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

GEOVÂNIA MARIA SALES DE MENEZES

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM MODELO DE SENESCÊNCIA INDUZIDA POR D-GALACTOSE E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO α -TERPINEOL EM EMBRIÕES E LARVAS DE ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

JOÃO PESSOA
2026

GEOVÂNIA MARIA SALES DE MENEZES

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM MODELO DE SENESCÊNCIA INDUZIDA POR D-GALACTOSE E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO α -TERPINEOL EM EMBRIÕES E LARVAS DE ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do grau de doutora no Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. Isac Almeida De Medeiros

Coorientador: Prof. Dr. Davi Felipe Farias

JOÃO PESSOA

2026

Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

M543d Menezes, Geovania Maria Sales de.
Desenvolvimento e caracterização de um modelo de senescência induzida por D-galactose e avaliação dos efeitos do alfa-terpineol em embriões e larvas de zebrafish (Danio rerio) / Geovania Maria Sales de Menezes. - João Pessoa, 2026.
136 f. : il.

Orientação: Isac Almeida de Medeiros.
Coorientação: Davi Felipe Farias.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Doença cardiovascular. 2. Envelhecimento em zebrafish. 3. Estudos in silico. 4. Frutos - Nordeste do Brasil. 5. Alfa - terpineol. I. Medeiros, Isac Almeida de. II. Farias, Davi Felipe. III. Título.

UFPB/BC CDU 616.1(043)

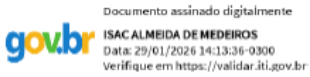
Elaborado por Larissa Silva Oliveira de Mesquita - CRB-15/746

GEOVÂNIA MARIA SALES DE MENEZES

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM MODELO DE SENESCÊNCIA INDUZIDA POR D-GALACTOSE E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO α -TERPINEOL EM EMBRIÕES E LARVAS DE ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

Aprovada em 29 / 01 / 2026

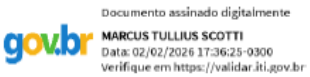
Banca examinadora



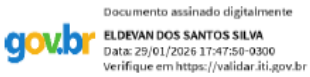
Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros (presidente)



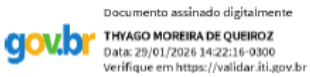
Prof.ª Dr.ª Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz (Examinadora Interna)



Prof. Dr. Marcus Tullius Scotti Diniz (Examinador Interno)



Prof. Dr. Eldevan dos Santos Silva (Examinador Externo)



Prof. Dr. Thyago Moreira de Queiroz (Examinador Externo)

A Deus, autor da minha vida e salvação, que me despertou para o desenvolvimento desse projeto e tem dado o direcionamento em todas as etapas. As minhas filhas Manuela Menezes Cahino, Melissa Menezes Cahino e Letícia Menezes Cahino, motivos da minha alegria ao acordar todas as manhãs e que sempre estiveram comigo nos momentos de dificuldade e de felicidade, nessa longa caminhada. Aos meus pais Guilibaldo Leal de Menezes (*in memorian*) e Hildemar Sales de Menezes que sempre contribuíram na formação do meu caráter, com respeito, humildade, fé e perseverança para prosseguir na caminhada da vida, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, Pai e Criador de todas as coisas, por me conceder a oportunidade, a força e a sabedoria necessárias para sonhar e concretizar este projeto, superando expectativas e limites que eu mesma não imaginava alcançar.

Ao meu orientador, Professor Dr. Isac Almeida de Medeiros, por ter despertado em mim a paixão pela pesquisa na área do envelhecimento associado às doenças cardiovasculares. Sua sabedoria, experiência científica e constante orientação foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho e para o avanço de mais uma etapa da minha trajetória acadêmica e profissional.

À equipe do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular, pelas incansáveis reuniões científicas semanais, que contribuíram significativamente para o aprofundamento crítico e a ampliação do conhecimento na área de farmacologia cardiovascular.

Ao meu coorientador, Professor Dr. Davi Farias, que idealizou este projeto comigo desde os seus primeiros passos. Mesmo diante de um método inicialmente desafiador na metodologia de envelhecimennto, área incomum a sua rotina, compartilhou generosamente seus conhecimentos, relacionados as técnicas de toxicidade e as particularidades do modelo zebrafish, que possibilitaram posteriormente o desenvolvimento das abordagens experimentais do modelo de envelhecimento proposto.

A todos os alunos, técnicos e professores da Unidade de Produção de Organismos Modelos Não Convencionais (UniPOM) e do Laboratório Labrisco da UFPB, pela disponibilidade, dedicação e ensinamentos ao longo de todo o período experimental.

À equipe do Laboratório de Quimioinformática da UFPB, em especial ao Professor Dr. Marcus Scotti e às alunas Mayara dos Santos Maia e Natália Ferreira de Sousa, pela colaboração essencial na condução da primeira etapa do estudo, voltada à seleção do composto utilizado nos ensaios in vivo.

À equipe técnica e ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação do DITM/UFPB, pela organização, responsabilidade e zelo no cumprimento das normas do curso, bem como aos professores que compuseram a banca de qualificação — Professoras(es) Dras(es). Hilzeth de Luna Freire Pessoa, Abrahão Alves de Oliveira Filho e Marcus Scotti — pela dedicação à pesquisa na UFPB e pelas valiosas contribuições que inspiraram e fortaleceram este trabalho.

Aos professores que integram a banca examinadora da defesa da tese — Professoras(es) Dras(es) — Eldevan dos Santos Silva, Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz, Marcus

Tullius Scotti e Thyago Moreira de Queiroz — pelas contribuições, sugestões e conhecimentos compartilhados, que possibilitaram o aprimoramento científico deste trabalho.

Às minhas filhas, minha maior fonte de alegria e orgulho, pelo amor, carinho e compreensão ao longo de toda essa jornada. Mesmo distantes fisicamente, sempre estiveram presentes de forma constante em meu coração, como preciosos presentes de Deus. Amo vocês.

Aos meus tios Ubiraji Mendes e Neusa Sales Mendes, professor e técnica da UFRN, pelo apoio e acolhimento, fazendo de sua casa a minha durante o período das disciplinas cursadas em Natal.

A toda a minha família, aos irmãos em Cristo que intercederam por mim em oração — em especial ao Pastor Celso e à Pastora Luciana — e a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão desta importante etapa da minha vida.

“A ciência é simplesmente pensar os pensamentos de Deus, depois Dele”

Johannes Kepler

MENEZES, G.M.S.; **Desenvolvimento e caracterização de um modelo de senescência induzida por d-galactose e avaliação dos efeitos do α-terpineol em embriões e larvas de *zebrafish* (*Danio rerio*).** Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, Tese de Doutorado. CCS/UFPB, 2026.

A senescência celular, mecanismo fundamental de envelhecimento, está implicada em muitas doenças cardiovasculares. O modelo peixe-zebra (*Danio rerio*) é gerontológico, bem estabelecido e a indução ao envelhecimento pela D-galactose (D-gal) não fora testada até o momento em larvas de *zebrafish* (*Danio rerio*). O objetivo dessa pesquisa foi selecionar, em testes in silico, compostos presentes em cinco frutos do Nordeste do Brasil com melhores atividades nas vias enzimáticas envolvidas em doenças cardiovasculares associadas ao envelhecimento, bem como desenvolver *in vivo*, um modelo de indução à senescência por D-galactose e avaliar a ação do α-terpineol (α-T) sobre a senescência, o estresse oxidativo, e frequênia cardiaca em embriões e larvas de *zebrafish*. Investigou-se, *in silico*, 67 compostos de frutas típicas do Nordeste do Brasil mais ativos em vias envolvidas na doença cardiovascular associada ao envelhecimento (NRF2, iNOS, NOX e COX-2). Avaliou-se a performance dos modelos, a atividade proComb e Pact de *docking* molecular e dinâmica molecular. No estudo com embriões de *D. rerio* (n=100) avaliou-se a toxicidade aguda do α-terpineol (OECD 236), taxa de mortalidade e alterações morfológicas provocadas por D-gal. Posteriormente, testes com embriões (n=60) por 6 dias avaliaram as alterações morfológias do tratamento com D-gal (36,03 mg/mL) e ação do α- T nas concentrações de 0,000468 mg/mL e de 0,0046 mg/mL. Na sequência desenvolveu-se um modelo de senescência induzida por exposição à D-gal por 72 horas em embriões e larvas de *zebrafish* divididos nos grupos: Controle (Meio E3); D-galactose (30 mg/mL); D-gal + α-T concentração menor (0,000047 mg/mL); D-gal + α-T concentração maior (0,000094 mg/mL); D-gal + resveratrol(RSV, 0,01 mg/mL). Avaliou-se a senescência (n=15), o estresse oxidativo pela avaliação da atividade da catalase (n=50), sobrevivência/alterações morfológicas (n=100) e frequência cardíaca (n=50) das larvas. Utilizou-se testes t de Student e "one-way" e pós-teste de Bonferroni. Resultados *in silico* revelaram 4 modelos enzimáticos robustos (48 compostos ativos 2 ≥ enzimas), sendo 16 com atividade ≥ 0,6 para NRF2 e para outra enzima (≥0,5). O α-terpineol foi escolhido para os testes *in vivo*, com melhores resultados nos testes de dinâmica molecular, como composto mais estável. A CL50 do α-T e da D-gal foram acima de 0,1 mg/mL e de 45,03 mg/mL, respectivamente e a LOAEL do α- T foi de 0,0062 mg/mL. Os primeiros testes com D-gal + α-T (0,0046 e 0,00046 mg/ mL) não reduziram o percentual de alterações morfológicas comparados ao grupo E3 ($p<0,05$), apenas atenuaram os tipos de alterações. Por sua vez, o modelo de indução à senescência desenvolvido em embriões e larvas de *zebrafish* levou a alta taxa de sobrevivência (95%), aumento do valor da atividade da enzima beta-galactosidase no grupo D-gal e redução no grupo D-gal + α-T concentração menor ($p<0,05$). A atividade da catalase aumentou e a frequência cardíaca diminuiu nos grupos tratados com D-gal ($p<0,05$), quando comparados ao controle, porém o tratamento com α-T não foi eficaz na atenuação dos danos. Conclui-se, portanto, que novos compostos apresentaram atividade nas vias de envelhecimento associado a doença cardiovascular, especialmente ligadas a NRF2, com destaqe para o α-terpineol. Enquanto, o modelo de senescência induzido por D-gal demonstrou ser funcional, pelo aumento dos níveis da betagalactosidase, da atividade da CAT, além de alterar a frequência cardíaca e o α-terpineol na menor concentração foi capaz de atenuar a senescência. Portanto, sugere-se a utilização do modelo desenvolvido em futuros estudos e do uso do α-T com uso de abordagens moleculares e funcionais adicionais para aprofundamento mecanístico.

Palavras-chave: Cardiovascular; Envelhecimento em *zebrafish*; Estudos *in silico*; Frutos do Nordeste do Brasil; α-terpineol.

MENEZES, G.M.S.; **Development and Characterization of a D-Galactose–Induced Senescence Model and Evaluation of the Effects of α-Terpineol in *Zebrafish* (*Danio rerio*) Embryos and Larvae.** Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, Tese de Doutorado. CCS/UFPB, 2026.

Cellular senescence, a fundamental mechanism of aging, is implicated in several cardiovascular diseases. The zebrafish model (*Danio rerio*) is a well-established gerontological model; however, D-galactose (D-gal)–induced aging has not yet been tested in zebrafish larvae. The aim of this study was to select, through in silico screening, compounds present in five fruits from Northeastern Brazil with the highest activity in enzymatic pathways involved in aging-associated cardiovascular diseases, as well as to develop *in vivo* a D-galactose–induced senescence model and to evaluate the effects of α-terpineol(α-T) on senescence, oxidative stress, and heart rate in zebrafish embryos and larvae. Sixty-seven compounds from typical fruits of Northeastern Brazil were investigated in silico for activity in pathways associated with aging-related cardiovascular disease (NRF_2, iNOS, NOX, and COX_2). Model performance, proComb and Pact docking activity, and molecular docking and molecular dynamics were evaluated. In studies with D. rerio embryos (n = 100), acute toxicity of α-terpineol (OECD 236), mortality rate, and D-gal–induced morphological alterations were assessed. Subsequently, embryos (n = 60) were treated for six days to evaluate morphological changes induced by D-gal (36.03 mg/mL) and the effects of α-terpineol at concentrations of 0.00046 mg/mL and 0.0046 mg/mL.A senescence model was then developed by exposing zebrafish embryos and larvae to D-gal for 72 hours, divided into the following groups: Control (E3 medium); D-galactose (30 mg/mL); D-gal + low-dose α-terpineol (0.000047 mg/mL); D-gal + high-dose α-terpineol (0.000094 mg/mL); and D-gal + resveratrol (RSV, 0.01 mg/mL). Senescence (n = 15), oxidative stress assessed by catalase activity (n = 50), survival and morphological alterations (n = 100), and heart rate (n = 50) were evaluated in the larvae. Student's t-test and one-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc tests were used for statistical analysis. In silico results revealed four robust enzymatic models, with 48 active compounds targeting two or more enzymes; among these, 16 showed activity ≥ 0.6 for NRF2 and ≥ 0.5 for at least one additional enzyme. α-Terpineol was selected for in vivo assays due to its superior molecular dynamics performance, indicating greater stability. The LC_{50} values for α-terpineol and D-gal were above 0.1 mg/mL and 45.03 mg/mL, respectively, and the LOAEL for α-terpineol was 0.0062 mg/mL. Initial tests with D-gal + α-terpineol (0.0046 and 0.00046 mg/mL) did not reduce the percentage of morphological alterations compared with the E3 group ($p < 0.05$), but attenuated the severity of the alterations.The developed D-gal–induced senescence model in zebrafish embryos and larvae resulted in a high survival rate (95%), increased β-galactosidase activity in the D-gal group, and reduced activity in the D-gal + low-dose α-terpineol group ($p < 0.05$). Catalase activity increased and heart rate decreased in the D-gal–treated groups ($p < 0.05$) compared with the control; however, α-terpineol treatment was not effective in attenuating these effects. In conclusion, novel compounds exhibited activity in aging-associated cardiovascular pathways, particularly those related to NRF2, with α-terpineol standing out. The D-gal–induced senescence model proved to be functional, as demonstrated by increased β-galactosidase levels, elevated catalase activity, and altered heart rate, and low-dose α-terpineol was able to attenuate senescence. Therefore, the use of the developed model is suggested for future studies, along with further molecular and functional approaches to deepen mechanistic understanding of α-terpineol's effects.

Keywords: Cardiovascular; Zebrafish aging; In silico studies; Fruits from Northeastern Brazil; α-terpineol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Áreas de pesquisa abordadas com o uso do modelo *zebrafish* ……..……. 24

Figura 2 – Estágios de desenvolvimento do *zebrafish* ……..... 25

Figura 3 – Ciclo de vida de *Danio rerio* …….....……..... 26

Figura 4 – Características de modelos animais em gerontologia comparados ao *zebrafish* . 27

Figura 5 – Representação esquemática da reação durante o teste com X-gal ……..…. 35

Figura 6 – Estrutura do α-terpineol …….....…… 44

Figura 7 – Propriedades biológicas do α-terpineol ……....…….....……. 45

Figura 8 – Propriedades e características físico-químicas do α-terpineol …….……..... 57

Figura 9 – Ilustração da distribuição das soluções de α-terpineol no ensaio de toxicidade aguda em embriões de *Danio Rerio* ….....…….…… 58

Figura 10 – Indicadores de letalidade em embriões e larvas de *zebrafish* ……....…… 59

Figura 11 – Delineamento experimental do modelo de indução a senescência por D-gal 61

Figura 12 – Interações 3D e 2D de três compostos potencialmente ativos contra iNOS 72

Figura 13 – Interações 3D e 2D de três compostos potencialmente ativos contra NFR2 73

Figura 14 – RMSD dos átomos Cα da enzima heterodímero NRF2-MAFG ligado ao CsMBE1 PDB …….....…… 75

Figura 15 – RMSD dos átomos de Cα dos compostos Magiferina (preto), Cianidina-3-glicosídeo (vermelho), Alfa-terpineol (verde) e Resveratrol (azul) ……..... 76

Figura 16 – RMSF dos átomos da enzima heterodímero NRF2-MAFG ligado ao CsMBE1 PDB: (7X5E) (preto) e complexado aos compostos Mangiferina (vermelho), Cianidina-3-glicosídeo (verde), Alfa terpineol (Azul) e Resveratrol (amarelo) …….....……..…. 77

Figura 17 – Teste de toxicidade do desenvolvimento em embriões de zebrafish expostos ao α-terpineol nas concentrações de 6,25; 12,5; 25; 50; 100 mg/L .....……..…… 78

Figura 18 – Batimentos das caudas de 10 embriões de *zebrafish* (24 hpf) expostos ao α-terpineol nas concentrações de 1,56, 3,12 e 6,25 mg/L ……..... 79

Figura 19 – Batimentos cardíacos por minuto de embriões de *zebrafish* (48 hpf) expostos ao α-terpineol nas concentrações de 1,56, 3,12 e 6,25 mg/L ……..... 80

Figura 20 – Efeitos sobre a taxa de mortalidade (%) de embriões (6 hpf) expostos à D-gal nas concentrações de 200; 250; 300;350 e 400 Mmol/L por 120 hpf e imagens

microscópicas representativas das larvas dos grupos controle e d-gal…..... 81
Figura 21 – Distribuição das alterações morfológicas subletais em embriões 6 hpf até 6 dpf expostos a D-gal e tratados com α- terpineol …..…….....…..……... 83
Figura 22 – Distribuição dos tipos de alterações morfológicas subletais em embriões 6 hpf até 6 dpf expostos a D-gal e tratados com α- terpineol …….....…. 84
Figura 23 – Avaliação da atividade da enzima β-galactosidase em larvas de peixe-zebra tratadas com D-galactose e diferentes concentrações de alfa-terpineol por 72 horas.....……..….. 88
Figura 24 – Efeitos sobre a taxa de sobrevivência (%) expostas ao tratamento com D-galactose e ao α- terpineol em diferentes concentrações por 72 horas..... 90
Figura 25 – Efeitos sobre a frequência cardíaca de larvas de *zebrafish* expostas ao tratamento com D-galactose em diferentes concentrações de alfa-terpineol por 72 horas....91
Figura 26 – Efeitos sobre a atividade catalásica em larvas de *zebrafish* expostas a D-galactose e diferentes concentrações de α- terpineol e de resveratrol por 72 horas..….....93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Conjunto de moléculas dos bancos de dados ChEMBL para cada enzima selecionada no estudo 50

Tabela 2 – Resumo dos parâmetros correspondentes aos resultados obtidos para todos os modelos 67

Tabela 3 – Resultados da probabilidade combinada entre o modelo de predição e a análise de *docking* molecular (Probcomb) para atividade potencial contra as enzimas dos compostos investigados 68

Tabela 4 – Compostos selecionados com melhor atividade (≥0,6) enzimática para 2 ou mais enzimas, incluindo a NRF2, presentes em cada fruta estudada e comprovação de estudos científicos nas vias enzimáticas do envelhecimento e doenças cardiovasculares 70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AUCROC	Área formada nas curvas ROC
ARES	Antioxidant Response Elements
α-T	Alpha terpineol
BPM	Batimentos por minutos
BHP	Hidroperóxido de terc-butila
CCM	Coeficiente de correlação de Mathews
CL50	Concentração letal mediana
CAT	Catalase;
D-gal	D- galactose
DPF	Dias pós fertilização
DCV	Doenças cardiovasculares
EC50	Concentração efetiva média
GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GST	Glutationa-S-transferase
H2O2	Peróxido de Hidrogênio
H2DCFDA	Dihidrodicloro diacetato de fluoresceína
HPF	Horas após fertilização
HSP	High shock protein
IGF-1	Insulin-like growth factor-1(fator de crescimento semelhante a insulina)
MafG	Musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog G
MDA	Malondialdeído
ROS-	Espécies reativas de oxigênio
SA-b-gal	Beta-galactosidase
SAHF	(Senesence-Associated Heterochromatin Foci)
SOD	Superóxido Dismutase
NRF2	Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2
HO-1	Heme oxigenase-1
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinases
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level
LOAEL	Lowest Observable Adverse Effect Level
ROC	Curva operacional do receptor
RSV	Resveratrol
SASP	Senescence-Associated Secretory Phenotype
RMSF	Root mean square flutuations
RMSD	Root mean square desvio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
2 OBJETIVOS 20
2.1 Objetivo geral 20
2.2 Objetivos específicos 20
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA 21
3.1 Envelhecimento e senescência 21
3.2 Sistema modelo *zebrafish* na senescência/ envelhecimento e risco associado a doenças 23
3.2.1 Características do desenvolvimento no modelo zebrafish 23
3.2.2 Processo de envelhecimento no modelo zebrafish 26
3.2.3 Modelos de indução à senescência celular e ao envelhecimento do modelo zebrafish 33
3.2.4 Importância dos estudos translacionais em Danio rerio para a compreensão de mecanismos cardiovasculares e do envelhecimento 39
3.2.5 Evidências translacionais e segurança clínica no uso de senolíticos e senomórficos 40
3.3 Testes de quimioinformática para escolha do composto a ser usado nos estudos com *zebrafish* 41
3.4 Abordagens sobre as características e funções do α-terpineol 43
3.4.1 Efeito cardiovascular e anti-hipertensivo, antioxidante e antisenescente do α-terpineol 44
3.5 Testes de toxicidade em embriões de *zebrafish* 46
4 METODOLOGIA 48
4.1 Estudo de quimioinformática 48
4.2 Coleta de dados experimentais 48
4.2.1 Identificação de plantas 48
4.2.2 Seleção de frutas 48
4.2.3 Coleta de dados para construção dos modelos 50
4.2.3.1 Modelagem da relação quantitativa estrutura-atividade (QSAR) 51
4.2.3.2 Análise combinada baseada em ligante e estrutura 51
4.2.3.3 Docking molecular: análises das interações formadas entre iNOS e NFR2 53

4.2.3.4 Simulações de dinâmica molecular com mangiferina, cianidim-3-glicosídeo, alfa-terpineol e heterodímero NRF2-MAFG ligado ao PDB CSMBE1: (7X5E) 53
4.2.3.4.1 Desvio quadrático médio (RMSD) dos átomos de Cα do heterodímero da enzima NRF2-MAFG ligada ao PDB CSMBE1 e complexada aos compostos mangiferina, cianidina-3-glicosídeo, alfa-terpineol e resveratrol 54
4.2.3.4.2 Flutuações quadráticas médias (RMSF) dos átomos do heterodímero da enzima NRF2-MAFG ligada ao PDB CSMBE1: (7X5E) e complexada aos compostos mangiferina, cianidina-3-glicosídeo, alfa-terpineol e resveratrol 54
4.2.3.4.3 Desvio quadrático médio (RMSD) dos átomos de c do heterodímero da enzima NRF2-MAFG ligada ao PDB CSMBE1 e complexada aos compostos mangiferina, cianidina-3-glicosídeo, alfa-terpineol e resveratrol 55
4.2.3.4.4 Flutuações quadráticas médias (RMSF) dos átomos do heterodímero da enzima NRF2-MAFG ligada ao PDB CSMBE1: (7X5E) e complexada aos compostos mangiferina, cianidina-3-glicosídeo, alfa-terpineol e resveratrol 55
4.2.4 Estudo com embriões e zebrafish adultos 55
4.2.4.1 Substâncias e soluções nutritivas 56
4.2.4.2 Preparação da solução de D-galactose, do α -terpineol e do resveratrol 56
4.2.5 Protocolos utilizados em embriões e larvas de zebrafish 57
4.2.5.1 Teste de toxidade aguda com o α -terpineol 57
4.2.5.1.1 Determinação dos parâmetros de toxicidade (CL_{50}, LOAEL e NOAEL) 57
4.2.5.1.2 Movimentos espontâneos da cauda e frequência cardíaca 59
4.2.5.2 Estabelecimento do modelo de indução a senescência por D-galactose em larvas de zebrafish 59
4.2.5.2.1 Teste piloto de efeitos sobre a taxa de mortalidade (%) de embriões (6 hpf) expostos à D-Gal..... 59
4.2.5.3 Avaliação das alterações morfológicas subletais em embriões 6 HPF até 6 DPF induzidos por D-gal e tratados com α – terpineol 60
4.2.5.4 Avaliação da funcionalidade do modelo de indução a senescência por D-gal e atuação dos compostos sobre a morfologia e sobrevivência, senescência, dano oxidativo e frequência cardíaca em larvas de zebrafish 60
4.2.5.4.1 Grupos experimentais e condições de exposição 61
4.2.5.4.2 Monitoramento de alterações morfológicas 62
4.2.5.4.3 Análise de atividade da βeta-galactosidase 62
4.2.5.4.4 Avaliação da frequência cardíaca 64

4.2.5.4.5 Avaliação do dano oxidativo 64
4.3 Análise estatística 64
5 RESULTADOS 66
5.1 Testes prévios de quimioinformática 66
5.1.1 Análise combinada com base em ligante e estrutura 66
5.1.1.1 Modelagem quantitativa da relação estrutura-atividade (QSAR) e docking molecular 66
5.1.1.1.1 Análise de interação no sítio ativo da INOS e COX-2 71
5.2 Simulações de dinâmica molecular 73
5.3 Teste de toxicidade aguda em embriões 77
5.3.1 Determinação dos parâmetros de toxicidade 77
5.3.1.1 CL_{50}, LOAEL 77
5.4 Modelo para indução ao envelhecimento por D-galactose em embriões de *zebrafish* 80
5.4.1 Teste piloto de efeitos sobre a taxa de mortalidade (%) de embriões (6 hpf) expostos à D-Gal 80
5.4.1.1 Distribuição das alterações morfológicas subletais em embriões 6 hpf até 6 dpf induzidos por D-gal e tratados com α- terpineol 80
5.4.2 Avaliação da funcionalidade do modelo de indução a senescência por D-gal em larvas de zebrafish e da ação do α- terpineol pela mensuração da atividade da enