treated for 48 hours, in the absence and presence of D-galactose, an agent that induces premature senescence, and carvacrol. Initially, was evaluated cell viability, β -galactosidase-associated senescence (SA- β -galactosidase), and the antioxidant activity of carvacrol. In the D-galactose model, treatment with carvacrol restored cell viability and, under basal conditions, did not show toxic effects. Regarding SA- β -galactosidase, carvacrol was able to reduce senescence both in the presence and absence of D-galactose. Furthermore, in the senescence model, carvacrol was capable of reducing oxidative stress. Oxidative stress is often accompanied by a lower production of nitric oxide (NO), which may weaken its protective effect. Therefore, we evaluated whether the decrease in oxidative stress caused by carvacrol could be increasing the bioavailability of NO. This analysis demonstrated that carvacrol, in the presence of D-galactose, increases the bioavailability of NO, indicating an improvement in endothelial health. Apoptosis was also evaluated, revealing that carvacrol is able to increase cell survival and decrease early and late apoptosis in the presence of D-galactose, suggesting that, by acting as an antioxidant and increasing NO bioavailability, it could be reducing the induced oxidative damage. Senescent cells are generally considered to be permanently arrested in the G0/G1 phase of the cell cycle, therefore, we evaluated the proportion of RCEC in each phase of the cycle. Carvacrol, in the presence of D-galactose, reduced the proportion of these cells in the G0/G1 phase and increased their presence in the S and G2/M phases, probably by acting as an antioxidant, since oxidative damage is one of the main mechanisms responsible for cell cycle arrest in senescent cells. Finally, in order to further understand the mechanisms involved in these effects, key molecular targets of senescence pathways were selected for interaction analysis with carvacrol, through *in silico* analysis. These studies revealed interactions with all seven evaluated targets, with emphasis on p53 and NADPH oxidase, which presented highly stable interactions, which may be even better than the standard ligand. Thus, the antioxidant activity and reduction of cell cycle arrest in the G0/G1 phase of carvacrol may be related to the negative modulation of NADPH oxidase and p53, respectively.

Keywords: 1. Aging. 2. Endothelial senescence. 3. Nitric oxide. 4. Antioxidant. 5. Carvacrol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Marcadores (hallmarks) do envelhecimento.....	35
Figura 2 - Expectativa de vida no mundo de 1950 até 2024.	37
Figura 3 - Envelhecimento e a incidência de doenças relacionadas a idade.	38
Figura 4 – Anatomia do pênis.	41
Figura 5 – Anatomia vascular do pênis.	43
Figura 6 – Mecânica da ereção.	44
Figura 7 - Principais mecanismos que levam à diminuição da	49
Figura 8 - Teoria do acúmulo de células senescentes.	51
Figura 9 - Características do fenótipo da senescência.	52
Figura 10 - Mecanismos da senescência celular.	54
Figura 11 - Comparação morfológica de células endoteliais jovens e senescentes .	55
Figura 12 - Vias supressoras de tumores p53 e p16 responsáveis pela parada do ciclo celular	57
Figura 13 - Mecanismos subjacentes à senescência endotelial.	58
Figura 14 - Desacoplamento da eNOS na senescência endotelial.	61
Figura 15 - Sistemas de proteção antioxidante.....	66
Figura 16 - Via de sinalização do Nrf-2/Keap 1.	67
Figura 17 - Forma estrutural do carvacrol.....	71
Figura 18 - Traçado original representativo (A) e gráfico estatístico (B) da pressão intracavernosa/pressão arterial média (ICP/MAP) em resposta à estimulação elétrica do nervo cavernoso de animais tratados com D-galactose.....	73
Figura 19 - Representação esquemática do isolamento e cultivo de RCEC.....	85
Figura 20 - Representação esquemática do brotamento de RCEC em garrafa de cultivo celular.	86
Figura 21 - Delineamento experimental.	87
Figura 22 - Reação de redução do MTT em formazan.	88
Figura 23 - Delineamento experimental dos protocolos realizados para avaliação dos mecanismos do carvacrol em RCEC.	97
Figura 24 - Detecção de viabilidade e apoptose por coloração de anexina V e 7-AAD.	99
Figura 25 - Viabilidade de RCEC tratadas com carvacrol 10^{-13} – 10^{-5} M em condições experimentais basais.....	105

Figura 26 - Viabilidade de RCEC tratadas com carvacrol 10^{-13} – 10^{-5} M em modelo de senescência induzida por D-galactose.	106
Figura 27 - Atividade da SA- β -galactosidase de RCEC tratadas com carvacrol 10^{-13} – 10^{-5} M em condições experimentais basais.	107
Figura 28 - Atividade da SA- β -galactosidase de RCEC tratadas com carvacrol 10^{-13} – 10^{-5} M em modelo de senescência induzida por D-galactose.	108
Figura 29 - Curva de concentração-resposta da senescência associada a β - galactosidase em função da concentração do carvacrol em célula endotelial cavernosa de rato no modelo de senescência induzida por D-galactose.	109
Figura 30 - Produção de ânions superóxidos de RCEC tratadas com carvacrol 10^{-13} – 10^{-5} M em condições experimentais basais.	110
Figura 31 - Produção de ânions superóxidos de RCEC tratadas com carvacrol 10^{-13} – 10^{-5} M em modelo de senescência induzida por D-galactose.	112
Figura 32 - Curva de concentração-resposta da produção de ânions superóxido em função da concentração do carvacrol em célula endotelial cavernosa de rato no modelo de senescência induzida por D-galactose.	113
Figura 33 - Mapa de interação molecular da enzima NADPH oxidase com o carvacrol (A) e o ligante-padrão apocinina (B).	116
Figura 34 - Mapa de interação molecular do alvo p53 com o carvacrol (A) e o ligante-padrão pfitirina (B).	117
Figura 35 - RMSD do alvo molecular p53 e complexado com o carvacrol e o ligante-padrão pfitirina.	118
Figura 36 - RMSD do alvo molecular NADPH oxidase e complexado com o carvacrol e o ligante-padrão apocinina.	119
Figura 37 - RMSD do alvo molecular p53 complexado ao carvacrol e ao ligante-padrão pfitirina, mediante alterações de temperatura, pressão e da influência de solventes.	120
Figura 38 - RMSD do alvo molecular NADPH oxidase complexado ao carvacrol e ao ligante-padrão apocinina, mediante alterações de temperatura, pressão e da influência de solventes.	121
Figura 39 - RMSF do alvo molecular p53 e dos complexos com o carvacrol e o ligante-padrão pfitirina.	122
Figura 40 - RMSF do alvo molecular NADPH oxidase e dos complexos com o carvacrol e o ligante-padrão apocinina.	123

Figura 41 - Raio de giro (Rg) do alvo molecular p53 (A) e NADPH oxidase (B) e dos complexos com o carvacrol e o ligante-padrão pfitirina.....	124
Figura 42 - Imagem representativa (A) e gráfico estatístico (B) da intensidade de fluorescência (%) da sonda DAF-FM DA relativa ao controle em célula endotelial cavernosa de ratos tratada com carvacrol 10^{-10} M e ACh 10^{-5} M em condições basais.	126
Figura 43 - Imagem representativa (A) e gráfico estatístico (B) da intensidade de fluorescência (%) da sonda DAF-FM DA relativa ao controle de célula endotelial cavernosa de ratos tratada com carvacrol 10^{-10} M e ACh 10^{-5} M em modelo de senescência induzida por D-galactose.	128
Figura 44 - <i>Dotplots</i> representativos de célula endotelial cavernosa de ratos tratada com carvacrol 10^{-10} M em condições basais e em modelo de senescência induzida por D-galactose, duplamente marcada com anexina V e 7-AAD.	130
Figura 45 - Taxa de sobrevivência (%) de RCEC tratadas com carvacrol 10^{-10} M, em condições basais e em modelo de senescência induzida por D-galactose.	131
Figura 46 - Taxa de apoptose inicial (%) de RCEC tratadas com carvacrol 10^{-10} M, em condições basais e em modelo de senescência induzida por D-galactose.	132
Figura 47 - Taxa de apoptose tardia (%) de RCEC tratadas com carvacrol 10^{-10} M, em condições basais e em modelo de senescência induzida por D-galactose.	133
Figura 48 - Taxa de apoptose total (%) de RCEC tratadas com carvacrol 10^{-10} M, em condições basais e em modelo de senescência induzida por D-galactose.	134
Figura 49 - Histogramas representativos da proporção (%) de RCEC nas diferentes fases do ciclo celular tratadas com carvacrol 10^{-10} M, em condições basais e em modelo de senescência induzida por D-galactose.	136
Figura 50 - Proporção (%) de RCEC da fase G0/G1 do ciclo celular tratadas com carvacrol 10^{-10} M, em condições basais e em modelo de senescência induzida por D-galactose.	137
Figura 51 - Proporção (%) de RCEC da fase S do ciclo celular tratadas com carvacrol 10^{-10} M, em condições basais e em modelo de senescência induzida por D-galactose.	138
Figura 52 - Proporção (%) de RCEC da fase G2/M do ciclo celular tratadas com carvacrol 10^{-10} M, em condições basais e em modelo de senescência induzida por D-galactose.	139

Figura 53 - Mecanismos de ação do carvacrol na senescência endotelial cavernosa induzida por D-galactose	154
---	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da solução salina balanceada de Hank.	81
Tabela 2 - Composição da solução de PBS (pH 7,2).	81
Tabela 3 - Composição da solução de coloração de x-gal.....	82
Tabela 4 - 10X Binding Buffer (pH 7,4).	82
Tabela 5 - Alvos-chave envolvidos em vias de senescência para o ensaio do <i>docking</i> molecular.	93
Tabela 6 - Energia de ligação (kJ/mol) do carvacrol e ligantes com alvos-chave das vias de senescência para a função de pontuação <i>Moldock score</i>	115
Tabela 7 - Energia de interação Coulommb e Lennard-Jones para o carvacrol e os ligantes-padrão dos alvos p53 e NADPH oxidase.	125

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7-AAD	7-amino-actinomicina
ACh	Acetilcolina
ADMA	Dimetilarginina assimétrica
Ala	Alanina
AMPK	Proteína cinase ativada por monofosfato de adenosina
APPN	ácido 3-[4-(difluorometil)fenil]-2-[(2-metilpropan-2-il)oxycarbonilamino] propanóico
Arg	Arginina
BH ₂	7,8-diidrobiopterina
BH ₄	Tetrahidrobiopterina
CAT	Catalase
CaV	Canal de Ca ²⁺ sensível a voltagem
CDK	Cinase dependente de ciclina
CE ₅₀	Concentração que produz 50% do efeito máximo
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina
CML	Célula muscular lisa
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CTL	Grupo experimental controle
CVC	Grupo experimental carvacrol
CXCL11	Ligante de quimiocina
DAF-FM	4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína
DAF-FM DA	3-amino, 4-aminometil-2', 7'-difluoresceína, diacetato
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindol,2-(4-Amidino-fenil)-6-indolecarbamidina
DCV	Doença cardiovascular
DE	Disfunção erétil
DGAL	Grupo experimental D-galactose
DGAL+CVC	Grupo experimental D-galactose + carvacrol
DHE	Dihidroetídio
DHFR	Di-hidrofolato redutase
DI	Índice de DNA

DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's médium</i>
DMSO	Dimetil sufóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
E _{máx}	Efeito máximo
eNOS	Sintase de óxido nítrico endotelial
EPCs	Células progenitoras endoteliais
EPM	Erro padrão da média
ET-1	Endotelina-1
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FMN	Flavina mononucleotídeo
Glu	Ácido glutâmico
GR	Glutaciona redutase
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona
HBSS	Solução salina balanceada de Hank
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICP/MAP	Intracavernosa/pressão arterial média
IL	Interleucina
Ile	Isoleucina
IPeFarM	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
Keap 1	Proteína 1 associada a ECH do tipo Kelch
Leu	Leucina
Lys	Lisina
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
MDA	Malondialdeído
MMP	Metaloproteinases de matriz
MTHFR	metilenotetra-hidrofolato redutase
mTOR	Alvo mecanicista da rapamicina
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado

NANC	Nervo não adrenérgico e não colinérgico
NF-κB	Fator nuclear de transcrição pró-inflamatória-κB
NHMC	N-[4-[2-(4-fluoro-3-metilfenil)imidazo[1,2-b]piridazin-3-il]piridin-2-il]-1-hidroxi-2-metilpiridin-1-ilo-4-carboxamida
nNOS	Sintase de óxido nítrico neuronal
NO	Óxido nítrico
Nrf2	Fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OH	Hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PAI-1	Inibidor-1 do ativador do plasminogênio
PBS	Solução nutritiva Tampão Fosfato-Salino
PDB	Protein Data Bank
PGI ₂	Prostaciclina
Phe	Fenilalanina
PI	Iodeto de propídio
PKB	Proteína cinase
pRb	Proteína do retinoblastoma
Pro	Prolina
PVPI	Iodopovidona
RCEC	Células endoteliais cavernosas de rato
RMSD	Desvio quadrático médio
RMSF	Flutuação quadrática média
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
SA-β-galactosidase	Senescência associada à β-galactosidase
SASP	Fenótipo secretor associado à senescência
Ser	Serina
SFB	Soro fetal bovino
SIRT	Sirtuína
SOD	Superóxido dismutase
TGFβ1	Fator de crescimento transformador β-1
UFPB	Universidade Federal da Paraíba

UPA	Unidade de Produção Animal
Val	Valina
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
X-Gal	5 - Bromo – 4 – Cloro – 3 - Indolil β – D - galactopiranosídeo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	30
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	33
2.1	Definindo o envelhecimento	33
2.2	Impacto do envelhecimento da população e das doenças associadas	36
2.3	Disfunção erétil associada ao envelhecimento	39
2.3.1	<i>Fisiologia da ereção e os mecanismos envolvidos</i>	40
2.3.2	<i>Alterações na hemodinâmica peniana no envelhecimento</i>	46
2.4	Senescência celular: um alvo terapêutico determinante no processo de envelhecimento	50
2.5	Mecanismos subjacentes à senescência endotelial e as evidências de sua importância clínica	56
2.6	Modelo de senescência prematura induzida por D-galactose	63
2.7	O papel do estresse oxidativo associado à senescência	64
2.8	Produtos naturais: Potencial terapêutico na senescência celular	69
2.9	Carvacrol	71
3	OBJETIVOS	76
3.1	Objetivo geral	76
3.2	Objetivos específicos	76
4	MATERIAL E MÉTODOS	79
4.1	Local da pesquisa	79
4.2	Substâncias e reagentes	79
4.3	Substância teste: Carvacrol	80
4.4	Soluções	80
4.5	Animais	82
4.6	Isolamento e cultivo de células endoteliais cavernosas de rato	83

4.7	Modelo de senescência acelerada induzida por D-galactose	86
4.8	Avaliação dos efeitos do carvacrol sobre os marcadores da senescência em condições basais e em modelo de senescência induzida por D-galactose em célula endotelial cavernosa de rato	87
4.8.1	Design experimental	87
4.8.2	Avaliação da viabilidade celular.....	88
4.8.3	Avaliação da senescência associada à β -galactosidase	89
4.8.4	Avaliação dos níveis de ânions superóxidos.....	90
4.9	Predição da interação do carvacrol com alvos da via da senescência através de abordagens <i>in silico</i>	91
4.9.1	Simulação de docking molecular para a determinação dos valores de energia de ligação entre o carvacrol e os alvos-chave da via da senescência..	91
4.9.2	Simulação de dinâmica molecular entre o carvacrol e os alvos-chave da via da senescência o p53 e a NADPH oxidase.....	95
4.10	Avaliação dos mecanismos do carvacrol sobre as vias de senescência induzida por D-galactose em célula endotelial cavernosa de ratos	96
4.10.1	Design experimental	96
4.10.2	Avaliação do efeito do carvacrol na detecção dos níveis de óxido nítrico de célula endotelial cavernosa de rato em modelo de senescência induzida por D-galactose.....	97
4.10.3	Avaliação do efeito do carvacrol na apoptose de RCEC em modelo de senescência induzida por D-galactose.....	98
4.10.4	Avaliação do efeito do carvacrol na distribuição de RCEC nas diferentes fases do ciclo celular em modelo de senescência induzida por D-galactose	100
4.11	Análise estatística	101
5	RESULTADOS	104
5.1	Avaliação dos efeitos do carvacrol sobre os marcadores da senescência em condições basais e em modelo de senescência induzida por D-galactose em célula endotelial cavernosa de rato	104

5.1.1	Avaliação do efeito do carvacrol sobre a viabilidade celular em célula endotelial cavernosa de rato	104
5.1.2	Avaliação do efeito do carvacrol sobre a atividade da β -galactosidase associada à senescência em célula endotelial cavernosa de rato	106
5.1.3	Avaliação do efeito do carvacrol sobre a produção de ânions superóxidos em célula endotelial cavernosa de rato	110
5.2	Predição da interação do carvacrol com alvos da via da senescência através de abordagens <i>in silico</i>	113
5.2.1	Simulação de docking molecular para a determinação dos valores de energia de ligação e das interações entre o carvacrol e os alvos-chave da via da senescência	113
5.2.2	Simulação de dinâmica molecular entre o carvacrol e os alvos-chave da via da senescência a NADPH oxidase e o p53	118
5.3	Avaliação dos mecanismos do carvacrol sobre as vias de senescência induzida por D-galactose em célula endotelial cavernosa de ratos	125
5.3.1	Avaliação do efeito do carvacrol na detecção dos níveis de óxido nítrico em célula endotelial cavernosa de rato em condições basais	125
5.3.2	Avaliação do efeito do carvacrol na detecção dos níveis de óxido nítrico em célula endotelial cavernosa de rato no modelo de senescência induzida por D-galactose	127
5.3.1	Avaliação do efeito do carvacrol na apoptose de RCEC	129
5.3.2	Avaliação do efeito do carvacrol sobre a progressão do ciclo celular em células endoteliais cavernosas de ratos	135
6	DISCUSSÃO	141
7	CONCLUSÃO	154
8	REFERÊNCIAS	156
9	APÊNDICES	176
	Apêndice A – Carvacrol prevents D-(+)-galactose-induced aging-associated erectile dysfunction by improving endothelial dysfunction and oxidative stress in rats	176

Apêndice B – D-(+)-Galactose-induced aging: A novel experimental model of erectile dysfunction	177
Apêndice C – Carvacrol Improves Vascular Function in Hypertensive Animals by Modulating Endothelial Progenitor Cells.....	178
Apêndice D – Evaluation of Cardiovascular Effects of Carvacrol in a D-(+)- Galactose-Induced aging Model	179
Apêndice E – ROS: Basic Concepts, Sources, Cellular Signaling, and its Implications in Aging Pathways	180
Apêndice F – Yeast carboxymethyl-glucan improves endothelial function and inhibits platelet aggregation in spontaneously hypertensive rats	181
Apêndice G – Unveiling the Role of Inflammation and Oxidative Stress on Age- Related Cardiovascular Diseases	182
Apêndice H – Pedido de patente.....	183
Apêndice H – Pedido de patente.....	184
Apêndice H – Pedido de patente.....	185
Apêndice H – Pedido de patente.....	186
Apêndice H – Pedido de patente.....	187
Apêndice H – Pedido de patente.....	188
Apêndice H – Pedido de patente.....	189
10 ANEXOS	191
Anexo A – Certificado de aprovação do projeto na Comissão de Ética no Uso de Animais	191

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento é um processo multifatorial caracterizado por alterações moleculares, celulares e fisiológicas que aumentam a suscetibilidade do indivíduo ao desenvolvimento de doenças (De Almeida Rezende; Oliveira De Almeida; Gonçalves; De Azevedo *et al.*, 2021). De fato, mais de 90% das pessoas com mais de 65 anos apresentam pelo menos uma doença crônica, e mais de 70% convivem com duas ou mais (Zhang; Pitcher; Prahalad; Niedernhofer; Robbins, 2023). Portanto, compreender os mecanismos do envelhecimento e desenvolver estratégias para retardar esse processo, bem como o surgimento de doenças associadas à idade, é de grande relevância (Fu; Zhang; Zhang, 2022).

Ao longo das décadas, tem sido amplamente discutido se a senescência contribui para o processo de envelhecimento do organismo. Uma vez que as células são os blocos de construção fundamentais do tecido e do organismo, é indiscutível que a senescência celular contribui para o envelhecimento, como evidenciado pelo acúmulo progressivo de células senescentes em diversos tecidos em doenças relacionadas à idade (Khor; Wong, 2020).

Nesse contexto, a senescência das células endoteliais desempenha um papel fundamental no desenvolvimento de desordens relacionadas ao envelhecimento, pois o acúmulo dessas células leva à disfunção endotelial, mecanismo-chave na origem de diversos distúrbios, incluindo a disfunção erétil (DE), marcador precoce de doenças cardiovasculares (DCV) (Jia; Aroor; Jia; Sowers, 2019; Khor; Wong, 2020).

A DE é a incapacidade de obter e/ou manter uma ereção peniana adequada para uma relação sexual satisfatória (Argiolas; Argiolas; Argiolas; Melis, 2023). O envelhecimento é reconhecido por alterar a função erétil e promover disfunção endotelial, que interrompe os mecanismos homeostáticos responsáveis pela regulação da contração da musculatura lisa e do tônus vascular peniano (Blick; Ritchie; Sullivan, 2016; Echeverri Tirado; Ferrer; Herrera, 2016).

A disfunção endotelial manifesta-se com uma diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO), resultante da sua degradação acelerada por espécies reativas de oxigênio (ROS), consequência do aumento do estresse oxidativo. Além disso, as ROS alteram a sinalização intracelular da sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS) de modo que ela entre em um estado de desacoplamento, produzindo ainda mais

ROS e reduzindo a biodisponibilidade de NO (De Almeida; De Oliveira; Da Silva Pontes; De Souza Júnior *et al.*, 2022).

Em células endoteliais, o estresse celular induzido pelo estresse oxidativo é um fator determinante para promover a senescência prematura (Jia; Aroor; Jia; Sowers, 2019). Assim, estratégias senoprotetoras que visam reduzir o estresse oxidativo e promover a recuperação ou eliminação de biomoléculas, organelas e células danificadas podem ser um processo importante para preservar a integridade celular (Chaudhary; Chaudhary; Sharma; Singh *et al.*, 2023).

Nesse contexto, os óleos essenciais, como antioxidantes naturais, apresentam um recurso útil para a identificação de terapias que podem atingir a senescência e as alterações associadas (Ledrhem; Nakamura; Obitsu; Hirae *et al.*, 2022). Dentre os componentes dos óleos essenciais, destaca-se o carvacrol, que tem atraído considerável atenção por sua ampla gama de atividades farmacológicas (Forqani; Akbarian; Amirahmadi; Khorrami *et al.*, 2024).

Carvacrol é um monoterpreno fenólico obtido de plantas aromáticas da família Lamiaceae como *Origanum vulgare* (orégano), *Thymus vulgare* (tomilho), *Lepidium flavum* (pimenta), *Bergamia loise var. Citrus aurantium* (bergamota selvagem) (Imran; Aslam; Alsagaby; Saeed *et al.*, 2022). As atividades biológicas do carvacrol foram demonstradas em diferentes estudos *in vivo* e *in vitro*, incluindo atividade antioxidante, anti-inflamatória, vasorrelaxante e antiapoptótica (De Almeida Feitosa; De Almeida; Dantas; De Azevedo *et al.*, 2024). Além disso, o carvacrol regula negativamente marcadores da senescência (El-Far; Mohamed; Elsabagh; Mohamed *et al.*, 2022).

Estudos recentes do nosso grupo de pesquisa evidenciaram que o carvacrol pode melhorar a função erétil associada ao envelhecimento, atuando através da redução do estresse oxidativo, melhora da disfunção endotelial e na diminuição do acúmulo de células senescentes no corpo cavernoso isolado de ratos. No entanto, são necessários mais estudos para aprofundar a compreensão dos mecanismos envolvidos nesses efeitos. Assim, o presente estudo teve como objetivo investigar a ação senoterapêutica do carvacrol em cultura de células endoteliais cavernosas de ratos (RCEC) no modelo experimental de senescência induzida por D-galactose, através de metodologias *in vitro* e *in silico*.

Fundamentação teórica

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Definindo o envelhecimento

O envelhecimento é um fenômeno natural complexo e multifatorial caracterizado por uma deterioração gradual das funções fisiológicas em nível molecular e celular de um organismo ao longo do tempo (De Almeida Rezende; Oliveira De Almeida; Gonçalves; De Azevedo *et al.*, 2021; El-Far; Elghaity; Mohamed; Noreldin *et al.*, 2024). Ele é desenvolvido a partir do acúmulo de fatores físicos, ambientais e sociais e os detalhes dos mecanismos moleculares que desencadeiam o processo de envelhecimento são considerados uma tarefa difícil (Davalli; Mitic; Caporali; Lauriola; D'arca, 2016).

A origem do envelhecimento tem sido uma questão de debate há décadas, e várias hipóteses que propõem mecanismos para sua evolução foram levantadas, como a teoria dos radicais livres mitocondriais (Harman, 1965), a teoria dos telômeros (Olovnikov, 1996), a teoria dos danos ao ácido Desoxirribonucleico (DNA) (Gensler; Bernstein, 1981), a teoria do erro (Orgel, 1963) e a teoria inflamatória (Franceschi; Bonafè; Valensin, 2000). De forma geral, essas hipóteses sugerem que o envelhecimento não é uma ocorrência aleatória, mas sim um fenômeno geneticamente programado, ocorrendo quando células e tecidos são desgastados ao longo dos anos (Harman, 1981; Weismann, 1891).

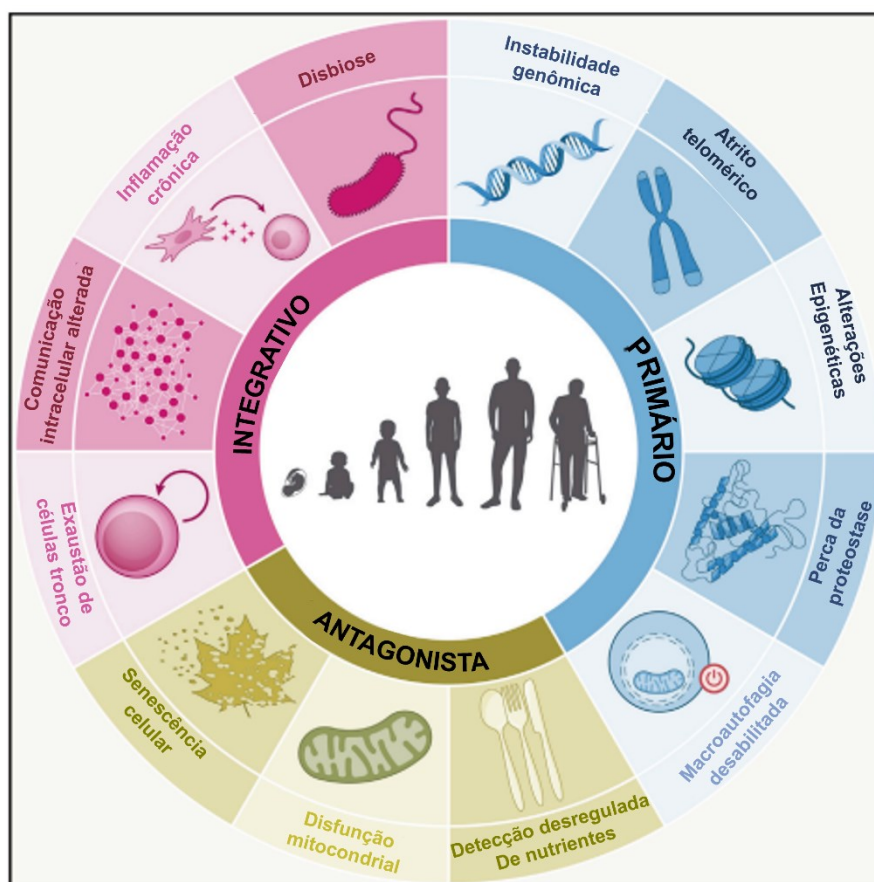
Em meados da década de 1900, os pesquisadores começaram a debater a ideia de que o envelhecimento era a causa de doenças crônicas relacionadas à idade. O uso da palavra "causa" continua controverso porque, embora o envelhecimento seja o maior fator de risco para uma infinidade de doenças relacionadas à idade, a causalidade não foi comprovada. Em apoio à ideia, alguns fenômenos aparentemente normais do envelhecimento, que interagem entre si de forma complexa, contribuem para as doenças (Campisi; Kapahi; Lithgow; Melov *et al.*, 2019). Um marco inicial importante na pesquisa sobre envelhecimento ocorreu em 1939, quando observaram que a restrição da ingestão calórica em camundongos e ratos aumentava a expectativa de vida; foi a primeira demonstração da plasticidade do processo de envelhecimento (Campisi; Kapahi; Lithgow; Melov *et al.*, 2019; Mccay; Maynard; Sperling; Barnes, 1939).

Em 2013, López-Otín et al. assumiram a tarefa de fornecer alguma ordem à multidão de vias biológicas envolvidas no processo de envelhecimento, propondo que todos os fatores implicados no envelhecimento sejam organizados em nove categorias, ou marcadores. Para que seja considerado um marcador, esses fatores devem estar presentes durante o envelhecimento normal e, ao ser manipulado experimentalmente, deve influenciar o ritmo do processo de envelhecimento. Esse último requisito continua sendo o mais difícil de ser alcançado, principalmente devido à interconexão entre os marcadores (Amorim; Coppotelli; Rolo; Palmeira *et al.*, 2022). Isso ressalta o fato de que o envelhecimento é um processo complexo que deve ser analisado como um todo. Consequentemente, cada um dos marcadores deve ser considerado como um ponto de entrada para a exploração futura do processo de envelhecimento (López-Otín; Blasco; Partridge; Serrano; Kroemer, 2023).

As nove características do envelhecimento que foram propostas pelo grupo de Lopez-Ótín, compreende instabilidade genômica, desgaste do telômero, alterações epigenéticas, disfunção mitocondrial, perda de proteostase, detecção desregulada de nutrientes, senescência celular, exaustão de células-tronco e comunicação intercelular alterada. A pesquisa sobre a biologia do envelhecimento progrediu notavelmente com base nesta proposta (López-Otín; Blasco; Partridge; Serrano; Kroemer, 2013).

Dez anos depois, em 2023, López-Ótín adicionou novas características às originais, que inclui autofagia, distúrbio da microbiota e inflamação crônica, fornecendo uma estrutura mais abrangente para estudos do envelhecimento (López-Otín; Blasco; Partridge; Serrano; Kroemer, 2023) Essas características são agrupadas em três categorias: primária, cujos efeitos são indubitavelmente negativos; antagônica, cujos efeitos podem ser benéficos ou deletérios dependendo de sua intensidade; e integrativa, que afeta a homeostase e a funcionalidade do tecido (Figura 1). Avanços na compreensão dos mecanismos subjacentes ao processo de envelhecimento e os possíveis determinantes modificáveis podem revelar *insights* sobre como atingir o envelhecimento mais saudável (Dominguez; Veronese; Barbagallo, 2024; Tartiere; Freije; López-Otín, 2024).

Figura 1 - Marcadores (*hallmarks*) do envelhecimento.



Legenda: O esquema compila doze marcadores do envelhecimento que estão agrupados em três categorias: primária, instabilidade genômica, desgaste do telômero, alterações epigenéticas, perda de proteostase e macroautofagia desabilitada; antagonista, desregulação da detecção de nutrientes, disfunção mitocondrial e senescência celular; integrativa, exaustão de células-tronco, alteração da comunicação intercelular, inflamação crônica e disbiose.

Fonte: Adaptado de López-Otín; Blasco; Partridge; Serrano e Kroemer (2023)

De fato, o envelhecimento é um fenômeno fisiológico e multifatorial de declínio progressivo da função do organismo ao longo do tempo (Fu; Zhang; Zhang, 2022). A maioria dos biogerontólogos concordaria que o envelhecimento é o impacto cumulativo de uma série de processos biológicos deletérios que gradualmente tornam um organismo cada vez mais vulnerável à mortalidade com a idade (Mc Auley, 2024). É considerado a raiz de múltiplas doenças, à medida que a população idosa e a

expectativa de vida aumentam, também se elevam as chances de sofrer de doenças relacionadas à idade (Navarro; Salazar; Díaz; Chacin *et al.*, 2023).

A relação entre as muitas comorbidades e o processo de envelhecimento envolve a interação constante e sinérgica de vários fatores intrínsecos e extrínsecos, que precisam ser completamente descritos para obter uma visão clara dos processos subjacentes ao fenômeno de envelhecimento (Navarro; Salazar; Díaz; Chacin *et al.*, 2023). Esse entendimento é particularmente relevante quando se considera que o processo de envelhecimento de um indivíduo não pode ser totalmente equiparado ao de outro, sabendo que a interação entre os fatores intrínsecos e extrínsecos nunca será exatamente a mesma.

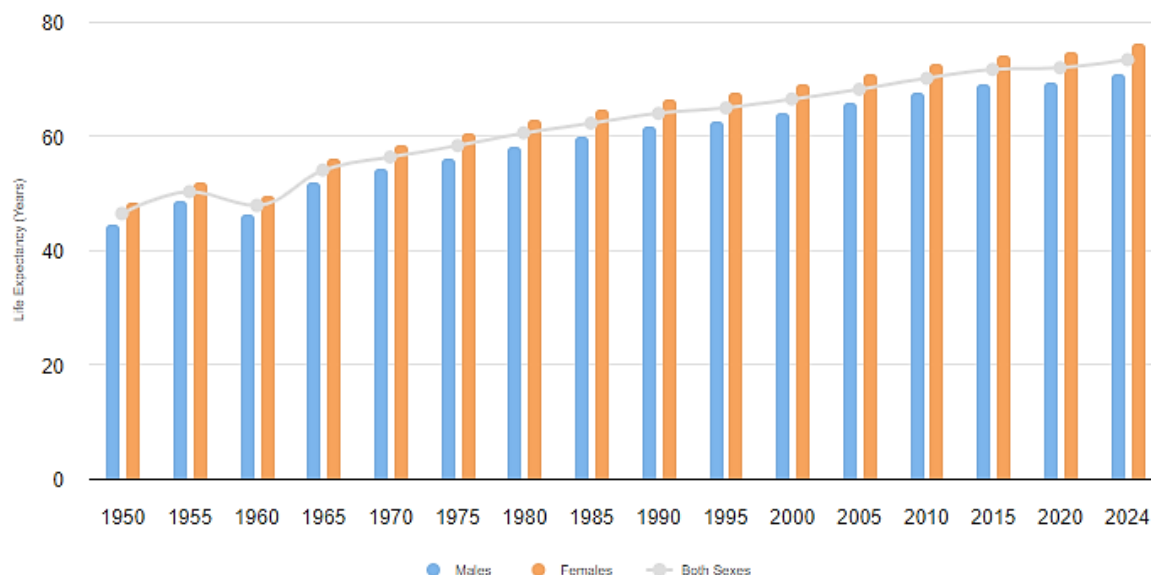
As bases extrínsecas que incluem os fatores ambientais relacionados ao estilo de vida, como dieta hipercalórica, sedentarismo e hábitos nocivos (cigarro, estresse e o consumo excessivo de álcool, por exemplo) afetam diretamente a saúde devido às suas consequências metabólicas prejudiciais; podendo ter uma influência mais decisiva do que os fenômenos intrínsecos (Denham; O'brien; Charchar, 2016; Juárez-Fernández; Porras; García-Mediavilla; Román-Sagüillo *et al.*, 2020; Ragonnaud; Biragyn, 2021).

Em relação à base intrínseca, o impacto e a interação entre genes candidatos selecionados relacionados à longevidade e suas variações, bem como fatores epigenéticos e outras características primárias do envelhecimento celular foram sugeridos como os principais culpados do processo de envelhecimento, em conjunto com moléculas específicas e organelas celulares, como metabólitos e mitocôndrias, respectivamente (Navarro; Salazar; Díaz; Chacin *et al.*, 2023).

2.2 Impacto do envelhecimento da população e das doenças associadas

A população global apresentou um crescimento notável ao longo do último século, quase triplicando de aproximadamente 3 bilhões de indivíduos em 1950 para 8 bilhões em 2022, de acordo com dados da Divisão de População do Departamento de Assuntos Económicos e Sociais das Nações Unidas. Este aumento populacional ocorreu em conjunto com um aumento notável na expectativa de vida, que foi de 45,51 anos em 1950 para 73,3 anos em 2024 (Figura 2). As projeções indicam uma trajetória ascendente adicional, com uma esperança média de vida prevista de 81,88 anos até ao ano de 2100 (Surugiu; Iancu; Vintilescu Ş; Stepan *et al.*, 2024).

Figura 2 - Expectativa de vida no mundo de 1950 até 2024.



Legenda: Expectativa média de vida global para homens, mulheres e ambos os sexos de 1950 a 2024.

Fonte: OMS acesso em 04/11/2024

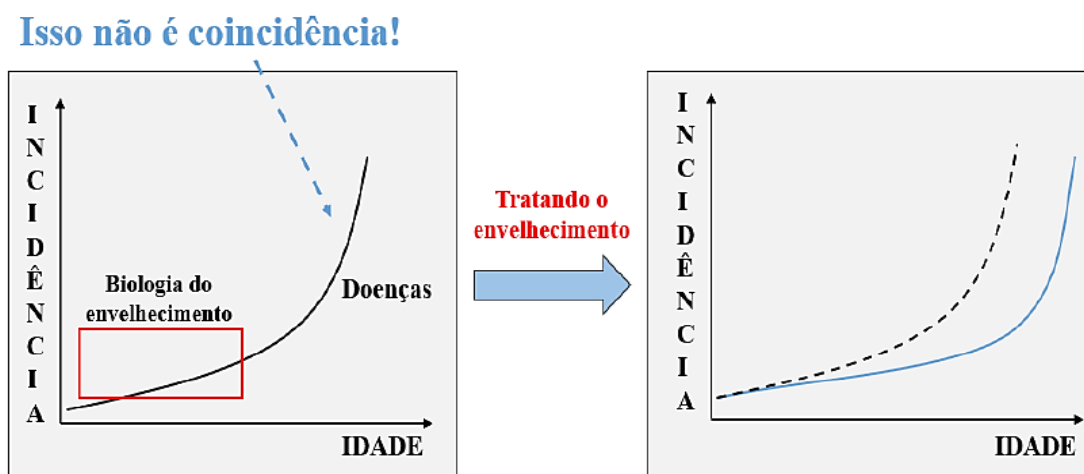
Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) e o Banco Mundial, a população global com 65 anos ou mais era de 727 milhões, constituindo 9,3% da população total em 2022. Considera-se que um país ou região está se tornando uma sociedade envelhecida quando uma proporção de pessoas com 60 anos ou mais atinge 10% da população, ou quando uma parcela de indivíduos com 65 anos ou mais chega a 7% (Liu; Fang; Tu; Mo *et al.*, 2024).

No Brasil, o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), apresenta, com base nos dados do Censo Demográfico 2022, resultados sobre a população de pessoas idosas, que é definida por aquelas pessoas que possuem 60 anos de idade ou mais. Em 1980, o Brasil tinha 6,1% da população com 60 anos ou mais de idade. Já em 2022, esse grupo etário representou 15,8% da população total e um crescimento de 46,6% em relação ao Censo Demográfico 2010, quando representava 10,8% da população. Entre os motivos para o envelhecimento da população

brasileira, é possível destacar o avanço da medicina, já que as pessoas podem realizar a prevenção médica com maior cuidado (Ibge, 2022).

Apesar do aumento da expectativa de vida ser uma realidade para a maioria dos países, os indivíduos não necessariamente apresentam melhora na sua qualidade de vida (Figura 3) (Amorim; Coppotelli; Rolo; Palmeira *et al.*, 2022; De Almeida; Ribeiro; De Medeiros, 2017). Durante o processo de envelhecimento, os tecidos e órgãos sofrem declínio funcional ou deterioração, aumentando assim sua suscetibilidade a doenças relacionadas à idade, como doenças neurodegenerativas, diabetes, câncer e DCV, encurtando sua expectativa de vida saudável, o que trouxe enorme pressão financeira aos países em todo o mundo em termos de assistência à saúde (Fu; Zhang; Zhang, 2022; Li; Tian; Luo; Bao *et al.*, 2024).

Figura 3 - Envelhecimento e a incidência de doenças relacionadas a idade.



Legenda: Aumento da incidência de doenças com o avanço da idade que pode ser atenuado por terapias de envelhecimento. Essas intervenções deslocam a curva de incidência para a direita, indicando a eficiência da terapia em retardar o surgimento de doenças associadas ao envelhecimento.

Fonte: Adaptado de (De Almeida; Ribeiro; De Medeiros, 2017)

Nos últimos anos, investigações moleculares revelaram redes de sinalização comuns que podem relacionar o processo de envelhecimento com a deterioração da homeostase cardiovascular (Costantino; Paneni; Cosentino, 2016). Esses diferentes

processos parecem estar altamente interconectados com o desenvolvimento de DCV, responsáveis pelo maior índice de morbimortalidade mundial, por isso, o envelhecimento é um dos principais fatores de risco para essas doenças (De Almeida; De Almeida Rezende; Dantas; De Lima Silva *et al.*, 2020).

Uma associação entre DCV e DE foi observada em 1997, e desde então ficou evidente que a DE frequentemente antecede eventos cardiovasculares, podendo ser utilizada como um marcador precoce para identificar homens com alto risco de DCV grave (Mobley; Khera; Baum, 2017). Mc Mahon ressalta, ainda, que a DE é um importante indicador de disfunção endotelial generalizada (Mcmahon, 2019).

Um estudo fundamental que estabeleceu as bases para a utilização potencial da DE para o diagnóstico precoce de DCVs, foi publicado por Montorsi e colaboradores, no qual 65% dos pacientes apresentaram sintomas de DE três anos antes do início das manifestações cardiovasculares. Os autores sugerem que, devido ao pequeno calibre dos vasos penianos, qualquer alteração mínima afetaria esses vasos primeiro, antes de causar sintomas cardiovasculares evidentes (Montorsi; Ravagnani; Galli; Rotatori *et al.*, 2004).

Os fatores de risco para DE são semelhantes aos de DCV, como hipertensão arterial, diabetes *mellitus*, tabagismo, obesidade e dislipidemia (MCMAHON, 2014; MOBLEY *et al.*, 2017). No entanto, o envelhecimento, por si só, pode ser o suficiente para o desenvolvimento da DE, sendo considerado um dos fatores de risco mais relevantes (De Almeida Feitosa; De Almeida; Dantas; De Azevedo *et al.*, 2024).

2.3 Disfunção erétil associada ao envelhecimento

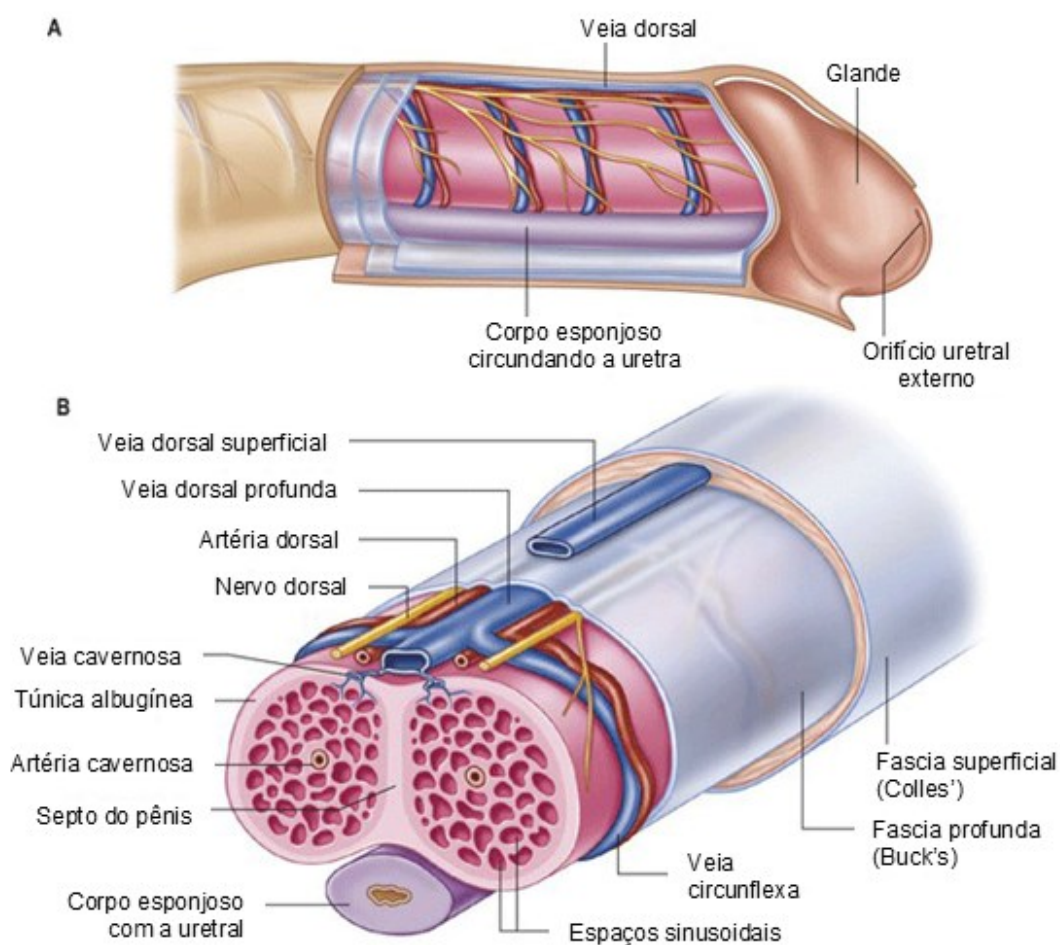
A DE é um problema sexual masculino caracterizado como a incapacidade persistente ou recorrente de obter e/ou manter uma ereção suficiente para uma relação sexual satisfatória (Nih, 1993). O principal fator de risco associado à DE é a idade, podendo afetar até 76% dos indivíduos que possuem mais de 70 anos de idade (De Almeida Rezende; Oliveira De Almeida; Gonçalves; De Azevedo *et al.*, 2021; Rinkūnienė; Gimžauskaitė; Badarienė; Dženkevičiūtė *et al.*, 2021). A alta prevalência está relacionada ao aumento da expectativa de vida da população, estima-se que até o final de 2025 a DE acometa 322 milhões de homens (Chen; Lu; Zhang; Tan; Qin,

2024; Kessler; Sollie; Challacombe; Briggs; Van Hemelrijck, 2019; Sin; Anand; Koh, 2021).

2.3.1 Fisiologia da ereção e os mecanismos envolvidos

A ereção peniana é um mecanismo neurovascular complexo que requer interação entre os sistemas nervosos central e periférico, endotélio vascular e fatores hormonais, além de ser dependente da integridade estrutural dos componentes celulares penianos (Bogacki-Rychlik; Gawęda; Bialy, 2023; Castela; Costa, 2016).

O tecido erétil é uma estrutura vascular altamente especializada, composta por três corpos esponjosos cilíndricos, sendo dois corpos cavernosos, localizados na porção dorsal do pênis, e um corpo esponjoso que circunda o segmento distal da uretra no lado ventral do pênis (Figura 4). Esse tecido compreende pequenas artérias de resistência (artérias helicoidais) que se abrem em cavidades sinusoidais (trabéculas) revestidas internamente por uma monocamada endotelial vascular. Este endotélio vascular é cercado por uma rede de células musculares lisas (CML), nervos autonômicos e matriz extracelular, que compreende colágeno, fibras elásticas e fibroblastos (Andersson, 2019; Castela; Costa, 2016).

Figura 4 – Anatomia do pênis.

Legenda: Anatomia peniana visão longitudinal (A) e transversal (B). A visão longitudinal destaca a estrutura alongada do pênis, revelando o corpo cavernoso, a veia dorsal, a inervação, a irrigação sanguínea, o corpo esponjoso, a glândula e a uretra. Já a visão transversal (B) revela três estruturas eréteis formadas por um corpo esponjoso e dois corpos cavernosos, que são revestidos pelas fâscias de Buck, de Colles e por tecido subcutâneo, que os separam da pele. Os corpos cavernosos são revestidos ainda por um envelope espesso denominado túnica albugínea, que se funde para formar o septo mediano, separando os dois corpos cavernosos.

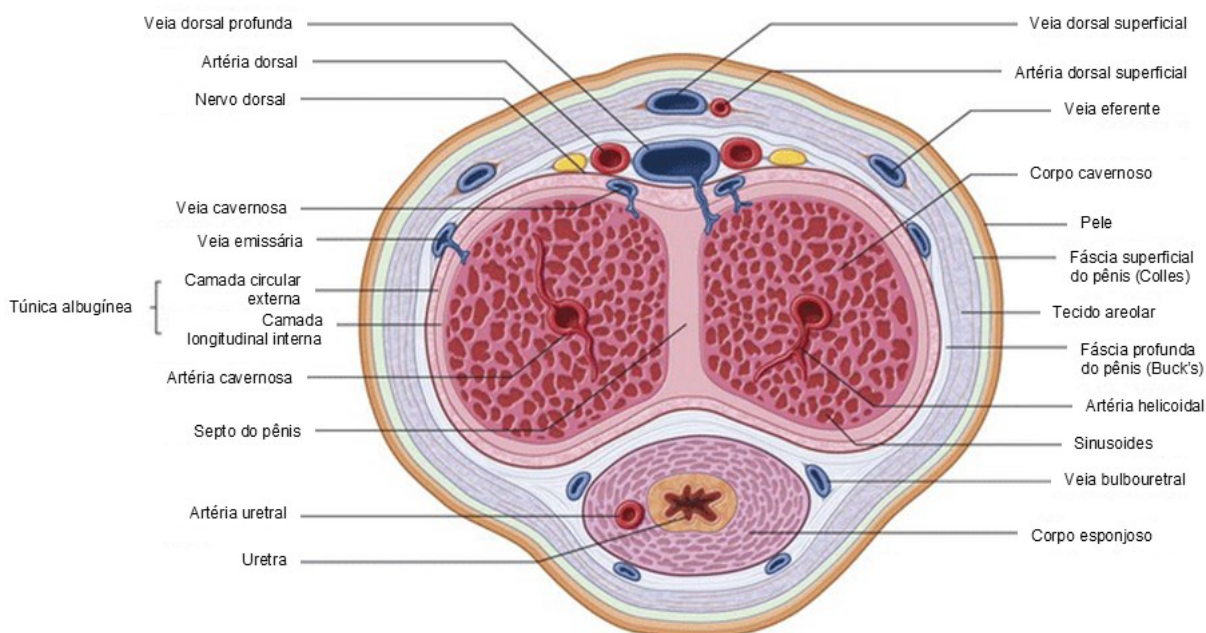
Fonte: Adaptado de Andersson (2019)

Os corpos cavernosos estão contidos em um envelope espesso denominado túnica albugínea, que se funde para formar o septo peniano. Este septo, por ser

perfurado e descontínuo, permite que os corpos cavernosos funcionem como uma unidade única (Andersson, 2019; Jung; Jo; Kwon; Jeong, 2014). A túnica albugínea é uma estrutura com múltiplas camadas circulares de tecido conjuntivo e é composta de colágeno fibrilar entrelaçado com fibras de elastina, proporcionando uma grande flexibilidade e rigidez ao pênis, além de fornecer resistência tecidual. Fáscias profundas (de Buck) e superficiais (de Colles) envolvem a túnica albugínea e encerram os vasos sanguíneos e os nervos penianos e um tecido subcutâneo os separa da pele (Andersson, 2019).

O suprimento sanguíneo arterial é fornecido principalmente por três ramos da artéria pudenda interna, artéria bulbar, uretral e cavernosa, que se unem formando a artéria dorsal (Figura 5) (Garg; Date; Gupta; Baliarsing, 2016). A artéria bulbar fornece suprimento sanguíneo para as glândulas de Cowper (glândulas bulbouretrais). A artéria uretral acompanha longitudinalmente a uretra e supre não apenas o corpo esponjoso, mas também a glândula do pênis e o tecido uretral. A artéria cavernosa, uma artéria mais profunda, está localizada no centro dos corpos cavernosos, e se divide em múltiplos ramos formando as artérias helicoidais. Estas artérias são responsáveis por controlar o fluxo sanguíneo nos sinusoides; no pênis relaxado, o suprimento de sangue para os espaços cavernosos é restrito e as artérias helicoidais encontram-se ocluídas (Andersson, 2019; Breza; Aboseif; Orvis; Lue; Tanagho, 1989; Garg; Date; Gupta; Baliarsing, 2016).

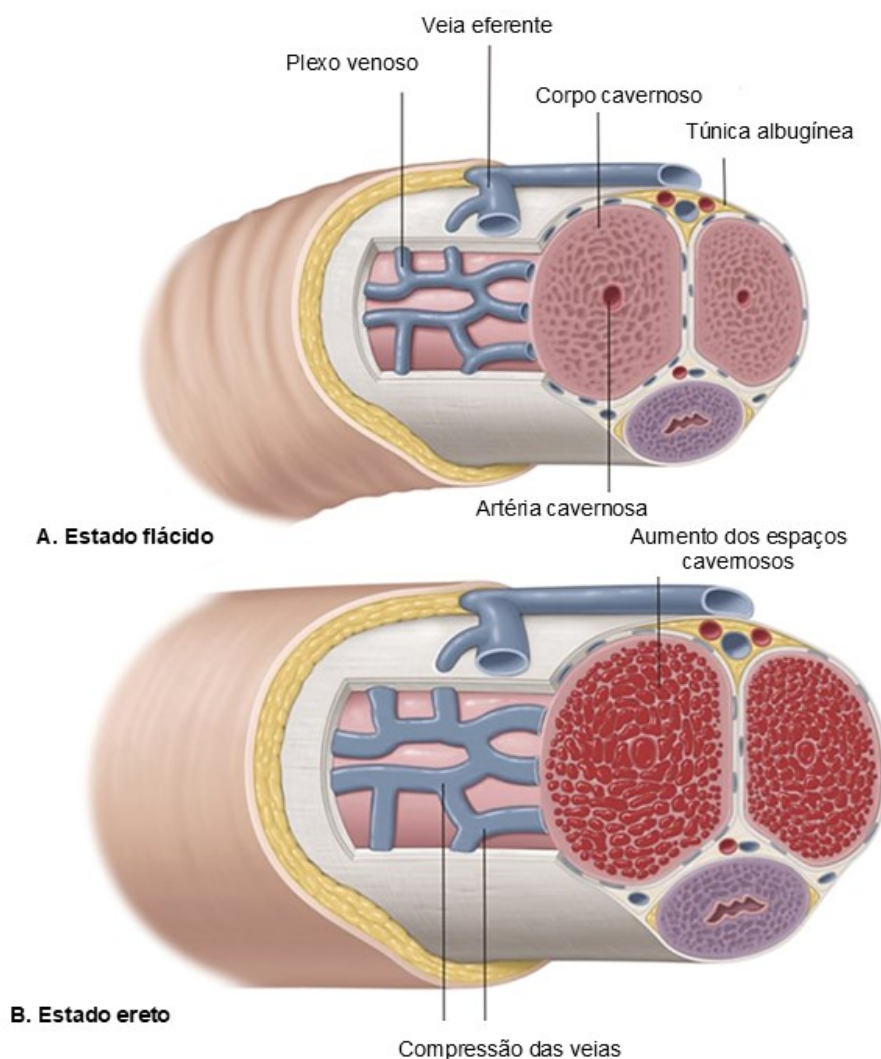
Figura 5 – Anatomia vascular do pênis.



Fonte: Adaptado de Andersson (2019)

Legenda: Corte transversal do pênis destacando a irrigação sanguínea.

A ereção peniana é desencadeada pela estimulação e excitação sexual. O processo é iniciado pela ativação da via parassimpática através dos nervos cavernosos, que promove a dilatação das artérias helicoidais e aumento do fluxo sanguíneo, que, por sua vez, causa a liberação de fatores relaxantes endoteliais, aumentando o relaxamento do músculo liso cavernoso. Como consequência, o sangue flui para os espaços cavernosos, promovendo a sua expansão. Durante esse processo, a drenagem venosa é comprimida mecanicamente, limitando o retorno do fluxo sanguíneo ao sistema venoso. Esses processos, em conjunto, aumentam a pressão intracavernosa que eleva o pênis para o estado ereto (Andersson, 2019; Garg; Date; Gupta; Baliarsing, 2016). Durante a detumescência (estado de flacidez peniana), esses eventos são invertidos (Figura 6) (Andersson, 2019).

Figura 6 – Mecânica da ereção.

Legenda: Estados de detumescência (A) e ereção peniana (B). O estado de detumescência é caracterizado pela contração tônica do músculo liso das trabéculas cavernosas e pela vasoconstrição das artérias do corpo cavernoso, diminuindo significativamente o suprimento sanguíneo. Já o estado de ereção, o relaxamento do músculo liso nas trabéculas e na vasculatura arterial resulta em aumento do fluxo sanguíneo, que rapidamente dilata e preenche os espaços cavernosos. O fluxo venoso cai à medida que os espaços cavernosos em expansão comprimem o plexo venoso.

Fonte: Adaptado de Holden; Akers e Llahana (2019)

O NO é o principal mediador envolvido no processo de ereção peniana. Ele é liberado pelos nervos não adrenérgicos e não colinérgicos (NANC), por meio da

enzima sintase de óxido nítrico neuronal (nNOS) e pelas células endoteliais, por meio da eNOS (Castela; Costa, 2016; De Almeida Feitosa; De Almeida; Dantas; De Azevedo *et al.*, 2024). Nos nervos NANC, o aumento do influxo de Ca^{2+} , pela abertura de canais de Ca^{2+} sensíveis a voltagem (CaV), resulta na formação do complexo cálcio-calmodulina e ativação da nNOS (Zamble; Carpentier; Kandoussi; Sahpaz *et al.*, 2006). Nas células endoteliais, a acetilcolina (ACh) liberada pelo nervo colinérgico, ativa o receptor muscarínico M_3 acoplado a proteína Gq/11, iniciando a via da fosfolipase C, que resulta no aumento de Ca^{2+} citosólico. O Ca^{2+} , por sua vez, se liga a calmodulina, formando o complexo cálcio-calmodulina que ativa a eNOS (Senbel; Hashad; Sharabi; Daabees, 2012; Viaro, 2000). A ativação da eNOS também pode ser mediada via fosforilação direta dos resíduos Ser^{1177} pela proteína cinase B (PKB), que é ativada em resposta ao estresse de cisalhamento nas células endoteliais, contribuindo para a produção contínua de NO (Hurt; Musicki; Palese; Crone *et al.*, 2002; Ming; Viswambharan; Barandier; Ruffieux *et al.*, 2002).

O NO é sintetizado a partir da oxidação e conversão catalítica de L-arginina em citrulina na presença de oxigênio molecular e diferentes cofatores, como BH_4 , nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), flavina mononucleotídeo (FMN) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD) (Wu; Ding; Ramprasath; Zou, 2021).

Uma vez que ele é produzido, difunde-se pelas CMLs do corpo cavernoso, ativando a ciclase de guanilil solúvel, aumentando o monofosfato cíclico de guanosina (cGMP). Este mediador, então, ativa inúmeras cascatas de sinalização resultando em: abertura dos canais de potássio e hiperpolarização; sequestro de cálcio intracelular pelo retículo sarcoplasmático; e inibição dos canais de cálcio, diminuindo assim os níveis citosólicos de cálcio, promovendo o relaxamento das CMLs, dilatação dos sinusoides e influxo sanguíneo (Shindel; Lue, 2000). O aumento do fluxo sanguíneo inicial nas artérias helicoidais aumenta o estresse de cisalhamento, estimulando mecanicamente a ativação da eNOS e, consequentemente a produção de NO pelas células endoteliais. Essas alterações resultam no aumento da pressão intracavernosa, possibilitando a manutenção da ereção (Castela; Costa, 2016; Dean; Lue, 2005; Zaid; Zhang; Lue, 2017).

Nesse contexto, mecanismos dependentes e independentes de NO regulam o tônus vascular peniano, garantindo um equilíbrio apropriado de vasoconstrição e vasodilatação e, anormalidades em qualquer desses fatores podem levar à DE (Blick; Ritchie; Sullivan, 2016; Zhuang; Zhuang; Jiang; Zhang *et al.*, 2024). O

envelhecimento, como um dos principais fatores que levam ao declínio dessas funções, tem um impacto significativo na função erétil que não pode ser ignorado (Pellegrino; Sjoberg; Tin; Benfante *et al.*, 2023; Zhuang; Zhuang; Jiang; Zhang *et al.*, 2024).

2.3.2 Alterações na hemodinâmica peniana no envelhecimento

Com o envelhecimento, várias modificações na composição e organização dos componentes eréteis foram relatadas demonstrando alterar a hemodinâmica peniana. Nessas condições, o tecido cavernoso apresenta variações no conteúdo e nas funções desempenhadas por suas células, há também alterações na arquitetura vascular e endotelial, aumento da senescência celular e degeneração das fibras elásticas. Essas modificações afetam a hemodinâmica peniana, prejudicando a ereção (Castela; Soares; Rocha; Vendeira *et al.*, 2011).

O corpo cavernoso, um importante componente vascular peniano, sofre modificações estruturais e funcionais significativas com o envelhecimento. Uma característica notável é a apoptose das CML, que, quando excessiva, pode levar à fibrose, afetando a funcionalidade do corpo cavernoso (Zhuang; Zhuang; Jiang; Zhang *et al.*, 2024). Foi relatado que um bom desempenho no processo de ereção exige uma porcentagem adequada de CML que estruturam um corpo cavernoso viável (Echeverri Tirado; Ferrer; Herrera, 2016). Além disso, mudanças funcionais como uma diminuição na capacidade de relaxamento dessas células também pode ser observado, comprometendo o tônus muscular peniano (Zhuang; Zhuang; Jiang; Zhang *et al.*, 2024).

Foi relatado que em animais com DE associada ao envelhecimento, houve um prejuízo na responsividade contrátil do corpo cavernoso, revelando uma hipercontratilidade em resposta à fenilefrina (agonista α_1 adrenérgico), e à estimulação por campo elétrico. Esse efeito pode estar relacionado à regulação positiva das vias contráteis do corpo cavernoso, neuropatia autonômica (causada pela exacerbação da atividade simpática) e/ou aumento da sensibilidade do receptor noradrenérgico (Andersson, 2011; De Almeida Feitosa; De Almeida; Dantas; De Azevedo *et al.*, 2024).

O colágeno e as fibras elásticas também são componentes afetados pelo processo de envelhecimento. Vários estudos revelaram que a concentração de fibras elásticas diminui gradualmente com a idade, acompanhada por um aumento nas fibras colágenas. De fato, a estrutura colunar dentro do corpo cavernoso se torna irregular, com um grande número de fibras de colágeno espessas, enquanto o número de fibras musculares lisas e elásticas diminui, resultando em fibrose (Meldrum; Morris; Gambone; Esposito, 2020; Segal; Hannan; Liu; Kutlu *et al.*, 2012; Zhuang; Zhuang; Jiang; Zhang *et al.*, 2024). Foi demonstrado que essas mudanças histológicas são causadas pelo aumento do estresse oxidativo associado a uma maior produção de fatores pró-fibróticos como o inibidor-1 do ativador do plasminogênio (PAI-1) e o fator de crescimento transformador β -1 (TGF β 1) que estimulam a apoptose de CML e a deposição de colágeno (Ferrini; Kovanecz; Sanchez; Vernet *et al.*, 2007).

Adicionalmente, a mudança na proporção de colágeno e elastina desencadeia uma remodelação anormal da túnica albugínea com uma possível diminuição na resistência à tração peniana induzida pela substituição de fibras elásticas por deposição desorganizada de colágeno, levando a uma perda na elasticidade e a um endurecimento anormal, afetando significativamente a arquitetura dos feixes e, finalmente, prejudicando sua função de oclusão venosa das veias subtunicais durante a ereção (Zhuang; Zhuang; Jiang; Zhang *et al.*, 2024).

De fato, a disfunção sexual pode ser desencadeada a partir de alterações morfológicas mínimas dos componentes eréteis ao longo dos anos, podendo levar a danos acumulativos gerados pelo processo de envelhecimento. Estudos afirmam que essas alterações estão intimamente relacionadas ao estresse oxidativo (Aversa; Bruzziches; Francomano; Natali *et al.*, 2010; De Almeida Feitosa; De Almeida; Dantas; De Azevedo *et al.*, 2024; Echeverri Tirado; Ferrer; Herrera, 2016).

O estresse oxidativo ocorre quando a produção de ROS excede a capacidade do sistema antioxidante de eliminá-las (Chaudhary; Chaudhary; Sharma; Singh *et al.*, 2023). Consequentemente, essas espécies podem combinar direta ou indiretamente com proteínas, ácido nucleicos e fosfolipídios não apenas destruindo suas estruturas químicas e perturbando a função celular, mas também danificando à nível tecidual, resultando em distúrbios metabólicos dos órgãos vitais e, eventualmente, em envelhecimento do organismo (Kong; Li; Li; Liao *et al.*, 2018; Yan; Zhao; Li; Zheng *et al.*, 2022).

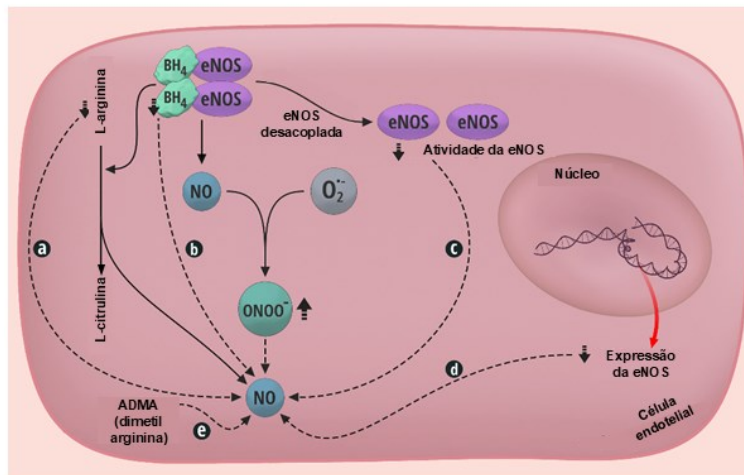
Dentro da célula, o estresse oxidativo está sob um controle rígido; níveis muito baixos de ROS são normalmente produzidos como subprodutos de processos metabólicos celulares e várias dessas espécies participam da transdução de sinais fisiológicos. Entretanto, a produção excessiva de ROS e o acúmulo de dano oxidativo ao longo do tempo está associada a diversos mecanismos fisiopatológicos (Meldrum; Morris; Gambone; Esposito, 2020).

Está bem estabelecido na literatura que o estresse oxidativo interrompe a função endotelial e a sinalização do NO, cruciais para a função erétil (Kaltsas; Zikopoulos; Dimitriadis; Sheshi *et al.*, 2024). Dados do nosso laboratório, obtidos em modelo animal de envelhecimento induzido por D-galactose, sugerem uma associação entre DE e disfunção endotelial, possivelmente mediada pelo aumento das ROS (De Almeida Rezende; Oliveira De Almeida; Gonçalves; De Azevedo *et al.*, 2021).

A perda da integridade do endotélio e a subsequente disfunção endotelial, interrompe os mecanismos homeostáticos responsáveis pela regulação da contração do músculo liso e do tônus vascular peniano, condições que equivalem a mecanismos-chave no início e progressão da DE (Blick; Ritchie; Sullivan, 2016). Postula-se que a disfunção endotelial implica em uma diminuição da biodisponibilidade NO, que é incapaz de compensar a complacência cavernosa prejudicada resultante de um aumento na deposição de colágeno e uma perda de CMLs (Helmy; Senbel, 2012).

A redução da biodisponibilidade de NO pode ocorrer das seguintes maneiras: (1) redução nos níveis de substrato (L-arginina) ou cofator (tetrahydrobiopterina – BH₄) de eNOS; (2) diminuição na expressão de eNOS; (3) mudança na atividade da eNOS, como o desacoplamento da eNOS; (4) acúmulo nos níveis de dimetilarginina assimétrica (ADMA), inibidor endógeno da eNOS; (5) inativação de NO, uma vez que o ânion superóxido (O₂⁻) reage com o NO produzindo peroxinitrito (ONOO⁻) (Shaito; Aramouni; Assaf; Parenti *et al.*, 2022) (Figura 7).

Figura 7 - Principais mecanismos que levam à diminuição da biodisponibilidade de NO.



Fonte: Shaito; Aramouni; Assaf; Parenti *et al.* (2022)

Legenda: Mecanismos de redução da biodisponibilidade de NO. Os traços pontilhados indicam vias que levam à diminuição dos níveis de NO. a) redução do substrato da eNOS, L-arginina; b) redução do cofator BH₄; c) alteração na atividade da eNOS levando ao seu estado de desacoplamento; d) diminuição na expressão de eNOS; e) acúmulo de ADMA, inibidor endógeno de eNOS. NO: óxido nítrico; O₂⁻: ânion superóxido; ONOO⁻: peroxinitrito; eNOS: sintase de óxido nítrico endotelial; BH₄: tetrahydrobiopterina; ADMA: dimetilarginina.

O desacoplamento da eNOS reduz significativamente os níveis de NO biodisponível, uma vez que a enzima desacoplada transfere um elétron do NADPH para o O₂ ao invés de transferir para o NO, resultando no aumento dos níveis de O₂⁻ e na redução da produção de NO (Shaito; Aramouni; Assaf; Parenti *et al.*, 2022; Wang; Zhang, 2024). Embora o O₂⁻ possa ser eliminado pela enzima superóxido dismutase (SOD), ele tem uma maior afinidade pelo NO, se ligando a ele para formar ONOO⁻, reduzindo ainda mais os níveis de NO (Han; Kim, 2023; Shaito; Aramouni; Assaf; Parenti *et al.*, 2022).

O ONOO⁻ é uma espécie de nitrogênio tóxica e altamente reativa, que não pode ser removida enzimaticamente, podendo causar danos oxidativos ao DNA, proteínas e lipídios, promover a liberação de vasoconstritores, aumentar a apoptose e causar lesão e inflamação nos tecidos (De Almeida; De Oliveira; Da Silva Pontes; De Souza

Júnior *et al.*, 2022; Musicki; Liu; Lagoda; Strong *et al.*, 2010). Adicionalmente, esse radical juntamente com o O_2^- pode aumentar a incidência de morte celular necrótica e apoptótica do endotélio e músculo liso vascular, favorecendo a um desnudamento desta camada e uma redução adicional da biodisponibilidade do NO (De Almeida; De Almeida Rezende; Dantas; De Lima Silva *et al.*, 2020).

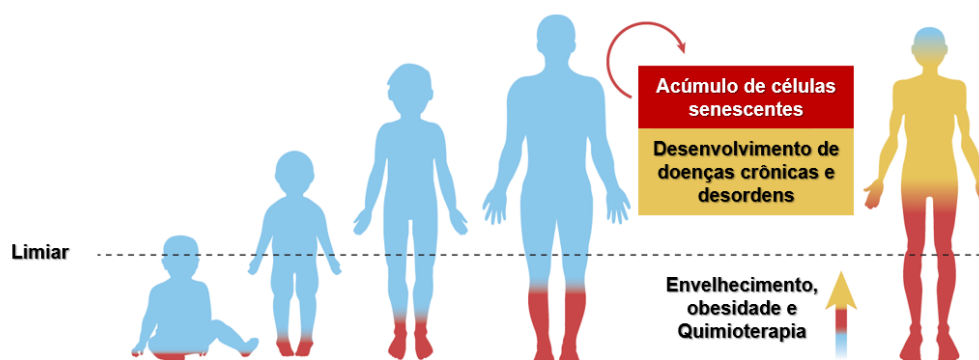
Um outro mecanismo importante para o desenvolvimento da disfunção endotelial além do estresse oxidativo é a senescência endotelial, que desempenha um papel crucial no desenvolvimento da DE associada ao envelhecimento (De Almeida Rezende; Oliveira De Almeida; Gonçalves; De Azevedo *et al.*, 2021; Han; Kim, 2023; Nishimatsu; Suzuki; Saito; Niimi *et al.*, 2015). Em condições fisiológicas, as células senescentes são precisamente controladas pelas células imunes, impedindo o seu acúmulo ao longo do tempo, no entanto, com o avanço da idade, essas células se acumulam, contribuindo para a instalação e progressão da DE (Nishimatsu; Suzuki; Saito; Niimi *et al.*, 2015).

2.4 Senescência celular: um alvo terapêutico determinante no processo de envelhecimento

Senescência e envelhecimento são processos intimamente conectados, mas não sinônimos. O envelhecimento é um processo gradual natural previsível do organismo e ocorre devido a mecanismos pró-envelhecimento, como danos ao DNA, peroxidação, dobramento incorreto de proteínas, resultando em morte celular ou senescência. A senescência é o processo de parada estável e irreversível do crescimento das células (Kudlova; De Sanctis; Hajduch, 2022).

A senescência contribui para o desenvolvimento normal do organismo, é uma resposta protetora que limita a fibrose e atua como uma barreira primária à tumorigênese e progressão maligna. No entanto, o acúmulo anormal de células senescentes contribui para o declínio relacionado à idade, sendo um elemento causador em muitas comorbidades associadas à idade (Figura 8) (Mchugh; Durán; Gil, 2025).

Figura 8 - Teoria do acúmulo de células senescentes.



Legenda: Uma vez que a carga de células senescentes excede um limiar, a disseminação parácrina e endócrina auto-amplificadora da senescência através do SASP supera a depuração das células senescentes pelo sistema imunológico. Além disso, o aumento da abundância de fatores SASP pode impedir a função do sistema imunológico, amplificando ainda mais o acúmulo de células senescentes. O acúmulo de células senescentes também pode levar a múltiplos distúrbios e doenças relacionados à idade. SASP: fenótipo secretor associado à senescência.

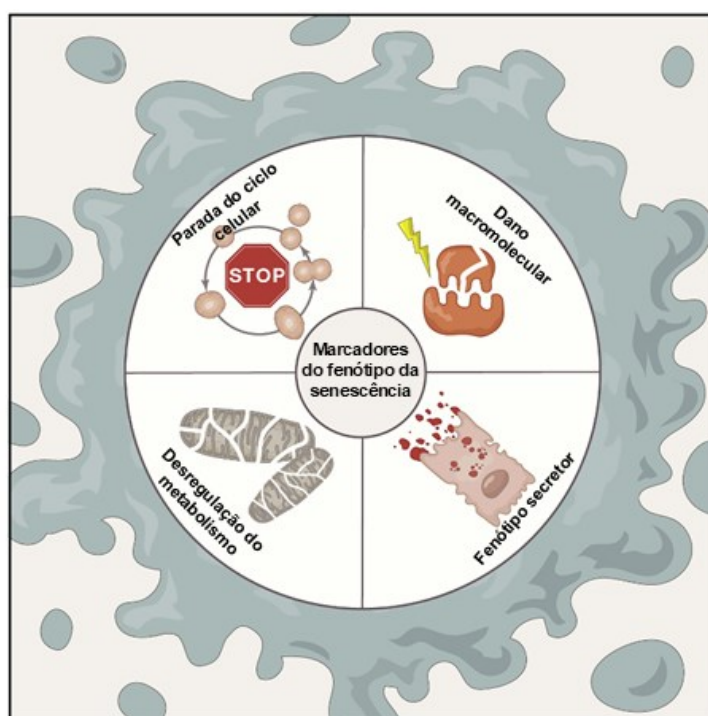
Fonte: Adaptado de Chaib; Tchkonja e Kirkland (2022)

Hayflick e Moorhead introduziram pela primeira vez o termo senescência para descrever o fenômeno da parada irreversível do crescimento de linhagens de células diploides humanas após extensa passagem serial em cultura (Hayflick; Moorhead, 1961). Desde então, a senescência tornou-se uma área de estudo amplamente explorada na pesquisa científica e tem sido um desafio compreender o papel da senescência como um mecanismo regulador central do processo de envelhecimento e das doenças associadas (Donato; Morgan; Walker; Lesniewski, 2015; Ogradnik, 2021).

De fato, o fenótipo da senescência é caracterizado como uma parada irreversível do ciclo celular associado a mudanças no perfil secretor, danos moleculares e alterações no metabolismo (Figura 9) (Gorgoulis; Adams; Alimonti; Bennett *et al.*, 2019; Ogradnik, 2021). A hipótese do telômero é uma das explicações amplamente aceita para a ocorrência da senescência. Os telômeros, sequências repetitivas de DNA nas extremidades dos cromossomos eucarióticos, encurtam como

uma função linear do aumento da divisão celular e, de acordo com a hipótese, o comprimento curto do telômero desencadeia o início da senescência (Hayashi; Matsui-Hirai; Miyazaki-Akita; Fukatsu *et al.*, 2006). Embora o encurtamento do telômero seja uma das principais causas da senescência celular (conhecida como senescência celular replicativa), outros estímulos estressores, como a ativação de oncogenes, dano ao DNA, irradiação e o estresse oxidativo, também podem causar senescência celular (denominada senescência celular prematura) (Nishimatsu; Suzuki; Saito; Niimi *et al.*, 2015; You; Nepovimova; Valko; Wu; Kuca, 2023).

Figura 9 - Características do fenótipo da senescência.

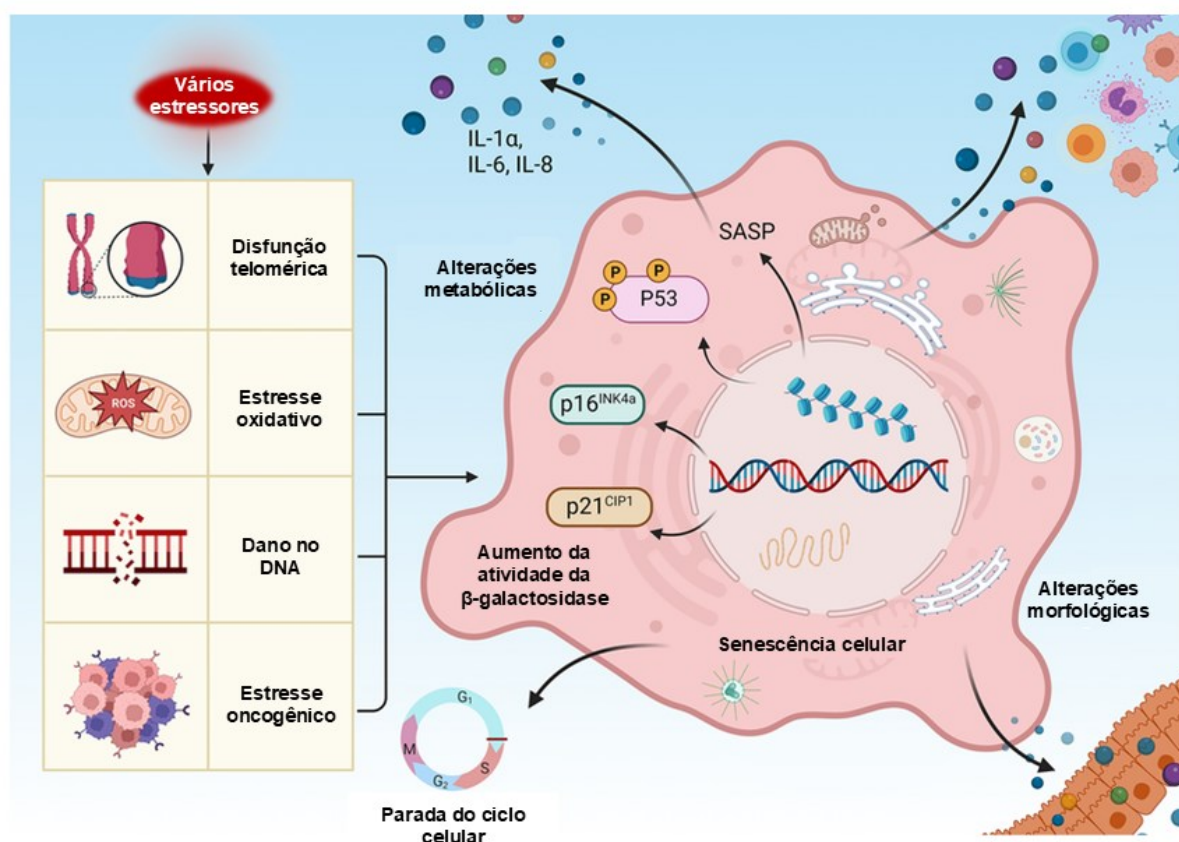


Legenda: Marcadores do fenótipo da senescência. As características do fenótipo da senescência como a parada do ciclo celular, alterações no metabolismo e no perfil secretor e dano macromolecular atuam de forma interdependentes, apesar de serem geralmente descritas separadamente.

Fonte: Gorgoulis; Adams; Alimonti; Bennett *et al.* (2019)

O estágio inicial da senescência é iniciado em resposta a um ou mais desses estímulos. Inicialmente, as células senescentes começam a sofrer mudanças morfológicas características, esse processo é acompanhado pela remodelação da cromatina nuclear, perda da lâmina B1, indução do metabolismo oxidativo nas mitocôndrias, aumento da expressão de proteínas reguladoras (p53, p21 e p16), além de secretar uma mistura complexa de fatores principalmente pró-inflamatórios denominados fenótipo secretor associado à senescência (SASP) (Herranz; Gil, 2018; Kudlova; De Sanctis; Hajduch, 2022). A parada da atividade proliferativa em células senescentes é frequentemente associada à uma regulação positiva da β -galactosidase lisossomal, SA- β -galactosidase, que tem sido considerada um excelente biomarcador de células senescentes *in vitro* (Figura 10) (De Mera-Rodríguez; Álvarez-Hernán; Gañán; Martín-Partido *et al.*, 2019). Enquanto a parada do ciclo celular é regulada pelas vias supressoras de tumores p53 e p16/pRb (proteína do retinoblastoma), o SASP é controlado pela modulação e ativação de fatores de transcrição, como Fator nuclear de transcrição pró-inflamatória- κ B (NF- κ B), alvo mecanicista da rapamicina (mTOR) e vias de sinalização da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) p38 (Gorgoulis; Adams; Alimonti; Bennett *et al.*, 2019).

Figura 10 - Mecanismos da senescência celular.



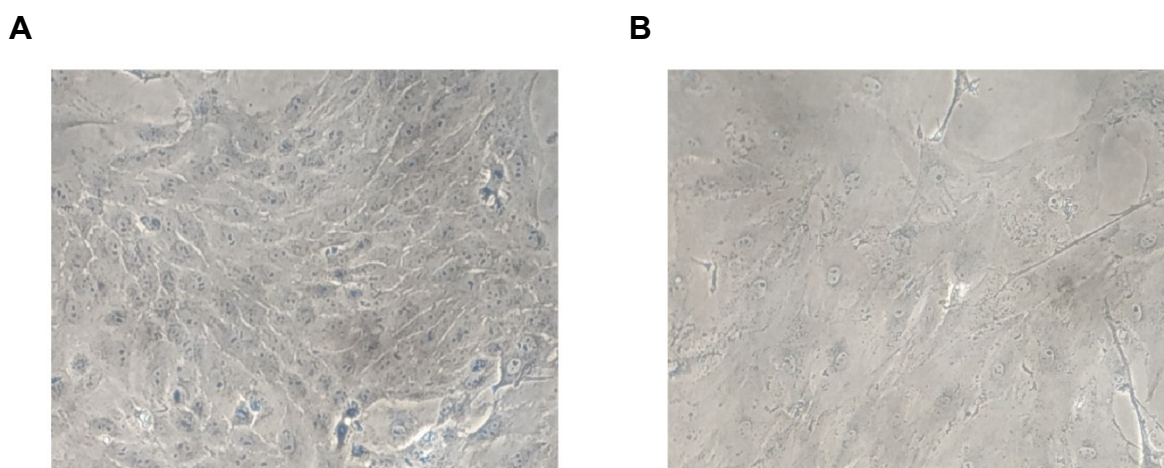
Fonte: Adaptado de You; Nepovimova; Valko; Wu e Kuca (2023)

Legenda: Senescência celular: causas e mecanismos subjacentes. A senescência celular é caracterizada como um estado de parada irreversível do ciclo celular e envolve alterações como o aumento de SA-β-galactosidase, p53, p16, p21 e SASP, incluindo IL-1, IL-6 e IL-8, todos considerados biomarcadores da senescência. Estímulos como a disfunção telomérica, estresse oxidativo, dano ao DNA e estresse oncogênico são alguns mecanismos envolvidos na indução da senescência. SASP: fenótipo secretor associado a senescência; IL: interleucina; SA-β-galactosidase: senescência associada à β-galactosidase.

Outra peculiaridade das células senescentes é a morfologia anormalmente aumentada e plana com aumento desproporcional da relação citoplasma-núcleo. Embora o citoplasma volumoso tenha sido originalmente descrito como uma característica que acompanha o estabelecimento da senescência celular, um estudo recente sugere que o aumento do tamanho da célula pode desempenhar um papel

causal na condução da parada do crescimento associada à senescência (Figura 11) (Di Micco; Krizhanovsky; Baker; D'adda Di Fagagna, 2021).

Figura 11 - Comparação morfológica de células endoteliais jovens e senescentes.



Fonte: (Wang; Konja; Singh; Zhang; Wang, 2024)

Legenda: Morfologia de células endoteliais jovens (A) e senescentes (B) isoladas da aorta suína (ampliação 4x). As células jovens apresentam uma morfologia típica de “paralelepípedo”, enquanto as células endoteliais senescentes exibem uma morfologia ampliada, multinucleada e achatada.

As alterações morfológicas são controladas por mudanças moleculares, e estão relacionadas com a produção do conteúdo intracelular que foi gerado para a divisão celular. As células senescentes também são caracterizadas por grandes núcleos, multinúcleos e reorganização da cromatina, incluindo condensação cromossômica, redistribuição e formação de focos heterocromáticos, possivelmente secundários à perda da lâmina B1 da superfície interna do envelope nuclear. Algumas organelas apresentam alterações morfológicas anormais, como mitocôndrias inchadas, aumento do número de lisossomos e expansão do retículo endoplasmático. Vacuolização, granularidade e detritos intracelulares no citoplasma de células senescentes também foram relatados (Huang; Hickson; Eirin; Kirkland; Lerman, 2022).

2.5 Mecanismos subjacentes à senescência endotelial e as evidências de sua importância clínica

Várias linhas de evidência fornecem motivações para investigar a senescência de células endoteliais. Tecidos com uma alta proporção de células endoteliais foram identificados como tendo a maior carga de células senescentes, e as células endoteliais são conhecidas por serem um dos primeiros tipos de células a se tornarem senescentes com o avanço da idade (Bloom; Islam; Lesniewski; Donato, 2023).

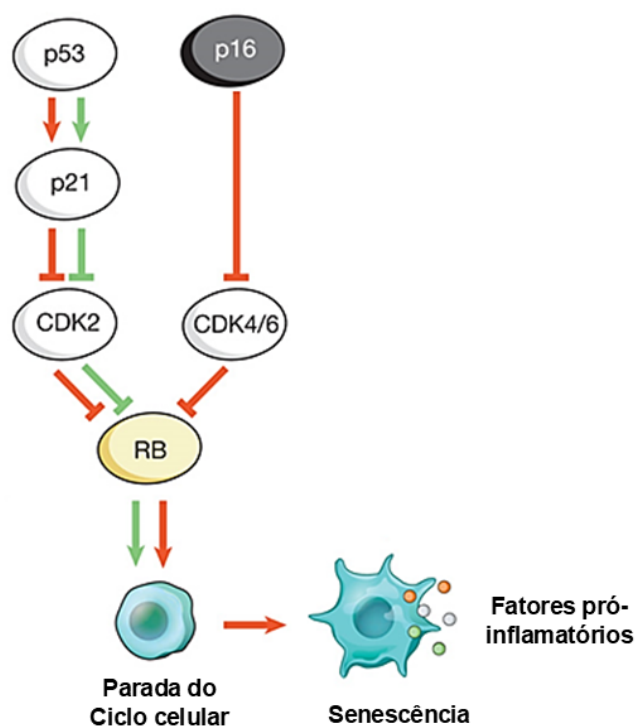
O endotélio é uma monocamada altamente dinâmica que atua como uma barreira seletivamente permeável, mediando o tráfego de macromoléculas. Ele é vital para manter o sangue em estado fluido, além de controlar o tônus através da produção de compostos vasoativos, como NO, prostaciclina e endotelina-1 (ET-1) (Deng; Zhang; Tang; Zhang, 2024; Donato; Morgan; Walker; Lesniewski, 2015). Devido à sua localização anatômica, as células endoteliais são continuamente expostas ao fluxo de sangue contendo muitas substâncias que podem contribuir para a senescência, incluindo oxigênio, glicose, lipídios, metabólitos de aminoácidos, células imunes, ROS e citocinas inflamatórias. As forças hemodinâmicas do fluxo sanguíneo, como tensão de cisalhamento e pressão alta ou pulsátil, também podem induzir a senescência (Bloom; Islam; Lesniewski; Donato, 2023). A senescência das células endoteliais revela uma produção atenuada de NO, aumento da liberação de ET-1, inflamação elevada e apoptose celular, contribuindo para o desenvolvimento e progressão de DCVs (Jia; Aroor; Jia; Sowers, 2019).

Embora a senescência endotelial tenha certas características que podem ser atribuídas exclusivamente a ela, ela compartilha vários mecanismos principais com outros tipos de senescência. A senescência endotelial é desencadeada por uma variedade de estressores de senescência que incluem estresse replicativo e oxidativo, ativação oncogênica, atrito do telômero, dano ao DNA e disfunção mitocondrial. Independentemente do tipo de estressor, as vias senescentes convergem para a parada do ciclo celular, que é mediada principalmente por duas principais vias supressoras de tumores envolvendo p53/p21 e/ou p16/pRB (Han; Kim, 2023).

A via p53 depende da ativação do fator de transcrição p53 por uma série de cascatas de sinalização iniciada pelos estressores. O p53 ativado promove a ativação de p21, que induz uma parada do ciclo celular pela inibição da cinase dependente de ciclina (CDK) 2. O p16 também inibe a progressão do ciclo celular, mas o faz ao inibir

os complexos CDK4/6. Tanto o p21 quanto o p16 inibem as CDKs impedindo a fosforilação e inativação da pRb. A pRb ativada desempenha um papel crucial na senescência, principalmente pela sua capacidade de interromper a transcrição, mediada pelos fatores de transcrição E2F, de proteínas do ciclo celular e promotoras de proliferação, necessários para o início da fase S e progressão do ciclo celular (Van Deursen, 2014) (Figura 12).

Figura 12 - Vias supressoras de tumores p53 e p16 responsáveis pela parada do ciclo celular.

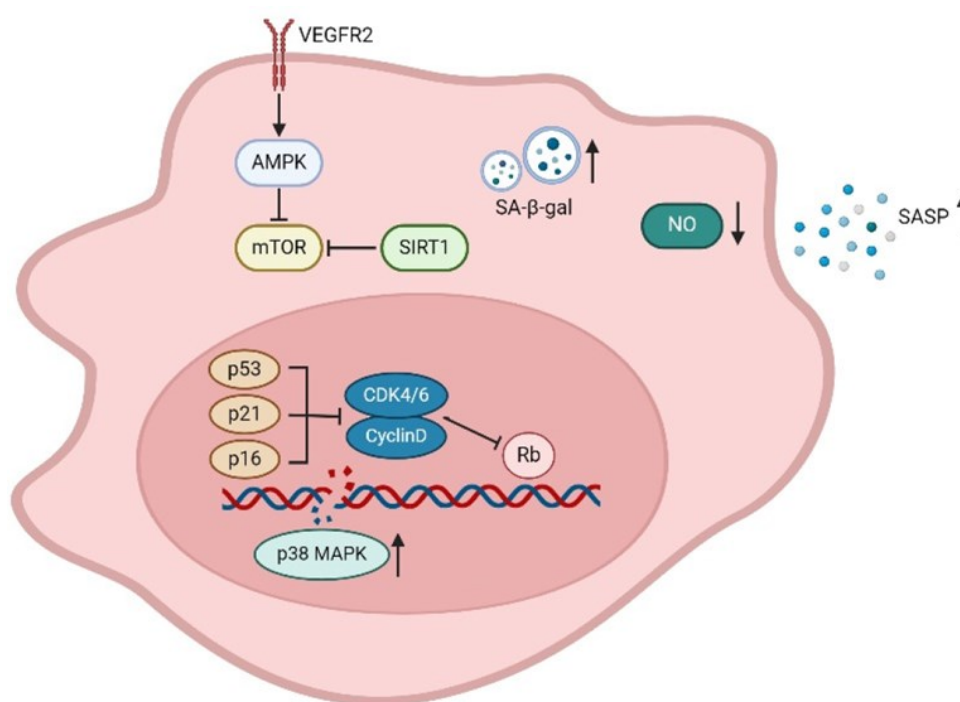


Legenda: A parada do ciclo celular é mediada pela ativação das redes supressoras de tumores p53 e p16. Uma vez ativada, essa rede inibe as CDKs, responsáveis pela fosforilação e inibição da Rb, resultando na supressão da transcrição de proteínas do crescimento e do ciclo celular. CDK: cinase dependente de ciclina; RB: proteína de retinoblastoma.

Fonte: Adaptada de Van Deursen (2014)

As células senescentes exibem uma regulação positiva das vias p53/p21 e p16/Rb, marcadores associados à ativação da resposta ao dano no DNA. Células endoteliais senescentes desenvolvem o SASP e um aumento da atividade de SA - β -galactosidase. Além disso, a via de sinalização fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), juntamente com proteína cinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK), mTOR e sirtuína (SIRT) 1, também está envolvida na senescência de células endoteliais (Figura 13) (Mansfield; Ramponi; Gupta; Stevenson *et al.*, 2024; Wang; Konja; Singh; Zhang; Wang, 2024).

Figura 13 - Mecanismos subjacentes à senescência endotelial.



Legenda: Características da senescência endotelial. Alterações induzidas por estímulos prejudiciais levam à ativação de vias supressoras tumorais, como p53-p21 e pRb-p16, resultando em parada proliferativa e senescência. VEGFR: receptor do fator de crescimento endotelial; AMPK: proteína cinase ativada por monofosfato de adenosina; mTOR: alvo mecanicista da rapamicina; SIRT: sirtuína; SA – β – gal: senescência associada a β – galactosidase; NO: óxido nítrico; SASP: fenótipo secretor associado a senescência; CDK: cinase dependente de ciclina; Rb: retinoblastoma; MAPK: proteína cinase ativada por mitógeno.

Fonte: Adaptado de Wang; Konja; Singh; Zhang e Wang (2024)

Nas células endoteliais, a senescência produz um fenótipo distinto - as células endoteliais senescentes são planas, ampliadas e refratárias às alterações fenotípicas. Mecanicamente, as células endoteliais senescentes aumentam a adesão às membranas basais, impedindo o alinhamento correto ao fluxo sanguíneo. As consequências funcionais do aumento da adesão são que as células resistem à desnudação e podem persistir por longos períodos de tempo. Além disso, a incapacidade dessas células de se alinharem ao fluxo sanguíneo pode contribuir para as reduções nos NO e aumento da sinalização inflamatória nas células endoteliais (Bloom; Islam; Lesniewski; Donato, 2023).

As células senescentes adquirem o SASP, que inclui quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, incluindo interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL-8, ligante de quimiocina CXCL11 (CXCL11) e PAI-1, enzimas que degradam a matriz extracelular como metaloproteinases de matriz (MMP) e fatores de crescimento (Bloom; Islam; Lesniewski; Donato, 2023; Guduric-Fuchs; Pedrini; Bertelli; McDonnell *et al.*, 2024). Uma das principais funções do SASP é recrutar células imunes para captar e eliminar células senescentes. Paradoxalmente, quando as células senescentes escapam da eliminação pelo sistema imunológico e permanecem em um tecido, seu SASP causa inflamação crônica, promove a fibrose, interrompe a homeostase do tecido e contribui para os efeitos prejudiciais da senescência (Mchugh; Durán; Gil, 2025).

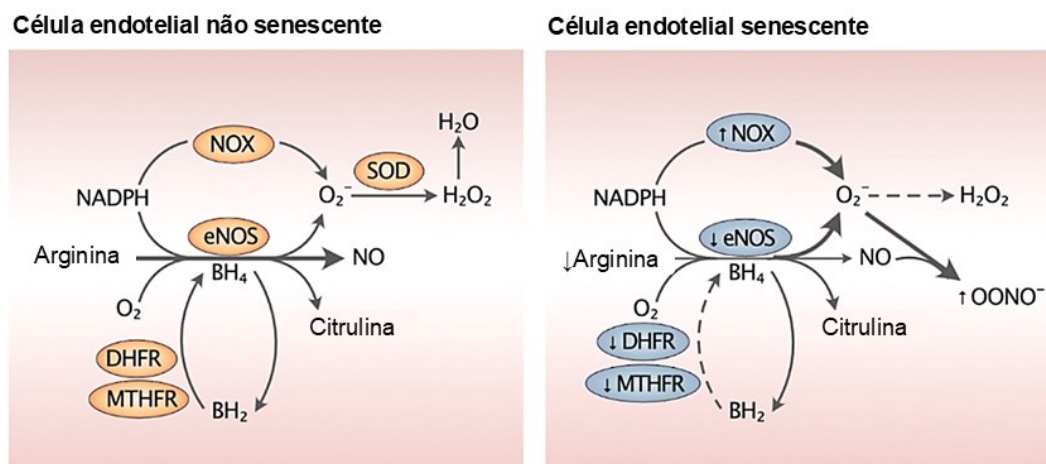
Embora o SASP seja heterogêneo e possa variar de acordo com o tipo de célula e estímulos, uma característica única do SASP endotelial é sua caracterização por reguladores da disfunção arterial, incluindo níveis aumentados de ROS e NO reduzido. A homeostase redox prejudicada, caracterizada pela produção reduzida de NO e aumento do estresse oxidativo, é amplamente reconhecida como uma característica definidora essencial da senescência endotelial (Han; Kim, 2023).

O fator nuclear de transcrição pró-inflamatória- κ B (NF- κ B) está associado à função endotelial prejudicada e parece estar envolvido na indução do SASP da célula endotelial. É amplamente reconhecida a associação entre NF- κ B e p38 MAPK, na qual a p38 MAPK estimula o NF- κ B, promovendo a indução de SASP. A p38 MAPK desempenha um papel importante na senescência celular em resposta a danos ao DNA, podendo contribuir também para a parada do ciclo celular por meio da ativação das vias mediadas por p53 e pRb (Bloom; Islam; Lesniewski; Donato, 2023; Salminen; Kauppinen; Kaarniranta, 2012). O mTOR também foi relatado como um regulador do SASP, uma vez que a sua inibição pela rapamicina reduz a expressão de IL-1 α ,

levando à redução da atividade transcricional de NF- κ B (Salazar; Durán; Díaz; Chacín *et al.*, 2023).

A senescência endotelial revela ainda alterações na função celular que podem induzir disfunção endotelial. Essas alterações incluem a redução da produção de prostaciclina (PGI₂), atividade reduzida da eNOS e produção diminuída de NO (Abdelgawad; Agostinucci; Zordoky, 2022; Wang; Konja; Singh; Zhang; Wang, 2024). A menor biodisponibilidade de NO pode ser atribuída ao desacoplamento da eNOS, que ocorre por causa da quantidade limitada de seus cofatores, como L-arginina e BH₄. Na senescência endotelial, a eNOS desacoplada e a NADPH oxidase podem produzir O₂⁻, que, por sua vez, se liga ao NO para formar ONOO⁻ oxidando o BH₄ em 7,8-diidrobiopterina (BH₂); o que danifica os aglomerados de zinco-tiolato da eNOS, impulsionando ainda mais o desacoplamento da eNOS, aumentando, em última análise, as ROSs e reduzindo o NO. Foi observado ainda que a di-hidrofolato redutase (DHFR) e a metilenotetra-hidrofolato redutase (MTHFR), duas enzimas responsáveis pela regeneração de BH₄ a partir de BH₂, são prejudicadas na senescência, amplificando ainda mais a deficiência de NO (figura 14) (Han; Kim, 2023).

Figura 14 - Desacoplamento da eNOS na senescência endotelial.



Legenda: Funcionamento da eNOS na célula endotelial senescente e não senescente. O desacoplamento de eNOS e NOX produz $O_2^{\cdot -}$ que possui uma maior afinidade pelo NO do que pelo seu eliminador alternativo, a SOD, levando a produção de $OONO^-$. Além de se associar ao NO para sua própria formação, $OONO^-$ oxida BH_4 em BH_2 , reduzindo o cofator eNOS. Esses mecanismos diminuem colaborativamente a disponibilidade de NO durante a senescência endotelial. As enzimas DHFR e MTHFR regeneram BH_4 reduzindo BH_2 . NOX: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase; eNOS: sintase de óxido nítrico endotelial; NO: óxido nítrico; SOD: superóxido dismutase; $OONO^-$: peroxinitrito; H_2O_2 : peróxido de hidrogênio; H_2O : água; BH_4 : tetra-hidrobiopterina; BH_2 : 7,8-di-hidrobiopterina; MTHFR: metilenotetra-hidrofolato redutase; DHFR: di-hidrofolato redutase.

Fonte: Han e Kim (2023)

A senescência endotelial pode ser atribuída ainda a uma diminuição da atividade das sirtuínas. Evidências crescentes têm mostrado que as sirtuínas são fatores essenciais no retardo da senescência celular e na extensão da vida útil do organismo. As sirtuínas são uma classe de proteínas que possuem atividade desacetilase dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado (NAD^+) (Kida; Goligorsky, 2016). As células endoteliais expressam todos os tipos de sirtuínas. Entre as sete sirtuínas (SIRT1-7) conhecidas, a SIRT1, localizada no núcleo, é a sirtuína mais amplamente analisada nas células endoteliais e é conhecida por ser um importante regulador do envelhecimento endotelial, prevenindo danos ao DNA, parada

do ciclo celular e estresse oxidativo. A SIRT1 exerce seus efeitos regulando a eNOS, o p53, a promoção do reparo de danos ao DNA e a prevenção do desgaste do telômero (Lee; Woo; Moon; Lee *et al.*, 2020; Lee; Lee; Lee; Min, 2019). A SIRT1 contribui para a neutralização do estresse oxidativo por meio da modulação de enzimas antioxidantes, aumentando os níveis de SOD2 e catalase (CAT) (Grabowska; Sikora; Bielak-Zmijewska, 2017). A SIRT1 ainda tem um papel protetor do endotélio mediando o nível do PAI-1 (Han; Kim, 2023).

Enquanto a inibição da SIRT-1 induz a senescência prematura e reduz a eNOS, sua superexpressão previne a senescência endotelial induzida por estresse. Por outro lado, a superexpressão de SIRT-1 suprime PAI-1 e aumenta a expressão de eNOS, sugerindo que a supressão de PAI-1 induzida por SIRT-1 contribui para a proteção contra disfunção endotelial e senescência. Os níveis elevados de PAI-1 durante o estresse aumentam a produção de ROS e aumentam os níveis dos mediadores p53, p16, p21 (Shaikh; Balaya; Dagamajalu; Bhandary *et al.*, 2024; Vaughan; Rai; Khan; Eren; Ghosh, 2017).

Outro achado importante sobre as sirtuínas revela a atuação da SIRT5 e SIRT6, localizadas na mitocôndria e núcleo, respectivamente. A SIRT5 desempenha papéis importantes em resposta ao estresse oxidativo, através do aumento da atividade da SOD1 (Singh; Chhabra; Ndiaye; Garcia-Peterson *et al.*, 2018). Já a SIRT6 desempenha um papel considerável no reparo do DNA em resposta ao estresse oxidativo e na manutenção da estabilidade genômica ao integrar sinais de danos ao DNA com ativação de enzimas de reparo; ela também está envolvida na manutenção do telômero (Morris, 2019). O SIRT6 também demonstrou coativar o fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) para proteger as células-tronco mesenquimais humanas do estresse oxidativo (Singh; Chhabra; Ndiaye; Garcia-Peterson *et al.*, 2018).

A sinalização do mTOR é uma outra via crucial que afeta a longevidade e o envelhecimento; a sua inibição tem sido associada ao retardo da senescência celular (Khor; Wong, 2020). O mTOR é uma serina/treonina quinase que regula diversos processos celulares e fisiológicos através de dois complexos proteicos distintos conhecidos como complexo mTOR 1 (mTORC1) e complexo mTOR 2 (mTORC2). Enquanto o mTORC1 regula principalmente a tradução de proteínas, a biossíntese de nucleotídeos e lipídios, bem como limita o catabolismo mediado pela autofagia, o

mTORC2 está envolvido na sobrevivência e proliferação celular (Islam; Hall; Dutson; Bloom *et al.*, 2024).

Evidências atuais revelam que a atividade elevada de mTOR e a consequente perda da autofagia é suficiente para conduzir a disfunção celular, tecidual e do organismo (Cassidy; Narita, 2022). Portanto, a hiperatividade do mTOR pode levar ao acúmulo de proteínas anormais nas células senescentes, levando ao desenvolvimento de doenças degenerativas caracterizadas pela formação de agregados proteicos (Tabibzadeh, 2021). Além disso, o mTORC1 é um mediador crítico da senescência celular dependente de p53/p21 e/ou p16/pRB. A ativação do mTORC1 leva o acúmulo de p53 através de um aumento da tradução p53 (Khor; Wong, 2020).

Diversos modelos experimentais de senescência têm sido criados e caracterizados e fornecem condições de pesquisa confiáveis para o estudo da senescência e doenças associadas à idade. Pesquisadores propuseram o modelo de senescência induzida por D-galactose, que é reconhecido como um modelo válido para estudar os mecanismos envolvidos no processo de senescência (García-Trejo; Gómez-Sierra; Eugenio-Pérez; Medina-Campos; Pedraza-Chaverri, 2024; Lee; Hoang; Jung; Jung *et al.*, 2020).

2.6 Modelo de senescência prematura induzida por D-galactose

A senescência celular é classificada em senescência replicativa e senescência prematura. A senescência celular prematura reflete o fenômeno da senescência sob estresse, que simula parcialmente o processo real de senescência celular em circunstâncias fisiológicas (Niu; Li; Liang; Wu; Chen, 2023). Por outro lado, a senescência replicativa ocorre quando células diploides cultivadas passam por rodadas repetidas de mitose, sendo intimamente relacionada ao desgaste do telômero, um processo que leva à instabilidade cromossômica (Van Deursen, 2014).

A D-galactose induz senescência principalmente por aumentar o nível de estresse oxidativo das células tratadas. A D-galactose pode acentuar a formação de ROS causando estresse oxidativo, inflamação, disfunção mitocondrial e apoptose (Lee; Hoang; Jung; Jung *et al.*, 2020).

A D-galactose é um açúcar monossacarídeo redutor presente em pequenas quantidades nos organismos. Entretanto, quando em excesso, é oxidada pela

galactose oxidase, resultando na formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Este, por sua vez, pode reagir com o ferro reduzido para formar íons hidróxido. Além disso, a D-galactose pode ser convertida em aldose, ainda pela ação da galactose oxidase. Outra via de reação envolve sua interação com aminas, formando um composto instável, que pode acarretar na formação de produtos finais de glicação avançada e estresse oxidativo (Cardoso; Magano; Marrana; Andrade, 2015; Guo; Guo; Wang; Shao *et al.*, 2020).

Em células endoteliais, a D-galactose é amplamente utilizada para induzir a senescência. Nessas células, D-galactose diminui as defesas antioxidantes através da redução da expressão do fator de transcrição Nrf2, reduzindo a atividade de SOD, catalase (CAT) e glutathione (GSH), além do aumento do estresse oxidativo e malondialdeído (MDA). Ademais, a atividade da SA- β -galactosidase, bem como os níveis de expressão das proteínas p16, p21, p53 e Keap1, aumentaram significativamente. Essas alterações, em conjunto, podem gerar alterações celulares graves como estresse oxidativo, redução da viabilidade celular, inflamação, disfunção mitocondrial e apoptose, favorecendo o desenvolvimento de doenças associadas à idade (Azman; Zakaria, 2019; Lee; Hoang; Jung; Jung *et al.*, 2020).

2.7 O papel do estresse oxidativo associado à senescência

O estresse oxidativo é bem conhecido por ser um importante contribuinte na disfunção endotelial associada à idade. Embora os níveis fisiológicos de ROS sejam necessários para manter a função celular normal, a sua superprodução induz efeitos deletérios, que perturbam o crescimento, o desenvolvimento e a diferenciação celular, prejudicando múltiplas vias metabólicas, incluindo vias de respiração e sinalização molecular (Chaudhary; Chaudhary; Sharma; Singh *et al.*, 2023).

As ROS e as espécies reativas de nitrogênio (RNS) contêm um elétron desemparelhado, tornando-os altamente reativos e rápidos para reagir com substratos próximos ou biomoléculas para atingir a estabilidade (De Almeida; De Oliveira; Da Silva Pontes; De Souza Júnior *et al.*, 2022). ROS consiste em vários compostos químicos, tais como O_2^- , H_2O_2 , radical hidroxila (OH) e ácido hipocloro (HOCl). Por outro lado, as RNS são compostas por NO e ONOO $^-$. Altos níveis de ONOO $^-$ e a depleção dos níveis de NO estão relacionados à disfunção endotelial, um evento que

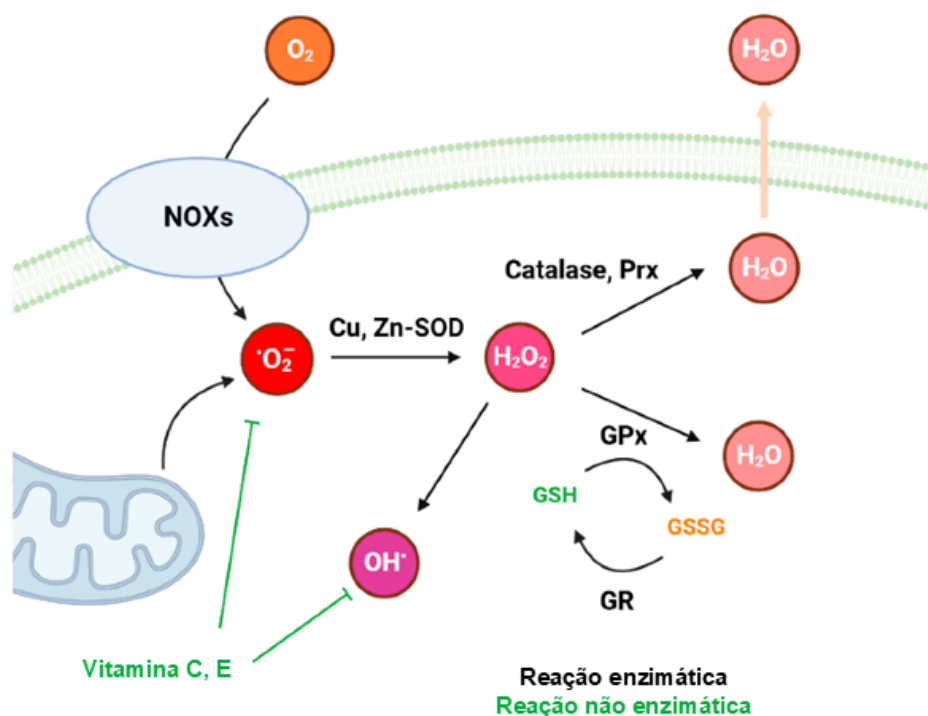
contribui significativamente para o envelhecimento e na gênese de várias DCVs (Jomova; Raptova; Alomar; Alwasel *et al.*, 2023).

O estresse oxidativo relacionado à senescência está associado, pelo menos em grande parte, à atividade NADPH oxidase (Lee; Zeeshan; Kim; Chae, 2017). Foi revelado que essa enzima oxidante induz a parada prematura do ciclo celular em células endoteliais senescentes (Weyemi; Lagente-Chevallier; Boufragech; Prenois *et al.*, 2012). Além desta enzima, há outras fontes de ROS nas células endoteliais como sintase de eNOS desacoplada, transporte de elétrons mitocondrial e xantina oxidase (Montezano; Touyz, 2012).

A NADPH oxidase é uma família de proteínas transmembranas, reconhecida como a principal enzima responsável pela produção de ROS como produto principal, e não como subproduto (Waghela; Vaidya; Agrawal; Santra *et al.*, 2021). Esta enzima produz O_2^- pela montagem de um complexo proteico de múltiplas subunidades, utilizando nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH) e NADPH como substratos (Lassègue; Clempus, 2003). Em células endoteliais e em vasos sanguíneos de idosos, foi demonstrado um aumento na atividade e expressão da enzima NADPH oxidase com consequente aumento na produção de O_2^- , favorecendo ao estresse oxidativo (Donato; Walker; Magerko; Bramwell *et al.*, 2013). O estresse oxidativo induzido pelo acúmulo de ROS e a consequente lesão celular são fatores determinantes para promover a senescência prematura das células endoteliais, a rigidez vascular e o desenvolvimento de DCV associada à idade (Jia; Aroor; Jia; Sowers, 2019).

Em condições fisiológicas, as concentrações de ROS são controladas e preservadas por um sistema homeostático vivo através de complexos enzimáticos e não enzimáticos conhecidos como antioxidantes. No sistema enzimático, a SOD, a CAT, a glutational peroxidase (GPx) e a glutational redutase (GR) estão relacionadas às defesas celulares contra o estresse oxidativo (De Almeida; De Oliveira; Da Silva Pontes; De Souza Júnior *et al.*, 2022). Além disso, antioxidantes não enzimáticos intracelulares, como ácido ascórbico (vitamina C), vitamina D, flavonoides, carotenoides, são particularmente eficazes contra agentes oxidantes (Figura 15) (Iakovou; Kourti, 2022).

Figura 15 - Sistemas de proteção antioxidante.



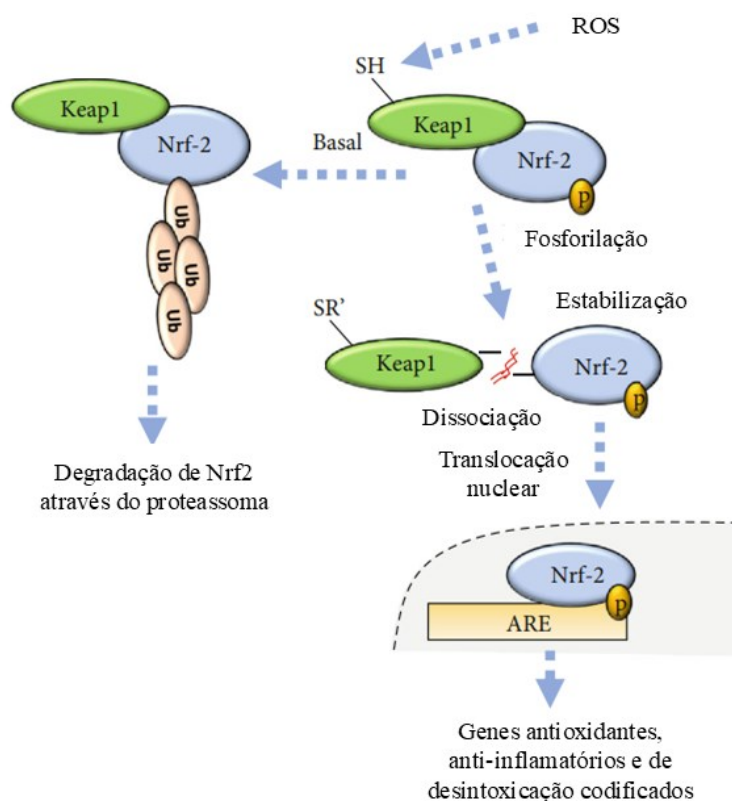
Legenda: Apresentação esquemática de sistemas de regulação de ROS com antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. A NOX produz $O_2^{\bullet -}$, que, por sua vez, é alvo da SOD convertendo-o em H_2O_2 . O H_2O_2 é degradado tanto pela catalase quando pela GPx, resultado na formação a H_2O . As setas pretas indicam reações enzimáticas e as linhas verdes indicam reações não enzimáticas. $O_2^{\bullet -}$: ânion superóxido; H_2O_2 : peróxido de hidrogênio; OH^{\bullet} : radical hidroxila; H_2O : água; NOX: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase; SOD: superóxido dismutase; Prx: peroxirredoxina; GPx: glutathione peroxidase; GR: glutathione redutase; GSH: glutathione; GSSG: glutathione dissulfeto.

Fonte: Hong; Boiti; Vallone e Foulkes (2024)

O fator nuclear 2 relacionado ao fator eritroide 2 (Nrf-2), um fator de transcrição sensível ao potencial redox, é o principal regulador do sistema antioxidante (Baird; Taguchi; Zhang; Takahashi *et al.*, 2023). As ROS desempenham um papel central na regulação da via do Nrf-2, proporcionando um equilíbrio dinâmico entre a ativação do Nrf2 e sua inibição pela proteína 1 associada a ECH do tipo Kelch (Keap 1) (Hong; Boiti; Vallone; Foulkes, 2024).

Em condições fisiológicas, Nrf-2 é regulado negativamente no citoplasma pela proteína Keap 1, levando à ubiquitinação e consequente degradação via proteassoma (Baird; Taguchi; Zhang; Takahashi *et al.*, 2023). Em condições de estresse, o Nrf-2 se dissocia do complexo e se transloca para o núcleo, ligando-se aos elementos de resposta antioxidante (ARE), codificando a transcrição de enzimas antioxidantes, como SOD, CAT, GPx e GR (Figura 16) (De Almeida; De Almeida Rezende; Dantas; De Lima Silva *et al.*, 2020). Esses produtos genéticos combatem coletivamente o estresse oxidativo, neutralizando moléculas prejudiciais e melhorando o sistema de defesa antioxidante celular (Hong; Boiti; Vallone; Foulkes, 2024).

Figura 16 - Via de sinalização do Nrf-2/Keap 1.



Legenda: Via do Nrf-2/Keap 1. O estresse oxidativo pode ativar a via de sinalização, por meio da fosforilação do Nrf-2 favorecendo a sua translocação para o núcleo causando a transcrição de enzimas antioxidantes. No entanto, em situações basais, o complexo Nrf-2/Keap 1 é degradado via proteassoma, mantendo a homeostase.

Fonte: Adaptado de De Almeida; De Almeida Rezende; Dantas; De Lima Silva *et al.* (2020)

Uma vez que os efeitos antioxidantes do Nrf-2 levam à proteção celular através da eliminação excessiva de ROS e da restauração da homeostase redox, é bem apreciado que o Nrf-2 seja um alvo potencial na prevenção da senescência. Uma evidência acumulada mostrou que o nível e a atividade de Nrf-2 diminuem com a idade, o que é identificado em vários tipos celulares. A deleção de Nrf-2 causa senescência prematura e seu silenciamento leva a uma diminuição da função biológica, aumento do estresse oxidativo e senescência acelerada de células progenitoras endoteliais (EPCs) (Yuan; Xu; Luo; Wang; Xiao, 2021). Adicionalmente, altos níveis de ROS induzidos ativam a p38 MAPK, o que leva ao aumento da atividade transcricional da p53 e à regulação positiva da p21 (Muñoz-Espín; Serrano, 2014).

As ROS agem ainda em vários componentes do SASP para promover a senescência, incluindo a ativação das vias mTOR, NF-κB e MAPKs, aumento da produção de IL-1α que aumenta ainda mais a atividade de NF-κB, favorecendo o estado pró-inflamatório (Liguori; Russo; Curcio; Bulli *et al.*, 2018; Zhou; Khan; Hussain; Gerdes *et al.*, 2023). Além disso, a exposição ao estresse oxidativo reduz a expressão endotelial de SIRT1 e SIRT6 (Bloom; Islam; Lesniewski; Donato, 2023). SIRT1 pode desacetilar proteínas-chave envolvidas na resposta ao estresse celular, causando a regulação positiva de enzimas antioxidantes como SOD, CAT e GSH-Px (Yan; Zhao; Li; Zheng *et al.*, 2022).

O papel relevante do estresse oxidativo na senescência é demonstrado pelo fato de que o tratamento com antioxidantes atrasa ou previne a senescência. As estratégias terapêuticas destinadas a atingir as células senescentes ou suas propriedades (globalmente referidas como senoterapias) incluem maneiras de promover a morte das células senescentes (senolíticos), regular o SASP sem a eliminação das células senescentes (senomórficos), ou mesmo modular ou reverter a indução da senescência (Mchugh; Durán; Gil, 2025).

Nesse contexto, com base na análise dos mecanismos subjacentes a senescência, os agentes com funções antioxidantes e/ou imunomoduladoras podem ter valor preventivo ou potencial terapêutico na senescência e em doenças associadas ao envelhecimento (Kong; Li; Li; Liao *et al.*, 2018). Terapias baseadas na diminuição do estresse oxidativo podem ser obtidas a partir da utilização de plantas, que consistem em importantes fontes de substâncias antioxidantes a serem utilizadas na medicina moderna (Cordeiro, 2015).

2.8 Produtos naturais: Potencial terapêutico na senescência celular

O uso de produtos naturais pode garantir o fornecimento de uma série de fitoquímicos que contribuem para aumentar a expectativa de vida e a saúde (Deledda; Giordano; Velluzzi; Flore *et al.*, 2022). Evidências indicam que substâncias que podem mediar os processos fisiológicos deteriorados têm grande probabilidade de ter o potencial de prolongar a vida útil e melhorar as doenças associadas ao envelhecimento. E os produtos naturais demonstraram ser capazes de retardar o envelhecimento e/ou melhorar as doenças associadas ao envelhecimento, prolongando assim a vida útil, por meio da regulação de vários processos fisiológicos (Song; Zhang, 2023).

Uma série de compostos naturais foi investigada por seu potencial anti-senescência e antienvelhecimento em modelos celulares e animais, bem como em humanos (Gurău; Baldoni; Prattichizzo; Espinosa *et al.*, 2018). Nos últimos anos, compostos naturais se destacaram por possuírem propriedades senolíticas, como quercetina, fisetina, piperlongumina e o análogo da curcumina, que contribui para a redução do acúmulo de células senescentes. Além disso, os produtos naturais possuem efeitos senomórficos, como a quercetina, naringenina, apigenina e kaempferol, que atuam reduzindo os fatores SASP ao reduzir a inflamação e o estresse oxidativo (Gurău; Baldoni; Prattichizzo; Espinosa *et al.*, 2018; Li; Qin; Feng; Hu *et al.*, 2019). O resveratrol, composto com uma forte atividade antioxidante, e seu derivado pterostilbeno também possuem efeitos antienvelhecimento por meio da modulação do dano oxidativo, inflamação, atrito dos telômeros e senescência celular (Lange; Li, 2018).

Nesse contexto, plantas medicinais ricas em fitoquímicos antioxidantes têm atraído cada vez mais atenção como potenciais agentes na prevenção de doenças. Descobriu-se que elas desempenham sua atividade protetora ao eliminar as ROS e desintoxicar oxidantes genotóxicos potentes (Alireza Mortazavi, 2023). Os antioxidantes ajudam a reduzir os danos oxidativos, melhorar a saúde endotelial e retardar a senescência, principalmente por sua capacidade de eliminar radicais livres. Esses compostos podem agir inibindo as vias de formação dos radicais livres ou protegendo as células contra seus efeitos prejudiciais (De Almeida Feitosa; De Almeida; Dantas; De Azevedo *et al.*, 2024; Evazalipour; Safarzadeh Kozani; Safarzadeh Kozani; Shabani *et al.*, 2021). Nesse contexto, os compostos

antioxidantes naturais, presentes de forma significativa em óleos essenciais, têm demonstrado numerosos efeitos benéficos no envelhecimento saudável e no tratamento de doenças associadas à idade (Agatonovic-Kustrin; Kustrin; Morton, 2019).

Os óleos essenciais são utilizados há muito tempo na medicina popular. Conhecidos como óleos voláteis ou óleos etéricos, eles são líquidos oleosos odoríferos comumente encontradas em plantas aromáticas e são “essenciais” porque incluem o aroma e as qualidades botânicas (Tareen; Catenacci; Perteghella; Sorrenti; Bonferoni, 2025). Óleos essenciais são misturas naturais complexas de moléculas voláteis e lipofílicas, compreendendo estruturas heterogêneas que podem, no entanto, ser agrupadas em classes de componentes com similaridade estrutural interna e uma rota biossintética comum. Ao longo desta linha, a maioria dos componentes típicos de óleos essenciais pertencem a uma das duas famílias principais: terpenoides (grupo principal) e fenilpropanoides (não terpenoides) (Matera; Lucchi; Valgimigli, 2023).

Os óleos essenciais têm sido amplamente investigados por seu potencial terapêutico em diversas condições patológicas e seu perfil farmacológico inclui propriedades antibacterianas, antioxidantes, antivirais, inseticidas e outros efeitos biológicos foram encontrados nesses óleos voláteis. Alguns desses óleos são utilizados para tratamento de câncer, preservação de alimentos, aromaterapia e perfumaria. As atividades antibacterianas e antioxidantes dos óleos essenciais sustentam muitas aplicações de preservação de alimentos e medicina natural, farmacêutica e alternativa (Tareen; Catenacci; Perteghella; Sorrenti; Bonferoni, 2025).

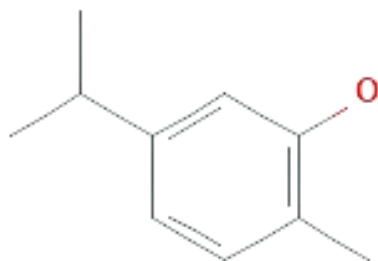
Os principais compostos bioativos encontrados nos óleos essenciais são os terpenos e terpenoides (Pezantes-Orellana; German Bermúdez; Matías De La Cruz; Montalvo; Orellana-Manzano, 2024). Os terpenos são formados por combinações de várias unidades de base de 5 carbonos (C₅) chamadas isopreno, enquanto os terpenoides são uma classe modificada de terpenos que apresentam grupos funcionais contendo oxigênio, como cetona, hidroxí, aldeído, éter ou frações carboxílicas. As estruturas químicas dos terpenos podem variar de compostos lineares a mono ou policíclicos, e seu esqueleto é formado pela condensação de dois a muitos milhares de unidades de isopreno (De Sousa; Damasceno; Amorati; Elshabrawy *et al.*, 2023).

Os monoterpenos são os terpenos mais representativos, produzidos a partir da união de duas unidades de isopreno (C_{10}), constituindo cerca de 90% dos óleos essenciais vegetais e permitindo uma variedade muito grande de estruturas químicas (Bakkali; Averbeck; Averbeck; Idaomar, 2008). Uma substância ativa que representa uma parte significativa dos óleos essenciais é o fenol monoterpenoide carvacrol (Gunes-Bayir; Guler; Bilgin; Ergun *et al.*, 2022).

2.9 Carvacrol

O carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol) é uma molécula pequena encontrada em óleos essenciais obtidos de plantas da família Lamiaceae, como a *Origanum vulgare* (orégano), *Thymus vulgaris* (tomilho), em concentrações de 85–90% (Abbasloo; Khaksari; Sanjari; Kobeissy; Thomas, 2023) (Figura 17). Podendo ser extraído ainda em menores concentrações da *Bergamia loise var. Citrus aurantium* (bergamota selvagem), *Nigella sativa* (cominho preto) e *Lepidium flavum* (pimenta). Não é solúvel em água, mas altamente solúvel em etanol, tetracloreto de carbono e éter dietílico (Imran; Aslam; Alsagaby; Saeed *et al.*, 2022; Mączka; Twardawska; Grabarczyk; Wińska, 2023). O carvacrol é considerado um composto químico pouco perigoso, sendo reconhecido como uma substância segura pela *Food and Drug Administration* (FDA) (Wang; Luo; Kou; Ye *et al.*, 2025).

Figura 17 - Forma estrutural do carvacrol.



Fonte: PubChem (2024)

Esse composto possui uma ampla atividade biológica, incluindo atividade antioxidante (El-Sayed; Abd-Allah; Mansour; El-Arabey, 2015; Samarghandian;

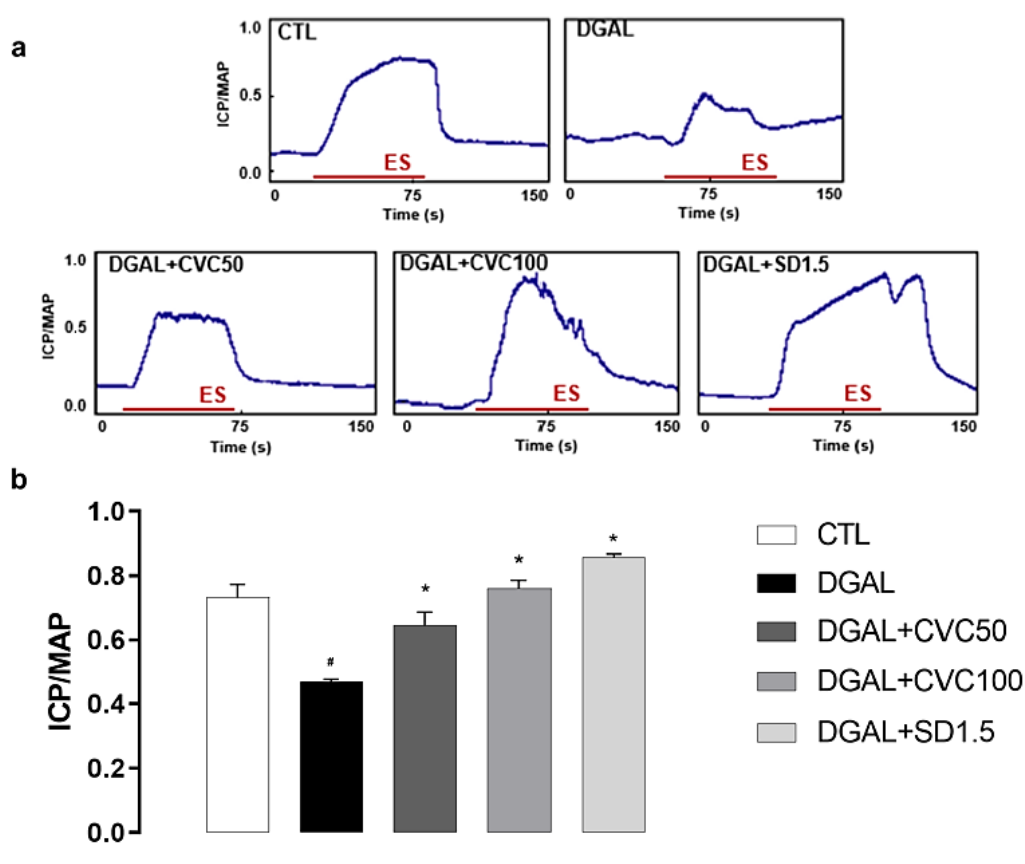
Farkhondeh; Samini; Borji, 2016), anti-inflamatória (Fachini-Queiroz; Kummer; Estevão-Silva; Carvalho *et al.*, 2012), melhora a saúde vascular (Dantas; Almeida; Gonçalves; Araújo *et al.*, 2022), restaura a função erétil associada ao envelhecimento (De Almeida Feitosa; De Almeida; Dantas; De Azevedo *et al.*, 2024) e à hipertensão (Gonçalves Taf, 2024), previne a disfunção endotelial e reduz a senescência em corpo cavernoso (De Almeida Feitosa; De Almeida; Dantas; De Azevedo *et al.*, 2024). Essas atividades farmacológicas têm um papel potencial no tratamento e prevenção de muitas doenças crônicas, como câncer, doenças degenerativas e cardiovasculares (Azizi; Majlessi; Choopani; Naghdi, 2022).

A presença do grupo OH no carvacrol é a principal razão para sua atividade de eliminação de radicais. Seu caráter ácido fraco facilita a doação de átomos de hidrogênio para elétrons desemparelhados, tornando outro radical estabilizado pelo espalhamento de elétrons produzido na estrutura de ressonância da molécula (Imran; Aslam; Alsagaby; Saeed *et al.*, 2022). O carvacrol, além de neutralizar ROS, modula positivamente o fator de transcrição Nrf2, parte integrante do mecanismo de defesa da célula, aumentando as defesas antioxidantes, como SOD, CAT e GPx, conferindo proteção às células, tecido e órgãos (Forqani; Akbarian; Amirahmadi; Khorrami *et al.*, 2024; Mączka; Twardawska; Grabarczyk; Wińska, 2023). Além disso, o carvacrol reduziu a expressão da enzima NADPH oxidase, principal enzima responsável pela produção de O_2^- na senescência, potencializando o efeito antioxidante (Khazdair; Moshtagh; Anaeigoudari; Jafari; Kazemi, 2024).

Descobertas recentes mostraram que o carvacrol também melhora a resposta imunológica, em células e em modelo animal (Alireza Mortazavi, 2023). Em tecido cardíaco, o carvacrol exerceu um efeito protetor pela diminuição dos níveis dos mediadores inflamatórios fator de necrose tumoral α (TNF- α), IL-6 e IL-1 β , reduzido a toxicidade nesse tecido (Khazdair; Moshtagh; Anaeigoudari; Jafari; Kazemi, 2024). Além disso, foi relatado o aumento da citocina anti-inflamatória IL-10 (Alireza Mortazavi, 2023).

Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que o tratamento oral com carvacrol melhora a DE (Figura 18) associada ao envelhecimento prematuro induzido por D-galactose, possivelmente devido à sua ação protetora sobre as células endoteliais cavernosas. Além disso, ele atenuou o estresse oxidativo e o acúmulo de células senescentes no tecido cavernoso de ratos (De Almeida Feitosa; De Almeida; Dantas; De Azevedo *et al.*, 2024).

Figura 18 - Traçado original representativo (A) e gráfico estatístico (B) da pressão intracavernosa/pressão arterial média (ICP/MAP) em resposta à estimulação elétrica do nervo cavernoso de animais tratados com D-galactose.



Legenda: ICP/MAP em resposta à estimulação elétrica (16 Hz, 6 V, 1 ms por 60 s) do nervo cavernoso nos diferentes grupos de animais tratados por oito semanas. Grupos: CTL (veículo); DGAL (D-galactose 150 mg/kg); DGAL+CVC50 (D-galactose 150 mg/kg + Carvacrol 50 mg/kg); DGAL+CVC100 (D-galactose 150 mg/kg + Carvacrol 100 mg/kg); DGAL+SD1,5 (D-galactose 150 mg/kg + Sildenafil 1,5 mg/kg). Os resultados estão expressos como média \pm e.p.m. (n = 5). Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA *one way*, seguido de pós-teste de Bonferroni. * p < 0,05 vs CTL. # p < 0,05 vs DGAL. ES: Estimulação elétrica.

Fonte: (De Almeida Feitosa; De Almeida; Dantas; De Azevedo *et al.*, 2024)

Em vista disso, como a senescência celular e o estresse oxidativo são mecanismos centrais no processo de envelhecimento e na progressão de doenças

como a DE, e considerando ainda que os produtos naturais com potencial atividade antioxidante podem desempenhar um papel fundamental na prevenção dos efeitos celulares deletérios associados ao envelhecimento. É fundamental realizar estudos com o carvacrol para avaliar o seu potencial senoterapêutico nas células endoteliais do corpo cavernoso de ratos em modelo de senescência induzida por D-galactose. Esses estudos podem elucidar os mecanismos moleculares envolvidos, fornecendo uma compreensão mais aprofundada de seus efeitos na melhora da DE associada ao envelhecimento e contribuindo para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas contra os efeitos deletérios da senescência.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito senoprotetor do monoterpene carvacrol em RCEC no modelo experimental de senescência induzida por D-galactose, mediante abordagens *in vitro* e *in silico*.

3.2 Objetivos específicos

Investigar os efeitos do carvacrol em cultura de células endoteliais cavernosas de ratos no modelo experimental de senescência induzida por D-galactose por meio de:

- Análise da viabilidade celular
- Determinação da atividade da β -galactosidase associada à senescência
- Modulação do estresse oxidativo

Prever a interação e estabilidade do carvacrol e os alvos-chave através de abordagens *in silico* por meio da:

- Simulação de *docking* molecular para a determinação dos valores de energia de ligação entre o carvacrol e os alvos-chave da via da senescência, sendo eles:
 - NADPH oxidase
 - Nrf2/Keap 1
 - p53
 - mTOR
 - SIRT1
 - PAI-1
 - MAPK p38
- Simulação de dinâmica molecular para avaliar a flexibilidade e estabilidade das interações entre o carvacrol e os alvos-chave da via da senescência o p53 e NADPH oxidase.

Investigar dos mecanismos do carvacrol sobre as vias de senescência induzida por D-galactose em célula endotelial cavernosa de ratos através da:

- Detecção dos níveis de NO
- Investigação da apoptose
- Análise da progressão do ciclo celular

Material e métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local da pesquisa

Os experimentos foram realizados no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarm) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus I, João Pessoa-PB. Sendo os estudos *in vitro* realizados no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular e os ensaios *in silico* no Laboratório de Quimioinformática sob coordenação do prof. Dr. Marcus Tullius Scotti.

4.2 Substâncias e reagentes

Para a realização dos protocolos experimentais foram utilizados os seguintes insumos: *Dulbecco's modified Eagle's médium* – baixa glicose (DMEM), solução de penicilina/estreptomicina, glutamina, D-valina, VEGF-A, gelatina 2%, D-(+)-galactose, dimetil sufóxido (DMSO), dihidroetídio (DHE), 5 - Bromo – 4 – Cloro – 3 - Indolil β – D - galactopiranosídeo (X-Gal), 3-Amino, 4-aminometil-2', 7'-difluoresceína, diacetato (DAF-FM DA), ACh todos obtidos da Sigma-Aldrich® Brasil Ltda (São Paulo, Brasil). Além disso, foi utilizado soro fetal bovino (SFB) e solução de tripsina/ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,5% obtidos da Gibco® by life technologies (Recife, Brasil). A heparina sódica (Hepamax-s®) foi obtida da Blau Farmacêutica S.A, o tampão de coloração iodo de propídio (PI)/RNase e a anexina V da BD Pharmingen™, o 4',6-Diamidino-2-fenilindol, 2-(4-Amidinofenil)-6-indolecarbamidina (DAPI), o brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e 7-amino-actinomicina D (7-AAD) da Sigma-Aldrich® Brasil Ltda (São Paulo, Brasil).

O bicarbonato de sódio (NaHCO_3), fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e a glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) foram obtidos da Anidrol e o hepes da Santa Cruz Biotechnology (Texas, Estados Unidos da América). O cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$), fosfato de sódio bibásico (Na_2HPO_4), sulfato de magnésio (MgSO_4), cloreto de magnésio (MgCl_2), cloreto de cálcio (CaCl_2) e a glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) foram obtidos da Dinâmica Química Contemporânea Ltda (São Paulo, Brasil). O ferrocianeto de potássio ($\text{C}_6\text{N}_6\text{FeK}_4$) e o

ferricianeto de potássio ($\text{C}_6\text{N}_6\text{FeK}_3$) foram obtidos da Neon Comercial Ltda. O ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) foi obtido da empresa Dinâmica Química Contemporânea Ltda.

O cloridrato de xilazina e cloridrato de cetamina foram obtidos da Syntec (São Paulo, Brasil). A solução de iodopovidona (PVPI) foi obtida da Natulab (Bahia, Brasil), o formaldeído da empresa Medi Química Indústria Farmacêutica Ltda.

O gás dióxido de carbono (CO_2) foi obtido da White Martins Gases Industriais do Nordeste S/A (Pernambuco, Brasil).

4.3 Substância teste: Carvacrol

O carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol) é um líquido obtido da Sigma-Aldrich Brasil LTDA, referência 282197, envase/lote #STBK3476, com 98% de pureza, fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}$, massa molecular 150,22 g/mol, ponto de fusão 3-4°C, ponto de ebulição 236-237 °C e densidade 0,976 g/mL em 20°C (Mączka; Twardawska; Grabarczyk; Wińska, 2023).

O carvacrol foi solubilizado em DMSO para o preparo da solução mãe, que foi utilizada para a preparação das diluições, realizadas em solução nutritiva Tampão Fosfato-Salino (PBS). Todas as soluções foram produzidas momentos antes da incubação. A concentração de DMSO em solução não excedeu 0,01%.

4.4 Soluções

Para o isolamento do corpo cavernoso a solução salina balanceada de Hank (HBSS) foi preparada utilizando água mili-Q estéril para a solubilização dos sais e estocada a 4°C. Os seguintes sais foram utilizados: NaCl, KCl, MgSO_4 , Na_2HPO_4 , CaCl_2 , NaHCO_3 , KH_2PO_4 e $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$. Segue a sua composição detalhada:

Tabela 1 - Composição da solução salina balanceada de Hank.

Composição	Concentração (mM)
NaCl	137,0
KCl	5,4
MgSO ₄	1,0
Na ₂ HPO ₄	0,25
CaCl ₂	1,3
NaHCO ₃	4,2
KH ₂ PO ₄	0,44
C ₆ H ₁₂ O ₆	5,5

Fonte: (De Almeida Feitosa; De Almeida; Dantas; De Azevedo *et al.*, 2024)

A solução de PBS foi preparada utilizando água mili-Q estéril para a solubilização dos sais e estocada a 4°C. Os seguintes sais foram utilizados: NaCl, NaH₂PO₄H₂O e Na₂HPO₄. Sua composição detalhada está discriminada na tabela abaixo:

Tabela 2 - Composição da solução de PBS (pH 7,2).

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

Fonte: De Almeida Rezende; Oliveira De Almeida; Gonçalves; De Azevedo *et al.* (2021)

Para avaliação da SA-β-galactosidase foi utilizada a solução de x-gal, que foi preparada utilizando água destilada para a solubilização dos sais, no dia do experimento. Os seguintes sais foram utilizados: C₆H₈O₇ e Na₂HPO₄ (solução tampão citrato-fosfato); NaCl, MgCl₂, C₆N₆FeK₄, C₆N₆FeK₃ e x-gal.

Tabela 3 - Composição da solução de coloração de x-gal.

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

Fonte: De Almeida Feitosa; De Almeida; Dantas; De Azevedo *et al.* (2024)

Para a detecção das taxas de apoptose utilizamos a solução de trabalho 10X *Binding Buffer*, que foi preparada utilizando água destilada para a solubilização dos sais e estocada a 4°C. Os seguintes sais foram utilizados: CaCl₂, NaCl e hepes. Sua composição detalhada está discriminada na tabela abaixo:

Tabela 4 - 10X Binding Buffer (pH 7,4).

Composição	Concentração
CaCl ₂	25 mM
NaCl	1,4 M
Hepes (pH 7,4)	0,1 M

Fonte: Vermes; Haanen; Steffens-Nakken e Reutelingsperger (1995)

4.5 Animais

Foram utilizados ratos Wistar da espécie *Rattus norvegicus*, com oito semanas de idade, provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual da Paraíba e mantidos na Unidade de Produção Animal (UPA) do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Os animais foram mantidos sob condições monitoradas de temperatura (22 ± 2°C), umidade (60%), ciclo claro-escuro de 12 horas (6h00 - 18h00) com livre acesso

à água potável e alimentação (ração comercial; Nuvilab CR-1 irradiada, Quimtia®), conforme recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Todos os protocolos experimentais foram previamente submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPB, protocolados sob o CEUA nº 6563220322 (ID 001669) (Anexo A). Os animais foram manipulados com todos os cuidados necessários para evitar o sofrimento, minimizar o desconforto e dor desde o início do estudo até o momento da eutanásia, obedecendo aos preceitos da lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008 e ainda da resolução editada pelo CONCEA nº 57 de 6 de dezembro de 2022.

4.6 Isolamento e cultivo de células endoteliais cavernosas de rato

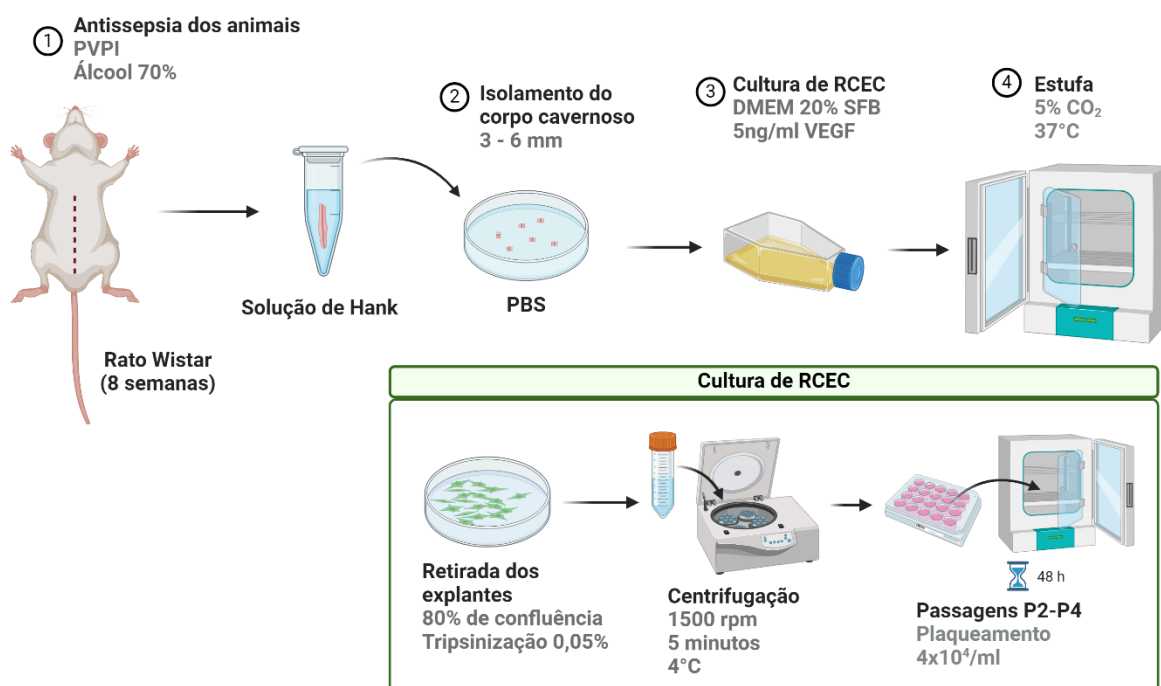
Inicialmente, os animais foram eutanasiados utilizando o método de sobredosagem da mistura anestésica de cetamina e xilazina (210 mg/kg e 30 mg/kg, respectivamente), administrados por via intraperitoneal. Após a confirmação da eutanásia, o animal foi colocado em decúbito dorsal e na região abdominal e pélvica foi pulverizado uma solução de PVPI e álcool 70% para a antisepsia. Posteriormente, o pênis foi cuidadosamente isolado, transferido para um frasco estéril contendo HBSS e, imediatamente transportado para uma capela de fluxo laminar. Nesta, o tecido foi lavado suavemente duas vezes com solução de PBS gelada para a limpeza e remoção do sangue residual.

A glândula do pênis, a uretra e o feixe neurovascular dorsal foram removidos do pênis, e apenas o tecido do corpo cavernoso foi utilizado para a cultura de células endoteliais primárias. O tecido do corpo cavernoso foi cortado em 4 - 6 fragmentos (3 - 6 mm) e imediatamente colocado em garrafa de cultivo celular pré-tratada com gelatina (0,2%), contendo meio de cultura DMEM baixa glicose suplementado com 20% de SFB, 1% de penicilina e estreptomicina, 4 mM de glutamina, 25 mM de hepes e 100 UI/mL heparina. O VEGF-A 5 ng/mL foi adicionado ao DMEM para a indução do brotamento de células endoteliais do tecido cavernoso. Os explantes foram mantidos em estufa com 5% de CO₂ e temperatura de 37°C, com inspeção diária e troca do meio a cada 2 dias.

Após o brotamento das células do tecido cavernoso e o crescimento celular atingir 80% de confluência, conforme inspecionado em microscópio (Nikon, Japão), os explantes foram removidos suavemente, sem interrupção ou toque nas células endoteliais em crescimento. Em seguida, as células foram removidas da placa utilizando uma solução de tripsina/EDTA a 0,05% por quatro minutos, centrifugadas em 1500 rotações por minuto (rpm) por cinco minutos, à 4°C e ressuspensas em DMEM suplementado com D-valina (100 µg/mL) para inibição do crescimento de fibroblastos, permanecendo assim por 2 dias.

Após a incubação com D-valina, as células foram mantidas em DMEM suplementado com 10% de SFB, fazendo a troca do meio a cada 2-3 dias, e quando as células atingiram 80% de confluência, foi realizada uma nova tripsinização. As passagens 2 - 4 foram utilizadas para a realização dos protocolos experimentais. Para cada experimento, as células foram plaqueadas na concentração de 4×10^4 células/mL e o percentual de SFB contido no meio DMEM foi reduzido de 10% para 2% durante a incubação (Figura 19 e 20).

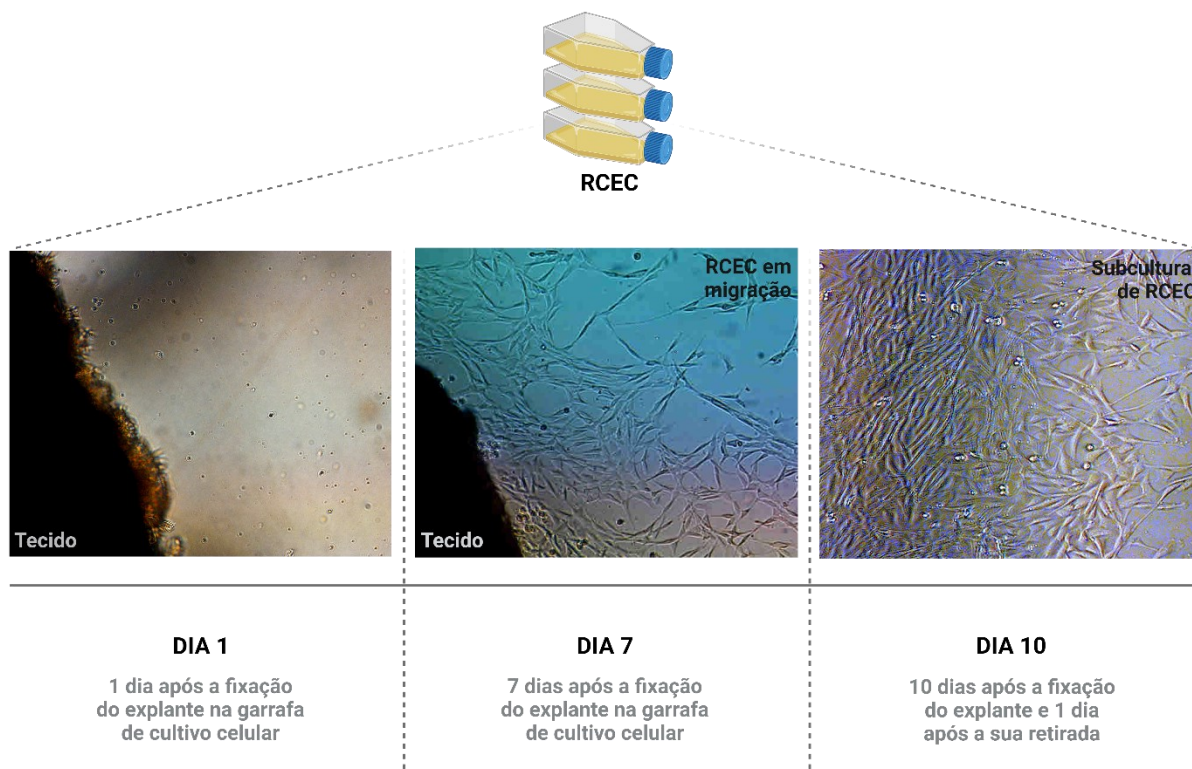
Figura 19 - Representação esquemática do isolamento e cultivo de RCEC.



Legenda: PVPI: iodopovidona; PBS: solução salina tamponada com fosfato; RCEC: Célula endotelial cavernosa de rato; DMEM: *Dulbecco's modified Eagle's médium*; VEGF-A: fator de crescimento endotelial vascular.

Fonte: FEITOSA (2025)

Figura 20 - Representação esquemática do brotamento de RCEC em garrafa de cultivo celular.



Legenda: O tecido de corpo cavernoso foi implantado em garrafa de cultivo celular revestida com gelatina 0,2% e o brotamento celular foi acompanhado diariamente. Após a migração das células, elas foram utilizadas para subcultivo. Objetiva de 10x. RCEC: célula endotelial cavernosa de rato.

Fonte: FEITOSA (2025)

4.7 Modelo de senescência acelerada induzida por D-galactose

O modelo de senescência acelerada de RCEC foi estabelecido via tratamento com D-galactose na concentração de 20 mg/mL por 48 horas, conforme descrito anteriormente (Ye; Feng; Zhang; Li *et al.*, 2023). Para tanto, após 24h do plaqueamento das células, elas foram submetidas a uma incubação com 20 mg/mL de D-(+)-galactose por 48 horas em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ a

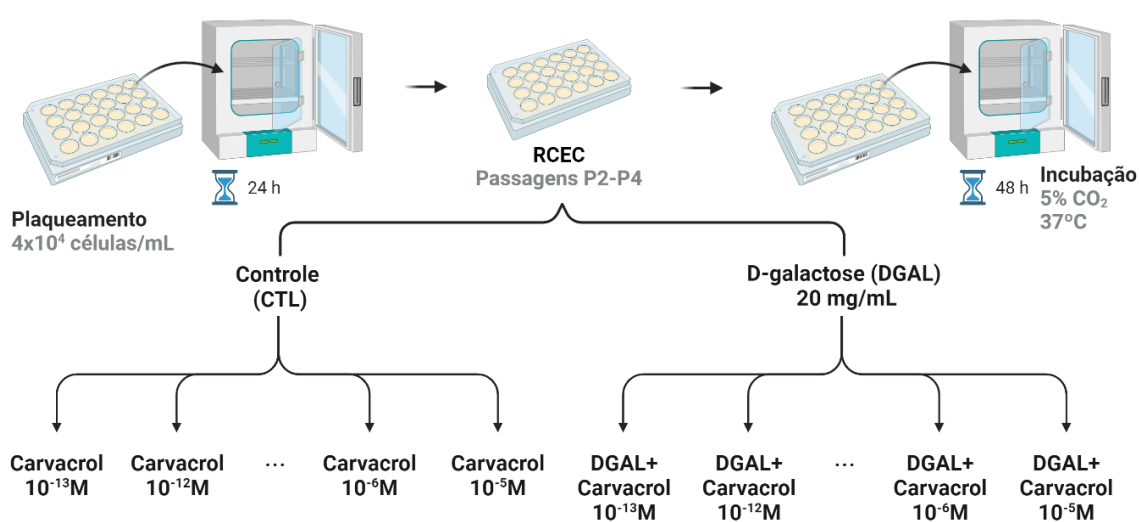
37°C. A D-galactose foi preparada no dia da incubação e solubilizada em meio de cultura DMEM suplementado com 2% de SFB.

4.8 Avaliação dos efeitos do carvacrol sobre os marcadores da senescência em condições basais e em modelo de senescência induzida por D-galactose em célula endotelial cavernosa de rato

4.8.1 Design experimental

O efeito do carvacrol foi avaliado na condição basal e no modelo de senescência acelerada. Na condição basal, as células foram divididas nos seguintes grupos experimentais: Controle (CTL); Carvacrol (CVC) 10^{-13} M; CVC 10^{-12} M; CVC 10^{-11} M; CVC 10^{-10} M; CVC 10^{-9} M; CVC 10^{-8} M; CVC 10^{-7} M; CVC 10^{-6} e CVC 10^{-5} M. Na condição de senescência, as células foram divididas nos grupos: CTL, D-galactose 20 mg/mL (DGAL); DGAL+CVC 10^{-13} M; DGAL+CVC 10^{-12} M; DGAL+CVC 10^{-11} M; DGAL+CVC 10^{-10} M; DGAL+CVC 10^{-9} M; DGAL+ CVC 10^{-8} M; DGAL+CVC 10^{-7} M; DGAL+CVC 10^{-6} e DGAL+CVC 10^{-5} M (Figura 21).

Figura 21 - Delineamento experimental.



Legenda: DGAL: Grupo experimental D-galactose; RCEC: Célula endotelial cavernosa de rato.

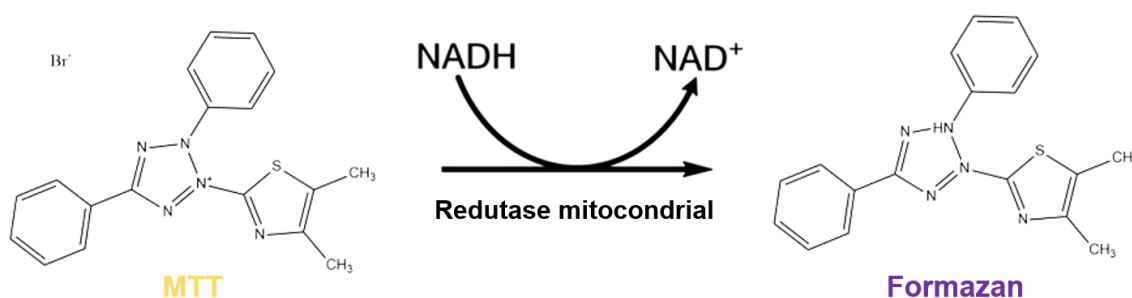
Fonte: FEITOSA (2025)

As células do grupo CTL foram tratadas com o veículo, que é composto pelo DMSO na mesma concentração que foi utilizada para a solubilização do carvacrol.

4.8.2 Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade de RCEC foi avaliada por meio do ensaio de redução do MTT, conforme descrito anteriormente (Mosmann, 1983). Esse ensaio colorimétrico é utilizado para medir a atividade metabólica celular como um indicador de viabilidade e proliferação celular. Baseia-se na redução do MTT, sal de tetrazólio amarelo solúvel em água, em cristais de formazan de cor púrpura, insolúvel em água, por meio da atividade de redutases mitocondriais em células metabolicamente ativas (Kumar; Nagarajan; Uchil, 2018). Os cristais de formazan são dissolvidos utilizando uma solução de solubilização que permite a quantificação da solução através de um espectrofotômetro de placas (Figura 22).

Figura 22 - Reação de redução do MTT em formazan.



Legenda: MTT: brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio; NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido; NAD^+ : nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado.

Fonte: Adaptado de Kamiloglu; Sari; Ozdal e Capanoglu (2020)

Para isso, as células foram distribuídas em placas de 96 poços na concentração de 4×10^4 células/mL e mantidas por 24 horas em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 a 37°C para a adesão celular. Após a adesão e o período de incubação,

descrito anteriormente (item 4.5 e 4.7.1), o MTT (0,45 mg/mL) foi adicionado em cada poço e uma nova incubação foi realizada por mais 3 horas em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ a 37°C. Ao final desse tempo, o MTT foi cuidadosamente aspirado e o DMSO foi adicionado para a solubilização dos cristais de formazan, permanecendo por 1 hora em temperatura ambiente ao abrigo da luz. A leitura da absorbância foi realizada em 595 nm utilizando um espectrofotômetro (iMark™ *Microplate Absorbance Reader*, Heiwajima, Ota-ku, TO, Japão). A intensidade colorimétrica é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Foram conduzidos três experimentos independentes, cada um em duplicata.

A intensidade colorimétrica foi utilizada para quantificar as células viáveis nos diferentes grupos experimentais. Os dados foram expressos como média da intensidade colorimétrica ± erro padrão da média (EPM), normalizados pelo grupo CTL.

4.8.3 Avaliação da senescência associada à β -galactosidase

SA- β -galactosidase é um biomarcador de senescência comumente usado e sua atividade aumentada em células senescentes deriva da β -D-galactosidase lisossomal. O ensaio SA- β -galactosidase é muito útil para testar se diferentes condições ou compostos podem induzir ou inibir o aparecimento de células senescentes. O método citoquímico foi utilizado e é baseado na coloração de células contendo uma enzima ativa com o cromógeno X-gal, substrato direto para a β -galactosidase. A β -galactosidase cliva o substrato em galactose e 5-bromo-4-cloro-3-hidroxiindol, e este, por sua vez, é oxidado em uma substância azul, fornecendo análise visual da atividade da β -galactosidase (Valieva; Ivanova; Fayzullin; Kurkov; Igrunkova, 2022).

Até o momento, sabe-se que a maioria das células de mamíferos, independentemente da idade, expressam atividade da β -galactosidase lisossomal em pH 4. Apesar da enzima demonstrar sua atividade máxima em pH 4, ela só pode ser usada para diferenciar células “velhas” e “jovens” por meio de reações bioquímicas em pH 6 (Piechota; Sunderland; Wysocka; Nalberczak *et al.*, 2016).

O ensaio da SA- β -galactosidase foi realizado para determinar o fenótipo senescente das RCECs, conforme descrito previamente (Sun; Hu; Hu; Xu; Jiang, 2015). Em resumo, as células foram distribuídas em placas de 48 poços na

concentração de 4×10^4 células/mL e mantidas por 24 horas em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ a 37°C para a adesão celular. Após a adesão e o período de incubação, descrito anteriormente (item 4.5 e 4.7.1), as células foram lavadas com PBS e fixadas com uma solução de formaldeído 2% e glutaraldeído 0,2% por 1 minuto. A solução de x-gal (1 mg/mL) (tabela 3) recém preparada foi adicionada em cada poço e incubada *overnight* (por 18h, no máximo), à 37°C em câmara úmida ao abrigo da luz. Após a lavagem com PBS para a remoção do excesso de coloração, foi adicionada uma solução de DAPI (300 nM), para a marcação do núcleo e facilitar a identificação da célula, por cinco minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Por fim, as células foram lavadas novamente com PBS, uma solução de glicerol 20% foi adicionada e as placas foram mantidas refrigeradas (2 – 8°C) até a análise subsequente. Foram conduzidos seis experimentos independentes, cada um em duplicata.

A leitura das placas foi realizada utilizando microscópio de luz *Nikon Eclipse Ti-E* (Nikon, Japão) acoplado ao *software NIS Elements* versão DS-U3 (Nikon, Japão) sendo analisadas utilizando o *software ImageJ*®. As células senescentes foram identificadas como células coradas em azul e, para cada poço, contou-se um mínimo de 200 células para determinar o percentual de células positivas para SA-β-galactosidase. Os dados foram expressos como média do percentual de células positivas para SA-β-galactosidase ± EPM, normalizados pelo grupo CTL.

4.8.4 Avaliação dos níveis de ânions superóxidos

A detecção dos níveis de ROS intracelular em RCEC foi realizada por meio de uma sonda fluorescente sensível à ROS, DHE, conforme descrito anteriormente (Ji; Chen; Pang; Chen *et al.*, 2024). O DHE é amplamente utilizado para detecção do O₂⁻ presente no citosol devido à sua capacidade de difusão passiva para o interior das células e alta reatividade. No interior da célula, o DHE é oxidado pelo O₂⁻, formando um produto intermediário, o 2-hidroxietídio que intercala com o DNA, levando à exibição de uma fluorescência vermelha. O 2-hidroxietídio é excitado em 500 nm e tem um espectro de emissão a 580 nm (Wojtala; Bonora; Malinska; Pinton *et al.*, 2014).

Em resumo, as células foram distribuídas em placas de 48 poços na concentração de 4×10^4 células/mL e mantidas por 24 horas em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ a 37°C para a adesão celular. Após a adesão e o período de

incubação, descrito anteriormente (item 4.5 e 4.7.1), as células foram lavadas com PBS e incubadas com a sonda fluorescente DHE (10 μ M) por quarenta minutos, a 37 °C ao abrigo da luz. Posteriormente, as células foram lavadas com solução de PBS para remoção do excesso da sonda e levadas imediatamente para análise no microscópio de fluorescência *Nikon Eclipse Ti-E* (Nikon, Japão) acoplado ao *software NIS Elements* versão DS-U3 (Nikon, Japão). Foram conduzidos três experimentos independentes, cada um em duplicata.

A intensidade de fluorescência foi utilizada para mensurar a concentração de O_2^- nos diferentes grupos. Os dados foram expressos como média da intensidade de fluorescência \pm EPM, normalizados pela fluorescência emitida pelo DHE do grupo CTL. As imagens foram analisadas utilizando o software ImageJ®.

4.9 Predição da interação do carvacrol com alvos da via da senescência através de abordagens *in silico*

4.9.1 Simulação de docking molecular para a determinação dos valores de energia de ligação entre o carvacrol e os alvos-chave da via da senescência

A abordagem de ancoragem (do inglês, *docking*) molecular é um método de biologia computacional e bioinformática para dar suporte à avaliação *in vivo* e *in vitro* de produtos naturais, modelando a interação entre esses compostos e as proteínas alvo (Nurhayati; Rihandoko; Fadlan; Ghaissani *et al.*, 2022).

O *docking* molecular realiza a predição da conformação e orientação da molécula ligante dentro do sítio de ligação de uma proteína alvo e estima a sua afinidade de ligação (Yuriev; Agostino; Ramsland, 2011). O grau de afinidade e especificidade para o reconhecimento molecular proteína-ligante depende das características físico-químicas e estão intimamente relacionadas com as interações intermoleculares existentes no complexo. Estas interações incluem as ligações de hidrogênio, as interações provenientes do efeito hidrofóbico, as interações de van der Waals, as interações eletrostáticas e as ligações covalentes que possam ser formadas durante o processo de interação proteína-ligante (Verli, 2014).

A formação de um complexo proteína-ligante envolve dois componentes principais: encaixe e pontuação. O processo de encaixe envolve uma amostragem conformacional e orientacional do ligante dentro das restrições impostas pelo sítio de ligação do receptor. A função de pontuação é responsável por selecionar a melhor pose – ou seja, sua conformação, orientação e posição no espaço – e por classificar os ligantes, caso um banco de dados seja utilizado para o encaixe ou triagem. Para ser bem sucedido, o encaixe deve prever com precisão dois componentes em relação às informações disponíveis experimentalmente: a estrutura do ligante (previsão de pose) e sua capacidade de ligação (previsão de afinidade) (Yuriev; Agostino; Ramsland, 2011).

O *docking* molecular foi utilizado para investigar alvos de ligação do monoterpeno carvacrol na atenuação dos efeitos produzidos pela senescência celular através da afinidade de ligação do composto com os alvos moleculares selecionados no estudo. A escolha desses alvos foi baseada em um rastreamento direcionado, com destaque para aqueles que atuam como componentes-chave em vias de sinalização relevantes para a senescência celular. Os detalhes das proteínas selecionadas estão disponíveis na tabela abaixo:

Tabela 5 - Alvos-chave envolvidos em vias de senescência para o ensaio do *docking* molecular.

Alvo molecular	PDB ID	Resolução	Método de obtenção	Ligante-padrão	Referência
Domínio SH3-subunidade de p40 da NADPH Oxidase	1W6X	2,00 Å	Difração de raios X	Apocinina	Massenet; Chenavas; Cohen-Addad; Dagher <i>et al.</i> (2005)
Nrf2/Keap 1	7Q5H	2,31 Å	Difração de raios X	Ligante co-cristalizado: APPN	Begnini; Geschwindner; Johansson; Wissler <i>et al.</i> (2022)
p53	1TUP	2,20 Å	Difração de raios X	Pifitrina-α	Cho; Gorina; Jeffrey e Pavletich (1994)
SIRT1	5BTR	3,20 Å	Difração de raios X	Ligante co-cristalizado: Resveratrol	Cao; Wang; Qiu; Liu <i>et al.</i> (2015)
mTOR	5WBY	3,10 Å	Difração de raios X	Rapamicina	Yang; Jiang; Li; Yang <i>et al.</i> (2017)
MAPK p38	5WJJ	1,60 Å	Difração de raios X	Ligante co-cristalizado: NHMC	Kaieda; Takahashi; Takai; Goto <i>et al.</i> (2018)
PAI-1	1B3K	2,99 Å	Difração de raios X	Tiplaxtinina	Sharp; Stein; Pannu; Carrell <i>et al.</i> (1999)

Fonte: FEITOSA (2025)

Legenda: Detalhes dos alvos-chave selecionados envolvidos em vias de sinalização da senescência celular. NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato; Nrf2: fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2; Keap 1: proteína 1 associada a ECH do tipo Kelch; APPN:

Ácido 3-[4-(difluorometil)fenil]-2-[(2-metilpropan-2-il)oxicarbonilamino] propanóico; SIRT1: sirtuína 1; mTOR: alvo mecanicista da rapamicina; MAPK: proteína cinase ativada por mitógeno; NHMC: N-[4-[2-(4-fluoro-3-metilfenil)imidazo[1,2-b]piridazin-3-il]piridin-2-il]-1-hidroxi-2-metilpiridin-1-ilo-4-carboxamida; PAI-1: inibidor-1 do ativador do plasminogênio. PDB: Protein Data Bank; PDB ID: Código de Identificação da macromolécula no PDB.

A simulação computacional foi iniciada com o desenho das estruturas químicas dos compostos no *Software* Marvin Sketch v.23.10, ChemAxon (<https://chemaxon.com/marvin>) e, em seguida, foi realizada a padronização das estruturas químicas em 3D e minimização da energia dos compostos pelos métodos de mecânica molecular e pelo método semi-empírico Austin Model 1 (AM1) por meio do *Software* Spartan 14, WaveFunction (<https://www.wavefun.com/>). As estruturas 3D das proteínas em estudo foram obtidas do Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) (Acesso em: 25 de setembro de 2024) (Bernstein; Koetzle; Williams; Meyer *et al.*, 1977).

Os encaixes moleculares foram realizados com os alvos que apresentaram em sua estrutura o ligante cocrystalizado: Keap 1, SIRT 1 e MAPK 38. Para os alvos que não apresentaram ligantes cocrystalizados: mTOR, domínio SH3- subunidade p40 da NADPH oxidase, p53 e o PAI-1; foi realizada a identificação do sítio ativo por meio da visualização dos resíduos que interagem com o ligante padrão. Essas informações foram obtidas de dados da literatura referentes a cada um dos alvos no PDB, como também pela utilização de molecular *Pocket Predictions*, sendo utilizada a plataforma Bite Net - Skoltech I Molecule, 2022 (<https://sites.skoltech.ru/imolecule/tools/bitenet>) (Acesso em: 01 de Julho de 2024).

Todas as moléculas de água foram removidas da estrutura cristalina, e um “*template*” foi criado entre o alvo e o ligante para demarcar o sítio ativo da macromolécula. Em seguida, a molécula teste foi inserida para a realização da simulação do *docking* molecular.

O *software* Molegro Virtual Docker v.6.0.1, CLC Bio Company (2002) foi utilizado para a execução do *docking* molecular e a energia de ligação e as pontuações foram calculadas utilizando a função de pontuação Moldock Scoring Function (MolDock Score) (Thomsen; Christensen, 2006).

O algoritmo MolDock SE (Simplex Evolution) foi usado com os seguintes parâmetros: 20 execuções com um máximo de 3.000 interações usando uma

população de 50 indivíduos, 2.000 etapas de minimização para cada resíduo flexível e 2.000 etapas de minimização global por simulação. A função de pontuação MolDock Score (GRID) foi usada para calcular os valores de energia de encaixe. Um GRID foi fixado em 0,3 Å e a esfera de busca foi fixada em 15 Å de raio. Para a análise da energia do ligante, foram avaliadas as interações eletrostáticas internas, ligações de hidrogênio internas e torções sp²-sp² (De Azevedo, 2010; Thomsen; Christensen, 2006).

Para a validação da análise, foi realizado o *redocking* e avaliado os valores para o desvio quadrático médio (RMSD), que foi calculado a partir das poses, indicando o grau de confiabilidade do ajuste. O RMSD fornece o modo de conexão próximo à estrutura experimental e é considerado bem-sucedido se o valor for inferior a 2,0 Å (Schlosser; Rarey, 2009).

4.9.2 Simulação de dinâmica molecular entre o carvacrol e os alvos-chave da via da senescência o p53 e a NADPH oxidase

A dinâmica molecular é um procedimento de simulação que descreve a variação do comportamento molecular em função do tempo. O comportamento molecular abrange diversas propriedades de uma molécula em estudo, tais como seu conteúdo de estrutura secundária, a orientação das cadeias laterais, a conformação de alças e a energia de interação com outras moléculas como enzima e substrato, proteína e proteína, proteína e DNA, ou fármaco e receptor. Além disso, a ideia de que essas propriedades variam como função do tempo reflete sua natureza dinâmica, evidenciando que elas não permanecem estáticas, mas se modificam em soluções biológicas (Verli, 2014).

As simulações de dinâmica molecular foram realizadas para estimar a estabilidade da ligação dos alvos que se destacaram no *docking* molecular: domínio SH3 - subunidade p40 da NADPH oxidase e p53. Para tanto, foi utilizado o software GROMACS versão 2023.1 (Abraham; Murtola; Schulz; Páll *et al.*, 2015; Berendsen; Van Der Spoel; Van Drunen, 1995). A topologia do ligante foi criada na plataforma Automated Topology Builder (ATB) versão 3.0 (<https://atb.uq.edu.au/>), usando o campo de força GROMOS 43a1. A simulação empregou o modelo de água SPC em uma caixa cúbica, com neutralização do sistema pela adição de íons Cl⁻ e Na⁺, e

minimização para remover interações inapropriadas (Bondi, 1964; Malde; Zuo; Breeze; Stroet *et al.*, 2011).

O sistema foi equilibrado a 300K usando o algoritmo V-rescale NVT (número constante de partículas, volume e temperatura) por 100 ps, seguido de equilíbrio a 1 atm com o algoritmo Parrinello-Rahman NPT (pressão e temperatura constantes) por mais 100 ps. A simulação de dinâmica molecular foi conduzida para 50 milhões de passos, totalizando 100 ns. A estabilidade estrutural foi avaliada com valores de RMSD para todos os átomos de C α e a flexibilidade com *Root Mean Square Flutuaction* (RMSF), além de analisar as energias de interação Coulombic e Lennard-Jones. Os gráficos RMSD e RMSF foram gerados usando o software Grace (Grace Development Team, <http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/>) (Nachbagauer; Feser; Naficy; Bernstein *et al.*, 2021; Pettersen; Goddard; Huang; Meng *et al.*, 2021).

4.10 Avaliação dos mecanismos do carvacrol sobre as vias de senescência induzida por D-galactose em célula endotelial cavernosa de ratos

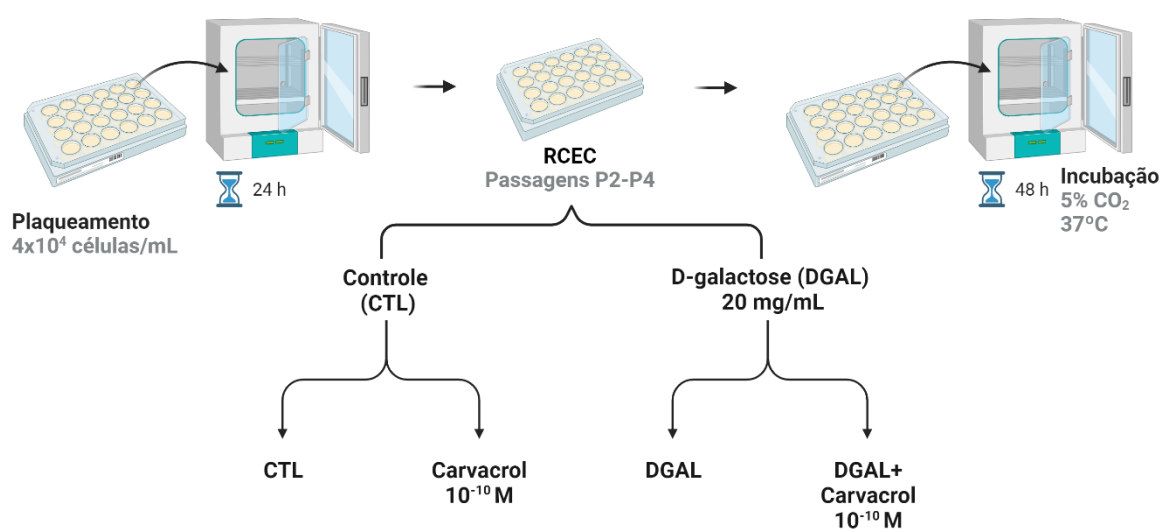
4.10.1 Design experimental

A partir dos protocolos realizados, utilizando uma ampla faixa de concentração do carvacrol (10^{-13} – 10^{-5} M), nos protocolos de viabilidade celular, ensaio da SA- β -galactosidase e quantificação de ROS, marcadores da senescência, identificamos a concentração que produz 50% do efeito máximo (CE₅₀) sem apresentar efeitos tóxicos para a célula. Portanto, para investigar os mecanismos subjacentes a esses efeitos e sua associação com as vias de senescência, optamos por utilizar a concentração de carvacrol de 10^{-10} M. Essa escolha se baseia nos bons resultados obtidos para os ensaios da SA- β -galactosidase e quantificação de ROS sem alteração da viabilidade celular, além de corresponder aproximadamente à CE₅₀ para esses dois ensaios. Em todos os experimentos conduzidos posteriormente, o carvacrol foi testado tanto na presença quanto na ausência da D-galactose (20 mg/mL).

Para isso, após o plaqueamento e adesão celular, as células foram divididas em grupos experimentais, basal e modelo. Na condição basal, as células foram distribuídas em dois grupos, controle (CTL) e tratadas com o carvacrol 10^{-10} M. Na

condição de modelo, as células foram distribuídas em D-galactose (DGAL) e tratadas com D-galactose e carvacrol 10^{-10} M (Figura 23).

Figura 23 - Delineamento experimental dos protocolos realizados para avaliação dos mecanismos do carvacrol em RCEC.



Legenda: RCEC: Célula endotelial cavernosa de rato; CTL: controle; DGAL: D-galactose.

Fonte: FEITOSA (2025)

4.10.2 Avaliação do efeito do carvacrol na detecção dos níveis de óxido nítrico de célula endotelial cavernosa de rato em modelo de senescência induzida por D-galactose

Para detectar os níveis de intracelular de NO, foi utilizada a sonda fluorescente sensível ao NO, DAF-FM DA, conforme descrito anteriormente (Gu; Tan; Song; Song *et al.*, 2022). O DAF-FM DA é um composto fluorescente que pode penetrar na membrana celular e, uma vez dentro da célula, é hidrolisado por esterases citosólicas não específicas. Isso resulta na formação de 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína (DAF-FM), que reage com uma forma parcialmente oxidada de

óxido nítrico (N_2O_3), formando um triazol. Este último apresenta alta intensidade de fluorescência (Metto; Evans; Barney; Culbertson *et al.*, 2013).

Portanto, para a detecção dos níveis intracelulares de NO, as células foram distribuídas em placas de 48 poços na concentração de 4×10^4 células/mL e mantidas por 24 horas em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 a 37°C para a adesão celular. Após a adesão e o período de incubação, descrito anteriormente (item 4.5 e 4.8.1), as células foram submetidas a um tratamento com ACh 10^{-5} M por quarenta e cinco minutos na presença e na ausência da D-galactose e, posteriormente, incubadas com a sonda fluorescente DAF-FM DA ($2 \mu\text{M}$) por trinta minutos, a 37°C ao abrigo da luz. As células foram lavadas com solução de PBS para remoção do excesso da sonda e levadas imediatamente para análise no microscópio de fluorescência *Nikon Eclipse Ti-E* (Nikon, Japão) acoplado ao *software NIS Elements* versão DS-U3 (Nikon, Japão). O DAF-FM DA é excitado em aproximadamente 495 nm e tem um espectro de emissão em 515 nm. Foram conduzidos quatro experimentos independentes, cada um em duplicata.

A intensidade de fluorescência foi utilizada para mensurar a concentração de NO nos diferentes grupos. Os dados foram expressos como média da intensidade de fluorescência \pm EPM, normalizados pela fluorescência emitida pelo DAF-FM DA do grupo CTL. As imagens foram analisadas utilizando o *software ImageJ®*.

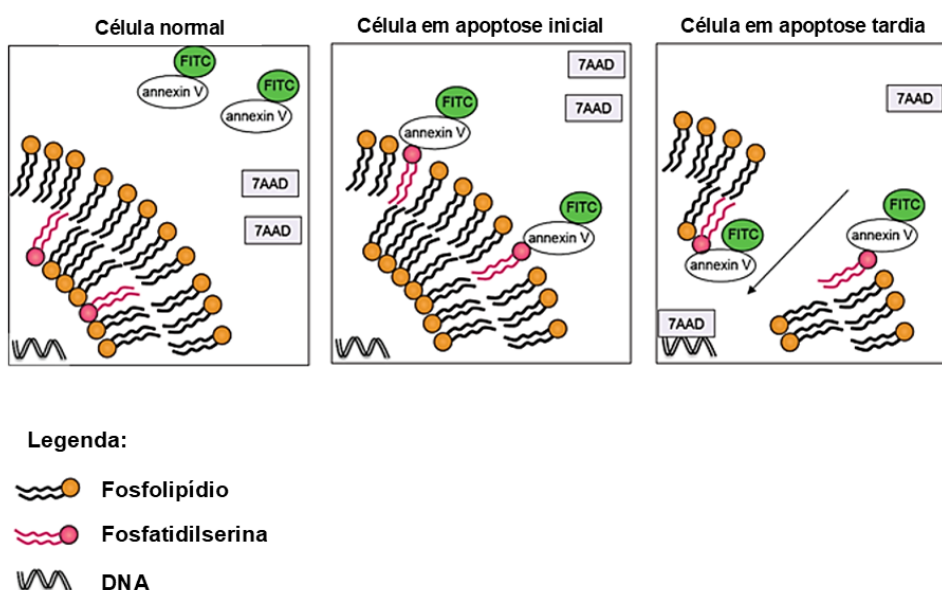
4.10.3 Avaliação do efeito do carvacrol na apoptose de RCEC em modelo de senescência induzida por D-galactose

Para detectar as taxas de apoptose, utilizamos a dupla marcação com anexina V e 7-AAD, que permite a diferenciação entre as células em apoptose inicial daquelas em apoptose tardia ou em processo de necrose (Xu; Zhang; Liao; Xuan *et al.*, 2023). A anexina V é uma proteína de ligação a fosfolipídios dependente de Ca^{2+} que tem alta afinidade pelo fosfolipídeo da membrana plasmática fosfatidilserina (Lecoeur; Ledru; Prévost; Gougeon, 1997). Na etapa inicial da apoptose, a fosfatidilserina é translocada do folheto interno da membrana para o externo, expondo assim a fosfatidilserina ao ambiente extracelular (Babes; Tofolean; Sandu; Baran *et al.*, 2018). A anexina V, por sua vez, se liga a fosfatidilserina quando exposta, indicando que uma população de células está alterando a assimetria da membrana e, conseqüentemente, iniciando o processo de apoptose (Zimmermann; Meyer, 2011).

7-AAD é um corante fluorescente vital derivado de actinomicina D, que se liga seletivamente às regiões guanina-citosina do DNA (Zembruski; Stache; Haefeli; Weiss, 2012). Enquanto a célula mantiver a integridade da sua membrana, o 7-AAD não pode ligar-se/intercalar-se ao DNA, uma vez que a sua entrada através da membrana não é possível. No entanto, quando a integridade da membrana é perdida, o 7-AAD passa a ter acesso ao DNA das células (Zimmermann; Meyer, 2011).

A coloração com a anexina V precede a perda da integridade da membrana que acompanha os últimos estágios da morte celular resultante de processos apoptóticos ou necróticos. Portanto, a coloração com anexina V é normalmente usada em conjunto com um corante vital, como o 7-AAD, para permitir a diferenciação dos estágios da apoptose (Figura 24) (Zimmermann; Meyer, 2011).

Figura 24 - Detecção de viabilidade e apoptose por coloração de anexina V e 7-AAD.



Legenda: A anexina V se liga à fosfatidilserina e 7-AAD intercala com DNA. A anexina V e o 7-AAD não podem penetrar através de uma membrana celular intacta. Em células normais, a fosfatidilserina está localizada apenas na face interna das membranas celulares. Durante o estágio inicial da apoptose, a fosfatidilserina fica exposta na parte externa da membrana. Assim, células viáveis são anexina V e 7-AAD negativas, células apoptóticas iniciais são anexina V positivas e 7-AAD negativas e células apoptóticas tardias e necróticas são anexina V e 7-AAD positivas.

Fonte: Adaptado de Zimmermann e Meyer (2011)

Células que apresentam coloração positiva para a anexina V e negativa para 7-AAD estão passando por apoptose em sua fase inicial. Células que apresentam coloração positiva para anexina V e 7-AAD estão no estágio final de apoptose. Células que apresentam coloração negativa para anexina V e 7-AAD estão viáveis e não estão passando por apoptose mensurável (Schroeder-Castagno; Del Rio-Serrato; Wilhelm; Romero-Suárez *et al.*, 2022). A coloração com anexina V/7-AAD não distingue entre células que sofreram morte apoptótica *versus* aquelas que morreram como resultado de uma via necrótica, uma vez que em ambos os casos as células mortas estão marcadas pela anexina V e 7-AAD (Zimmermann; Meyer, 2011).

Para a análise, as células foram distribuídas em placas de 24 poços na concentração de 4×10^4 células/mL e mantidas por 24 horas em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ a 37°C para a adesão celular. Após a adesão e o período de incubação, descrito anteriormente (item 4.5 e 4.8.1), as células foram removidas da placa utilizando uma solução de tripsina/EDTA a 0,05% e centrifugadas por cinco minutos à 4°C a 1500 rpm. As células foram ressuspensas em *1X Binding Buffer* (solução de trabalho) preparada a partir da diluição da solução *10X Binding Buffer* e incubadas com anexina V 5 µL/10⁶ células e 7-AAD 0,25 µg/mL por quinze minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz.

Passado o tempo de incubação, a solução *1X Binding Buffer* foi adicionada para posteriormente realizar a leitura (10.000 eventos/amostra) utilizando o citometro de fluxo FACS Canto II (BD FACSCanto™ II, Woburn, MA, EUA) dentro de 1 hora. A anexina V é detectada usando um filtro óptico centralizado próximo a 575 nm do espectro e o 7-AAD é um corante de ácido nucleico pronto para uso com fluorescência detectável na faixa do vermelho distante do espectro. Foram conduzidos seis experimentos independentes, cada um em duplicata. Os dados foram analisados utilizando o *software* FACSDIVA™.

4.10.4 Avaliação do efeito do carvacrol na distribuição de RCEC nas diferentes fases do ciclo celular em modelo de senescência induzida por D-galactose

O conteúdo de DNA foi determinado utilizando o PI/RNase (ribonuclease) para analisar a distribuição das células no ciclo celular, conforme descrito anteriormente (Ye; Feng; Zhang; Li *et al.*, 2023). O PI é um composto fluorogênico que se liga aos ácidos nucleicos de maneira estequiométrica, de forma que a quantidade de luz

emitida seja proporcional ao conteúdo de DNA das células. O PI liga-se tanto ao DNA quanto ao ácido ribonucleico (RNA), portanto este último deve ser removido por digestão com RNases. Ao quantificar o nível de DNA, pode-se avaliar a proporção de células em cada fase do ciclo celular e até mesmo a presença de células apoptóticas. A distribuição das células nas principais fases do ciclo celular é dada pela diferença no conteúdo de DNA entre as células pré-replicativas (fases G0/G1), as replicativas (fase S) e as pós-replicativas + mitóticas (fases G2/M) (Babes; Tofolean; Sandu; Baran *et al.*, 2018). O reagente PI pode ser utilizado para analisar o ciclo celular por citometria de fluxo, além de ser utilizado com anticorpos para examinar a expressão de proteínas durante o ciclo celular.

Resumidamente, as células foram distribuídas em placas de 24 poços na concentração de 4×10^4 células/mL e mantidas por 24 horas em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ a 37°C para a adesão celular. Após a adesão e o período de incubação, descrito anteriormente (item 4.5 e 4.8.1), as células foram lavadas com PBS, removidas da placa utilizando uma solução de tripsina/EDTA a 0,05% e centrifugadas por cinco minutos à 4°C a 1500 rpm. As células foram tratadas com uma solução de paraformaldeído a 1% para ressuspensão e fixação, sendo mantidas nessa solução por um período de dez minutos a temperatura ambiente. Passado esse tempo, as células foram lavadas com PBS até a remoção do paraformaldeído e foi adicionado, gota por gota, etanol (70%) gelado. As células foram incubadas a -20°C por, no mínimo, 2 horas até a análise.

Para a leitura, as células foram lavadas até a remoção do etanol, centrifugando-as por cinco minutos a 1500 rpm à 4°C. A solução de coloração PI/RNase foi adicionada na proporção de 0,5 mL de solução para 10^6 células/mL por um período de vinte minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após esse tempo, a leitura (10.000 eventos/amostra) foi realizada utilizando o citometro de fluxo FACSanto II (BD FACSCanto™ II, Woburn, MA, EUA) dentro de 1 hora. PI é detectado na faixa laranja do espectro usando um filtro de 562-588 nm. Foram conduzidos quatro experimentos independentes, cada um em duplicata. Os dados foram analisados utilizando o *software* FACSDIVA™.

4.11 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm EPM. A análise de variância ANOVA *one-way* com pós-teste de Dunnett's foi utilizada para comparações de mais de duas variáveis, que foram consideradas significativas quando o $p < 0,05$. Nas curvas concentração-resposta, os valores de efeito máximo ($E_{\text{máx}}$) e de pD_2 (logaritmo negativo da concentração que produz 50% do $E_{\text{máx}}$) foram obtidas por regressão não linear. Todas as análises realizadas foram calculadas pelo programa estatístico Graph Pad Prism® versão 9.3.0.

Resultados

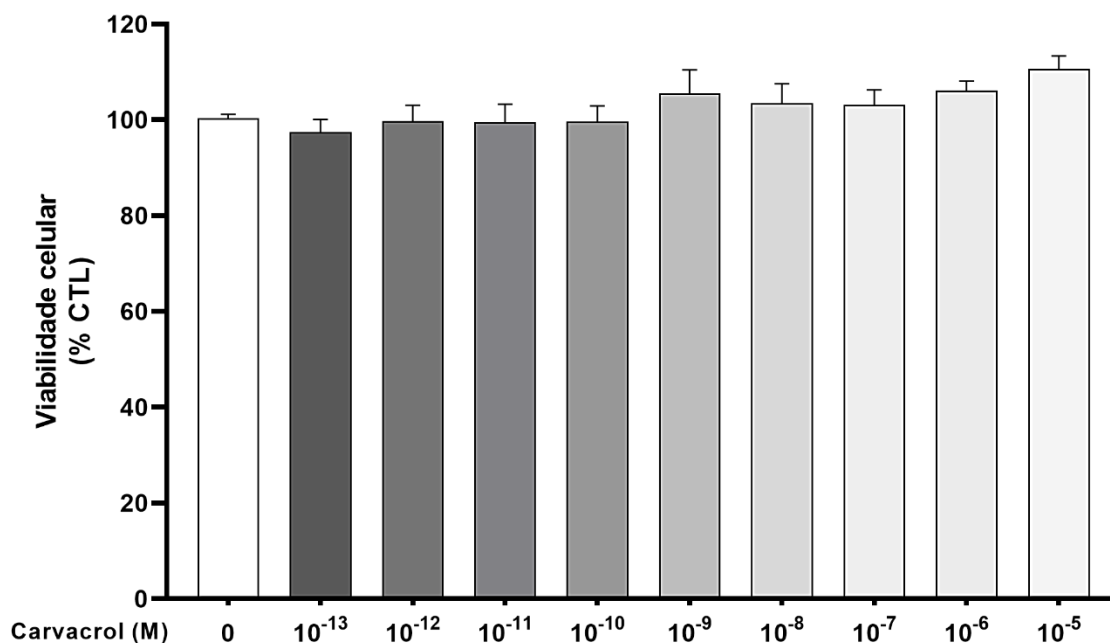
5 RESULTADOS

5.1 Avaliação dos efeitos do carvacrol sobre os marcadores da senescência em condições basais e em modelo de senescência induzida por D-galactose em célula endotelial cavernosa de rato

5.1.1 Avaliação do efeito do carvacrol sobre a viabilidade celular em célula endotelial cavernosa de rato

Em condições basais, após 48 horas de incubação das RCECs com o carvacrol (10^{-13} M: $97,45 \pm 2,64$ %, $n = 3$; 10^{-12} M: $99,81 \pm 3,24$ %, $n = 3$; 10^{-11} M: $99,52 \pm 3,76$ %, $n = 3$; 10^{-10} M: $99,65 \pm 3,29$ %, $n = 3$; 10^{-9} M: $105,53 \pm 4,93$ %, $n = 3$; 10^{-8} M: $103,44 \pm 4,11$ %, $n = 3$; 10^{-7} M: $103,09 \pm 3,18$ %, $n = 3$; 10^{-6} M: $106,17 \pm 1,94$ %, $n = 3$; 10^{-5} M: $110,65 \pm 2,68$ %, $n = 3$) ($p > 0,05$) a viabilidade celular não apresentou diferenças significativas quando comparado com o grupo controle (0) ($100,33 \pm 0,87$ %, $n = 3$) (Figura 25).

Figura 25 - Viabilidade de RCEC tratadas com carvacrol 10^{-13} – 10^{-5} M em condições experimentais basais.

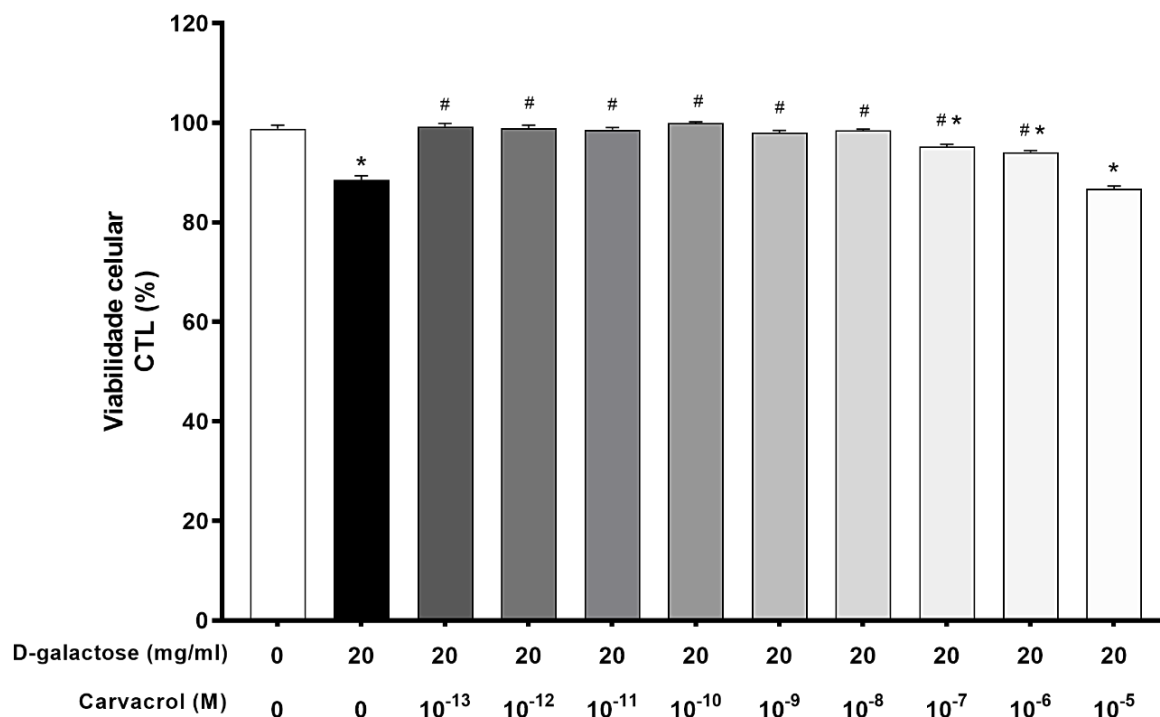


Legenda: Viabilidade celular (%) relativa ao controle de RCEC em diferentes grupos experimentais em condições basais. Grupos experimentais: 0 (controle); 10^{-13} – 10^{-5} (carvacrol 10^{-13} – 10^{-5} M). Os dados estão expressos em valores médios de viabilidade celular em relação ao controle (0) \pm EPM (n = 3). Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA *one way*, seguido de pós-teste de Dunnett's. CTL: controle.

Fonte: FEITOSA (2025)

Em condições de senescência, o grupo D-galactose 20 mg/mL ($88,55 \pm 1,37$ %, n = 3, p < 0,005) apresentou uma redução significativa da viabilidade celular quando comparado ao grupo controle ($98,82 \pm 1,20$ %, n = 3). No entanto, o tratamento com o carvacrol (10^{-13} M: $99,23 \pm 1,06$ %, n = 3; 10^{-12} M: $98,86 \pm 1,13$ %, n = 3; 10^{-11} M: $98,63 \pm 0,66$ %, n = 3; 10^{-10} M: $99,92 \pm 0,447$ %, n = 3; 10^{-9} M: $98,02 \pm 0,72$ %, n = 3; 10^{-8} M: $98,44 \pm 0,50$ %, n = 3; 10^{-7} M: $95,21 \pm 0,80$ %, n = 3; 10^{-6} M: $94,11 \pm 0,56$ %, n = 3) (p < 0,05) na presença da D-galactose melhorou significativamente a viabilidade celular, com exceção da concentração de 10^{-5} M ($86,71 \pm 1,02$ %, n = 3, p > 0,05), quando comparado ao grupo D-galactose 20 mg/mL ($88,55 \pm 1,37$ %, n = 3) (Figura 26).

Figura 26 - Viabilidade de RCEC tratadas com carvacrol 10^{-13} – 10^{-5} M em modelo de senescência induzida por D-galactose.



Legenda: Viabilidade celular (%) relativa ao controle de RCEC em diferentes grupos experimentais em modelo de senescência induzida por D-galactose. Grupos experimentais: 0 (controle); 20 (D-galactose 20 mg/ml=L); 20 e 10^{-13} – 10^{-5} (D-galactose 20 mg/mL + carvacrol 10^{-13} – 10^{-5} M). Os dados estão expressos em valores médios de viabilidade celular em relação ao controle (0) \pm EPM (n = 3). Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA one way, seguido de pós-teste de Dunnett's. *p < 0,05 vs 0 0, # p < 0,05 vs 20 0. CTL: controle.

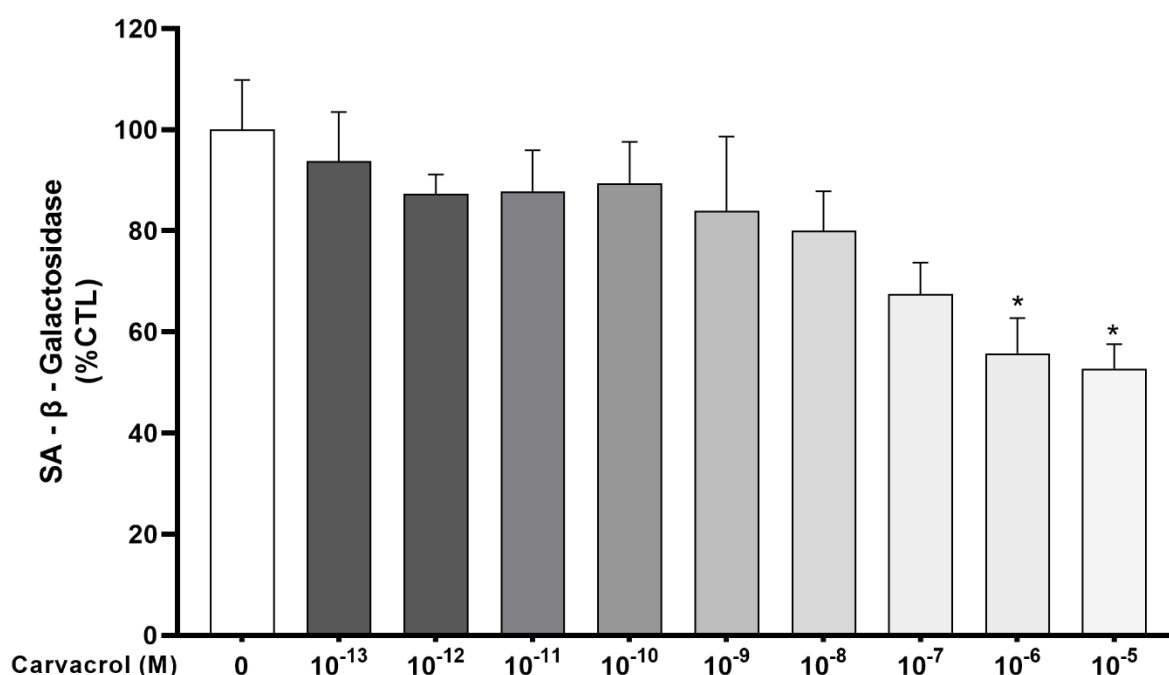
Fonte: FEITOSA (2025)

5.1.2 Avaliação do efeito do carvacrol sobre a atividade da β -galactosidase associada à senescência em célula endotelial cavernosa de rato

Em condições basais, após 48 horas de incubação das RCECs com o carvacrol a atividade da β -galactosidase diminuiu significativamente no grupo carvacrol nas concentrações 10^{-6} M ($55,75 \pm 7,00$ %, n = 6, p < 0,05) e 10^{-5} M ($52,72 \pm 4,88$ %, n = 6, p < 0,05) quando comparado ao grupo controle ($100,00 \pm 9,87$ %, n = 6), diferente das

concentrações de 10^{-13} - 10^{-7} M (10^{-13} M: $93,77 \pm 9,73$ %, $n = 6$; 10^{-12} M: $87,32 \pm 3,81$ %, $n = 6$; 10^{-11} M: $87,85 \pm 8,06$ %, $n = 6$; 10^{-10} M: $89,38 \pm 8,21$ %, $n = 6$; 10^{-9} M: $83,99 \pm 14,61$ %, $n = 6$; 10^{-8} M: $79,97 \pm 7,83$ %, $n = 6$; 10^{-7} M: $67,54 \pm 6,16$ %, $n = 6$) ($p > 0,05$) que não apresentaram nenhuma diferença significativa (Figura 27).

Figura 27 - Atividade da SA- β -galactosidase de RCEC tratadas com carvacrol 10^{-13} – 10^{-5} M em condições experimentais basais.



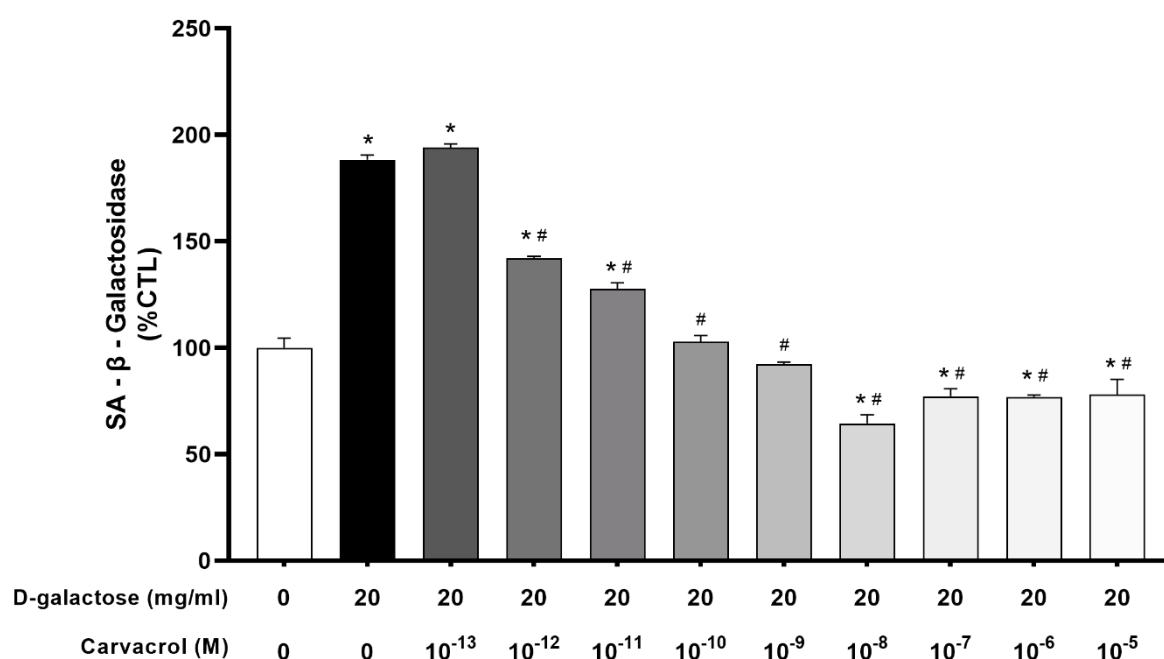
Legenda: Atividade da SA- β -galactosidase (%) relativa ao controle de RCEC em diferentes grupos experimentais em condições basais. Grupos experimentais: 0 (controle); 10^{-13} – 10^{-5} (carvacrol 10^{-13} – 10^{-5} M). Os dados estão expressos em valores médios de porcentagem de atividade da β -galactosidase em relação ao controle \pm EPM ($n = 6$). Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA *one way*, seguido de pós-teste de Dunnett's. * $p < 0,05$ vs 0. SA- β -galactosidase: Senescência associada à β -galactosidase; CTL: controle.

Fonte: FEITOSA (2025)

Em condições de senescência, o grupo D-galactose 20 mg/mL ($188,17 \pm 2,20$ %, $n = 6$, $p < 0,05$) apresentou um aumento significativo da atividade da β -galactosidase quando comparado ao grupo controle ($100,00 \pm 4,53$ %, $n = 6$). O tratamento com o carvacrol (10^{-12} M: $142,11 \pm 0,77$ %, $n = 6$; 10^{-11} M: $127,55 \pm 2,94$ %, $n = 6$) apresentou um aumento significativo da atividade da β -galactosidase quando comparado ao grupo controle ($100,00 \pm 4,53$ %, $n = 6$).

$n = 6$; 10^{-10} M: $102,78 \pm 2,98$ %, $n = 6$; 10^{-9} M: $92,24 \pm 1,04$ %, $n = 6$; 10^{-8} M: $64,40 \pm 4,11$ %, $n = 6$; 10^{-7} M: $77,19 \pm 3,51$ %, $n = 6$; 10^{-6} M: $76,93 \pm 0,87$ %, $n = 6$; 10^{-5} M: $78,08 \pm 7,07$ %, $n = 6$) ($p < 0,05$) na presença da D-galactose promoveu uma redução significativa da atividade da β -galactosidase quando comparada ao grupo D-galactose ($188,17 \pm 2,20$ %, $n = 6$), com exceção da concentração 10^{-13} M ($193,97 \pm 1,68$, $n = 6$, $p > 0,05$) que não demonstrou nenhuma diferença estatística (Figura 28).

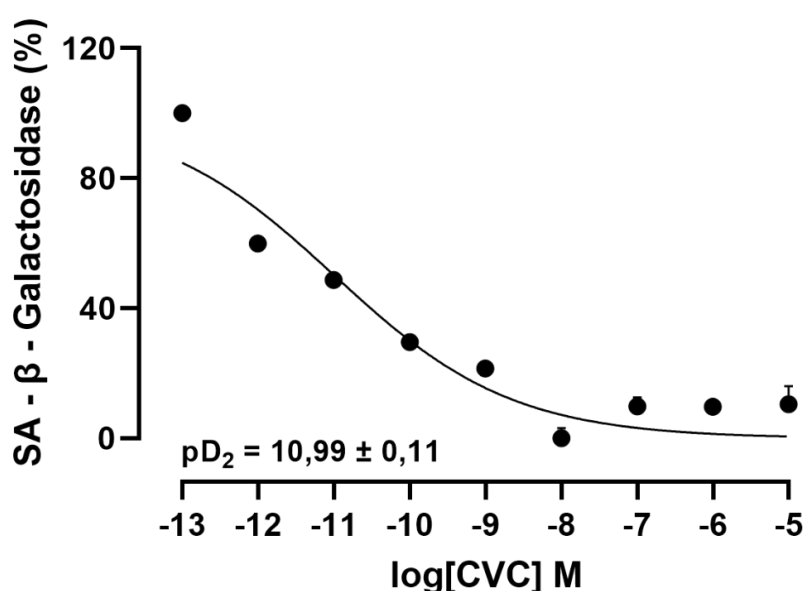
Figura 28 - Atividade da SA- β -galactosidase de RCEC tratadas com carvacrol 10^{-13} – 10^{-5} M em modelo de senescência induzida por D-galactose.



Legenda: Atividade da SA- β -galactosidase (%) relativa ao controle de RCEC em diferentes grupos experimentais em modelo de senescência induzida por D-galactose. Grupos experimentais: 0 (controle); 20 (D-galactose 20 mg/mL); 20 e 10^{-13} – 10^{-5} (D-galactose 20 mg/mL + carvacrol 10^{-13} – 10^{-5} M). Os dados estão expressos em valores médios de porcentagem de atividade da β -galactosidase em relação ao controle \pm EPM ($n = 6$). Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA *one way*, seguido de pós-teste de Dunnett's. * $p < 0,05$ vs 0 0, # $p < 0,05$ vs 20 0. SA- β -galactosidase: Senescência associada à β -galactosidase; CTL: controle.

Em condições de senescência, na presença da D-galactose, o carvacrol reduziu a atividade da β -galactosidase de forma dependente de concentração (10^{-13} M: $100,00 \pm 1,29$ %, $n = 6$; 10^{-12} M: $59,97 \pm 0,59$ %, $n = 6$; 10^{-11} M: $48,73 \pm 2,27$ %, $n = 6$; 10^{-10} M: $29,61 \pm 2,30$ %, $n = 6$; 10^{-9} M: $21,48 \pm 0,80$ %, $n = 6$; 10^{-8} M: $00,00 \pm 3,17$ %, $n = 6$; 10^{-7} M: $9,86 \pm 2,71$ %, $n = 6$; 10^{-6} M: $9,66 \pm 0,67$ %, $n = 6$; 10^{-5} M: $10,55 \pm 5,45$ %, $n = 6$), apresentando um $E_{\text{máx}}$ de $0,00 \pm 3,17$ % ($n = 6$) e pD_2 de $10,99 \pm 0,11$ ($n = 6$) (Figura 29).

Figura 29 - Curva de concentração-resposta da senescência associada a β - galactosidase em função da concentração do carvacrol em célula endotelial cavernosa de rato no modelo de senescência induzida por D-galactose.



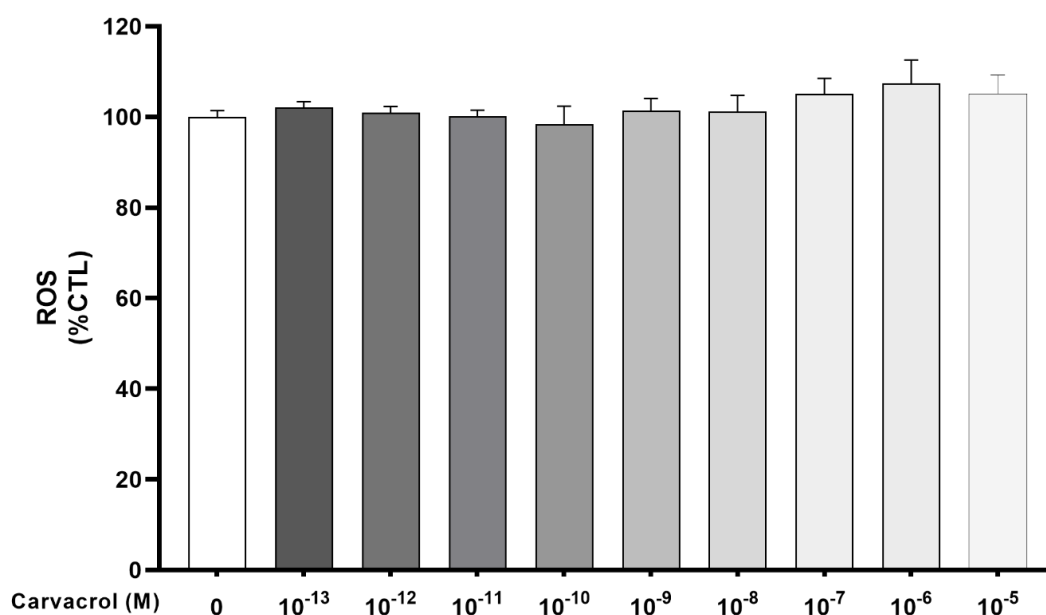
Legenda: Curva concentração-resposta da atividade da SA- β -galactosidase em função das concentrações de carvacrol (10^{-13} M – 10^{-7} M) em célula endotelial cavernosa de ratos no modelo de senescência induzida por D-galactose. Os dados estão expressos em valores médios de porcentagem de atividade da β -galactosidase em relação ao controle \pm EPM ($n = 6$). SA- β -galactosidase: Senescência associada à β -galactosidase; CVC: carvacrol; pD_2 : Logaritmo negativo da concentração que produz 50% de seu efeito máximo.

Fonte: FEITOSA (2025)

5.1.3 Avaliação do efeito do carvacrol sobre a produção de ânions superóxidos em célula endotelial cavernosa de rato

Em condições basais, após 48 horas de incubação das RCECs com o carvacrol (10^{-13} M: $102,18 \pm 1,21$ %, $n = 3$; 10^{-12} M: $100,93 \pm 1,43$ %, $n = 3$; 10^{-11} M: $100,13 \pm 1,41$ %, $n = 3$; 10^{-10} M: $98,48 \pm 3,89$ %, $n = 3$; 10^{-9} M: $101,41 \pm 2,67$ %, $n = 3$; 10^{-8} M: $101,21 \pm 3,55$ %, $n = 3$; 10^{-7} M: $105,16 \pm 3,34$ %, $n = 3$; 10^{-6} M: $107,45 \pm 5,08$ %, $n = 3$; 10^{-5} M: $105,10 \pm 4,15$ %, $n = 3$) ($p > 0,05$) a produção de ânions superóxidos não apresentou diferenças significativas quando comparado com o grupo controle (0) ($100,00 \pm 1,40$ %, $n = 3$) (Figura 30).

Figura 30 - Produção de ânions superóxidos de RCEC tratadas com carvacrol 10^{-13} – 10^{-5} M em condições experimentais basais.

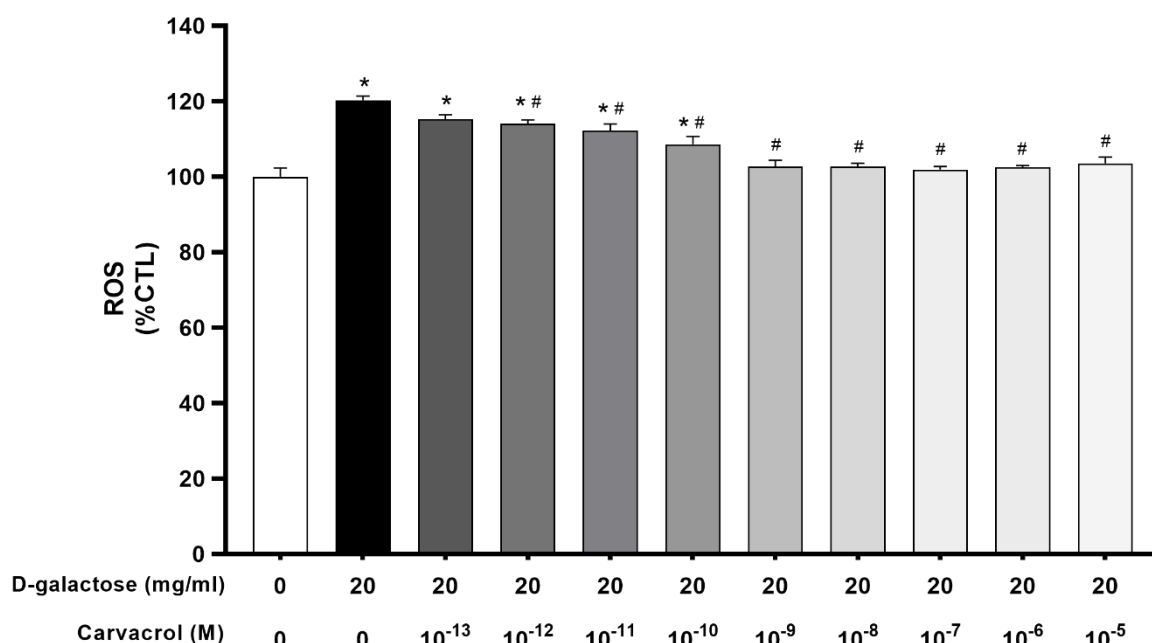


Legenda: Produção de ânions superóxidos (%) relativa ao controle de RCEC em diferentes grupos experimentais em condições basais. Grupos experimentais: 0 (controle); 10^{-13} – 10^{-5} (carvacrol 10^{-13} – 10^{-5} M). Os dados estão expressos em valores médios de porcentagem de fluorescência em relação ao controle ($0 \pm \text{EPM}$ ($n = 3$)). Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA *one way*, seguido de pós-teste de Dunnett's. ROS: Espécies reativas de oxigênio; CTL: controle.

Fonte: FEITOSA (2025)

Em condições de senescência, o grupo D-galactose 20 mg/mL ($120,27 \pm 2,61$ %, $n = 6$, $p < 0,05$) apresentou um aumento significativo da produção de ânions superóxidos quando comparado ao grupo controle ($100,00 \pm 5,78$ %, $n = 6$). O tratamento com o carvacrol (10^{-12} M: $114,01 \pm 2,54$ %, $n = 6$; 10^{-11} M: $112,23 \pm 4,29$ %, $n = 6$; 10^{-10} M: $108,64 \pm 4,98$ %, $n = 6$; 10^{-9} M: $102,69 \pm 4,12$ %, $n = 6$; 10^{-8} M: $102,66 \pm 2,14$ %, $n = 6$; 10^{-7} M: $101,93 \pm 2,05$ %, $n = 6$; 10^{-6} M: $102,53 \pm 1,22$ %, $n = 6$; 10^{-5} M: $103,54 \pm 4,10$ %, $n = 6$) ($p < 0,05$), na presença da D-galactose, promoveu uma redução significativa da produção de ânions superóxidos quando comparada ao grupo D-galactose ($120,27 \pm 2,61$ %, $n = 6$), com exceção da concentração 10^{-13} M ($115,24 \pm 2,91$, $n = 6$, $p > 0,05$) que não demonstrou nenhuma diferença estatística (Figura 31).

Figura 31 - Produção de ânions superóxidos de RCEC tratadas com carvacrol 10^{-13} – 10^{-5} M em modelo de senescência induzida por D-galactose.

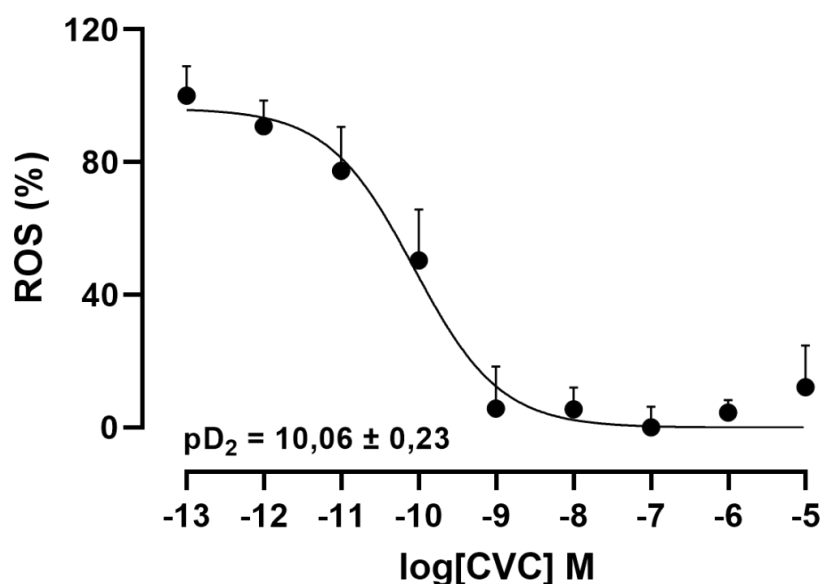


Legenda: Produção de ânions superóxidos (%) relativa ao controle de RCEC em diferentes grupos experimentais em modelo de senescência induzida por D-galactose. Grupos experimentais: 0 (controle); 20 (D-galactose 20 mg/mL); 20 e 10^{-13} – 10^{-5} (D-galactose 20 mg/mL + carvacrol 10^{-13} – 10^{-5} M). Os dados estão expressos em valores médios de porcentagem de fluorescência em relação ao controle \pm EPM ($n = 6$). Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA *one way*, seguido de pós-teste de Dunnett's. * $p < 0,05$ vs 0 0, # $p < 0,05$ vs 20 0. ROS: Espécies reativas de oxigênio; CTL: controle.

Fonte: FEITOSA (2025)

Em condições de senescência, na presença da D-galactose, o carvacrol reduziu a produção de ânions superóxidos de forma dependente de concentração (10^{-13} M: $100,00 \pm 8,92$ %, $n = 6$; 10^{-12} M: $90,77 \pm 7,82$ %, $n = 6$; 10^{-11} M: $77,42 \pm 13,16$ %, $n = 6$; 10^{-10} M: $50,40 \pm 15,29$ %, $n = 6$; 10^{-9} M: $5,71 \pm 12,64$ %, $n = 6$; 10^{-8} M: $5,51 \pm 6,59$ %, $n = 6$; 10^{-7} M: $0,00 \pm 6,31$ %, $n = 6$; 10^{-6} M: $4,48 \pm 3,76$ %, $n = 6$; 10^{-5} M: $12,13 \pm 12,59$ %, $n = 6$), apresentando um $E_{\text{máx}}$ de $0,00 \pm 6,31$ % ($n = 6$) e pD_2 de $10,06 \pm 0,23$ ($n = 6$) (Figura 32).

Figura 32 - Curva de concentração-resposta da produção de ânions superóxido em função da concentração do carvacrol em célula endotelial cavernosa de rato no modelo de senescência induzida por D-galactose.



Legenda: Curva concentração-resposta da produção de ânions superóxidos em função das concentrações de carvacrol (10^{-13} M – 10^{-7} M) em célula endotelial cavernosa de ratos no modelo de senescência induzida por D-galactose. Os dados estão expressos em valores médios de fluorescência em relação ao controle \pm EPM ($n = 6$). ROS: Espécies reativas de oxigênio; CVC: carvacrol; pD_2 : Logaritmo negativo da concentração que produz 50% de seu efeito máximo.

Fonte: FEITOSA (2025)

5.2 Predição da interação do carvacrol com alvos da via da senescência através de abordagens *in silico*

5.2.1 Simulação de docking molecular para a determinação dos valores de energia de ligação e das interações entre o carvacrol e os alvos-chave da via da senescência

O *docking* molecular foi realizado para a investigação do mecanismo de ação do carvacrol através da energia de ligação e das interações entre o monoterpene e os alvos moleculares envolvidos na via da senescência. A validação da análise foi realizada por meio do *redocking* entre o ligante-padrão cristalográfico e os alvos moleculares selecionados. Os valores de RMSD das poses de ajuste foram obtidas: 0,15 Å para o ligante ácido 3-[4-(difluorometil)fenil]-2-[(2-metilpropan-2-il)oxicarbonilamino] propanóico (APPN) co-cristalizado da proteína Keap 1/Nrf2; 0,31 Å para o ligante resveratrol co-cristalizado da proteína SIRT1; 0,18 Å para o ligante N-[4-[2-(4-fluoro-3-metilfenil)imidazo[1,2-b]piridazin-3-il]piridin-2-il]-1-hidroxi-2-metilpiridin-1-ilo-4-carboxamida (NHMC) co-cristalizado da proteína MAPK p38.

Os resultados de *docking* molecular foram gerados através da função de pontuação Moldock *score*, de maneira que os valores mais negativos indicam melhores previsões. A ancoragem molecular do carvacrol demonstrou valores de energia de interação negativos para todos os alvos selecionados, conforme demonstrado na tabela 6. Entretanto, o Moldock *score* do carvacrol apresentou valores de energia de ligação mais negativos ou mais próximos dos ligantes-padrão para os seus respectivos alvos moleculares NADPH oxidase e p53. O Moldock *score* do carvacrol (-60,55 kJ/mol) para o alvo p53 apresentou um valor de energia de ligação mais negativo quando comparado com o ligante-padrão, a Pifitrina- α , (-60,29 kJ/mol). Enquanto que o *score* do carvacrol para o alvo NADPH oxidase (-57,66 kJ/mol) revelou um valor próximo aos do seu respectivo ligante, apocinina (-58,68 kJ/mol).

Tabela 6 - Energia de ligação (kJ/mol) do carvacrol e ligantes com alvos-chave das vias de senescência para a função de pontuação Moldock score.

Alvo molecular	MolDock score Energia de ligação (kJ/mol)		Resíduos críticos
	Carvacrol	Ligante-padrão	
NADPH Oxidase	-57,66	-58,68	Arg 202, Leu 199 e Leu 208
Nrf2/Keap 1	-53,89	-136,09	Ala 556 e Arg 415
p53	-60,55	-60,29	Arg 273 e Arg 248
SIRT1	-49,69	-66,32	Pro 212 e Ala 295
mTOR	-69,50	-172,38	-
MAPK p38	-66,82	-191,5	Ala51, Val 38 e Phe 169
PAI-1	-76,71	-162,68	Arg 76

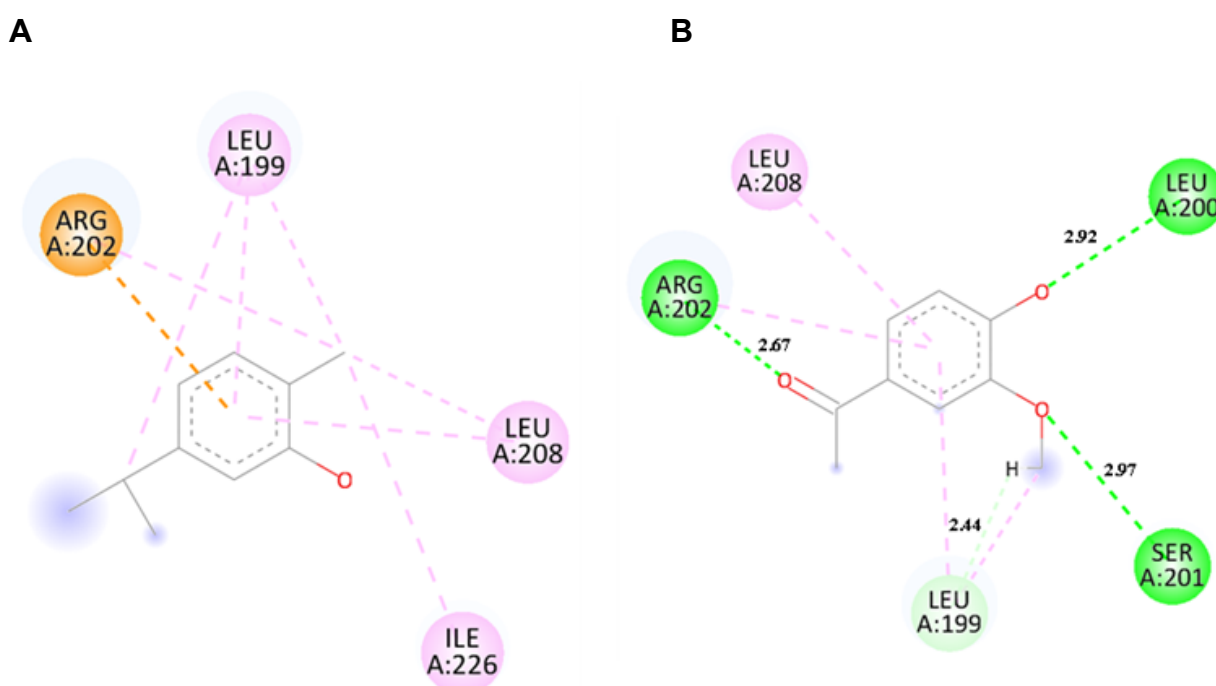
Legenda: Valores de energia de ligação do carvacrol e ligantes com alvos chave das vias de sinalização. Em negrito encontram-se os valores de energia em que o carvacrol apresentou energia menor ou próxima quando comparado ao ligante-padrão. NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato; Nrf2: fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2; Keap 1: proteína 1 associada a ECH do tipo Kelch; SIRT1: sirtuína 1; mTOR: alvo mecanicista da rapamicina; MAPK: proteína cinase ativada por mitógeno; PAI-1: inibidor-1 do ativador do plasminogênio. Arg: arginina; Leu: leucina; Ala: alanina; Pro: prolina; Val: valina; Phe: fenilalanina.

Fonte: FEITOSA (2025)

Diante disso, a interação molecular dos alvos que se destacaram, NADPH oxidase e p53, foi avaliada, revelando que as ligações possuem diferentes graus de especificidade. O mapa de interação molecular entre a enzima NADPH oxidase e o

composto carvacrol demonstrou interações apolares, pois foram observadas interações no anel benzênico e na cadeia carbônica, sendo estas interações correspondentes aos tipos alquil (linha tracejada em rosa claro) por meio dos resíduos Leucina (Leu) 199 (3 interações), Leu 208 (2 interações) e Isoleucina (Ile) 226 (1 interação), além da Arginina (Arg) 202 (1 interação) (Figura 45A). O outro tipo de interação visualizada correspondeu a interação estérica por meio das interações do tipo pi-cátion (linha tracejada em laranja) através do resíduo Arg 202 (1 interação) (Figura 33A). O ligante-padrão da NADPH oxidase, a apocinina, apresentou interações semelhantes do tipo hidrofóbicas Arg 202, Leu 199 e Leu 208 (Figura 33B).

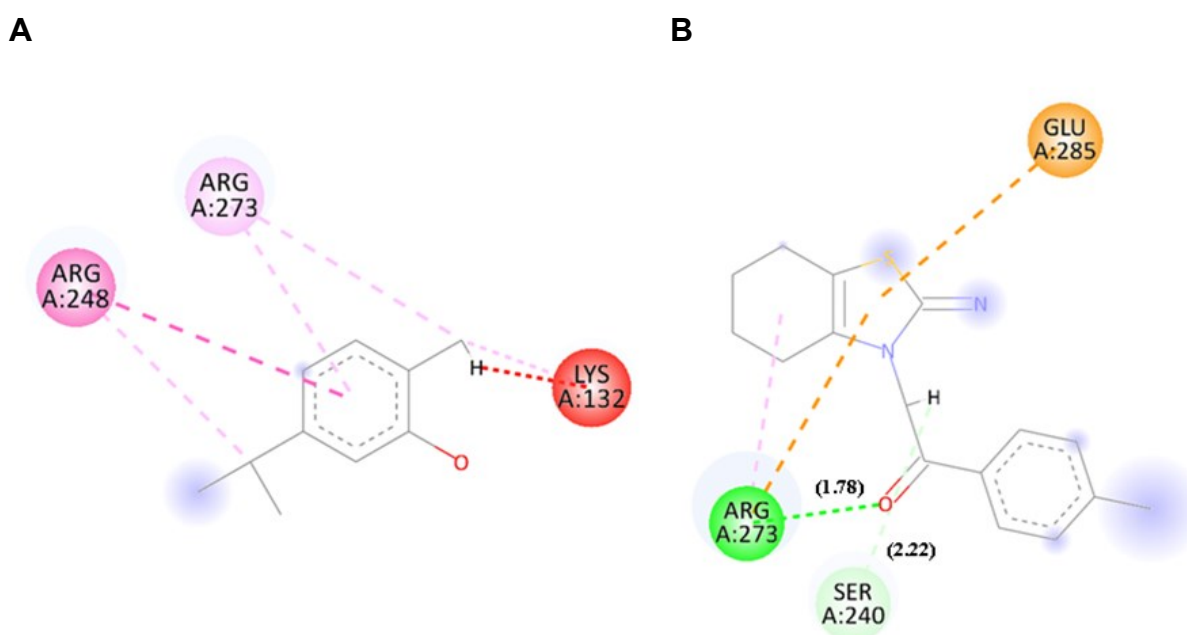
Figura 33 - Mapa de interação molecular da enzima NADPH oxidase com o carvacrol (A) e o ligante-padrão apocinina (B).



Legenda: Interações moleculares em 2D entre os compostos carvacrol (A) e apocinina (B) com a enzima NADPH oxidase (PDB: 1W6X). Rosa claro: interação alquil; verde claro: interação carbono-hidrogênio; verde escuro: interação convencional de hidrogênio; laranja: interação Pi-cátion. Resíduos: Arg (Arginina); Leu (Leucina); Ile (Isoleucina) e Ser (Serina).

O mapa de interação molecular para o alvo p53 com o carvacrol demonstrou interações do tipo apolares, pois apresentou ligações no anel benzeno e na cadeia carbônica, sendo estas interações do tipo alquil (linha tracejada rosa claro) e estabelecidas nos resíduos Arg 273 (2 interações), Lisina (Lys) 132 (1 interação) e Arg 248 (1 interação), como também foi revelada uma interação do tipo amida Pi-stacked (linha tracejada rosa escuro) no resíduo Arg 248. A última interação foi do tipo não favorável (linha tracejada vermelha) no resíduo Lys 132 (Figura 34A). O ligante-padrão pfitirina revelou interações do tipo Pi-cátion no resíduo Ácido glutâmico (Glu) 285 (1 interação); interação convencional de hidrogênio estabelecida pelo resíduo Arg 273 (1 interação); interação do tipo carbono-hidrogênio no resíduo Serina (Ser) 240 (1 interação) (Figura 34B).

Figura 34 - Mapa de interação molecular do alvo p53 com o carvacrol (A) e o ligante-padrão pfitirina (B).



Legenda: Interações moleculares em 2D entre os compostos carvacrol (A) e pfitirina (B) com o alvo p53 (PDB: 1PUT). Rosa claro: interação alquil; rosa escuro: interação Amida Pi-stacked; verde claro: interação carbono-hidrogênio; verde escuro: interação convencional de hidrogênio; laranja: interação Pi-cátion; vermelho: interação não favorável. Resíduos: Arg (Arginina); Glu (Ácido glutâmico); Lys (lisina); Ser (serina).

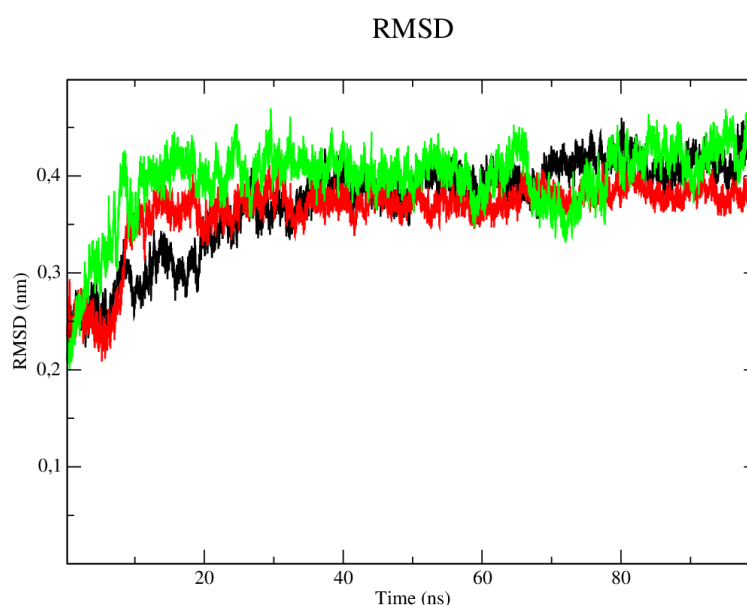
Fonte: FEITOSA (2025)

5.2.2 Simulação de dinâmica molecular entre o carvacrol e os alvos-chave da via da senescência a NADPH oxidase e o p53

As simulações de dinâmica molecular foram realizadas para investigar a estabilidade das ligações dos alvos que se destacaram no *Docking molecular*, sendo eles a NADPH oxidase e o p53. Para isso, foram calculados o RMSD e a flutuação quadrática média (RMSF) para os átomos de C α dos alvos moleculares complexados com o seu respectivo ligante-padrão e o carvacrol. Os valores mais baixos de RMSD e uma menor ocorrência de flutuações expressam uma maior estabilidade de ligação.

Para o alvo molecular p53 (linha preta) (Figura 35), o complexo formado com o carvacrol (linha vermelha) apresentou valores de RMSD correspondentes a 0,37 nm desde o período de 10 ns até o tempo final da simulação. Enquanto que o complexo formado com o ligante-padrão, a pfitirina (linha verde), o valor de RMSD obtido foi de 0,47 nm (Figura 35).

Figura 35 - RMSD do alvo molecular p53 e complexado com o carvacrol e o ligante-padrão pfitirina.

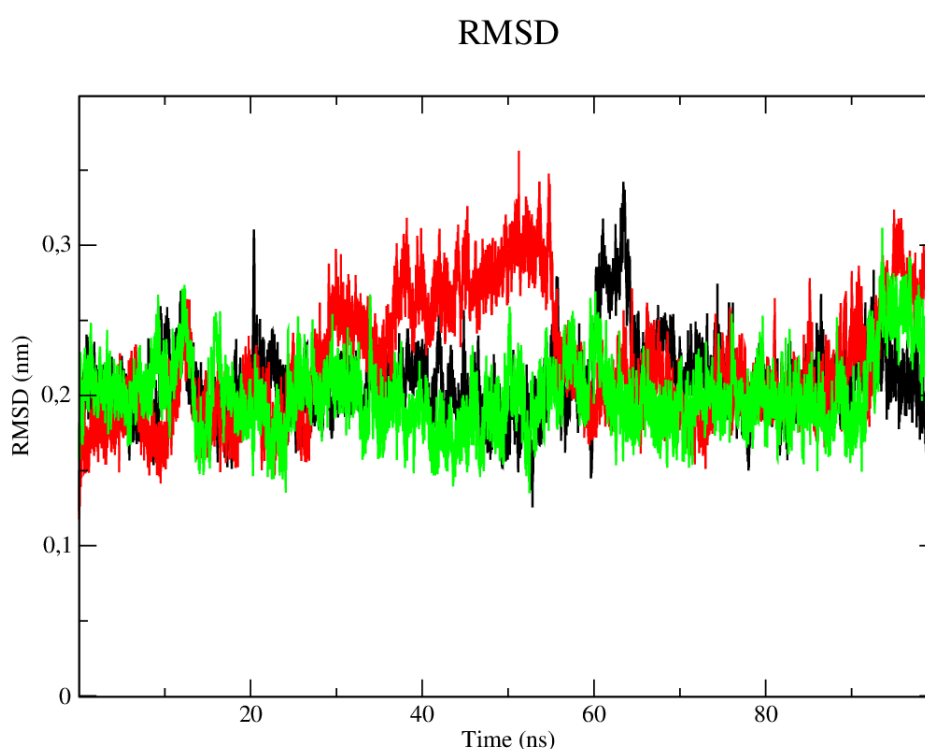


Legenda: Desvio quadrático médio (RMSD) dos átomos de C α da proteína p53 (linha preta) e complexado com o carvacrol (linha vermelha) e pfitirina (linha verde).

Fonte: FEITOSA (2025)

Para o alvo molecular NADPH oxidase (linha preta) (Figura 36), o complexo formado com o carvacrol (linha vermelha) apresentou valores de RMSD correspondentes a 0,39 nm, sendo observada uma alta quantidade de flutuações, enquanto que o complexo formado com o ligante-padrão, a apocinina (linha verde), o valor de RMSD obtido foi de 0,30 nm (Figura 36).

Figura 36 - RMSD do alvo molecular NADPH oxidase e complexado com o carvacrol e o ligante-padrão apocinina.



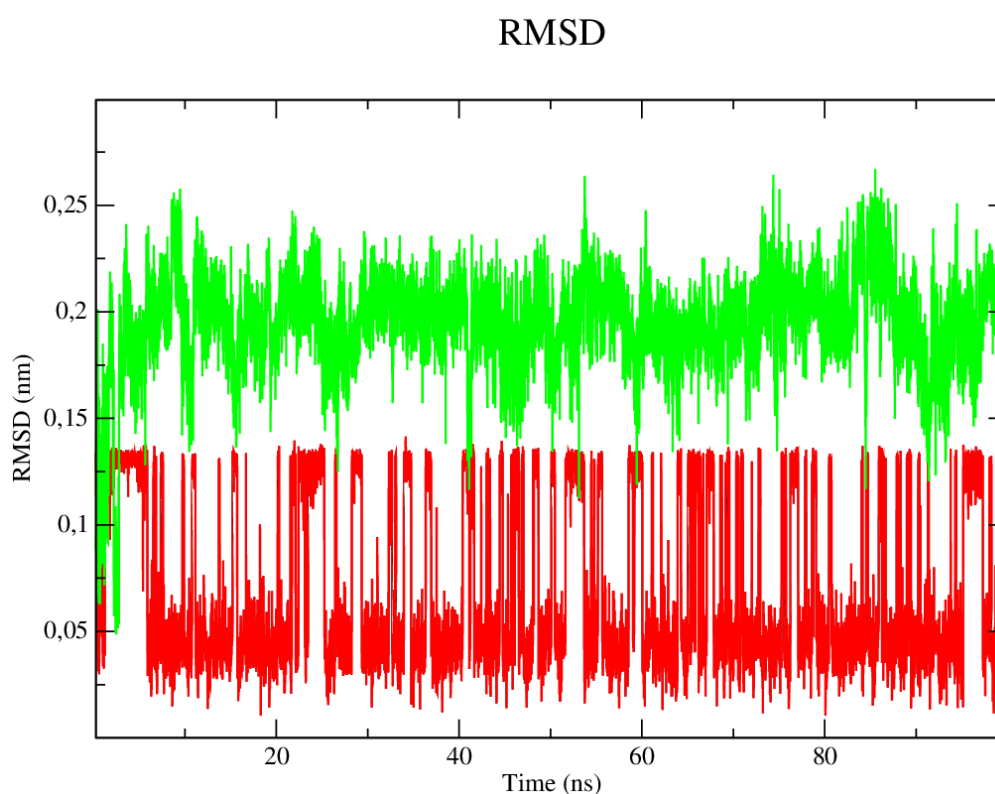
Legenda: Desvio quadrático médio (RMSD) dos átomos de C α da proteína nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (linha preta) e complexado com o carvacrol (linha vermelha) e apocinina (linha verde).

Fonte: FEITOSA (2025)

A estabilidade dos complexos proteicos foi avaliada mediante alterações de temperatura, pressão e da influência de solventes, através da métrica de RMSD. A

proteína p53 apresentou um valor de RMSD correspondente a 0,14 nm para o carvacrol (linha vermelha), enquanto que o ligante-padrão pfitirina (linha verde) expressou um valor de 0,26 nm (Figura 37).

Figura 37 - RMSD do alvo molecular p53 complexado ao carvacrol e ao ligante-padrão pfitirina, mediante alterações de temperatura, pressão e da influência de solventes.

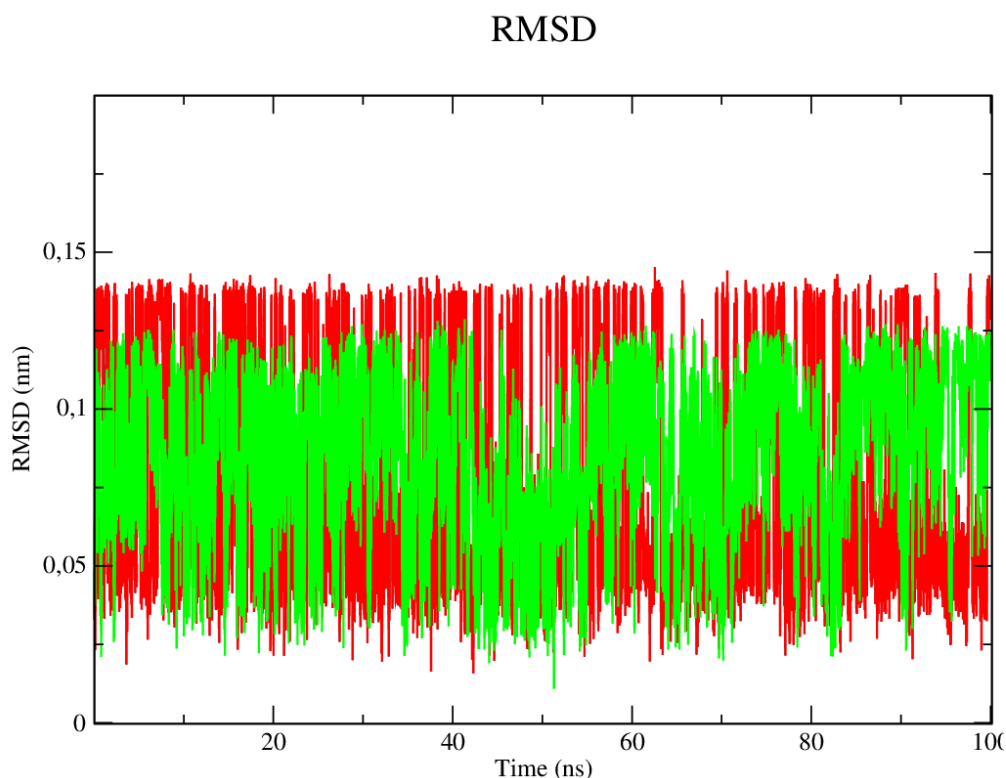


Legenda: Desvio quadrático médio (RMSD) dos átomos de Ca da proteína p53 complexada ao carvacrol (linha vermelha) e pfitirina (linha verde).

Fonte: FEITOSA (2025)

A proteína NADPH oxidase apresentou um valor de RMSD correspondente a 0,14 nm para o carvacrol (linha vermelha), enquanto que o ligante-padrão apocinina (linha verde) expressou um valor de 0,13 nm (Figura 38).

Figura 38 - RMSD do alvo molecular NADPH oxidase complexado ao carvacrol e ao ligante-padrão apocinina, mediante alterações de temperatura, pressão e da influência de solventes.



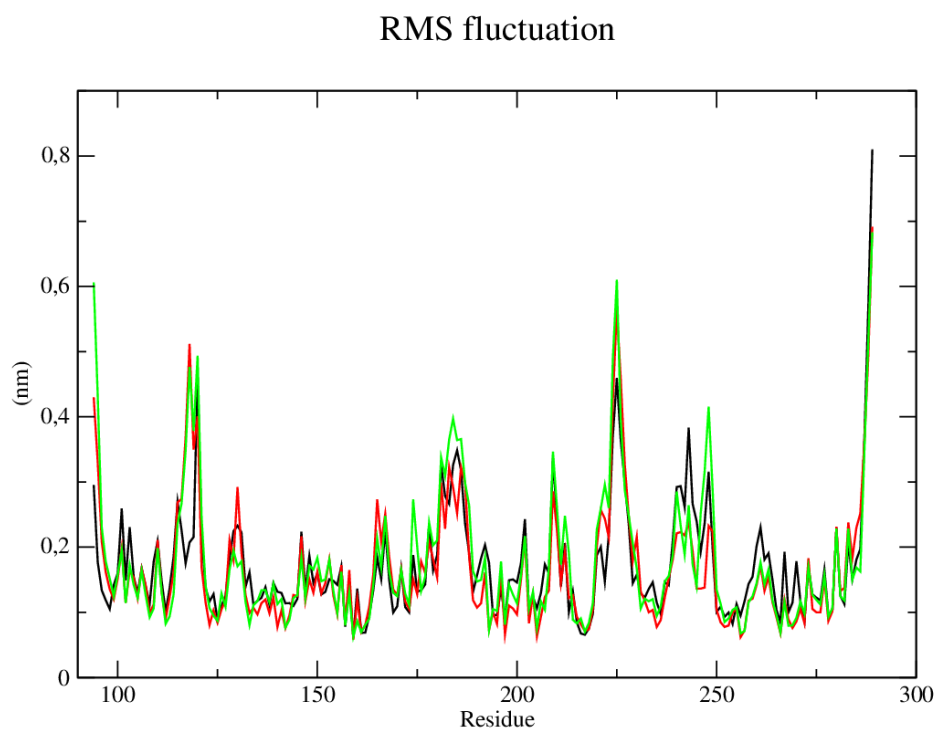
Legenda: Desvio quadrático médio (RMSD) dos átomos de C α da proteína nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase complexada ao carvacrol (linha vermelha) e apocinina (linha verde).

Fonte: FEITOSA (2025)

A fim de avaliar a flexibilidade dos resíduos de aminoácidos que compõem os complexos, e, se esses resíduos podem influenciar na mudança conformacional dos alvos moleculares, foi avaliada a métrica RMSF de cada aminoácido que compõe a proteína. Os valores de RMSF acima de 0,3 nm sugerem uma alta flexibilidade, podendo implicar em uma mudança conformacional no alvo.

A proteína p53 apresentou valores de RMSF acima de 0,3 nm para os resíduos 120, 186, 224-226, 287-289 (Figura 39).

Figura 39 - RMSF do alvo molecular p53 e dos complexos com o carvacrol e o ligante-padrão pfitirina.

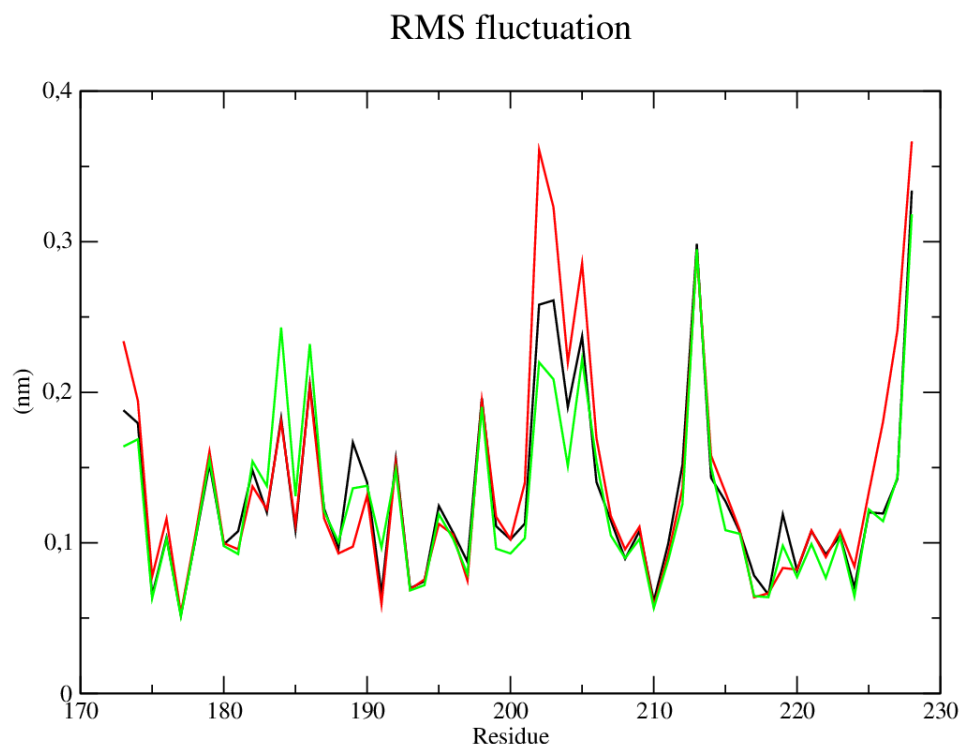


Legenda: Flutuações da raiz quadrada média (RMSF) da proteína p53 (linha preta) e dos seus complexos com o carvacrol (linha vermelha) e pfitirina (linha verde).

Fonte: FEITOSA (2025)

A proteína NADPH oxidase apresentou valores de RMSF acima de 0,3 nm para o resíduo 228 (Figura 40).

Figura 40 - RMSF do alvo molecular NADPH oxidase e dos complexos com o carvacrol e o ligante-padrão apocinina.



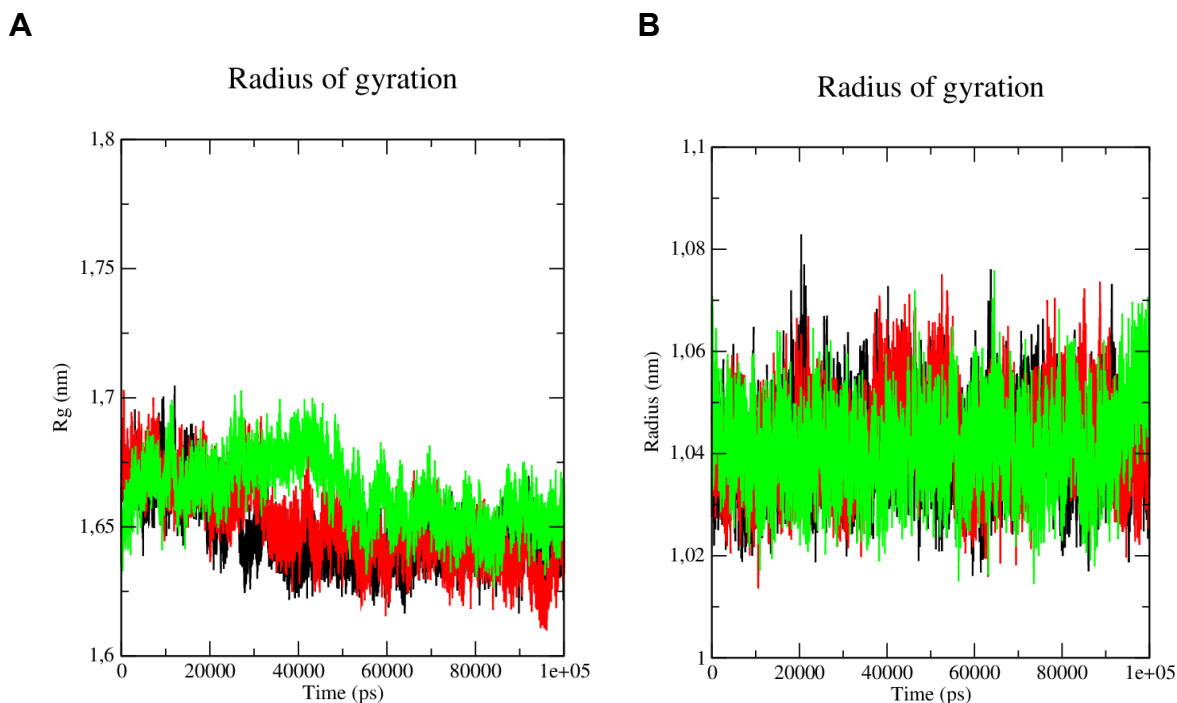
Legenda: Flutuações da raiz quadrada média (RMSF) da proteína nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (linha preta) e dos seus complexos com o carvacrol (linha vermelha) e apocinina (linha verde).

Fonte: FEITOSA (2025)

Adicionalmente, também foi avaliada a evolução dos níveis de empacotamento proteico do alvo molecular isolado e complexado com o carvacrol e o ligante-padrão. Para isso, foi utilizada a métrica de valores do raio de giro, que fornece uma ideia de quão compacta ou estendida é uma molécula durante uma simulação de dinâmica molecular, fornecendo informações sobre a conformação, a estabilidade, as interações e a flexibilidade das moléculas em análise.

Os alvos moleculares p53 (linha preta) (Figura 41A) e NADPH oxidase (linha preta) (Figura 41B) complexados com o carvacrol (linha vermelha) e os seus respectivos ligantes-padrão (linha verde) não apresentaram variações em relação à proteína isolada.

Figura 41 - Raio de giro (Rg) do alvo molecular p53 (A) e NADPH oxidase (B) e dos complexos com o carvacrol e o ligante-padrão pfitirina.



Legenda: Raio de giro (Rg) da proteína p53 (linha preta) (A) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (linha preta) (B) e dos seus complexos com o carvacrol (linha vermelha) e pfitirina (linha verde).

Fonte: FEITOSA (2025)

As energias de interação Coulomb e Lennard-Jones dos complexos proteína-ligante foram calculadas para fornecer informações sobre a estabilidade das interações dentro do sítio ativo. Com base nos cálculos da energia de Coulomb para os alvos p53 e NADPH oxidase, o carvacrol apresentou uma energia de ligação mais negativa (-86,543; -63,762; respectivamente) quando comparado aos ligantes-padrão (-43,093; -47,362; respectivamente) (Tabela 7). Entretanto, para a energia de interação de Lennard-Jones dos alvos p53 e NADPH oxidase, o carvacrol apresentou um valor mais positivo (-39,9326; -48,441; respectivamente) quando comparado aos ligantes-padrão (-137,045; -52,606; respectivamente) (Tabela 7).

Tabela 7 - Energia de interação Coulommb e Lennard-Jones para o carvacrol e os ligantes-padrão dos alvos p53 e NADPH oxidase.

Energia de interação	p53		NADPH Oxidase	
	Carvacrol	Pfitirina	Carvacrol	Apocinina
Coulomb	-86,543	-43,093	-63,762	-47,362
Lennard-Jones	-39,9326	-137,045	-48,441	-52,606

Legenda: Energia de interação Coulommb e Lennard-Jones para o carvacrol e os ligantes-padrão dos alvos p53 (pfitirina), nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (apocinina) e NF-κB (emetine). Em negrito, destaca-se a menor energia.

Fonte: FEITOSA (2025)

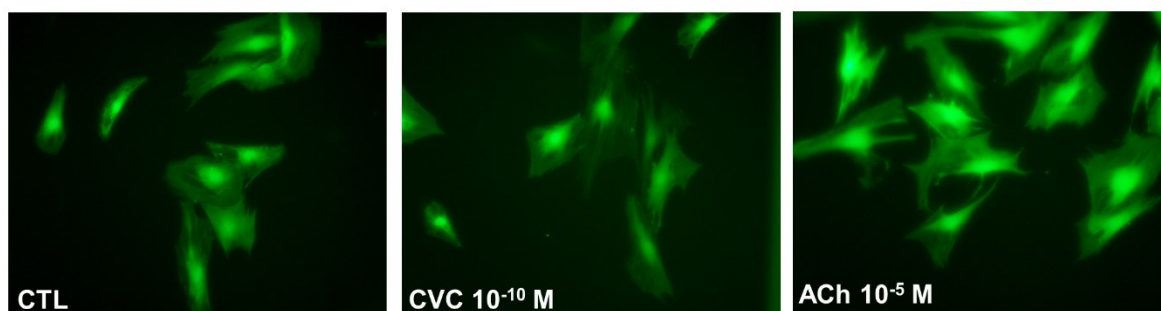
5.3 Avaliação dos mecanismos do carvacrol sobre as vias de senescência induzida por D-galactose em célula endotelial cavernosa de ratos

5.3.1 Avaliação do efeito do carvacrol na detecção dos níveis de óxido nítrico em célula endotelial cavernosa de rato em condições basais

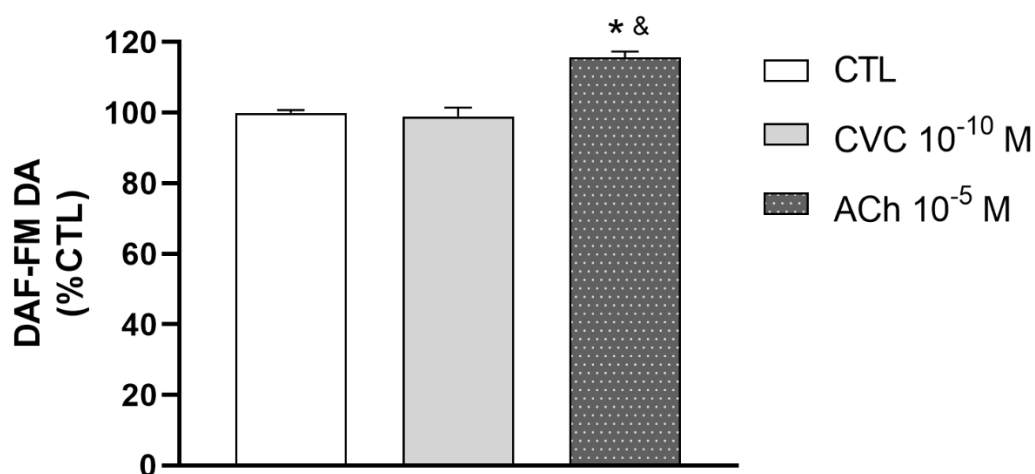
Em condições basais, após 48 horas de incubação das RCECs com o carvacrol (10^{-10} M: $98,96 \pm 2,51$ %, $n = 4$) ($p > 0,05$), a produção de NO não apresentou diferenças significativas quando comparado com o grupo controle ($100,00 \pm 0,75$ %, $n = 4$). Em contrapartida, a ACh (10^{-5} M: $115,69 \pm 1,68$ %, $n = 4$) ($p < 0,05$) aumentou significativamente a produção de NO quando comparado ao grupo controle (Figura 42).

Figura 42 - Imagem representativa (A) e gráfico estatístico (B) da intensidade de fluorescência (%) da sonda DAF-FM DA relativa ao controle em célula endotelial cavernosa de ratos tratada com carvacrol 10^{-10} M e ACh 10^{-5} M em condições basais.

A



B



Legenda: Intensidade de fluorescência emitida pela sonda DAF-FM DA (%) relativa ao controle de RCEC em condições basais. Grupos experimentais: CTL (controle); CVC 10^{-10} (carvacrol 10^{-10} M); acetilcolina 10^{-5} (acetilcolina 10^{-5} M). Objetiva 20x. Os dados estão expressos em valores médios de porcentagem de fluorescência em relação ao controle \pm EPM ($n = 4$). Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA *one way*, seguido de pós-teste de Dunnett's. * $p < 0,05$ vs CTL, & $p < 0,05$ vs CVC 10^{-10} .

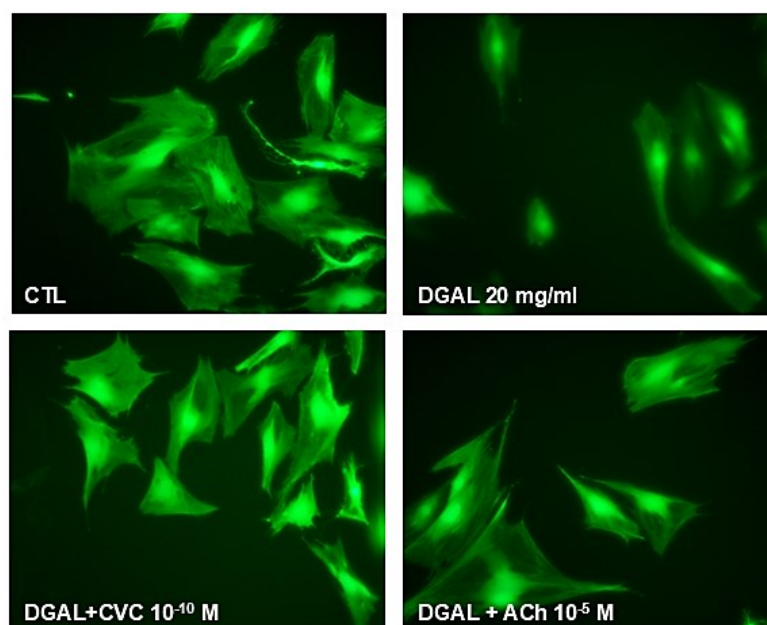
Fonte: FEITOSA (2025)

5.3.2 Avaliação do efeito do carvacrol na detecção dos níveis de óxido nítrico em célula endotelial cavernosa de rato no modelo de senescência induzida por D-galactose

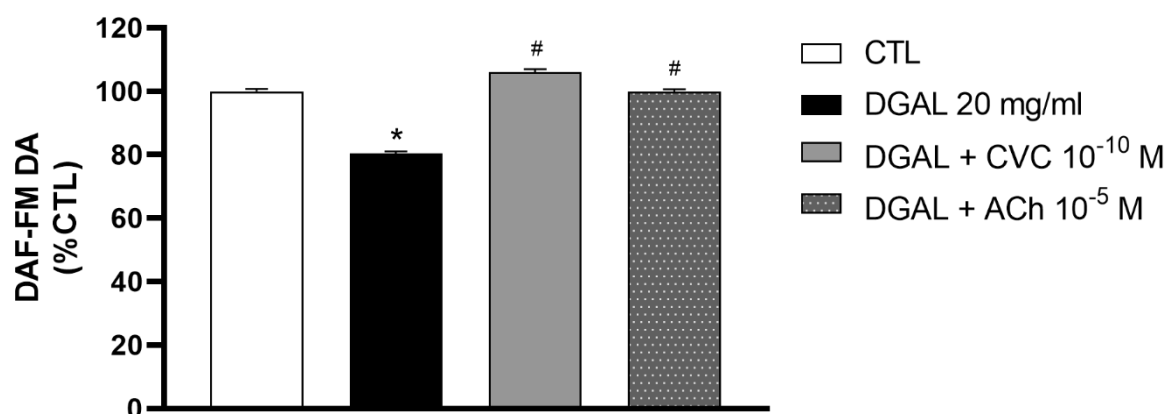
Em condições de senescência, o grupo D-galactose 20 mg/mL ($80,30 \pm 0,786$ %, $n = 4$, $p < 0,05$) apresentou uma redução significativa da intensidade de fluorescência emitida pela sonda DAF-FM DA quando comparado ao grupo controle ($100,00 \pm 0,752$ %, $n = 4$). Entretanto, o tratamento com o carvacrol (DGAL+ CVC 10^{-10} M: $106,08 \pm 0,846$ %, $n = 4$, $p < 0,05$) e com a ACh (DGAL+ ACh 10^{-5} M: $99,86 \pm 0,77$ %, $n = 4$, $p < 0,05$) promoveu um aumento significativo da intensidade de fluorescência emitida pela sonda DAF-FM DA quando comparado ao grupo D-galactose (Figura 43).

Figura 43 - Imagem representativa (A) e gráfico estatístico (B) da intensidade de fluorescência (%) da sonda DAF-FM DA relativa ao controle de célula endotelial cavernosa de ratos tratada com carvacrol 10^{-10} M e ACh 10^{-5} M em modelo de senescência induzida por D-galactose.

A



B



Legenda: Intensidade de fluorescência emitida pela sonda DAF-FM DA (%) relativa ao controle de RCEC em modelo de senescência induzida por D-galactose. Grupos experimentais: CTL (controle); DGAL 20 mg/mL (D-galactose 20 mg/mL); DGAL + CVC 10^{-10} (D-galactose 20 mg/mL + carvacrol 10^{-10} M); DGAL + acetilcolina 10^{-5} (D-galactose 20 mg/mL + acetilcolina 10^{-5} M). Objetiva 20x. Os dados estão expressos em valores médios de

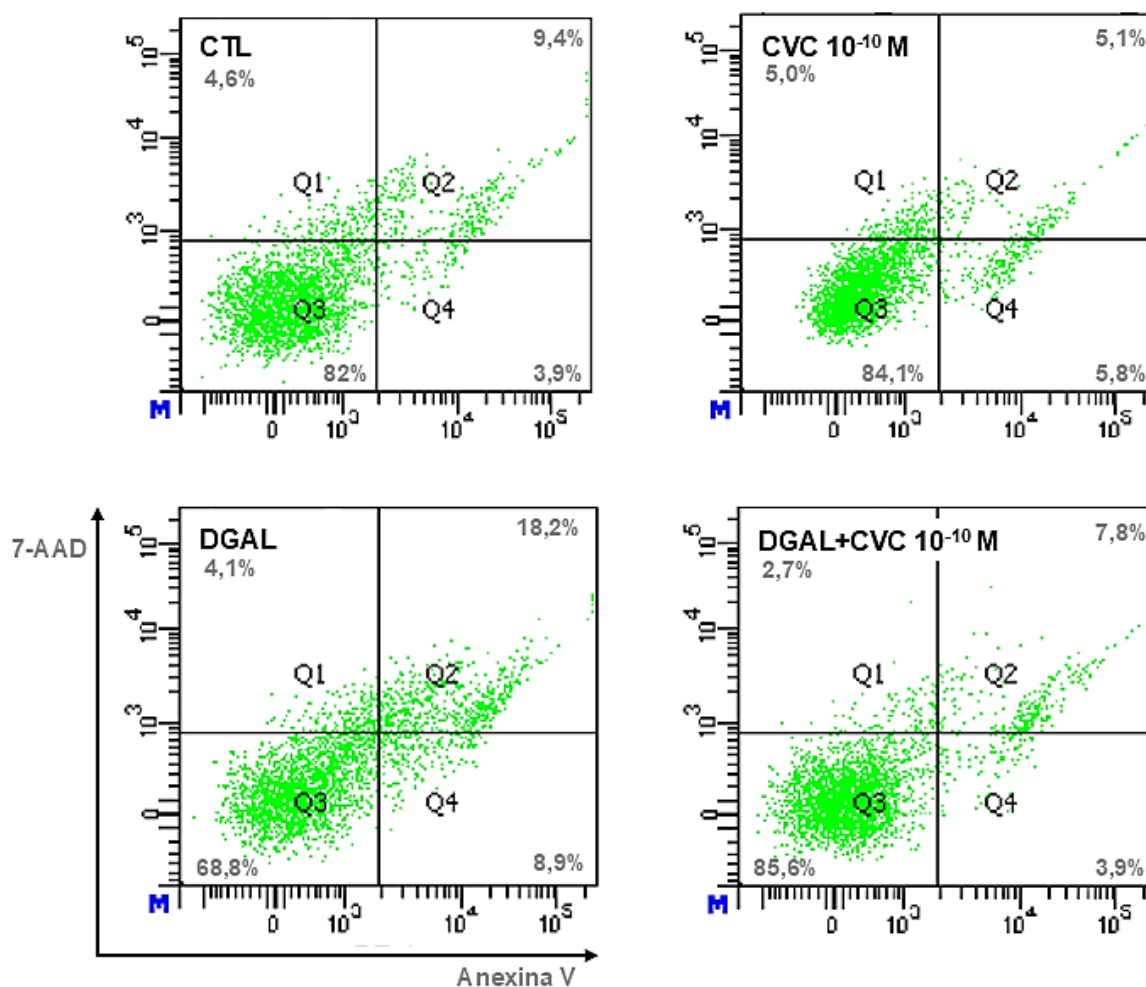
porcentagem de fluorescência em relação ao controle \pm EPM ($n = 4$). Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA *one way*, seguido de pós-teste de Dunnett's. * $p < 0,05$ vs CTL, # $p < 0,05$ vs DGAL.

Fonte: FEITOSA (2025)

5.3.1 Avaliação do efeito do carvacrol na apoptose de RCEC

Após 48 horas de incubação das RCECs, a dupla marcação com anexina V e 7-AAD permitiu a visualização de quatro quadrantes que representam diferentes populações celulares (Figura 44).

Figura 44 - *Dotplots* representativos de célula endotelial cavernosa de ratos tratada com carvacrol 10^{-10} M em condições basais e em modelo de senescência induzida por D-galactose, duplamente marcada com anexina V e 7-AAD.

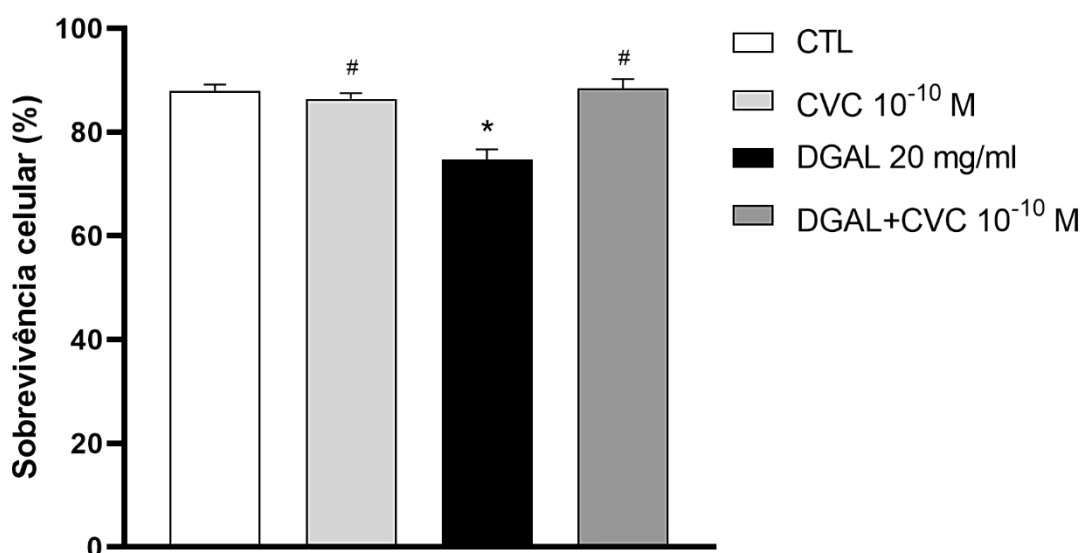


Legenda: *Dotplots* representativos de RCEC em condições basais e em modelo de senescência induzida por D-galactose duplamente marcada com anexina V e 7-AAD obtidos por análise de citometria de fluxo. Os *dotplots* foram divididos em quatro quadrantes que representam diferentes populações celulares: células mortas (Q1), células em apoptose tardia (Q2); células viáveis (Q3); células em apoptose inicial (Q4). Grupos experimentais: CTL (controle); CVC 10^{-10} (carvacrol 10^{-10} M); DGAL 20 mg/mL (D-galactose 20 mg/mL); DGAL + CVC 10^{-10} (D-galactose 20 mg/mL + carvacrol 10^{-10} M).

Fonte: FEITOSA (2025)

Na análise da taxa de sobrevivência celular, o grupo D-galactose 20 mg/mL ($74,72 \pm 1,95 \%$, $n = 6$, $p < 0,05$) apresentou uma redução significativa quando comparado ao grupo controle ($88,01 \pm 1,12 \%$, $n = 6$). Entretanto, o tratamento com o carvacrol, tanto em condições basais (CVC 10^{-10} M: $86,38 \pm 1,13 \%$, $n = 6$, $p < 0,05$) quanto em modelo de senescência (DGAL+ CVC 10^{-10} M: $88,40 \pm 1,84 \%$, $n = 6$, $p < 0,05$), promoveu um aumento significativo da taxa de sobrevivência celular quando comparado ao grupo D-galactose (Figura 45).

Figura 45 - Taxa de sobrevivência (%) de RCEC tratadas com carvacrol 10^{-10} M, em condições basais e em modelo de senescência induzida por D-galactose.

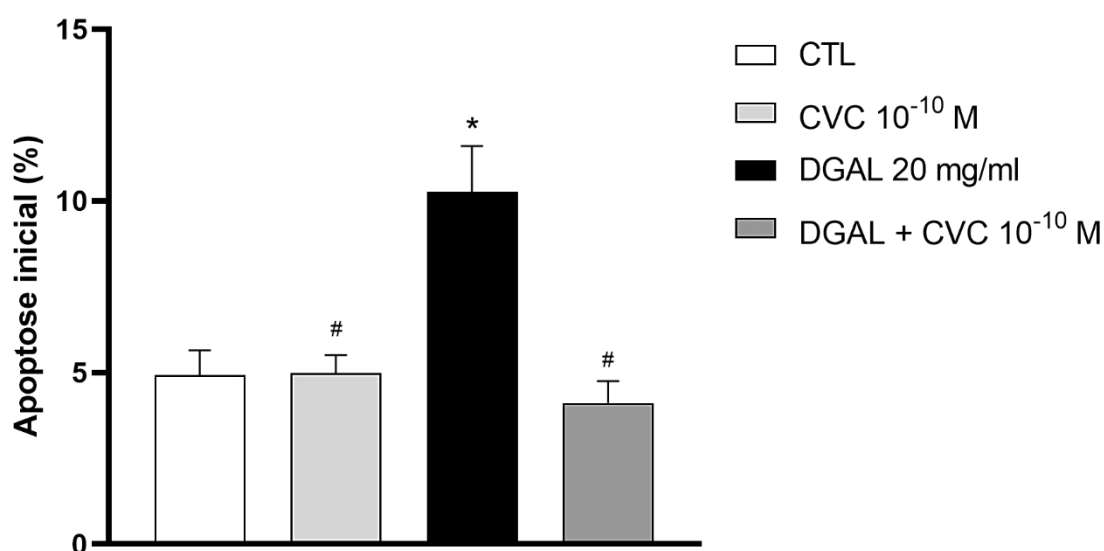


Legenda: Taxa de sobrevivência (%) de RCEC em condições basais e em modelo de senescência induzida por D-galactose. Grupos experimentais: CTL (controle); CVC 10^{-10} (carvacrol 10^{-10} M); DGAL 20 mg/mL (D-galactose 20 mg/mL); DGAL + CVC 10^{-10} (D-galactose 20 mg/mL + carvacrol 10^{-10} M). Os dados estão expressos em valores médios de porcentagem de sobrevivência celular \pm EPM ($n = 6$). Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA *one way*, seguido de pós-teste de Dunnett's. * $p < 0,05$ vs CTL, # $p < 0,05$ vs DGAL.

Fonte: FEITOSA (2025)

Na análise da taxa de apoptose inicial, o grupo D-galactose 20 mg/mL ($10,26 \pm 1,34$ %, $n = 6$, $p < 0,05$) apresentou um aumento significativo quando comparado ao grupo controle ($4,93 \pm 0,71$ %, $n = 6$). Entretanto, o tratamento com o carvacrol, tanto em condições basais (CVC 10^{-10} M: $4,98 \pm 0,52$ %, $n = 6$, $p < 0,05$) quanto em modelo de senescência (DGAL+ CVC 10^{-10} M: $4,11 \pm 0,63$ %, $n = 6$, $p < 0,05$), promoveu uma redução significativa da taxa de apoptose inicial quando comparado ao grupo D-galactose (Figura 46).

Figura 46 - Taxa de apoptose inicial (%) de RCEC tratadas com carvacrol 10^{-10} M, em condições basais e em modelo de senescência induzida por D-galactose.

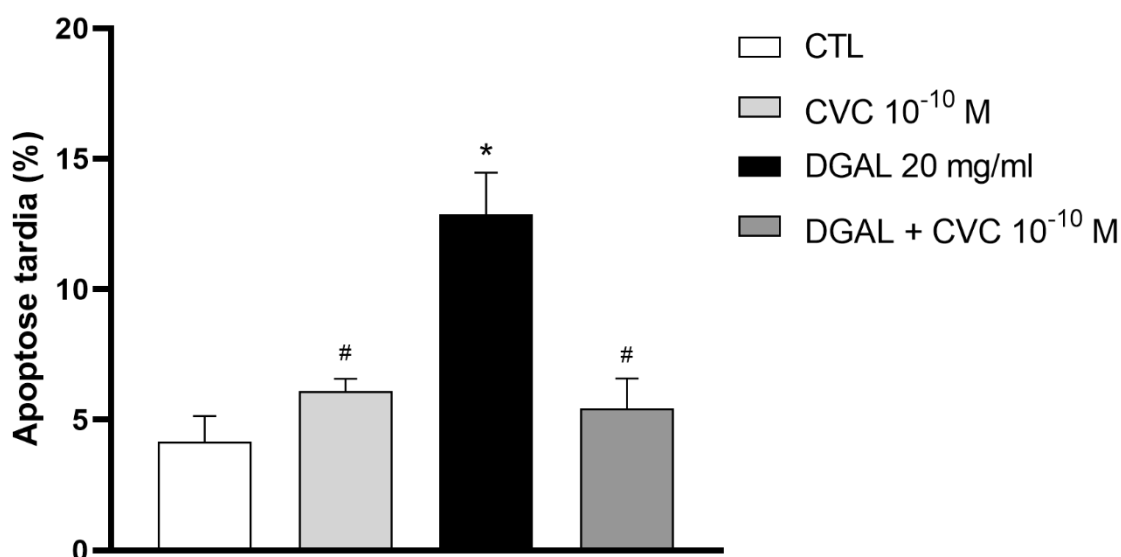


Legenda: Taxa de apoptose inicial (%) de RCEC em condições basais e em modelo de senescência induzida por D-galactose. Grupos experimentais: CTL (controle); CVC 10^{-10} (carvacrol 10^{-10} M); DGAL 20 mg/mL (D-galactose 20 mg/mL); DGAL + CVC 10^{-10} (D-galactose 20 mg/mL + carvacrol 10^{-10} M). Os dados estão expressos em valores médios de porcentagem de células em apoptose inicial \pm EPM ($n = 6$). Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA *one way*, seguido de pós-teste de Dunnett's. * $p < 0,05$ vs CTL, # $p < 0,05$ vs DGAL.

Fonte: FEITOSA (2025)

Na análise da taxa de apoptose tardia, o grupo D-galactose 20 mg/mL ($12,88 \pm 1,59 \%$, $n = 6$, $p < 0,05$) apresentou um aumento significativo quando comparado ao grupo controle ($4,16 \pm 0,97 \%$, $n = 6$). Entretanto, o tratamento com o carvacrol, tanto em condições basais (CVC 10^{-10} M: $6,10 \pm 0,46 \%$, $n = 6$, $p < 0,05$) quanto em modelo de senescência (DGAL+ CVC 10^{-10} M: $5,43 \pm 1,15 \%$, $n = 6$, $p < 0,05$), promoveu uma redução significativa da taxa de apoptose tardia quando comparado ao grupo D-galactose (Figura 47).

Figura 47 - Taxa de apoptose tardia (%) de RCEC tratadas com carvacrol 10^{-10} M, em condições basais e em modelo de senescência induzida por D-galactose.

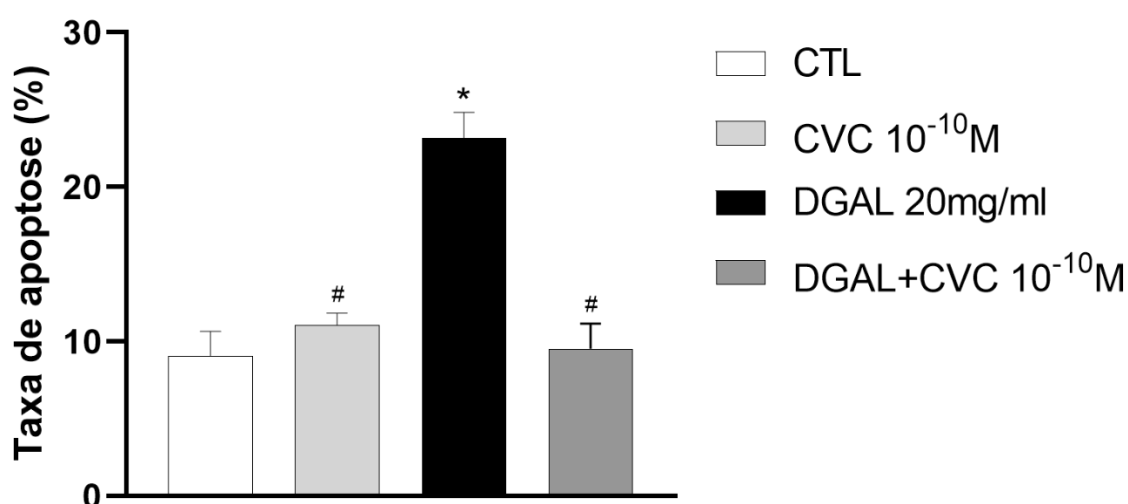


Legenda: Taxa de apoptose tardia (%) de RCEC em condições basais e em modelo de senescência induzida por D-galactose. Grupos experimentais: CTL (controle); CVC 10^{-10} (carvacrol 10^{-10} M); DGAL 20 mg/mL (D-galactose 20 mg/mL); DGAL + CVC 10^{-10} (D-galactose 20 mg/mL + carvacrol 10^{-10} M). Os dados estão expressos em valores médios de porcentagem de células em apoptose tardia \pm EPM ($n = 6$). Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA *one way*, seguido de pós-teste de Dunnett's. * $p < 0,05$ vs CTL, # $p < 0,05$ vs DGAL.

Fonte: FEITOSA (2025)

Na análise da taxa de apoptose total, o grupo D-galactose 20 mg/mL ($23,15 \pm 1,68 \%$, $n = 6$, $p < 0,05$) apresentou um aumento significativo quando comparado ao grupo controle ($9,10 \pm 1,56 \%$, $n = 6$). Entretanto, o tratamento com o carvacrol, tanto em condições basais (CVC 10^{-10} M: $11,08 \pm 0,74 \%$, $n = 6$, $p < 0,05$) quanto em modelo de senescência (DGAL+ CVC 10^{-10} M: $9,55 \pm 1,61 \%$, $n = 6$, $p < 0,05$), promoveu uma redução significativa da taxa de apoptose total quando comparado ao grupo D-galactose (Figura 48).

Figura 48 - Taxa de apoptose total (%) de RCEC tratadas com carvacrol 10^{-10} M, em condições basais e em modelo de senescência induzida por D-galactose.



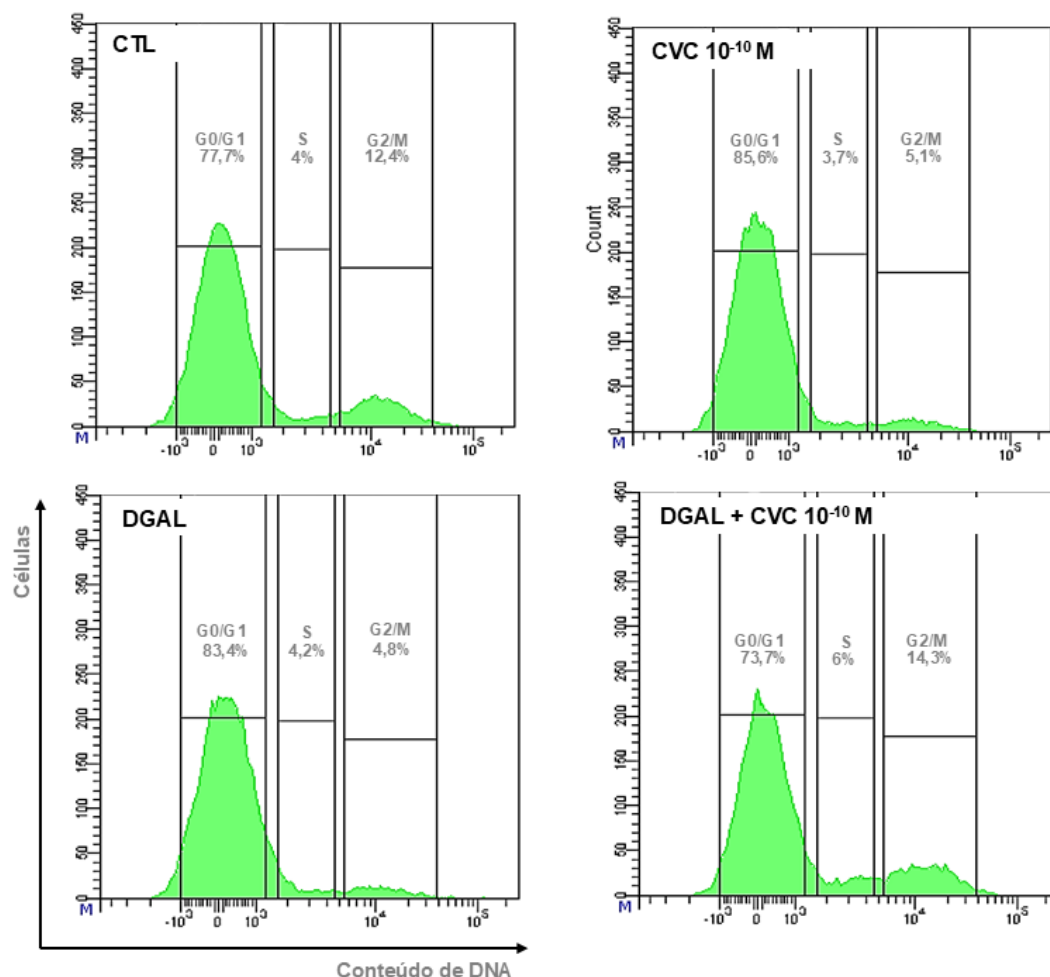
Legenda: Taxa de apoptose total (%) de RCEC em condições basais e em modelo de senescência induzida por D-galactose. Grupos experimentais: CTL (controle); CVC 10^{-10} (carvacrol 10^{-10} M); DGAL 20 mg/mL (D-galactose 20 mg/mL); DGAL + CVC 10^{-10} (D-galactose 20 mg/mL + carvacrol 10^{-10} M). Os dados estão expressos em valores médios de porcentagem de células em apoptose total \pm EPM ($n = 6$). Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA *one way*, seguido de pós-teste de Dunnett's. * $p < 0,05$ vs CTL, # $p < 0,05$ vs DGAL.

Fonte: FEITOSA (2025)

5.3.2 Avaliação do efeito do carvacrol sobre a progressão do ciclo celular em células endoteliais cavernosas de ratos

Na análise do ciclo celular, após 48 horas de incubação das RCECs, a marcação com PI permitiu a visualização da distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular (Figura 49).

Figura 49 - Histogramas representativos da proporção (%) de RCEC nas diferentes fases do ciclo celular tratadas com carvacrol 10^{-10} M, em condições basais e em modelo de senescência induzida por D-galactose.

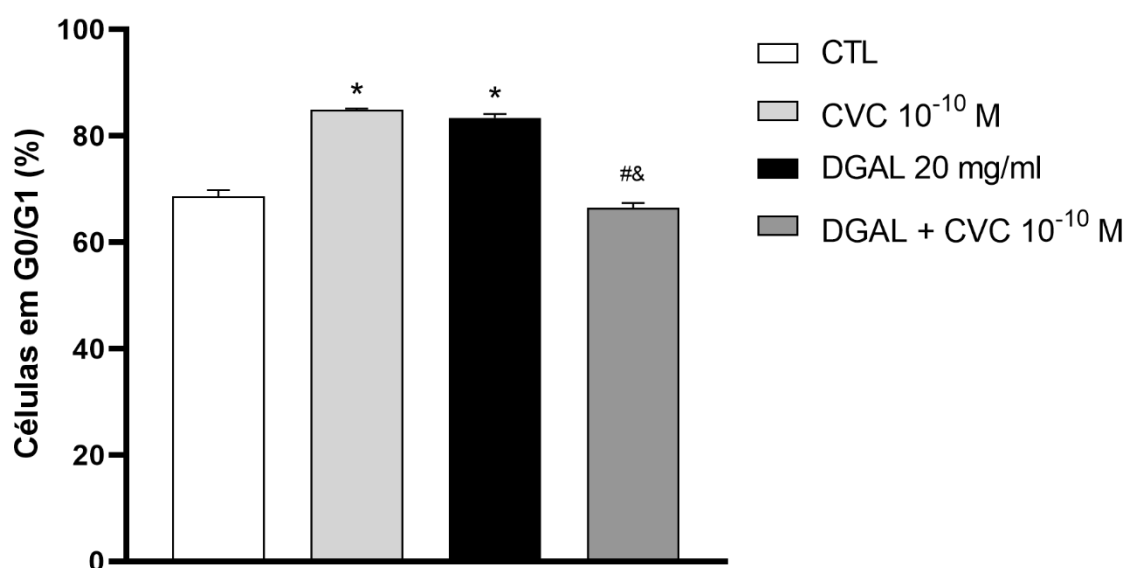


Legenda: Distribuição de RCEC (%) nas diferentes fases do ciclo celular em condições basais e em modelo de senescência induzida por D-galactose marcadas com iodeto de propídio obtidos por análise de citometria de fluxo. Grupos experimentais: CTL (controle); CVC 10^{-10} (carvacrol 10^{-10} M); DGAL 20 mg/mL (D-galactose 20 mg/mL); DGAL + CVC 10^{-10} (D-galactose 20 mg/mL + carvacrol 10^{-10} M). Os dados estão expressos em valores médios de porcentagem de células \pm EPM ($n = 6$). Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA *one way*, seguido de pós-teste de Dunnett's. * $p < 0,05$ vs CTL, # $p < 0,05$ vs DGAL, & $p < 0,05$ vs CVC 10^{-10} .

Fonte: FEITOSA (2025)

Na análise da fase G0/G1 do ciclo celular, o grupo D-galactose 20 mg/mL ($83,35 \pm 0,71 \%$, $n = 6$, $p < 0,05$) apresentou um aumento significativo na proporção de células quando comparado ao grupo controle ($68,61 \pm 1,16 \%$, $n = 6$). Entretanto, o tratamento com o carvacrol, em modelo de senescência (DGAL+ CVC 10^{-10} M: $66,46 \pm 0,87 \%$, $n = 6$, $p < 0,05$), promoveu uma redução significativa da proporção de células da fase G0/G1 quando comparado ao grupo D-galactose. O tratamento com o carvacrol em condições basais (CVC 10^{-10} M: $84,84 \pm 0,27 \%$, $n = 6$, $p > 0,05$) não promoveu alterações significativas na proporção de células da fase G0/G1 quando comparado ao grupo D-galactose (Figura 50).

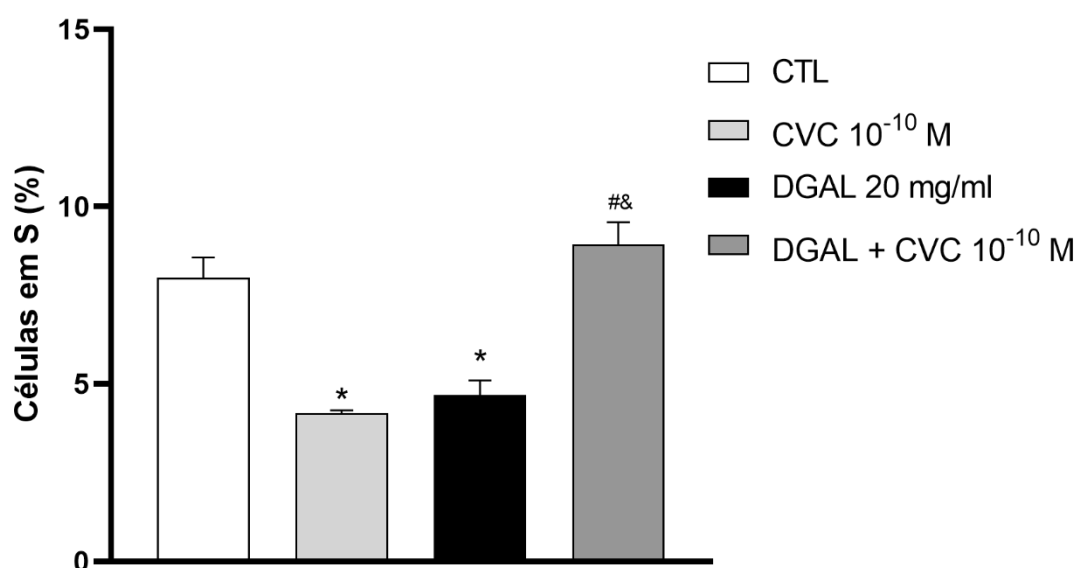
Figura 50 - Proporção (%) de RCEC da fase G0/G1 do ciclo celular tratadas com carvacrol 10^{-10} M, em condições basais e em modelo de senescência induzida por D-galactose.



Legenda: Distribuição de RCEC (%) da fase G0/G1 do ciclo celular em condições basais e em modelo de senescência induzida por D-galactose. Grupos experimentais: CTL (controle); CVC 10^{-10} (carvacrol 10^{-10} M); DGAL 20 mg/mL (D-galactose 20 mg/mL); DGAL + CVC 10^{-10} (D-galactose 20 mg/mL + carvacrol 10^{-10} M). Os dados estão expressos em valores médios de porcentagem de células da fase G0/G1 \pm EPM ($n = 6$). Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA *one way*, seguido de pós-teste de Dunnett's. * $p < 0,05$ vs CTL, # $p < 0,05$ vs DGAL, & $p < 0,05$ vs CVC 10^{-10} .

Na análise da fase S do ciclo celular, o grupo D-galactose 20 mg/mL ($4,69 \pm 0,41$ %, $n = 6$, $p < 0,05$) apresentou uma diminuição significativa na proporção de células quando comparado ao grupo controle ($8,00 \pm 0,57$ %, $n = 6$). Entretanto, o tratamento com o carvacrol, em modelo de senescência (DGAL+ CVC 10^{-10} M: $8,93 \pm 0,63$ %, $n = 6$, $p < 0,05$), promoveu um aumento significativo da proporção de células da fase S quando comparado ao grupo D-galactose. O tratamento com o carvacrol em condições basais (CVC 10^{-10} M: $4,18 \pm 0,06$ %, $n = 6$, $p > 0,05$) não promoveu alterações significativas na proporção de células da fase S quando comparado ao grupo D-galactose (Figura 51).

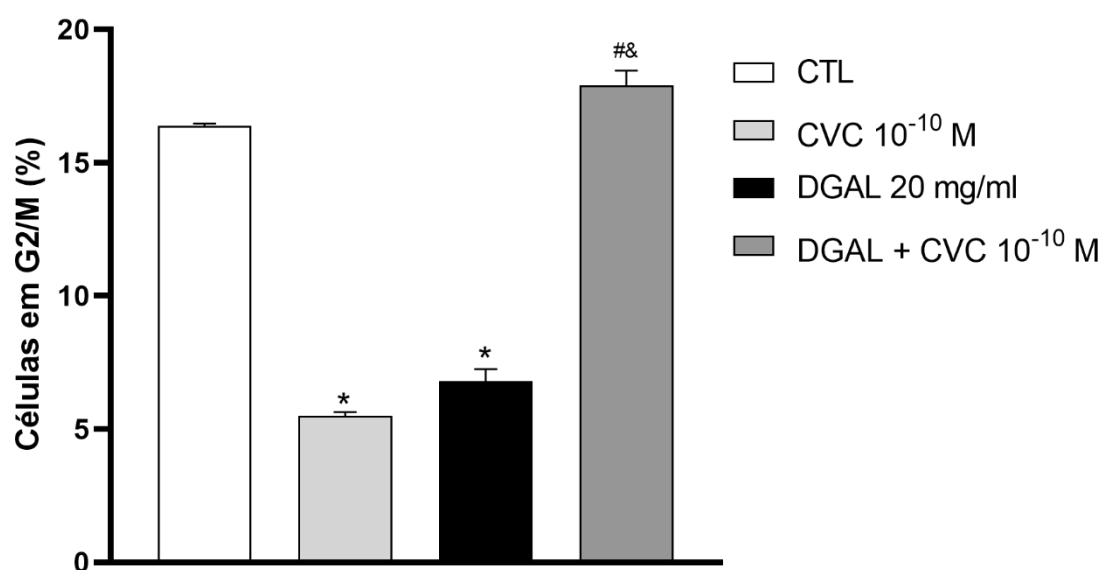
Figura 51 - Proporção (%) de RCEC da fase S do ciclo celular tratadas com carvacrol 10^{-10} M, em condições basais e em modelo de senescência induzida por D-galactose.



Legenda: Distribuição de RCEC (%) da fase S do ciclo celular em condições basais e em modelo de senescência induzida por D-galactose. Grupos experimentais: CTL (controle); CVC 10^{-10} (carvacrol 10^{-10} M); DGAL 20 mg/mL (D-galactose 20 mg/mL); DGAL + CVC 10^{-10} (D-galactose 20 mg/mL + carvacrol 10^{-10} M). Os dados estão expressos em valores médios de porcentagem de células da fase S \pm EPM ($n = 6$). Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA *one way*, seguido de pós-teste de Dunnett's. * $p < 0,05$ vs CTL, # $p < 0,05$ vs DGAL, & $p < 0,05$ vs CVC 10^{-10} .

Na análise da fase G2/M do ciclo celular, o grupo D-galactose 20 mg/mL ($6,79 \pm 0,46 \%$, $n = 6$, $p < 0,05$) apresentou uma diminuição significativa na proporção de células quando comparado ao grupo controle ($16,38 \pm 0,08 \%$, $n = 6$). Entretanto, o tratamento com o carvacrol, em modelo de senescência (DGAL+ CVC 10^{-10} M: $17,89 \pm 0,56 \%$, $n = 6$, $p < 0,05$), promoveu um aumento significativo da proporção de células da fase G2/M quando comparado ao grupo D-galactose. O tratamento com o carvacrol em condições basais (CVC 10^{-10} M: $5,49 \pm 0,14 \%$, $n = 6$, $p > 0,05$) não promoveu alterações significativas na proporção de células da fase G2/M quando comparado ao grupo D-galactose (Figura 52).

Figura 52 - Proporção (%) de RCEC da fase G2/M do ciclo celular tratadas com carvacrol 10^{-10} M, em condições basais e em modelo de senescência induzida por D-galactose.



Legenda: Distribuição de RCEC (%) da fase G2/M do ciclo celular em condições basais e em modelo de senescência induzida por D-galactose. Grupos experimentais: CTL (controle); CVC 10^{-10} (carvacrol 10^{-10} M); DGAL 20 mg/mL (D-galactose 20 mg/mL); DGAL + CVC 10^{-10} (D-galactose 20 mg/mL + carvacrol 10^{-10} M). Os dados estão expressos em valores médios de porcentagem de células da fase G2/M \pm EPM ($n = 6$). Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA *one way*, seguido de pós-teste de Dunnett's. * $p < 0,05$ vs CTL, # $p < 0,05$ vs DGAL, & $p < 0,05$ vs CVC 10^{-10} .

Discussão

6 DISCUSSÃO

O presente estudo foi realizado com o objetivo de investigar o efeito senoprotetor do monoterpene carvacrol na senescência endotelial cavernosa induzida por D-galactose, através de metodologias *in vitro* e *in silico*. As investigações *in vitro* demonstraram que o carvacrol restaurou a viabilidade celular, reduziu o acúmulo de células endoteliais senescentes, bem como atenuou os níveis de ROS. Além disso, o carvacrol aumentou a biodisponibilidade de NO, reduziu a apoptose e atenuou a parada do ciclo celular. Já as análises *in silico* revelaram que o carvacrol tem capacidade de interagir com alvos proteicos relevantes das vias de senescência, apresentando valores de energia de acoplamento negativos, podendo ser ainda mais negativo do que o do ligante-padrão, sendo essas interações estáveis.

O envelhecimento é a diminuição contínua e gradual da função fisiológica que influencia a qualidade de vida e a longevidade. Durante o processo de envelhecimento, uma combinação de fatores de estresse genéticos, ambientais e de estilo de vida causa o acúmulo de uma variedade de danos moleculares e celulares ao longo do tempo, o que, por sua vez, leva a uma deterioração progressiva das funções celulares e teciduais. Além disso, o envelhecimento representa um fator de risco primário para muitas doenças, como doenças neurodegenerativas, câncer, DCV e DE. Retardar os processos biológicos do envelhecimento e gerenciar condições crônicas poderia promover o envelhecimento saudável e aumentar a expectativa de vida (Wu; Bai; Chen; Yang; Zhu, 2024; Xue; Jiang; Meng; Lu *et al.*, 2024; Zhuang; Zhuang; Jiang; Zhang *et al.*, 2024).

Um mecanismo fundamental do envelhecimento que tem ganhado cada vez mais atenção é a senescência celular (Chaib; Tchkonja; Kirkland, 2022). Ela é essencial para a embriogênese, cicatrização de feridas e restauração da plasticidade. Também pode atuar como um mecanismo antineoplásico para restringir a proliferação de células danificadas. Embora a senescência celular seja fundamental para o desenvolvimento e a saúde, estudos sobre senescência desregulada estão crescendo rapidamente devido aos seus efeitos prejudiciais em muitos sistemas de órgãos vitais (Wu; Bai; Chen; Yang; Zhu, 2024).

A senescência compromete o papel essencial que o endotélio desempenha na manutenção da homeostase vascular, promovendo assim a disfunção endotelial, que tem sido implicada no desenvolvimento de várias doenças associadas ao envelhecimento, incluindo diabetes, hipertensão e DE (Ferrini; Gonzalez-Cadavid;

Rajfer, 2017; Han; Kim, 2023). A incapacidade das células endoteliais senescentes de proliferar compromete a integridade da monocamada das células endoteliais e da barreira semipermeável entre o sangue e os tecidos subjacentes, o que pode quebrar a hemodinâmica peniana e contribuir para o desenvolvimento da DE (Echeverri Tirado; Ferrer; Herrera, 2016; Ferrini; Gonzalez-Cadavid; Rajfer, 2017; Khor; Wong, 2020). Nesse contexto, se a senescência contribui para a disfunção endotelial, e esta, por sua vez, é uma das principais manifestações da DE, então estratégias que reduzam a senescência podem favorecer a saúde endotelial e, conseqüentemente, melhorar a função erétil (Nishimatsu; Suzuki; Saito; Niimi *et al.*, 2015). O desenvolvimento de terapias voltadas para células senescentes, forneceu evidências adicionais de que as células endoteliais senescentes são um alvo terapêutico viável, tornando-se, assim, um tópico de intensa investigação (Bloom; Islam; Lesniewski; Donato, 2023).

Estudos demonstram diversos benefícios terapêuticos da utilização de produtos naturais que visam células senescentes, denominadas senoterapias, para a melhora de doenças relacionadas à idade (Saccon; Nagpal; Yadav; Cavalcante *et al.*, 2021; Wu; Bai; Chen; Yang; Zhu, 2024; Zhu; Doornebal; Pirtskhalava; Giorgadze *et al.*, 2017). Os agentes senoterapêuticos são divididos em duas classes: senolíticas, que matam seletivamente as células senescentes, e senomórficas, que atenuam o SASP (Calabrò; Accardi; Aiello; Caruso *et al.*, 2024). A maioria dos senolíticos identificados até o momento promove a apoptose de células senescentes ao atingir enzimas críticas envolvidas em mecanismos pró-sobrevivência e antiapoptóticos, como p53, p21, proteínas da família Bcl-2 e outros. Dentre os senolíticos podemos destacar o desatinib, quercetina, ABT-263 (Navitoclax) e fisetin. Em contraste, os senomórficos suprimem a senescência através da redução da expressão de SASP por meio da modulação de NF- κ B, sirtuínas, mTOR, IL-1 α , p38 MAPK e outras vias de sinalização. A classe dos senomórficos incluem rapamicina, ruxolitinib e outros (Zhang; Pitcher; Prahalad; Niedernhofer; Robbins, 2023).

Apesar do crescimento exponencial nos estudos para o desenvolvimento de senoterapêuticos voltados ao tratamento de doenças relacionadas a idade e à ampliação da longevidade saudável, os efeitos adversos relacionados ao uso dessas terapias representam um desafio significativo para o seu uso seguro. Esses agentes estão associados a efeitos graves, como trombocitopenia, neutropenia, nefrotoxicidade, disfunção metabólica, imunossupressão, dentre outros. Assim, torna-se essencial a busca por novas abordagens terapêuticas que mantenham a eficácia

no combate à senescência celular, minimizando os riscos relacionados ao seu uso (Chaib; Tchkonja; Kirkland, 2022; Rudin; Hann; Garon; Ribeiro De Oliveira *et al.*, 2012).

Nessa perspectiva, os produtos naturais possuem atividades antioxidantes e anti-inflamatórias amplamente documentadas, sugerindo o seu potencial para atuar como senoterapêuticos (Zhang; Pitcher; Prahalad; Niedernhofer; Robbins, 2023). Os óleos essenciais, têm sido objeto de interesse científico, com extensa triagem indicando que muitos extratos vegetais e seus componentes isolados têm atividades benéficas para doenças associadas à idade, principalmente por possuir propriedades antioxidantes (Ayaz; Sadiq; Junaid; Ullah *et al.*, 2017). Dentre os antioxidantes mais ativos, encontrados em óleos essenciais destaca-se o monoterpene carvacrol (El-Sayed; Abd-Allah; Mansour; El-Arabey, 2015).

O carvacrol é um fenol monoterpênico produzido por um número abundante de plantas aromáticas, incluindo tomilho e orégano. Atualmente, o carvacrol é usado como um ingrediente aromatizante e conservante de alimentos. Ele possui uma ampla gama de bioatividades úteis para aplicações clínicas, como atividades antioxidante, anti-inflamatória, anti-envelhecimento e vasorrelaxante (Imran; Aslam; Alsagaby; Saeed *et al.*, 2022; Suntres; Coccimiglio; Alipour, 2015). Acredita-se que o carvacrol produza esses efeitos através de sua ação em oposição aos efeitos de ROS, portanto, podem ser indicados para proteção e prevenção de danos oxidativos aos tecidos (Samarghandian; Farkhondeh; Samini; Borji, 2016). Nesse contexto, essas propriedades, em conjunto, fornecem suporte para a avaliação de suas possíveis ações benéficas, em que os seus efeitos biológicos ainda não foram estudados, como é o caso da senescência endotelial cavernosa.

Diante dos efeitos promissores do carvacrol, foi investigado se ele promoveria ação benéfica sobre a senescência endotelial cavernosa induzida por D-galactose. O modelo de senescência celular induzida por D-galactose tem sido amplamente utilizado e foi estabelecido que, um dos principais mecanismos pelos quais ele exerce seu efeito é por meio do aumento da produção de ROS (García-Trejo; Gómez-Sierra; Eugenio-Pérez; Medina-Campos; Pedraza-Chaverri, 2024). D-galactose aumenta significativamente os níveis de ROS e MDA e diminui as atividades de enzimas antioxidantes como SOD, CAT e GSH. Os níveis de expressão de SA- β -galactosidade, bem como os níveis de expressão da proteína p16, p21, p53 e Keap1, aumentaram significativamente, enquanto os níveis de expressão de Nrf-2 foram regulados negativamente. Essas alterações, em conjunto, podem gerar alterações celulares

graves como estresse oxidativo, redução da viabilidade celular, inflamação, disfunção mitocondrial e apoptose, favorecendo o desenvolvimento de doenças associadas à idade (Azman; Zakaria, 2019; Lee; Hoang; Jung; Jung *et al.*, 2020).

No presente estudo, iniciamos as análises para avaliar a viabilidade celular, a SA- β -galactosidase e a produção de ROS em RCEC, utilizando uma ampla faixa de concentração do carvacrol (10^{-13} – 10^{-5} M), a fim de determinar a CE_{50} e, consequentemente, a concentração que será utilizada nos ensaios subsequentes.

Para avaliar a viabilidade celular o ensaio de MTT é comumente usado, e a sua redução para formazan é devido à atividade enzimática celular em mitocôndrias. Fatores no ambiente de cultura de células, como pH e glicose, NADH ou fornecimento de NADPH, também influenciam a redução de MTT para formazan e, portanto, os dados de MTT também refletem mudanças no metabolismo celular. O tratamento com D-galactose (20 mg/mL) reduziu a viabilidade das RCEC após 48 horas de tratamento. Corroborando com os nossos achados, estudos anteriores também demonstraram uma redução na viabilidade celular após tratamento com D-galactose (Lee; Hoang; Jung; Jung *et al.*, 2020; Wang; Sun; Qu; Sang *et al.*, 2022). O tratamento com o carvacrol, na presença da D-galactose, restaurou a viabilidade celular, enquanto na sua ausência não houve alteração nesse parâmetro. Como o ensaio de MTT é dependente de atividades enzimáticas celulares que refletem o metabolismo celular, é sugestivo que o carvacrol, em condições de senescência, pode ter melhorado a atividade metabólica das células senescentes.

Para confirmar o fenótipo senescente após o tratamento com D-galactose, utilizamos o método “padrão ouro”: a SA- β -galactosidase. Esse ensaio tem sido amplamente utilizado como biomarcador tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Childs; Durik; Baker; Van Deursen, 2015; González-Gualda; Baker; Fruk; Muñoz-Espín, 2021). A atividade da SA- β -galactosidase é a β -galactosidase lisossômica, que é detectada pelo aumento do número ou atividade dos lisossomos e que, há muito tempo, está associada ao envelhecimento (Lee; Han; Im; Morrone *et al.*, 2006). As células SA- β -galactosidase positivas desempenham papéis no desenvolvimento normal e na manutenção da homeostase tecidual. No entanto, quando estão em condições elevadas, podem impactar negativamente na regeneração dos tecidos, contribuindo para o desenvolvimento de doenças relacionadas à idade (Dungan; Murach; Zdunek; Tang *et al.*, 2022; Mchugh; Durán; Gil, 2025). O tratamento das RCEC com D-galactose promoveu um aumento significativo de células senescentes quando

comparado ao grupo CTL. Esses resultados sugerem que essas células desenvolveram o fenótipo senescente. Resultados semelhantes foram demonstrados por Zhang; Ouyang; Zhan; Li *et al.* (2023), revelando que a D-galactose aumentou em mais de três vezes a quantidade de células endoteliais senescentes em comparação ao grupo controle. E o tratamento com o carvacrol, tanto na ausência quanto na presença da D-galactose, promoveu redução da senescência endotelial cavernosa, indicando uma redução do fenótipo senescente nessas células.

Uma vez que o carvacrol reduz a senescência endotelial cavernosa, avaliamos se ele poderia estar atuando através da modulação do estresse oxidativo. Em experimentos *in vitro*, o açúcar redutor D-galactose pode levar à senescência celular por aumentar os níveis de ROS, resultando em estresse oxidativo (Lee; Hoang; Jung; Jung *et al.*, 2020). O aumento nos níveis de ROS em células senescentes é considerado um indicador do processo de senescência e um potencial fator-chave na sua indução e manutenção (Zhang; Ouyang; Zhan; Li *et al.*, 2023).

O tratamento com D-galactose aumentou os níveis de ROS quando comparado com o grupo CTL, corroborando com estudos anteriores que utilizaram esse mesmo modelo de indução (Lee; Hoang; Jung; Jung *et al.*, 2020; Xiao; Chen; Yan; Zheng *et al.*, 2024). O carvacrol, apesar de não ter modulado os níveis de ROS de RCEC em condições basais, no modelo de senescência induzida por D-galactose reduziu a produção de ROS. Esta diminuição mediada pelo carvacrol pode ser atribuída a sua forte atividade antioxidante. O grupo OH do carvacrol é essencial para sua ação antioxidante, permitindo a eliminação de ROS. Além de neutralizar, ele ativa o fator de transcrição Nrf-2, aumentando as defesas antioxidantes como SOD, CAT e GPx, conferindo uma maior proteção às células. O carvacrol também reduz a expressão da NADPH oxidase, diminuindo a produção de O_2^- e potencializando seu efeito antioxidante (Forqani; Akbarian; Amirahmadi; Khorrami *et al.*, 2024; Friedman, 2014; Khazdair; Moshtagh; Anaeigoudari; Jafari; Kazemi, 2024; Mączka; Twardawska; Grabarczyk; Wińska, 2023).

A partir dos resultados obtidos, utilizando uma ampla faixa de concentração de carvacrol (10^{-13} – 10^{-5} M), identificamos a CE_{50} , para os ensaios da SA- β -galactosidase e quantificação de ROS. Optamos por utilizar a concentração 10^{-10} M por apresentar bons resultados nessas análises, sem comprometer a viabilidade celular. Assim, em todos os protocolos conduzidos posteriormente, o carvacrol foi testado nessa concentração, na presença e na ausência da D-galactose.

Considerando os efeitos benéficos do carvacrol no modelo de senescência em RCEC - reduzindo a senescência por meio da modulação negativa do estresse oxidativo – realizamos estudos *in silico*, através do *docking* e dinâmica molecular, para avaliar se o carvacrol poderia interagir com alvos moleculares das vias de senescência, buscando compreender os possíveis mecanismos envolvidos na resposta senoprotetora.

O *docking* molecular se tornou um método essencial do desenvolvimento de medicamentos *in silico* nos últimos anos. Essa técnica consiste em prever a interação entre uma pequena molécula e uma proteína no nível atômico. Isso permite que os pesquisadores estudem o comportamento de pequenas moléculas, dentro do sítio de ligação de uma proteína alvo e entendam o processo bioquímico fundamental subjacente a essa interação (Agu; Afiukwa; Orji; Ezeh *et al.*, 2023).

Os resultados de *docking* molecular gerados pela função de pontuação foram validados por meio do *redocking* entre o ligante-padrão cristalográfico e os alvos moleculares selecionados. Todos os valores de RMSD, que indica a distância média quadrática do ligante na estrutura cristalina e os átomos correspondentes na pose ancorada, para os complexos APPN - Keap1/Nrf-2, resveratrol - SIRT1 e NHMC - MAPK p38, apresentaram valores inferiores a 2,0 Å. Para que um *docking* seja considerado confiável, é necessário que o valor de RMSD seja igual ou inferior a 2,0 Å (Hung; Guerquin; Samudrala, 2011). Portanto, os nossos resultados indicam que as poses geradas posicionaram o ligante corretamente no local ativo e que o programa forneceu valores considerados satisfatórios para a validação do *docking*.

A análise do *docking* molecular do carvacrol com os principais alvos-chave das vias de senescência, para avaliar o processamento do acoplamento e interação entre as moléculas, revelou diferentes valores de energia de ligação com base no algoritmo *Moldock Score*. A interação do carvacrol com os sete alvos moleculares avaliados apresentou valores negativos de energia de ligação, indicando que houve interação. Entretanto, destacam-se os alvos NADPH oxidase e p53 que apresentaram valores de energia de interação próximos aos do ligante-padrão, a apocinina para a NADPH oxidase, e até menores para a pfitirina e p53, indicando que o carvacrol interagiu tão bem quanto o ligante-padrão, ou até melhor do que ele, respectivamente.

Com base na capacidade do carvacrol em apresentar ótimas interações com os alvos NADPH oxidase e p53, foram avaliados os mapas de interações intermoleculares envolvidas na estabilidade dos complexos. O mapa de interação

molecular entre a enzima NADPH oxidase e o composto carvacrol demonstrou interações apolares, sendo estas interações correspondentes aos tipos alquil, por meio dos resíduos Leu 199, Leu 208 e Ile 226, além da Arg 202. O outro tipo de interação visualizada correspondeu a interação estérica por meio das interações do tipo pi-cation através do resíduo Arg 202. O ligante-padrão da NADPH oxidase, a apocinina, apresentou interações semelhantes do tipo hidrofóbicas Arg 202, Leu 199 e Leu 208. Assim, o carvacrol apresentou interações semelhantes ao ligante-padrão apocinina, interações do tipo hidrofóbicas Arg 202, Leu 199 e Leu 208, indicando que os compostos interagem com a NADPH oxidase no mesmo sítio de ligação. Os mapas de interação molecular para o alvo p53 demonstraram que, de forma semelhante ao observado no alvo NADPH oxidase, houve uma maior contribuição das interações apolares, uma vez que foram observadas interações no anel benzeno e na cadeia carbônica, sendo estas interações do tipo alquil e estabelecidas nos resíduos Arg 273, Lys 132 e Arg 248, além da interação do tipo amida *Pi-stacked* no resíduo 248 outra considerada não favorável no resíduo Lys 132. É importante destacar que apesar da ligação não favorável no resíduo Lys 132, ele não é responsável pela manutenção da atividade da enzima, e sim os resíduos de Arg 273 e 248 (Cho; Gorina; Jeffrey; Pavletich, 1994). Além disso, é importante mencionar que o carvacrol apresentou interação semelhante ao ligante-padrão pfitirina que correspondeu ao resíduo Arg 273 da interação *Pi-alquil*.

A dinâmica molecular é amplamente usada como um método de simulação poderoso em muitos campos da modelagem molecular. No contexto de encaixe, ao mover cada átomo separadamente no campo dos átomos restantes, a simulação da dinâmica representa a flexibilidade do ligante e da proteína de forma mais eficaz do que outros algoritmos, de forma substancialmente semelhante às condições fisiológicas (Meng; Zhang; Mezei; Cui, 2011; Rajiv Gandhi; Sharanya; Jayanandan; Haridas *et al.*, 2024).

Para a avaliação da dinâmica molecular e investigação da estabilidade das ligações observadas nas simulações de *docking* molecular, os alvos moleculares NADPH oxidase e p53 foram escolhidos, uma vez que a energia de interação entre eles e o carvacrol foram promissoras.

Uma métrica importante nas simulações de dinâmica molecular, além do RMSD é o RMSF, responsável por medir a flutuação da variação da posição de um átomo específico ou de um grupo de átomos em relação à sua posição média durante uma

simulação (Pitera, 2014). Valores de RMSD mais baixos como também uma redução nas flutuações demonstra uma maior estabilidade. Para o alvo molecular p53, foi observada uma maior estabilidade para o composto carvacrol, visto que este apresentou valores de RMSD mais baixos quando comparado ao complexo do p53 com o ligante-padrão pfitirina, como também foi observada a ocorrência de uma baixa quantidade de flutuações para os dois complexos. Em contraste, para o alvo NADPH oxidase, foi observada uma maior estabilidade para o ligante-padrão apocinina, visto que este apresentou valores de RMSD mais baixos quando comparado ao complexo do p53 com o carvacrol; foi também observada a ocorrência de uma alta quantidade de flutuações para o complexo com o carvacrol.

Após avaliar a estabilidade dos complexos, é necessário avaliar as métricas de RMSD referentes aos ligantes a fim de observar se eles apresentam estabilidade mediante mudanças de temperatura, pressão e da influência de solventes. Para o p53, foram observados valores de RMSD mais baixos para o complexo com o carvacrol quando comparado ao ligante-padrão pfitirina, demonstrando a maior estabilidade do carvacrol e, conseqüentemente uma maior tendência de permanecer ligado a p53 na presença de solventes ou alterações bruscas de temperatura e pressão. Já para o alvo NADPH oxidase foi observado que a apocinina apresentou uma maior estabilidade, quando comparado ao carvacrol. Esse efeito pode estar relacionado com a maior rigidez da ligação da apocinina ao alvo que aumenta a probabilidade de permanência no sítio ativo da enzima.

Para avaliar a flexibilidade dos resíduos de aminoácidos que compõem os complexos, e, se esses resíduos podem influenciar na mudança conformacional dos alvos moleculares, foi avaliada a métrica RMSF de cada aminoácido que compõe a proteína. Quando o valor de RMSF é acima de 0,3 nm sugerem uma alta flexibilidade, podendo implicar na mudança conformacional do alvo. Para os dois alvos avaliados, p53 e NADPH oxidase, o complexo com o carvacrol apresentou valores de RMSF superiores a 0,3 nm em alguns resíduos de aminoácidos. Esses resultados sugerem uma interação com o carvacrol de alta flexibilidade, potencialmente induzindo alterações conformacionais que podem impactar na modulação do alvo.

Para avaliar os níveis de empacotamento proteico do alvo molecular isolado e complexado com o carvacrol e o ligante-padrão, foi utilizada a métrica de valores do Rg. Esta análise fornece uma ideia de quão compacta ou estendida é uma molécula durante uma simulação de dinâmica molecular, revelando informações sobre a

conformação, a estabilidade, as interações e a flexibilidade das moléculas em análise. Os alvos moleculares p53 e NADPH oxidase complexados ao carvacrol e os seus respectivos ligantes-padrão não apresentaram variações em relação à proteína isolada, demonstrando estabilidade das ligações, elucidando acomodação do ligante no sítio de ligação do alvo molecular.

As energias de interação Coulomb e Lennard-Jones dos complexos proteína-ligante foram calculadas para fornecer informações sobre a estabilidade das interações dentro do sítio ativo. Com base nos cálculos da energia de Coulomb para os alvos p53 e NADPH oxidase, o carvacrol apresentou uma energia de ligação mais negativa quando comparado aos ligantes-padrão, demonstrando uma maior contribuição da energia eletrostática nas interações estabelecidas. Entretanto, de acordo com a energia de Lennard-Jones dos alvos p53 e NADPH oxidase, o carvacrol apresentou um valor mais positivo quando comparado aos ligantes-padrão. Essa maior estabilidade entre os alvos e os ligantes-padrão decorrem de uma maior contribuição da energia de Van der Waals nessas interações.

Considerando os efeitos benéficos do carvacrol no modelo de senescência em RCEC através da redução da senescência por meio da modulação negativa do estresse oxidativo e pela possível interação com alvos moleculares das vias de senescência, buscamos compreender quais os possíveis mecanismos moleculares pelos quais o carvacrol poderia estar atuando para promover esses efeitos.

O estresse oxidativo é frequentemente acompanhado de uma menor produção de NO, o que pode enfraquecer o seu efeito protetor (Wu; Hou; Mu; Sun *et al.*, 2017). O aumento de ROS, em células endoteliais senescentes, é resultado da atuação da eNOS desacoplada, da atividade aumentada de NADPH oxidase e da redução da defesa antioxidante, resultando na perda da integridade do endotélio e consequente disfunção endotelial (Lee; Hoang; Jung; Jung *et al.*, 2020). Evidências crescentes demonstraram que a disfunção endotelial é a marca registrada de uma ampla gama de doenças vasculares associadas à vasoconstrição, incluindo a DE (Aversa; Bruzziches; Francomano; Natali *et al.*, 2010).

Nessa perspectiva, uma vez que o carvacrol reduziu os níveis de ROS em células endoteliais senescentes, avaliamos se essa redução poderia estar associada a um aumento dos níveis de NO. A capacidade de produzir NO serviu como marcador para as células endoteliais saudáveis (Gu; Tan; Song; Song *et al.*, 2022). O tratamento com D-galactose reduziu significativamente a produção de NO quando comparado ao

grupo CTL. Consistentes com os nossos estudos, dados revelam uma redução na biodisponibilidade de NO em modelo senescência em células endoteliais e este efeito está associado a alterações que prejudicam a função endotelial (Hwang; Kim; Herman; Gorospe; Lee, 2022). No entanto, o carvacrol aumentou a produção de NO na presença da D-galactose, de forma semelhante a ACh, sugerindo que ele pode melhorar a saúde endotelial, e, conseqüentemente, aumentar a biodisponibilidade de NO nas células RCEC. Em condições basais, o carvacrol não alterou a produção de NO nessas células. Assim, o NO endotelial pode proteger contra um estado de estresse oxidativo, e a ativação da eNOS e a subsequente produção de NO retardam a senescência celular endotelial (Ota; Eto; Kano; Ogawa *et al.*, 2008).

A estreita relação entre envelhecimento e disfunção endotelial aponta para uma necessidade crítica de encontrar maneiras de proteger contra a senescência endotelial (Song; Liu; Hao; Yu *et al.*, 2014). As células endoteliais senescentes têm sensibilidade aumentada à apoptose, que perdem expressão de eNOS e expressam níveis reduzidos de NO pró-sobrevivência (Childs; Durik; Baker; Van Deursen, 2015).

A avaliação da apoptose foi realizada através da dupla marcação com anexina V e 7-AAD, para a identificação dos estágios inicial e tardio, respectivamente, da apoptose. Essa medida possibilita a detecção de qualquer nível do processo de apoptose, mesmo que mínimo, permitindo uma avaliação mais precisa da resposta. O tratamento com D-galactose reduziu a sobrevivência celular e aumentou significativamente a apoptose inicial e tardia de RCEC quando comparado ao grupo CTL. Consistentes com as nossas análises, dados de Rippe; Blimline; Magerko; Lawson *et al.* (2012) revelam o aumento da apoptose com a senescência endotelial. Esse efeito pode ser atribuído, além da diminuição de NO (mediador pró-sobrevivência) e aumento de ROS, aos efeitos da superexpressão de p53/p21 (Childs; Durik; Baker; Van Deursen, 2015; Erusalimsky, 2009; Lee; Fenster; Ito; Takeda *et al.*, 1999). No entanto, o carvacrol aumentou a sobrevivência celular e reduziu a apoptose inicial e tardia de RCEC na presença da D-galactose. Em condições basais, o carvacrol não alterou esses parâmetros, quando comparado ao grupo CTL. Por atuar como antioxidante, o carvacrol provavelmente reduz os danos induzidos por ROS, que levam à apoptose, atenuando o fenótipo pró-apoptótico de RCEC induzido pela D-galactose.

Além da apoptose, outra característica essencial da senescência celular é a parada do ciclo celular (De Mera-Rodríguez; Álvarez-Hernán; Gañán; Martín-Partido

et al., 2021). No processo de senescência, a replicação celular para quando ocorrem lesões irreversíveis no DNA (Calabrò; Accardi; Aiello; Caruso *et al.*, 2024). Geralmente, considera-se que as células senescentes estão permanentemente paradas na fase G0/G1 do ciclo celular, no entanto, outros poucos estudos apoiam também o papel da parada em G2 (Anwar; Khosla; Ramakrishna, 2016).

O conteúdo de DNA é o constituinte celular mais frequentemente medido para avaliar o nível de ploidia do DNA e a posição de parada da célula no ciclo celular. O conteúdo de DNA é definido como índice de DNA (DI). Em células normais na fase G0/G1 do ciclo celular, o DI = 1,0. Já as células na fase G2/M apresentam DI = 2,0, enquanto aquelas em fase S são caracterizadas por um DI entre 1,0 e 2,0 (Darzynkiewicz, 2011). O tratamento com D-galactose aumentou significativamente a proporção de RCEC na fase G0/G1 e reduziu nas fases S e G2/M quando comparado ao grupo CTL, indicando que a D-galactose induziu a parada do ciclo celular na fase G0/G1. Corroborando com os nossos estudos, Ye; Feng; Zhang; Li *et al.* (2023) revelaram efeitos semelhantes em modelo senescência celular induzida por D-galactose (Ye; Feng; Zhang; Li *et al.*, 2023). A parada do ciclo celular na senescência é amplamente mediada pela ativação de uma ou ambas as vias supressoras de tumores p53/p21 e p16, principalmente pelo aumento na expressão desses fatores de transcrição. O p53 induz a parada do ciclo celular ativando o inibidor da CDK2, p21. Da mesma forma, o p16 ativa um inibidor de CDK4/6. Tanto o p21 quanto o p16 ao inibir as CDKs, inibe a fosforilação e inativação da pRb. A pRb ativada interrompe a transcrição de proteínas promotoras de crescimento celular (Calabrò; Accardi; Aiello; Caruso *et al.*, 2024; Kumari; Jat, 2021).

O carvacrol, por sua vez, na presença da D-galactose, reduziu significativamente a proporção de RCEC na fase G0/G1 e aumentou nas fases S e G2/M, indicando que o carvacrol reverteu a parada do ciclo celular na fase G0/G1 devido a maior distribuição dessas células nas fases do ciclo. Como o carvacrol é um potente antioxidante e o dano oxidativo é um dos principais responsáveis pela parada do ciclo celular em células senescente, é possível que sua ação esteja relacionada a esse mecanismo. Além disso, estudos anteriores relataram que o carvacrol, poderia modular negativamente os marcadores p53 e p21, cruciais para a parada do ciclo celular em células senescentes. Em condições basais, o tratamento com carvacrol aumentou significativamente a proporção de RCEC na fase G0/G1 e reduziu nas fases

S e G2/M quando comparado ao grupo CTL. Esses efeitos requerem uma investigação mais aprofundada em nível molecular.

Em resumo, as investigações demonstraram que o carvacrol restaurou a viabilidade celular, reduziu o acúmulo de células endoteliais senescentes, bem como atenuou os níveis de ROS, reduzindo o estresse oxidativo em RCEC. Esse efeito pode estar relacionado à diminuição da atividade da NADPH oxidase, mediada pela possível interação com o carvacrol. Além disso, o carvacrol aumentou a biodisponibilidade de NO, cuja ação protetora endotelial pode estar envolvida na redução da apoptose. Por fim, o carvacrol reduziu a proporção de células em parada do ciclo celular na fase G0/G1, possivelmente por modular negativamente o fator de transcrição p53, responsável pela ativação da via de parada do ciclo celular, característica da senescência.

Portanto, os resultados fornecem evidências de que o carvacrol pode ser um forte candidato para atuar como senoterapêutico de células endoteliais cavernosas, ao reduzir a senescência e seus efeitos deletérios, conferindo uma maior proteção endotelial e contribuindo para a prevenção da DE associada ao envelhecimento.

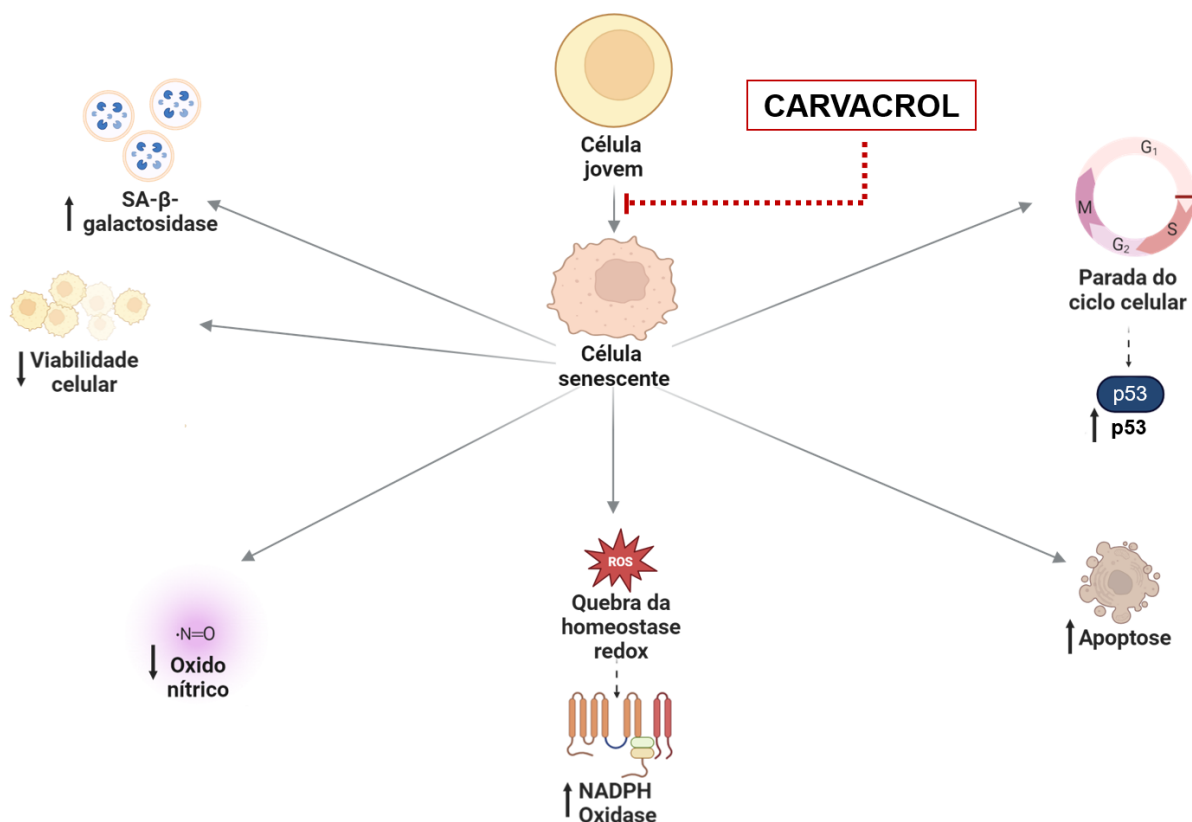
Conclusão

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que na senescência endotelial cavernosa induzida por D-galactose, por meio de análises *in vitro* e *in silico*, o carvacrol (Figura 53):

- Restaurou a viabilidade celular;
- Reduziu a senescência endotelial;
- Atenuou o estresse oxidativo;
- Possivelmente interage com alvos moleculares importantes das vias de senescência, principalmente p53 e NADPH oxidase, sendo essas alterações com alta estabilidade e baixas flutuações;
- Aumentou a biodisponibilidade de NO;
- Reduziu a apoptose inicial e tardia;
- Diminuiu a proporção de células na fase G0/G1 do ciclo celular.

Figura 53 - Mecanismos de ação do carvacrol na senescência endotelial cavernosa induzida por D-galactose



Referências

8 REFERÊNCIAS

- ABBASLOO, E.; KHAKSARI, M.; SANJARI, M.; KOBEISSY, F.; THOMAS, T. C. Carvacrol decreases blood–brain barrier permeability post-diffuse traumatic brain injury in rats. **Scientific Reports**, 13, n. 1, p. 14546, 2023/09/04 2023.
- ABDELGAWAD, I. Y.; AGOSTINUCCI, K.; ZORDOKY, B. N. Cardiovascular ramifications of therapy-induced endothelial cell senescence in cancer survivors. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, 1868, n. 4, p. 166352, 2022/04/01/ 2022.
- ABRAHAM, M. J.; MURTOLA, T.; SCHULZ, R.; PÁLL, S. *et al.* GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, 1-2, p. 19-25, 2015/09/01/ 2015.
- AGATONOVIC-KUSTRIN, S.; KUSTRIN, E.; MORTON, D. W. Essential oils and functional herbs for healthy aging. **Neural Regen Res**, 14, n. 3, p. 441-445, Mar 2019.
- AGU, P. C.; AFIUKWA, C. A.; ORJI, O. U.; EZEH, E. M. *et al.* Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in diseases management. **Scientific Reports**, 13, n. 1, p. 13398, 2023/08/17 2023.
- ALIREZA MORTAZAVI, H. M. P. K., FARIMAH BEHESHTI, AKBAR ANAEIGOUDARI, GHOLAMHASAN VAEZI AND MAHMOUD HOSSEINI. The effects of carvacrol on oxidative stress, inflammation, and liver function indicators in a systemic inflammation model induced by lipopolysaccharide in rats. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, 93, n. 2, p. 111-121, 2023.
- AMORIM, J. A.; COPPOTELLI, G.; ROLO, A. P.; PALMEIRA, C. M. *et al.* Mitochondrial and metabolic dysfunction in ageing and age-related diseases. **Nat Rev Endocrinol**, 18, n. 4, p. 243-258, Apr 2022.
- ANDERSSON, K. E. Mechanisms of penile erection and basis for pharmacological treatment of erectile dysfunction. **Pharmacol Rev**, 63, n. 4, p. 811-859, Dec 2011.
- ANDERSSON, K. E. Autonomic Regulation of Penile Erection. : Oxford University Press 2019.
- ANWAR, T.; KHOSLA, S.; RAMAKRISHNA, G. Increased expression of SIRT2 is a novel marker of cellular senescence and is dependent on wild type p53 status. **Cell Cycle**, 15, n. 14, p. 1883-1897, Jul 17 2016.
- ARGIOLAS, A.; ARGIOLAS, F. M.; ARGIOLAS, G.; MELIS, M. R. Erectile Dysfunction: Treatments, Advances and New Therapeutic Strategies. **Brain Sci**, 13, n. 5, May 15 2023.

AVERSA, A.; BRUZZICHES, R.; FRANCOMANO, D.; NATALI, M. *et al.* Endothelial dysfunction and erectile dysfunction in the aging man. **International Journal of Urology**, 17, n. 1, p. 38-47, 2010/01/01 2010.

AYAZ, M.; SADIQ, A.; JUNAID, M.; ULLAH, F. *et al.* Neuroprotective and Anti-Aging Potentials of Essential Oils from Aromatic and Medicinal Plants. **Front Aging Neurosci**, 9, p. 168, 2017.

AZIZI, Z.; MAJLESSI, N.; CHOOPANI, S.; NAGHDI, N. Neuroprotective effects of carvacrol against Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases: A review. **Avicenna J Phytomed**, 12, n. 4, p. 371-387, Jul-Aug 2022.

AZMAN, K. F.; ZAKARIA, R. d-Galactose-induced accelerated aging model: an overview. **Biogerontology**, 20, n. 6, p. 763-782, 2019/12/01 2019.

BABES, R. M.; TOFOLEAN, I. T.; SANDU, R. G.; BARAN, O. E. *et al.* Simple discrimination of sub-cycling cells by propidium iodide flow cytometric assay in Jurkat cell samples with extensive DNA fragmentation. **Cell Cycle**, 17, n. 6, p. 766-779, 2018.

BAIRD, L.; TAGUCHI, K.; ZHANG, A.; TAKAHASHI, Y. *et al.* A NRF2-induced secretory phenotype activates immune surveillance to remove irreparably damaged cells. **Redox Biology**, 66, p. 102845, 2023/10/01/ 2023.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, 46, n. 2, p. 446-475, 2008/02/01/ 2008.

BEGNINI, F.; GESCHWINDNER, S.; JOHANSSON, P.; WISSLER, L. *et al.* Importance of Binding Site Hydration and Flexibility Revealed When Optimizing a Macrocyclic Inhibitor of the Keap1–Nrf2 Protein–Protein Interaction. **Journal of Medicinal Chemistry**, 65, n. 4, p. 3473-3517, 2022/02/24 2022.

BERENDSEN, H. J. C.; VAN DER SPOEL, D.; VAN DRUNEN, R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. **Computer Physics Communications**, 91, n. 1, p. 43-56, 1995/09/02/ 1995.

BERNSTEIN, F. C.; KOETZLE, T. F.; WILLIAMS, G. J.; MEYER, E. F., JR. *et al.* The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. **J Mol Biol**, 112, n. 3, p. 535-542, May 25 1977.

BLICK, C.; RITCHIE, R. W.; SULLIVAN, M. E. Is Erectile Dysfunction an Example of Abnormal Endothelial Function? **Curr Vasc Pharmacol**, 14, n. 2, p. 163-167, 2016.

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.

BOGACKI-RYCHLIK, W.; GAWĘDA, K.; BIALY, M. Neurophysiology of male sexual arousal-Behavioral perspective. **Front Behav Neurosci**, 17, p. 1330460, 2023.

BONDI, A. van der Waals Volumes and Radii. **The Journal of Physical Chemistry**, 68, n. 3, p. 441-451, 1964/03/01 1964.

BREZA, J.; ABOSEIF, S. R.; ORVIS, B. R.; LUE, T. F.; TANAGHO, E. A. Detailed anatomy of penile neurovascular structures: surgical significance. **J Urol**, 141, n. 2, p. 437-443, Feb 1989.

CALABRÒ, A.; ACCARDI, G.; AIELLO, A.; CARUSO, C. *et al.* Senotherapeutics to Counteract Senescent Cells Are Prominent Topics in the Context of Anti-Ageing Strategies. **Int J Mol Sci**, 25, n. 3, Feb 1 2024.

CAMPISI, J.; KAPAH, P.; LITHGOW, G. J.; MELOV, S. *et al.* From discoveries in ageing research to therapeutics for healthy ageing. **Nature**, 571, n. 7764, p. 183-192, Jul 2019.

CAO, D.; WANG, M.; QIU, X.; LIU, D. *et al.* Structural basis for allosteric, substrate-dependent stimulation of SIRT1 activity by resveratrol. **Genes Dev**, 29, n. 12, p. 1316-1325, Jun 15 2015.

CARDOSO, A.; MAGANO, S.; MARRANA, F.; ANDRADE, J. P. D-Galactose High-Dose Administration Failed to Induce Accelerated Aging Changes in Neurogenesis, Anxiety, and Spatial Memory on Young Male Wistar Rats. **Rejuvenation Res**, 18, n. 6, p. 497-507, Dec 2015.

CASSIDY, L. D.; NARITA, M. Autophagy at the intersection of aging, senescence, and cancer. **Mol Oncol**, 16, n. 18, p. 3259-3275, Sep 2022.

CASTELA, Â.; COSTA, C. Molecular mechanisms associated with diabetic endothelial–erectile dysfunction. **Nature Reviews Urology**, 13, n. 5, p. 266-274, 2016/05/01 2016.

CASTELA, A.; SOARES, R.; ROCHA, F.; VENDEIRA, P. *et al.* Erectile tissue molecular alterations with aging: differential activation of the p42/44 MAP Kinase pathway. **Age (Dordr)**, 33, n. 2, p. 119-130, Jun 2011.

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.

CHAUDHARY, M. R.; CHAUDHARY, S.; SHARMA, Y.; SINGH, T. A. *et al.* Aging, oxidative stress and degenerative diseases: mechanisms, complications and emerging therapeutic strategies. **Biogerontology**, 24, n. 5, p. 609-662, 2023/10/01 2023.

CHEN, X.-Y.; LU, W.-T.; ZHANG, D.; TAN, M.-Y.; QIN, X. Development and validation of a prediction model for ED using machine learning: according to NHANES 2001–2004. **Scientific Reports**, 14, n. 1, p. 27279, 2024/11/08 2024.

CHILDS, B. G.; DURIK, M.; BAKER, D. J.; VAN DEURSEN, J. M. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. **Nat Med**, 21, n. 12, p. 1424-1435, Dec 2015.

CHO, Y.; GORINA, S.; JEFFREY, P. D.; PAVLETICH, N. P. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. **Science**, 265, n. 5170, p. 346-355, Jul 15 1994.

CORDEIRO, V. C., L. C. R. M.; BEM, G.; DA COSTA, C. ET AL. Euterpe oleracea Mart. extract prevents vascular remodeling and endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, 8, p. 6-16, 2015.

COSTANTINO, S.; PANENI, F.; COSENTINO, F. Ageing, metabolism and cardiovascular disease. **J Physiol**, 594, n. 8, p. 2061-2073, Apr 15 2016.

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.

DARZYNKIEWICZ, Z. Critical aspects in analysis of cellular DNA content. **Curr Protoc Cytom**, Chapter 7, p. 7.2.1-7.2.8, Apr 2011.

DAVALLI, P.; MITIC, T.; CAPORALI, A.; LAURIOLA, A.; D'ARCA, D. ROS, Cell Senescence, and Novel Molecular Mechanisms in Aging and Age-Related Diseases. **Oxid Med Cell Longev**, 2016, p. 3565127, 2016.

DE ALMEIDA, A.; DE ALMEIDA REZENDE, M. S.; DANTAS, S. H.; DE LIMA SILVA, S. *et al.* Unveiling the Role of Inflammation and Oxidative Stress on Age-Related Cardiovascular Diseases. **Oxid Med Cell Longev**, 2020, p. 1954398, 2020.

DE ALMEIDA, A.; DE OLIVEIRA, J.; DA SILVA PONTES, L. V.; DE SOUZA JÚNIOR, J. F. *et al.* ROS: Basic Concepts, Sources, Cellular Signaling, and its Implications in Aging Pathways. **Oxid Med Cell Longev**, 2022, p. 1225578, 2022.

DE ALMEIDA, A.; RIBEIRO, T. P.; DE MEDEIROS, I. A. Aging: Molecular Pathways and Implications on the Cardiovascular System. **Oxid Med Cell Longev**, 2017, p. 7941563, 2017.

DE ALMEIDA FEITOSA, M. S.; DE ALMEIDA, A. J. P. O.; DANTAS, S. H.; DE AZEVEDO, F. D. L. A. A. *et al.* Carvacrol prevents D-(+)-galactose-induced aging-associated erectile dysfunction by improving endothelial dysfunction and oxidative stress in rats. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, 2024/07/05 2024.

DE ALMEIDA REZENDE, M. S.; OLIVEIRA DE ALMEIDA, A. J. P.; GONÇALVES, T. A. F.; DE AZEVEDO, F. *et al.* D-(+)-Galactose-induced aging: A novel experimental model of erectile dysfunction. **PLoS One**, 16, n. 4, p. e0249487, 2021.

DE AZEVEDO, W. F., JR. MolDock applied to structure-based virtual screening. **Curr Drug Targets**, 11, n. 3, p. 327-334, Mar 2010.

DE MERA-RODRÍGUEZ, J. A.; ÁLVAREZ-HERNÁN, G.; GAÑÁN, Y.; MARTÍN-PARTIDO, G. *et al.* Senescence-associated β -galactosidase activity in the developing avian retina. **Developmental Dynamics**, 248, n. 9, p. 850-865, 2019/09/01 2019.

DE MERA-RODRÍGUEZ, J. A.; ÁLVAREZ-HERNÁN, G.; GAÑÁN, Y.; MARTÍN-PARTIDO, G. *et al.* Is Senescence-Associated β -Galactosidase a Reliable in vivo Marker of Cellular Senescence During Embryonic Development? **Front Cell Dev Biol**, 9, p. 623175, 2021.

DE SOUSA, D. P.; DAMASCENO, R. O. S.; AMORATI, R.; ELSHABRAWY, H. A. *et al.* Essential Oils: Chemistry and Pharmacological Activities. **Biomolecules**, v.13, n. 7, DOI: 10.3390/biom13071144.

DEAN, R. C.; LUE, T. F. Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction. **Urol Clin North Am**, 32, n. 4, p. 379-395, v, Nov 2005.

DELEDDA, A.; GIORDANO, E.; VELLUZZI, F.; FLORE, G. *et al.* Mitochondrial Aging and Senolytic Natural Products with Protective Potential. **Int J Mol Sci**, 23, n. 24, Dec 19 2022.

DENG, D.; ZHANG, Y.; TANG, B.; ZHANG, Z. Sources and applications of endothelial seed cells: a review. **Stem Cell Res Ther**, 15, n. 1, p. 175, Jun 18 2024.

DENHAM, J.; O'BRIEN, B. J.; CHARCHAR, F. J. Telomere Length Maintenance and Cardio-Metabolic Disease Prevention Through Exercise Training. **Sports Med**, 46, n. 9, p. 1213-1237, Sep 2016.

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.

DOMINGUEZ, L. J.; VERONESE, N.; BARBAGALLO, M. Magnesium and the Hallmarks of Aging. **Nutrients**, 16, n. 4, Feb 9 2024.

DONATO, A. J.; MORGAN, R. G.; WALKER, A. E.; LESNIEWSKI, L. A. Cellular and molecular biology of aging endothelial cells. **J Mol Cell Cardiol**, 89, n. Pt B, p. 122-135, Dec 2015.

DONATO, A. J.; WALKER, A. E.; MAGERKO, K. A.; BRAMWELL, R. C. *et al.* Life-long caloric restriction reduces oxidative stress and preserves nitric oxide bioavailability and function in arteries of old mice. **Aging Cell**, 12, n. 5, p. 772-783, Oct 2013.

DUNGAN, C. M.; MURACH, K. A.; ZDUNEK, C. J.; TANG, Z. J. *et al.* Deletion of SA β -Gal⁺ cells using senolytics improves muscle regeneration in old mice. **Aging Cell**, 21, n. 1, p. e13528, Jan 2022.

ECHEVERRI TIRADO, L. C.; FERRER, J. E.; HERRERA, A. M. Aging and Erectile Dysfunction. **Sex Med Rev**, 4, n. 1, p. 63-73, Jan 2016.

EL-FAR, A. H.; ELGHAITY, M. M.; MOHAMED, S. A.; NORELDIN, A. E. *et al.* Diosgenin alleviates D-galactose-induced oxidative stress in rats' brain and liver targeting aging and apoptotic marker genes. **Front Mol Biosci**, 11, p. 1303379, 2024.

EL-FAR, A. H.; MOHAMED, H. H.; ELSABAGH, D. A.; MOHAMED, S. A. *et al.* Eugenol and carvacrol attenuate brain D-galactose-induced aging-related oxidative alterations in rats. **Environ Sci Pollut Res Int**, 29, n. 31, p. 47436-47447, Jul 2022.

EL-SAYED, E. M.; ABD-ALLAH, A. R.; MANSOUR, A. M.; EL-ARABEY, A. A. Thymol and carvacrol prevent cisplatin-induced nephrotoxicity by abrogation of oxidative stress, inflammation, and apoptosis in rats. **J Biochem Mol Toxicol**, 29, n. 4, p. 165-172, Apr 2015.

ERUSALIMSKY, J. D. Vascular endothelial senescence: from mechanisms to pathophysiology. **J Appl Physiol (1985)**, 106, n. 1, p. 326-332, Jan 2009.

EVAZALIPOUR, M.; SAFARZADEH KOZANI, P.; SAFARZADEH KOZANI, P.; SHABANI, S. *et al.* Acrylamide Induced Oxidative Cellular Senescence in Embryonic Fibroblast Cell Line (NIH 3T3): A Protection by Carvacrol. **Jundishapur J Nat Pharm Prod**, 16, n. 4, p. e109399, 2021. Research Article.

FACHINI-QUEIROZ, F. C.; KUMMER, R.; ESTEVÃO-SILVA, C. F.; CARVALHO, M. D. *et al.* Effects of Thymol and Carvacrol, Constituents of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil, on the Inflammatory Response. **Evid Based Complement Alternat Med**, 2012, p. 657026, 2012.

FERRINI, M. G.; GONZALEZ-CADAVID, N. F.; RAJFER, J. Aging related erectile dysfunction—potential mechanism to halt or delay its onset. **Translational Andrology and Urology; Vol 6, No 1 (February 09, 2017): Translational Andrology and Urology (Erectile Dysfunction)**, 2017.

FERRINI, M. G.; KOVANECH, I.; SANCHEZ, S.; VERNET, D. *et al.* Long-Term Continuous Treatment with Sildenafil Ameliorates Aging-Related Erectile Dysfunction and the Underlying Corporal Fibrosis in the Rat1. **Biology of Reproduction**, 76, n. 5, p. 915-923, 2007.

FORQANI, M. A.; AKBARIAN, M.; AMIRAHMADI, S.; KHORRAMI, M. B. *et al.* Protective Effect of Carvacrol against Oxidative Damage in Aged Rats. **Cent Nerv Syst Agents Med Chem**, Aug 13 2024.

FRANCESCHI, C.; BONAFÈ, M.; VALENSIN, S. Human immunosenescence: the prevailing of innate immunity, the failing of clonotypic immunity, and the filling of immunological space. **Vaccine**, 18, n. 16, p. 1717-1720, Feb 25 2000.

FRIEDMAN, M. Chemistry and multibeneficial bioactivities of carvacrol (4-isopropyl-2-methylphenol), a component of essential oils produced by aromatic plants and spices. **J Agric Food Chem**, 62, n. 31, p. 7652-7670, Aug 6 2014.

FU, Z.; ZHANG, J.; ZHANG, Y. Role of Molecular Hydrogen in Ageing and Ageing-Related Diseases. **Oxid Med Cell Longev**, 2022, p. 2249749, 2022.

GARCÍA-TREJO, S. S.; GÓMEZ-SIERRA, T.; EUGENIO-PÉREZ, D.; MEDINA-CAMPOS, O. N.; PEDRAZA-CHAVERRI, J. Protective Effect of Curcumin on D-Galactose-Induced Senescence and Oxidative Stress in LLC-PK1 and HK-2 Cells. **Antioxidants**, v.13, n. 4, DOI: 10.3390/antiox13040415.

GARG, S.; DATE, S. V.; GUPTA, A.; BALIARSING, A. S. Successful microsurgical replantation of an amputated penis. **Indian J Plast Surg**, 49, n. 1, p. 99-105, Jan-Apr 2016.

GENSLER, H. L.; BERNSTEIN, H. DNA damage as the primary cause of aging. **Q Rev Biol**, 56, n. 3, p. 279-303, Sep 1981.

GONÇALVES TAF, M. P., VILLANUEVA LIM, DOS SANTOS PF, JÚNIOR ILO, VERAS RC, ARAÚJO IGA, MEDEIROS IAD. 5-Isopropyl-2-methylphenol enhances penile function in spontaneously hypertensive rats. **The Journal of Applied Pharmaceutical Science**, 14 (02), p. 126-135, 2024

GONZÁLEZ-GUALDA, E.; BAKER, A. G.; FRUK, L.; MUÑOZ-ESPÍN, D. A guide to assessing cellular senescence in vitro and in vivo. **The FEBS Journal**, 288, n. 1, p. 56-80, 2021/01/01 2021.

GORGOU LIS, V.; ADAMS, P. D.; ALIMONTI, A.; BENNETT, D. C. *et al.* Cellular Senescence: Defining a Path Forward. **Cell**, 179, n. 4, p. 813-827, 2019.

GRABOWSKA, W.; SIKORA, E.; BIELAK-ZMIJEWSKA, A. Sirtuins, a promising target in slowing down the ageing process. **Biogerontology**, 18, n. 4, p. 447-476, Aug 2017.

GU, Y. Y.; TAN, X. H.; SONG, W. P.; SONG, W. D. *et al.* Icariside II Attenuates Palmitic Acid-Induced Endothelial Dysfunction Through SRPK1-Akt-eNOS Signaling Pathway. **Front Pharmacol**, 13, p. 920601, 2022.

GUDURIC-FUCHS, J.; PEDRINI, E.; BERTELLI, P. M.; MCDONNELL, S. *et al.* A new gene signature for endothelial senescence identifies self-RNA sensing by retinoic acid-inducible gene I as a molecular facilitator of vascular aging. **Aging Cell**, 23, n. 9, p. e14240, 2024/09/01 2024.

GUNES-BAYIR, A.; GULER, E. M.; BILGIN, M. G.; ERGUN, I. S. *et al.* Anti-Inflammatory and Antioxidant Effects of Carvacrol on N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine (MNNG) Induced Gastric Carcinogenesis in Wistar Rats. **Nutrients**, v.14, n. 14, DOI: 10.3390/nu14142848.

GUO, B.; GUO, Q.; WANG, Z.; SHAO, J. B. *et al.* D-Galactose-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the cochlear basilar membrane: an in vitro aging model. **Biogerontology**, 21, n. 3, p. 311-323, Jun 2020.

GURĂU, F.; BALDONI, S.; PRATTICHIZZO, F.; ESPINOSA, E. *et al.* Anti-senescence compounds: A potential nutraceutical approach to healthy aging. **Ageing Research Reviews**, 46, p. 14-31, 2018/09/01/ 2018.

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. THE FREE RADICAL THEORY OF AGING: EFFECT OF AGE ON SERUM COPPER LEVELS. **J Gerontol**, 20, p. 151-153, Apr 1965.

HARMAN, D. The aging process. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 78, n. 11, p. 7124-7128, Nov 1981.

HAYASHI, T.; MATSUI-HIRAI, H.; MIYAZAKI-AKITA, A.; FUKATSU, A. *et al.* Endothelial cellular senescence is inhibited by nitric oxide: Implications in atherosclerosis associated with menopause and diabetes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 103, n. 45, p. 17018-17023, 2006/11/07 2006.

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

HELMY, M. M.; SENBEL, A. M. Evaluation of vitamin E in the treatment of erectile dysfunction in aged rats. **Life Sci**, 90, n. 13-14, p. 489-494, Apr 9 2012.

HERRANZ, N.; GIL, J. Mechanisms and functions of cellular senescence. **J Clin Invest**, 128, n. 4, p. 1238-1246, Apr 2 2018.

HOLDEN, F.; AKERS, C.; LLAHANA, S. Diagnosis and Management of Erectile Dysfunction in Men. *In*: LLAHANA, S.; FOLLIN, C., *et al* (Ed.). **Advanced Practice in Endocrinology Nursing**. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 925-941.

HONG, Y.; BOITI, A.; VALLONE, D.; FOULKES, N. S. Reactive Oxygen Species Signaling and Oxidative Stress: Transcriptional Regulation and Evolution. **Antioxidants**, v.13, n. 3, DOI: 10.3390/antiox13030312.

HUANG, W.; HICKSON, L. J.; EIRIN, A.; KIRKLAND, J. L.; LERMAN, L. O. Cellular senescence: the good, the bad and the unknown. **Nat Rev Nephrol**, 18, n. 10, p. 611-627, Oct 2022.

HUNG, L. H.; GUERQUIN, M.; SAMUDRALA, R. GPU-Q-J, a fast method for calculating root mean square deviation (RMSD) after optimal superposition. **BMC Res Notes**, 4, p. 97, Apr 1 2011.

HURT, K. J.; MUSICKI, B.; PALESE, M. A.; CRONE, J. K. *et al.* Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase mediates penile erection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 99, n. 6, p. 4061-4066, Mar 19 2002.

HWANG, H. J.; KIM, N.; HERMAN, A. B.; GOROSPE, M.; LEE, J. S. Factors and Pathways Modulating Endothelial Cell Senescence in Vascular Aging. **Int J Mol Sci**, 23, n. 17, Sep 4 2022.

IAKOVOU, E.; KOURTI, M. A Comprehensive Overview of the Complex Role of Oxidative Stress in Aging, The Contributing Environmental Stressors and Emerging

Antioxidant Therapeutic Interventions. **Frontiers in Aging Neuroscience**, 14, 2022. Review.

IBGE, I. B. D. G. E. E. **Censo Demográfico 2022 - População por idade e sexo, Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação**. 2022. Disponível em: https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/media/com_mediaibge/arquivos/0c84737978791f626ea10b75eae18b3c.docx. Acesso em: 04/11.

IMRAN, M.; ASLAM, M.; ALSAGABY, S. A.; SAEED, F. *et al.* Therapeutic application of carvacrol: A comprehensive review. **Food Science & Nutrition**, 10, n. 11, p. 3544-3561, 2022/11/01 2022.

ISLAM, M. T.; HALL, S. A.; DUTSON, T.; BLOOM, S. I. *et al.* Endothelial cell-specific reduction in mTOR ameliorates age-related arterial and metabolic dysfunction. **Aging Cell**, 23, n. 2, p. e14040, Feb 2024.

JI, Y.; CHEN, J.; PANG, L.; CHEN, C. *et al.* The Acid Sphingomyelinase Inhibitor Amitriptyline Ameliorates TNF- α -Induced Endothelial Dysfunction. **Cardiovasc Drugs Ther**, 38, n. 1, p. 43-56, Feb 2024.

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.

JOMOVA, K.; RAPTOVA, R.; ALOMAR, S. Y.; ALWASEL, S. H. *et al.* Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging. **Archives of Toxicology**, 97, n. 10, p. 2499-2574, 2023/10/01 2023.

JUÁREZ-FERNÁNDEZ, M.; PORRAS, D.; GARCÍA-MEDIAVILLA, M. V.; ROMÁN-SAGÜILLO, S. *et al.* Aging, Gut Microbiota and Metabolic Diseases: Management through Physical Exercise and Nutritional Interventions. **Nutrients**, 13, n. 1, Dec 23 2020.

JUNG, J.; JO, H. W.; KWON, H.; JEONG, N. Y. Clinical neuroanatomy and neurotransmitter-mediated regulation of penile erection. **Int Neurourol J**, 18, n. 2, p. 58-62, Jun 2014.

KAIEDA, A.; TAKAHASHI, M.; TAKAI, T.; GOTO, M. *et al.* Structure-based design, synthesis, and biological evaluation of imidazo[1,2-b]pyridazine-based p38 MAP kinase inhibitors. **Bioorg Med Chem**, 26, n. 3, p. 647-660, Feb 1 2018.

KALTSAS, A.; ZIKOPOULOS, A.; DIMITRIADIS, F.; SHESHI, D. *et al.* Oxidative Stress and Erectile Dysfunction: Pathophysiology, Impacts, and Potential Treatments. **Curr Issues Mol Biol**, 46, n. 8, p. 8807-8834, Aug 14 2024.

KAMILOGLU, S.; SARI, G.; OZDAL, T.; CAPANOGLU, E. Guidelines for cell viability assays. **Food Frontiers**, 1, n. 3, p. 332-349, 2020/09/01 2020.

KESSLER, A.; SOLLIE, S.; CHALLACOMBE, B.; BRIGGS, K.; VAN HEMELRIJCK, M. The global prevalence of erectile dysfunction: a review. **BJU Int**, 124, n. 4, p. 587-599, Oct 2019.

KHAZDAIR, M. R.; MOSHTAGH, M.; ANAEIGOUDARI, A.; JAFARI, S.; KAZEMI, T. Protective effects of carvacrol on lipid profiles, oxidative stress, hypertension, and cardiac dysfunction – A comprehensive review. **Food Science & Nutrition**, 12, n. 5, p. 3137-3149, 2024.

KHOR, E.-S.; WONG, P.-F. The roles of MTOR and miRNAs in endothelial cell senescence. **Biogerontology**, 21, n. 5, p. 517-530, 2020/10/01 2020.

KIDA, Y.; GOLIGORSKY, M. S. Sirtuins, Cell Senescence, and Vascular Aging. **Can J Cardiol**, 32, n. 5, p. 634-641, May 2016.

KONG, S. Z.; LI, J. C.; LI, S. D.; LIAO, M. N. *et al.* Anti-Aging Effect of Chitosan Oligosaccharide on d-Galactose-Induced Subacute Aging in Mice. **Mar Drugs**, 16, n. 6, May 24 2018.

KUDLOVA, N.; DE SANCTIS, J. B.; HAJDUCH, M. Cellular Senescence: Molecular Targets, Biomarkers, and Senolytic Drugs. **Int J Mol Sci**, 23, n. 8, Apr 10 2022.

KUMAR, P.; NAGARAJAN, A.; UCHIL, P. D. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. **Cold Spring Harb Protoc**, 2018, n. 6, Jun 1 2018.

KUMARI, R.; JAT, P. Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. **Front Cell Dev Biol**, 9, p. 645593, 2021.

LANGE, K. W.; LI, S. Resveratrol, pterostilbene, and dementia. **BioFactors**, 44, n. 1, p. 83-90, 2018.

LASSÈGUE, B.; CLEMPUS, R. E. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 285, n. 2, p. R277-297, Aug 2003.

LECOEUR, H.; LEDRU, E.; PRÉVOST, M. C.; GOUGEON, M. L. Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin-V and 7-AAD cytofluorometric staining methods. **J Immunol Methods**, 209, n. 2, p. 111-123, Dec 1 1997.

LEDRHEM, M.; NAKAMURA, M.; OBITSU, M.; HIRAE, K. *et al.* Essential Oils Derived from Cistus Species Activate Mitochondria by Inducing SIRT1 Expression in Human Keratinocytes, Leading to Senescence Inhibition. **Molecules**, 27, n. 7, Mar 22 2022.

LEE, A. C.; FENSTER, B. E.; ITO, H.; TAKEDA, K. *et al.* Ras Proteins Induce Senescence by Altering the Intracellular Levels of Reactive Oxygen Species*. **Journal of Biological Chemistry**, 274, n. 12, p. 7936-7940, 1999/03/19/ 1999.

LEE, B. Y.; HAN, J. A.; IM, J. S.; MORRONE, A. *et al.* Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. **Aging Cell**, 5, n. 2, p. 187-195, Apr 2006.

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.

LEE, H.-Y.; ZEESHAN, H. M. A.; KIM, H.-R.; CHAE, H.-J. Nox4 regulates the eNOS uncoupling process in aging endothelial cells. **Free Radical Biology and Medicine**, 113, p. 26-35, 2017/12/01/ 2017.

LEE, O. H.; WOO, Y. M.; MOON, S.; LEE, J. *et al.* Sirtuin 6 deficiency induces endothelial cell senescence via downregulation of forkhead box M1 expression. **Aging (Albany NY)**, 12, n. 21, p. 20946-20967, Nov 10 2020.

LEE, S. H.; LEE, J. H.; LEE, H. Y.; MIN, K. J. Sirtuin signaling in cellular senescence and aging. **BMB Rep**, 52, n. 1, p. 24-34, Jan 2019.

LI, W.; QIN, L.; FENG, R.; HU, G. *et al.* Emerging senolytic agents derived from natural products. **Mechanisms of Ageing and Development**, 181, p. 1-6, 2019/07/01/ 2019.

LI, Y.; TIAN, X.; LUO, J.; BAO, T. *et al.* Molecular mechanisms of aging and anti-aging strategies. **Cell Commun Signal**, 22, n. 1, p. 285, May 24 2024.

LIGUORI, I.; RUSSO, G.; CURCIO, F.; BULLI, G. *et al.* Oxidative stress, aging, and diseases. **Clin Interv Aging**, 13, p. 757-772, 2018.

LIU, Y.; FANG, M.; TU, X.; MO, X. *et al.* Dietary Polyphenols as Anti-Aging Agents: Targeting the Hallmarks of Aging. **Nutrients**, 16, n. 19, Sep 29 2024.

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

LÓPEZ-OTÍN, C.; BLASCO, M. A.; PARTRIDGE, L.; SERRANO, M.; KROEMER, G. Hallmarks of aging: An expanding universe. **Cell**, 186, n. 2, p. 243-278, 2023.

MAĆZKA, W.; TWARDAWSKA, M.; GRABARCZYK, M.; WIŃSKA, K. Carvacrol-A Natural Phenolic Compound with Antimicrobial Properties. **Antibiotics (Basel)**, 12, n. 5, Apr 27 2023.

MALDE, A. K.; ZUO, L.; BREEZE, M.; STROET, M. *et al.* An Automated Force Field Topology Builder (ATB) and Repository: Version 1.0. **J Chem Theory Comput**, 7, n. 12, p. 4026-4037, Dec 13 2011.

MANSFIELD, L.; RAMPONI, V.; GUPTA, K.; STEVENSON, T. *et al.* Emerging insights in senescence: pathways from preclinical models to therapeutic innovations. **npj Aging**, 10, n. 1, p. 53, 2024/11/22 2024.

MASSENET, C.; CHENAVAS, S.; COHEN-ADDAD, C.; DAGHER, M. C. *et al.* Effects of p47phox C terminus phosphorylations on binding interactions with p40phox and p67phox. Structural and functional comparison of p40phox and p67phox SH3 domains. **J Biol Chem**, 280, n. 14, p. 13752-13761, Apr 8 2005.

MATERA, R.; LUCCHI, E.; VALGIMIGLI, L. Plant Essential Oils as Healthy Functional Ingredients of Nutraceuticals and Diet Supplements: A Review. **Molecules**, v.28, n. 2, DOI: 10.3390/molecules28020901.

MC AULEY, M. T. The evolution of ageing: classic theories and emerging ideas. **Biogerontology**, 26, n. 1, p. 6, Oct 29 2024.

MCCAY, C. M.; MAYNARD, L. A.; SPERLING, G.; BARNES, L. L. The Journal of Nutrition. Volume 18 July--December, 1939. Pages 1--13. Retarded growth, life span, ultimate body size and age changes in the albino rat after feeding diets restricted in calories. **Nutr Rev**, 33, n. 8, p. 241-243, Aug 1939.

MCHUGH, D.; DURÁN, I.; GIL, J. Senescence as a therapeutic target in cancer and age-related diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, 24, n. 1, p. 57-71, 2025/01/01 2025.

MCMAHON, C. G. Current diagnosis and management of erectile dysfunction. **Med J Aust**, 210, n. 10, p. 469-476, Jun 2019.

MELDRUM, D. R.; MORRIS, M. A.; GAMBONE, J. C.; ESPOSITO, K. Aging and erectile function. **Aging Male**, 23, n. 5, p. 1115-1124, Dec 2020.

MENG, X. Y.; ZHANG, H. X.; MEZEI, M.; CUI, M. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. **Curr Comput Aided Drug Des**, 7, n. 2, p. 146-157, Jun 2011.

METTO, E. C.; EVANS, K.; BARNEY, P.; CULBERTSON, A. H. *et al.* An integrated microfluidic device for monitoring changes in nitric oxide production in single T-lymphocyte (Jurkat) cells. **Anal Chem**, 85, n. 21, p. 10188-10195, Nov 5 2013.

MING, X. F.; VISWAMBHARAN, H.; BARANDIER, C.; RUFFIEUX, J. *et al.* Rho GTPase/Rho kinase negatively regulates endothelial nitric oxide synthase phosphorylation through the inhibition of protein kinase B/Akt in human endothelial cells. **Mol Cell Biol**, 22, n. 24, p. 8467-8477, Dec 2002.

MOBLEY, D. F.; KHERA, M.; BAUM, N. Recent advances in the treatment of erectile dysfunction. **Postgrad Med J**, 93, n. 1105, p. 679-685, Nov 2017.

MONTEZANO, A. C.; TOUYZ, R. M. Reactive Oxygen Species and Endothelial Function – Role of Nitric Oxide Synthase Uncoupling and Nox Family Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidases. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 110, n. 1, p. 87-94, 2012/01/01 2012.

MONTORSI, P.; RAVAGNANI, P. M.; GALLI, S.; ROTATORI, F. *et al.* Common grounds for erectile dysfunction and coronary artery disease. **Curr Opin Urol**, 14, n. 6, p. 361-365, Nov 2004.

MORRIS, B. J. Sirtuins in Aging. *In*: GU, D. e DUPRE, M. E. (Ed.). **Encyclopedia of Gerontology and Population Aging**. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 1-10.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 16 1983.

MUÑOZ-ESPÍN, D.; SERRANO, M. Cellular senescence: from physiology to pathology. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 15, n. 7, p. 482-496, 2014/07/01 2014.

MUSICKI, B.; LIU, T.; LAGODA, G. A.; STRONG, T. D. *et al.* Hypercholesterolemia-induced erectile dysfunction: endothelial nitric oxide synthase (eNOS) uncoupling in the mouse penis by NAD(P)H oxidase. **J Sex Med**, 7, n. 9, p. 3023-3032, Sep 2010.

NACHBAGAUER, R.; FESER, J.; NAFICY, A.; BERNSTEIN, D. I. *et al.* A chimeric hemagglutinin-based universal influenza virus vaccine approach induces broad and long-lasting immunity in a randomized, placebo-controlled phase I trial. **Nature Medicine**, 27, n. 1, p. 106-114, 2021/01/01 2021.

NAVARRO, C.; SALAZAR, J.; DÍAZ, M. P.; CHACIN, M. *et al.* Intrinsic and environmental basis of aging: A narrative review. **Heliyon**, 9, n. 8, p. e18239, Aug 2023.

NIH. NIH Consensus Conference. Impotence. NIH Consensus Development Panel on Impotence. **Jama**, 270, n. 1, p. 83-90, Jul 7 1993.

NISHIMATSU, H.; SUZUKI, E.; SAITO, Y.; NIIMI, A. *et al.* Senescent Cells Impair Erectile Function through Induction of Endothelial Dysfunction and Nerve Injury in Mice. **PLoS One**, 10, n. 4, p. e0124129, 2015.

NIU, H.; LI, J.; LIANG, H.; WU, G.; CHEN, M. Exogenous Hydrogen Sulfide Activates PI3K/Akt/eNOS Pathway to Improve Replicative Senescence in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. **Cardiol Res Pract**, 2023, p. 7296874, 2023.

NURHAYATI, A. P. D.; RIHANDOKO, A.; FADLAN, A.; GHAISSANI, S. S. *et al.* Anti-cancer potency by induced apoptosis by molecular docking P53, caspase, cyclin D1, cytotoxicity analysis and phagocytosis activity of trisindoline 1,3 and 4. **Saudi Pharmaceutical Journal**, 30, n. 9, p. 1345-1359, 2022/09/01/ 2022.

OGRODNIK, M. Cellular aging beyond cellular senescence: Markers of senescence prior to cell cycle arrest in vitro and in vivo. **Aging Cell**, 20, n. 4, p. e13338, Apr 2021.

OLOVNIKOV, A. M. Telomeres, telomerase, and aging: origin of the theory. **Exp Gerontol**, 31, n. 4, p. 443-448, Jul-Aug 1996.

ORGEL, L. E. The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 49, n. 4, p. 517-521, Apr 1963.

OTA, H.; ETO, M.; KANO, M. R.; OGAWA, S. *et al.* Cilostazol inhibits oxidative stress-induced premature senescence via upregulation of Sirt1 in human endothelial cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 28, n. 9, p. 1634-1639, Sep 2008.

PELLEGRINO, F.; SJOBERG, D. D.; TIN, A. L.; BENFANTE, N. E. *et al.* Relationship Between Age, Comorbidity, and the Prevalence of Erectile Dysfunction. **Eur Urol Focus**, 9, n. 1, p. 162-167, Jan 2023.

PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; MENG, E. C. *et al.* UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. **Protein Sci**, 30, n. 1, p. 70-82, Jan 2021.

PEZANTES-ORELLANA, C.; GERMAN BERMÚDEZ, F.; MATÍAS DE LA CRUZ, C.; MONTALVO, J. L.; ORELLANA-MANZANO, A. Essential oils: a systematic review on revolutionizing health, nutrition, and omics for optimal well-being. **Front Med (Lausanne)**, 11, p. 1337785, 2024.

PIECHOTA, M.; SUNDERLAND, P.; WYSOCKA, A.; NALBERCZAK, M. *et al.* Is senescence-associated β -galactosidase a marker of neuronal senescence? **Oncotarget**, 7, n. 49, 2016.

PITERA, J. W. Expected distributions of root-mean-square positional deviations in proteins. **J Phys Chem B**, 118, n. 24, p. 6526-6530, Jun 19 2014.

RAGONNAUD, E.; BIRAGYN, A. Gut microbiota as the key controllers of "healthy" aging of elderly people. **Immun Ageing**, 18, n. 1, p. 2, Jan 5 2021.

RAJIV GANDHI, G.; SHARANYA, C. S.; JAYANANDAN, A.; HARIDAS, M. *et al.* Multitargeted molecular docking and dynamics simulation studies of flavonoids and volatile components from the peel of Citrus sinensis L. (Osbeck) against specific tumor protein markers. **J Biomol Struct Dyn**, 42, n. 6, p. 3051-3080, Apr 2024.

RINKŪNIENĖ, E.; GIMŽAUSKAITĖ, S.; BADARIENĖ, J.; DŽENKEVIČIŪTĖ, V. *et al.* The Prevalence of Erectile Dysfunction and Its Association with Cardiovascular Risk Factors in Patients after Myocardial Infarction. **Medicina (Kaunas)**, 57, n. 10, Oct 14 2021.

RIPPE, C.; BLIMLINE, M.; MAGERKO, K. A.; LAWSON, B. R. *et al.* MicroRNA changes in human arterial endothelial cells with senescence: relation to apoptosis, eNOS and inflammation. **Exp Gerontol**, 47, n. 1, p. 45-51, Jan 2012.

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.

SACCON, T. D.; NAGPAL, R.; YADAV, H.; CAVALCANTE, M. B. *et al.* Senolytic Combination of Dasatinib and Quercetin Alleviates Intestinal Senescence and

Inflammation and Modulates the Gut Microbiome in Aged Mice. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, 76, n. 11, p. 1895-1905, Oct 13 2021.

SALAZAR, J.; DURÁN, P.; DÍAZ, M. P.; CHACÍN, M. *et al.* Exploring the Relationship between the Gut Microbiota and Ageing: A Possible Age Modulator. **Int J Environ Res Public Health**, 20, n. 10, May 17 2023.

SALMINEN, A.; KAUPPINEN, A.; KAARNIRANTA, K. Emerging role of NF- κ B signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP). **Cellular Signalling**, 24, n. 4, p. 835-845, 2012/04/01/ 2012.

SAMARGHANDIAN, S.; FARKHONDEH, T.; SAMINI, F.; BORJI, A. Protective Effects of Carvacrol against Oxidative Stress Induced by Chronic Stress in Rat's Brain, Liver, and Kidney. **Biochem Res Int**, 2016, p. 2645237, 2016.

SCHLOSSER, J.; RAREY, M. Beyond the virtual screening paradigm: structure-based searching for new lead compounds. **J Chem Inf Model**, 49, n. 4, p. 800-809, Apr 2009.

SCHROEDER-CASTAGNO, M.; DEL RIO-SERRATO, A.; WILHELM, A.; ROMERO-SUÁREZ, S. *et al.* Impaired response of blood neutrophils to cell-death stimulus differentiates AQP4-IgG-seropositive NMOSD from MOGAD. **J Neuroinflammation**, 19, n. 1, p. 239, Oct 1 2022.

SEGAL, R.; HANNAN, J. L.; LIU, X.; KUTLU, O. *et al.* Chronic oral administration of the arginase inhibitor 2(S)-amino-6-boronohexanoic acid (ABH) improves erectile function in aged rats. **J Androl**, 33, n. 6, p. 1169-1175, Nov-Dec 2012.

SENBEL, A. M.; HASHAD, A. M.; SHARABI, F. M.; DAABEES, T. T. Combined effect of sildenafil and guanethidine, propranolol or verapamil on erectile function in rats. **J Pharm Pharmacol**, 64, n. 11, p. 1659-1666, Nov 2012.

SHAIKH, S. B.; BALAYA, R. D. A.; DAGAMAJALU, S.; BHANDARY, Y. P. *et al.* A signaling pathway map of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1/SERPINE-1): a review of an innovative frontier in molecular aging and cellular senescence. **Cell Communication and Signaling**, 22, n. 1, p. 544, 2024/11/14 2024.

SHAITO, A.; ARAMOUNI, K.; ASSAF, R.; PARENTI, A. *et al.* Oxidative Stress-Induced Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases. **FBL**, 27, n. 3, 2022-03-25 2022.

SHARP, A. M.; STEIN, P. E.; PANNU, N. S.; CARRELL, R. W. *et al.* The active conformation of plasminogen activator inhibitor 1, a target for drugs to control fibrinolysis and cell adhesion. **Structure**, 7, n. 2, p. 111-118, Feb 15 1999.

SHINDEL, A. W.; LUE, T. F. Medical and Surgical Therapy of Erectile Dysfunction. *In*: FEINGOLD, K. R.; ANAWALT, B., *et al.* (Ed.). **Endotext**. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.

Copyright © 2000-2025, MDText.com, Inc., 2000.

SIN, V. J.; ANAND, G. S.; KOH, H. L. Botanical Medicine and Natural Products Used for Erectile Dysfunction. **Sex Med Rev**, 9, n. 4, p. 568-592, Oct 2021.

SINGH, C. K.; CHHABRA, G.; NDIAYE, M. A.; GARCIA-PETERSON, L. M. *et al.* The Role of Sirtuins in Antioxidant and Redox Signaling. **Antioxid Redox Signal**, 28, n. 8, p. 643-661, Mar 10 2018.

SONG, L.; ZHANG, S. Anti-Aging Activity and Modes of Action of Compounds from Natural Food Sources. **Biomolecules**, 13, n. 11, Oct 31 2023.

SONG, Z.; LIU, Y.; HAO, B.; YU, S. *et al.* Ginsenoside Rb1 prevents H₂O₂-induced HUVEC senescence by stimulating sirtuin-1 pathway. **PLoS One**, 9, n. 11, p. e112699, 2014.

SUN, Y.; HU, X.; HU, G.; XU, C.; JIANG, H. Curcumin Attenuates Hydrogen Peroxide-Induced Premature Senescence *via* the Activation of SIRT1 in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 38, n. 8, p. 1134-1141, 2015.

SUNTRES, Z. E.; COCCIMIGLIO, J.; ALIPOUR, M. The Bioactivity and Toxicological Actions of Carvacrol. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 55, n. 3, p. 304-318, 2015/02/23 2015.

SURUGIU, R.; IANCU, M. A.; VINTILESCU Ș, B.; STEPAN, M. D. *et al.* Molecular Mechanisms of Healthy Aging: The Role of Caloric Restriction, Intermittent Fasting, Mediterranean Diet, and Ketogenic Diet-A Scoping Review. **Nutrients**, 16, n. 17, Aug 28 2024.

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

TAREEN, F. K.; CATENACCI, L.; PERTEGHELLA, S.; SORRENTI, M.; BONFERONI, M. C. Carvacrol Essential Oil as a Neuroprotective Agent: A Review of the Study Designs and Recent Advances. **Molecules**, v.30, n. 1, DOI: 10.3390/molecules30010104.

TARTIERE, A. G.; FREIJE, J. M. P.; LÓPEZ-OTÍN, C. The hallmarks of aging as a conceptual framework for health and longevity research. **Front Aging**, 5, p. 1334261, 2024.

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

VALIEVA, Y.; IVANOVA, E.; FAYZULLIN, A.; KURKOV, A.; IGRUNKOVA, A. Senescence-Associated β -Galactosidase Detection in Pathology. **Diagnostics (Basel)**, 12, n. 10, Sep 25 2022.

VAN DEURSEN, J. M. The role of senescent cells in ageing. **Nature**, 509, n. 7501, p. 439-446, May 22 2014.

VAUGHAN, D. E.; RAI, R.; KHAN, S. S.; EREN, M.; GHOSH, A. K. Plasminogen Activator Inhibitor-1 Is a Marker and a Mediator of Senescence. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 37, n. 8, p. 1446-1452, Aug 2017.

VERLI, H. **Bioinformática: da Biologia à Flexibilidade Molecular**. Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq: 2014.

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.

VIARO, F. É., PAULO ROBERTO B. . Expressão das óxido nítrico sintetases na vasculopatia coronariana do transplante cardíaco. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, 15, n. 1, p. 55-65, 2000.

WAGHELA, B. N.; VAIDYA, F. U.; AGRAWAL, Y.; SANTRA, M. K. *et al.* Molecular insights of NADPH oxidases and its pathological consequences. **Cell Biochemistry and Function**, 39, n. 2, p. 218-234, 2021/03/01 2021.

WANG, H. H.; SUN, Y. N.; QU, T. Q.; SANG, X. Q. *et al.* Nobiletin Prevents D-Galactose-Induced C2C12 Cell Aging by Improving Mitochondrial Function. **Int J Mol Sci**, 23, n. 19, Oct 8 2022.

WANG, N.; ZHANG, C. Oxidative Stress: A Culprit in the Progression of Diabetic Kidney Disease. **Antioxidants (Basel)**, 13, n. 4, Apr 12 2024.

WANG, P.; KONJA, D.; SINGH, S.; ZHANG, B.; WANG, Y. Endothelial Senescence: From Macro- to Micro-Vasculature and Its Implications on Cardiovascular Health. **International Journal of Molecular Sciences**, v.25, n. 4, DOI: 10.3390/ijms25041978.

WANG, X.; LUO, D.; KOU, X.; YE, S. *et al.* Carvacrol enhances antioxidant activity and slows down cell wall metabolism by maintaining the energy level of ‘Guifei’ mango. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 105, n. 4, p. 2134-2145, 2025/03/15 2025.

WEISMANN, A. **Essays upon heredity and kindred biological problems**. Clarendon press, 1891.

WEYEMI, U.; LAGENTE-CHEVALLIER, O.; BOUFRAQECH, M.; PRENOIS, F. *et al.* ROS-generating NADPH oxidase NOX4 is a critical mediator in oncogenic H-Ras-induced DNA damage and subsequent senescence. **Oncogene**, 31, n. 9, p. 1117-1129, 2012/03/01 2012.

WOJTALA, A.; BONORA, M.; MALINSKA, D.; PINTON, P. *et al.* Methods to monitor ROS production by fluorescence microscopy and fluorometry. **Methods Enzymol**, 542, p. 243-262, 2014.

WU, J.; BAI, Q.; CHEN, J.; YANG, Z.; ZHU, X. Systemic Analyses of Anti-Cell-Senescence Active Compounds in Camellia Sect. Chrysanthus and Their Mechanisms. **Plants (Basel)**, 13, n. 15, Aug 1 2024.

WU, W.; HOU, C. L.; MU, X. P.; SUN, C. *et al.* H₂S Donor NaHS Changes the Production of Endogenous H₂S and NO in D-Galactose-Induced Accelerated Ageing. **Oxid Med Cell Longev**, 2017, p. 5707830, 2017.

WU, Y.; DING, Y.; RAMPRASATH, T.; ZOU, M. H. Oxidative Stress, GTPCH1, and Endothelial Nitric Oxide Synthase Uncoupling in Hypertension. **Antioxid Redox Signal**, 34, n. 9, p. 750-764, Mar 20 2021.

XIAO, T.; CHEN, S.; YAN, G.; ZHENG, J. *et al.* Cystathionine γ -lyase inhibits mitochondrial oxidative stress by releasing H₂S nearby through the AKT/NRF2 signaling pathway. **Front Pharmacol**, 15, p. 1374720, 2024.

XU, T.; ZHANG, Y.; LIAO, G.; XUAN, H. *et al.* Luteolin Pretreatment Ameliorates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by lncRNA-JPX/miR-146b Axis. **Anal Cell Pathol (Amst)**, 2023, p. 4500810, 2023.

XUE, Z.; JIANG, Y.; MENG, B.; LU, L. *et al.* Apoptotic vesicle-mediated senolytics requires mechanical loading. **Theranostics**, 14, n. 12, p. 4730-4746, 2024.

YAN, F.; ZHAO, Q.; LI, Y.; ZHENG, Z. *et al.* The role of oxidative stress in ovarian aging: a review. **J Ovarian Res**, 15, n. 1, p. 100, Sep 1 2022.

YANG, H.; JIANG, X.; LI, B.; YANG, H. J. *et al.* Mechanisms of mTORC1 activation by RHEB and inhibition by PRAS40. **Nature**, 552, n. 7685, p. 368-373, 2017/12/01 2017.

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

YOU, L.; NEPOVIMOVA, E.; VALKO, M.; WU, Q.; KUCA, K. Mycotoxins and cellular senescence: the impact of oxidative stress, hypoxia, and immunosuppression. **Arch Toxicol**, 97, n. 2, p. 393-404, Feb 2023.

YUAN, H.; XU, Y.; LUO, Y.; WANG, N.-X.; XIAO, J.-H. Role of Nrf2 in cell senescence regulation. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 476, n. 1, p. 247-259, 2021/01/01 2021.

YURIEV, E.; AGOSTINO, M.; RAMSLAND, P. A. Challenges and advances in computational docking: 2009 in review. **J Mol Recognit**, 24, n. 2, p. 149-164, Mar-Apr 2011.

ZAID, U. B.; ZHANG, X.; LUE, T. F. **Physiology of penile erection**. John Wiley & Sons Ltd, 2017. 14-21 p. 9781118746509.

ZAMBLE, A.; CARPENTIER, M.; KANDOUSSI, A.; SAHPAZ, S. *et al.* Paullinia pinnata extracts rich in polyphenols promote vascular relaxation via endothelium-dependent mechanisms. **J Cardiovasc Pharmacol**, 47, n. 4, p. 599-608, Apr 2006.

ZEMBRUSKI, N. C.; STACHE, V.; HAEFELI, W. E.; WEISS, J. 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry. **Anal Biochem**, 429, n. 1, p. 79-81, Oct 1 2012.

ZHANG, L.; PITCHER, L. E.; PRAHALAD, V.; NIEDERNHOFER, L. J.; ROBBINS, P. D. Targeting cellular senescence with senotherapeutics: senolytics and senomorphics. **The FEBS Journal**, 290, n. 5, p. 1362-1383, 2023/03/01 2023.

ZHANG, Y.; OUYANG, J.; ZHAN, L.; LI, Y. *et al.* Autophagy in homocysteine-induced HUVEC senescence. **Exp Ther Med**, 26, n. 1, p. 354, Jul 2023.

ZHOU, H.; KHAN, D.; HUSSAIN, S. M.; GERDES, N. *et al.* Colchicine prevents oxidative stress-induced endothelial cell senescence via blocking NF- κ B and MAPKs: implications in vascular diseases. **Journal of Inflammation**, 20, n. 1, p. 41, 2023/11/24 2023.

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

ZHUANG, B.; ZHUANG, C.; JIANG, Y.; ZHANG, J. *et al.* Mechanisms of erectile dysfunction induced by aging: A comprehensive review. **Andrology**, n/a, n. n/a, 2024/10/09 2024.

ZIMMERMANN, M.; MEYER, N. Annexin V/7-AAD staining in keratinocytes. **Methods Mol Biol**, 740, p. 57-63, 2011.

Apêndice

9 APÊNDICES

Apêndice A – Carvacrol prevents D-(+)-galactose-induced aging-associated erectile dysfunction by improving endothelial dysfunction and oxidative stress in rats

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology
<https://doi.org/10.1007/s00210-024-03264-8>

RESEARCH



Carvacrol prevents D-(+)-galactose-induced aging-associated erectile dysfunction by improving endothelial dysfunction and oxidative stress in rats

Mathania Silva de Almeida Feitosa¹ · Arthur José Pontes Oliveira de Almeida¹ · Sabine Helena Dantas¹ · Fátima de Lourdes Assunção Araújo de Azevedo¹ · Javanyr Frederico de Souza Júnior¹ · Tays Amanda Felisberto Gonçalves¹ · Sonaly de Lima Silva¹ · Evyllen Myllena Cardoso Soares¹ · Hayaly Felinto Alves¹ · Thais Trajano Lima¹ · Larisse Virgolino da Silva Pontes¹ · Ricardo Romão Guerra² · Islania Giselia Albuquerque Araújo¹ · Isac Almeida de Medeiros¹

Received: 10 August 2023 / Accepted: 27 June 2024

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2024

Abstract

Aging is one of the risk factors involved in the development of erectile dysfunction (ED). Growing evidence suggests that oxidative stress is the critical mediator of changes in endothelial function and penile vascular tone in the aging process. Thus, reducing reactive oxygen species (ROS) levels may preserve the bioactivity of the penile vasculature. Antioxidant compounds, such as carvacrol, limit the damage caused by ROS and, therefore, benefit the treatment of ED. Thus, this study aims to evaluate the effects of carvacrol on ED using the D-(+)-galactose aging model. The animals were divided into five groups: control, D-(+)-galactose 150 mg/kg, carvacrol 50 mg/kg or 100 mg/kg, and sildenafil 1.5 mg/kg treated daily for 8 weeks. The physiological, functional, and morphological characteristics of aging-associated ED were evaluated after treatment with carvacrol. Carvacrol prevented ED in a D-(+)-galactose-induced aging model by reducing hypercontractility, enhancing endothelial dysfunction in the rat corpus cavernosum, and improving endothelial health of rat cavernous endothelial cells. In addition, carvacrol prevented the destruction of erectile components essential for penile erection and promoted a reduction of penile tissue senescence, probably through mechanisms that involve the harmful modulation of oxidative stress. Carvacrol significantly improved the erectile function of rats in a D-(+)-galactose-induced aging model and has excellent potential as a new therapeutic alternative in treating erectile dysfunction.

Keywords Sexual dysfunction · Accelerated aging · Reactive oxygen species · Monoterpene

Introduction

Erectile dysfunction (ED) is a male sexual problem characterized by the persistent or recurrent inability to obtain and/or maintain an erection sufficient for satisfactory sexual intercourse (NIH 1993). The main risk factor associated with ED is aging, affecting up to 90% of individuals over 70 years

(de Almeida Rezende et al. 2021, Crafa et al. 2023). The high prevalence is related to the increase in life expectancy of the population; it is estimated that by 2025, ED will affect 322 million men (Kessler et al. 2019; Sin et al. 2021).

Several mechanisms involved in the aging process, such as endothelial dysfunction, increased contractility, decreased relaxation of the corpus cavernosum (CC), and vascular senescence, play a vital role in the development of ED (Aversa et al. 2010; Echeverri Tirado et al. 2016). Furthermore, these mechanisms are tightly connected with the increased reactive oxygen species (ROS) (de Almeida Rezende et al. 2021).

Increased exposure to oxidative stress disrupts penile hemodynamics, probably by depleting nitric oxide (NO) levels (Xu et al. 2022). NO may react with superoxide anions (O_2^-), producing peroxynitrite, a highly cytotoxic

✉ Isac Almeida de Medeiros
isac.ufpb@gmail.com

¹ Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

² Departamento de Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, Paraíba, Brazil

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

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 Felisberto 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 Giselia 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>

Copyright: © 2021 de Almeida Rezende et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

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.

Introduction

Erectile dysfunction (ED) is defined as the inability to achieve and/or maintain sufficient erection for satisfactory sexual relations [1]. Its prevalence tends to increase throughout the individual's life, affecting mainly men over 40 years old [2]. With the global increase in life

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



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,
Evyllen 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@lftf.ufpb.br (T.A.F.G.); vivianelima@lftf.ufpb.br (V.S.L.); arthur-jp@hotmail.com (A.J.P.O.d.A.); alinnevillar@lftf.ufpb.br (A.V.d.A.); carolmeneses@lftf.ufpb.br (A.C.M.E.V.); thaís.trajano@academico.ufpb.br (T.T.L.); evyllen.cardoso@academico.ufpb.br (E.M.C.S.); adhonia.correia@academico.ufpb.br (A.C.d.S.); mec@academico.ufpb.br (M.E.C.d.V.); mathaniafez@lftf.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



Citation: Gonçalves, T.A.F.; Lima, V.S.; de Almeida, A.J.P.O.; de Arruda, A.V.; Veras, A.C.M.E.; Lima, T.T.; Soares, E.M.C.; Santos, A.C.d.; Vasconcelos, M.E.C.d.; de Almeida Feitosa, M.S.; et al. Carvacrol Improves Vascular Function in Hypertensive Animals by Modulating Endothelial Progenitor Cells. *Nutrients* 2023, 15, 3032. <https://doi.org/10.3390/nu15133032>

Academic Editor: Arrigo Cicero

Received: 31 May 2023

Revised: 29 June 2023

Accepted: 29 June 2023

Published: 4 July 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Carvacrol, a phenolic monoterpene, has diverse biological activities, highlighting its antioxidant and antihypertensive capacity. However, there is little evidence demonstrating its influence on vascular regeneration. Therefore, we evaluated the modulation of carvacrol on endothelial repair induced by endothelial progenitor cells (EPC) in hypertension. Twelve-week-old spontaneously hypertensive rats (SHR) were treated with a vehicle, carvacrol (50 or 100 mg/kg/day), or resveratrol (10 mg/kg/day) orally for four weeks. Wistar Kyoto (WKY) rats were used as the normotensive controls. Their systolic blood pressure (SBP) was measured weekly through the tail cuff. The EPCs were isolated from the bone marrow and peripheral circulation and were quantified by flow cytometry. The functionality of the EPC was evaluated after cultivation through the quantification of colony-forming units (CFU), evaluation of eNOS, intracellular detection of reactive oxygen species (ROS), and evaluation of senescence. The superior mesenteric artery was isolated to evaluate the quantification of ROS, CD34, and CD31. Treatment with carvacrol induced EPC migration, increased CFU formation and eNOS expression and activity, and reduced ROS and senescence. In addition, carvacrol reduced vascular ROS and increased CD31 and CD34 expression. This study showed that treatment with carvacrol improved the functionality of EPC, contributing to the reduction of endothelial dysfunction.

Keywords: oxidative stress; endothelial progenitor cells; endothelial dysfunction

1. Introduction

Endothelial progenitor cells (EPC), precursors of mature endothelial cells, are capable of exerting functional effects on arteries, capillaries, and veins, which include maintenance of the endothelial layer and vascular homeostasis, as well as participation in vascular regeneration and neovascularization [1].

Under normal conditions, most EPC remains in the bone marrow, relatively inactivated, in contact with stromal cells. However, in response to an injury through chemotactic factors, EPCs are released from the bone marrow and mobilized to the injured tissue directly into the damaged vessel structures, preventing blood vessel dysfunction [2,3]. In contrast, when the percentage of EPC decreases, or its function is impaired, the angiogenic capacity is weakened, reducing its regeneration capacity and potentiating vascular injury [4].

A series of experimental and clinical studies have been conducted in the context of hypertension that demonstrate reductions in functionality and proliferative capacity [5] with lower numbers of circulating EPCs [6–8]. The pathological mechanisms involving

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



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.

Authors' contributions

This work was carried out in collaboration among all authors. Author SHD designed the study, conducted the research, analyzed the results, and drafted the manuscript. Authors AJPDA, TAFG and MSDAR, conducted the research and analyzed the results. Antonia Leda Silva analyzed the results and helped to draft and review the manuscript. Authors IGAA and RCV designed the study and helped to draft the manuscript. Author IADM took primary responsibility for the paper, conceived and coordinated the study, and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Article Information

DOI: 10.9734/JALSI/2022/v25i6581

Open Peer Review History:

This journal follows the Advanced Open Peer Review policy. Identity of the Reviewers, Editor(s) and additional Reviewers, peer review comments, different versions of the manuscript, comments of the editors, etc are available here: <https://www.sdiarticle5.com/review-history/92463>

Original Research Article

Received 06 August 2022
Accepted 12 October 2022
Published 18 October 2022

ABSTRACT

Aim: To evaluate the cardiovascular effect of carvacrol treatment in a D-(+)-galactose accelerated aging model, investigating effects on vascular reactivity, oxidative stress, and systolic blood pressure (SBP).

Methodology: Eight-week-old male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were used for oral treatment for eight weeks. Organ baths were used for vascular reactivity studies (FEN, ACh, and NPS), fluorescence microscopy to detect reactive oxygen species (ROS, using DHE probe), and Tail-Cuff for systolic blood pressure (SBP) measurements. Non-linear regression was used to create the

*Corresponding author: E-mail: isac@lf.ufpb.br;

Apêndice E – ROS: Basic Concepts, Sources, Cellular Signaling, and its Implications in Aging Pathways

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@luf.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.

1. Introduction

All living organisms produce reactive oxygen species (ROS) as a result of cellular metabolism [1, 2]. Despite the presence of antioxidant defenses (e.g., enzymes, proteins, and vitamins) in organisms, ROS can accumulate due to overproduction or failure in the antioxidant system, leading to the stage of "oxidative stress" [3], a key hallmark of aging [4–6].

Harman, in 1956, proposed the "free radical theory of aging," which argued that ROS derived from metabolism were the primary cause of aging [7]. Since then, several publications have reported the deleterious effects of ROS on aging [8, 9]. However, recent studies on long-lived models and genetically altered animals challenge the role of ROS in aging [10]. In this

way, ROS appear to have a dual effect, first as an activator of a homeostatic compensatory response that increases with age to maintain survival, and then, beyond a certain point, as a factor that, rather than alleviating, aggravates the damages associated with aging [11, 12].

In this context, this review drafts an integrated approach to the dual role of ROS on aging, addressing molecular, cellular, and physiological aspects of ROS.

2. A General Overview of ROS

A range of molecules with oxidizing properties contributes to oxidative stress [3]. These ROS include superoxide anions ($O_2^{\bullet -}$), hydroxyl radical (HO^{\bullet}), nitric oxide ($^{\bullet}NO$), and lipid

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

Edição 9, 2022

[Artigo anterior](#)[Próximo artigo](#)

Do diário:
Alimentos e Função

Carboximetil-glucano de levedura melhora a função endotelial e inibe a agregação plaquetária em ratos espontaneamente hipertensos

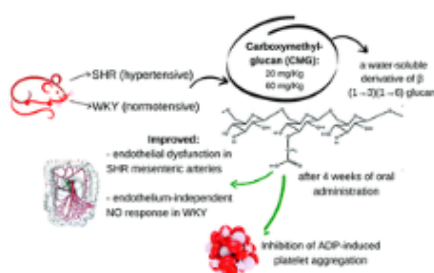


[Lorena Soares Bezerra](#), ^a [Marciane Magnani](#), ^{* ab} [Tatiana Colombo Pimentel](#), ^c [Júlio César Pinheiro Lúcio de Oliveira](#), ^d [Francisca Manuela de Souza Freire](#), ^d [Arthur José Pontes Oliveira de Almeida](#), ^e [Mathania Silva de Almeida Rezende](#), ^f [Islânia Giselia Albuquerque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

Afiliações do autor

Resumo

Carboximetil-glucano é um derivado semissintético do β -D-glucano, um polissacarídeo amplamente encontrado em várias fontes naturais, como leveduras, fungos e cereais. Este composto tem efeitos benéficos à saúde e é considerado um importante imunomodulador. No entanto, estudos explorando a bioatividade do carboximetil-glucano na saúde cardiovascular ainda são escassos, principalmente na hipertensão. Assim, este estudo buscou expandir a compreensão dos efeitos do carboximetil-glucano nas funções vasculares e plaquetárias em um modelo animal hipertensivo. Ratos espontaneamente hipertensos e seus controles Wistar-Kyoto normotensos foram designados a cinco grupos: controle, carboximetil-glucano (60 mg kg^{-1}), ratos controle espontaneamente hipertensos, ratos espontaneamente hipertensos carboximetil-glucano (20 mg kg^{-1}) e ratos espontaneamente hipertensos carboximetil-glucano (60 mg kg^{-1}). Os animais foram tratados por quatro semanas com carboximetil-glucano nas doses de 20 e 60 mg kg^{-1} por via oral, e os ratos controle receberam solução salina como placebo. A reatividade vascular, a agregação plaquetária e a produção de espécies reativas de oxigênio foram avaliadas no final do tratamento. Os resultados mostraram que o carboximetil-glucano melhorou a função vascular e reduziu a agregação plaquetária, principalmente na dose de 60 mg kg^{-1} . No entanto, apesar desses efeitos, não houve redução nos níveis de espécies reativas de oxigênio. Esses achados sugeriram que o carboximetil-glucano modula a função endotelial. Ele também atua como um antiagregante plaquetário, o que é um recurso interessante para o manejo da hipertensão e suas complicações trombóticas.












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

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@lrf.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.

1. Introduction

The average life expectancy of the global population has been increasing rapidly [1]. According to the United Nations (UN), the world population over 60 years will keep growing exponentially in the next decades, rising from 12%, data from 2015, to 22% in 2050 [2]. In parallel, age-related diseases have also been increasing, highlighting cardiovascular diseases (CVDs) as the main cause of morbidity and mortality worldwide, aging being the main risk factor for these diseases [3–5].

Cardiovascular aging (cardiac and vascular aging) is characterized by a progressive decline in physiological processes at the molecular, cellular, and tissue levels [6–8]. Two factors play a key role in this process: the gradual and persistent increase in inflammation “inflammaging” and the oxidative stress, including the crosstalk between them [9, 10]. These processes are associated with the pathophysiology of aging-related CVDs, such as hypertension, acute myocardial infarction, and stroke (Figure 1) [11–13].

This review brings an integrated approach to the role of inflammation and oxidative stress associated with the

Apêndice H – Pedido 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

Apêndice H – Pedido de patente

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

Apêndice H – Pedido de patente**Dados do Inventor (72)**

Inventor 1 de 8**Nome:** ISAC ALMEIDA DE MEDEIROS**CPF:** 39666441420**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Professor do ensino superior**Endereço:** Avenida Hilton Souto Maior, nº 6701, Condomínio Cabo Branco Privê, Quadra 752, Lote 435, Portal do Sol.**Cidade:** João Pessoa**Estado:** PB**CEP:** 58046-600**País:** BRASIL**Telefone:** (83) 982 057003**Fax:****Email:** isac.medeiros@academico.ufpb.br**Inventor 2 de 8****Nome:** TAYS AMANDA FELISBERTO GONÇALVES**CPF:** 07737189408**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Estudante de Pós Graduação**Endereço:** Rua Desportista João Apostolo de Souza, nº 100, Condomínio Amália Gurgel, Apto. 301D, Mangabeira VII.**Cidade:** João Pessoa**Estado:** PB**CEP:** 58058-562**País:** BRASIL**Telefone:** (83) 988 333217**Fax:****Email:** taysamanda@ltf.ufpb.br**Inventor 3 de 8**

Apêndice H – Pedido de patente

Nome: ISLANIA GISELIA ALBUQUERQUE GONÇALVES

CPF: 02788267410

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua das Acácias, nº 100, Condomínio Palazzo Milleluci, Apto. 202B, Miramar.

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58043-250

País: BRASIL

Telefone: (83) 993 071172

Fax:

Email: islania.giselia@academico.ufpb.br

Inventor 4 de 8

Nome: MATHANIA SILVA DE ALMEIDA REZENDE

CPF: 09593956441

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Possidônio Lourenço Andrade, nº 89, Edifício Verdes Mares, Apto. 201, Mangabeira II.

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58057-140

País: BRASIL

Telefone: (83) 987 950411

Fax:

Email: mathania_rezende@hotmail.com

Inventor 5 de 8

Apêndice H – Pedido de patente

Nome: SABINE HELENA DANTAS

CPF: 10165841486

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Mestrando

Endereço: Avenida Hilton Souto Maior, nº 6701, Condomínio Cabo Branco
Privé, Quadra 752, Lote 435, Portal do Sol.

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58046-600

País: BRASIL

Telefone: (83) 999 751030

Fax:

Email: sabinedantas@gmail.com

Inventor 6 de 8

Nome: ROBSON CAVALCANTE VERAS

CPF: 00801067499

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Oceano Antártico, nº 281, Edifício Bessa Tower, Apto. 302,
Oceania.

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58037-655

País: BRASIL

Telefone: (83) 988 920855

Fax:

Email: robsonveras@ccs.ufpb.br

Inventor 7 de 8

Apêndice H – Pedido de patente

Nome: ARTHUR JOSÉ PONTES OLIVEIRA DE ALMEIDA

CPF: 09752613470

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Radialista Severino Gomes de Brito, nº 300, Água Fria.

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58074-600

País: BRASIL

Telefone: (83) 998 431162

Fax:

Email: arthur-jp@hotmail.com

Inventor 8 de 8

Nome: ANTÔNIA LÊDA OLIVEIRA SILVA

CPF: 32199724468

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Carlos Ulisses de Carvalho, 45, Apto. 502, Brisamar.

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58033-130

País: BRASIL

Telefone: (83) 999 935100

Fax:

Email: alfaleda2@gmail.com

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	00_Comprovante.pdf
Relatório Descritivo	01_Relatorio descritivo.pdf
Reivindicação	02_Reivindicacoes.pdf
Desenho	03_Desenhos.pdf
Resumo	04_Resumo.pdf

Apêndice H – Pedido de patente

Acesso ao Patrimônio Genético

- ☒ Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- ☒ Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Anexos

10 ANEXOS

Anexo A – Certificado de aprovação do projeto na Comissão de Ética no Uso de Animais



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais

Reitoria



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação dos efeitos do carvacrol sobre as alterações cardiovasculares associadas ao envelhecimento induzido por D-galactose", protocolada sob o CEUA nº 6563220322 (ID 001669), sob a responsabilidade de **Isac Almeida de Medeiros e equipe; Mathania Silva de Almeida Rezende; Islania Gisélia Albuquerque Gonçalves** - 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 01/06/2022.

We certify that the proposal "Evaluation of the effects of carvacrol on cardiovascular changes associated with aging induced by D-galactose", utilizing 129 Heterogenics rats (129 males), protocol number CEUA 6563220322 (ID 001669), under the responsibility of **Isac Almeida de Medeiros and team; Mathania Silva de Almeida Rezende; Islania Gisélia Albuquerque Gonçalves** - 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 06/01/2022.

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

Vigência da Proposta: de **07/2022** a **12/2024**

Área: **Ciências Farmacêuticas**

Origem: **Biotério José Paulino**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **8 a 8 semanas**

N: **129**

Linhagem: **Rattus Norvegicus - Wistar**

Peso: **250 a 300 g**

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

João Pessoa, 01 de junho 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. Ivia Carmem Talleri
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba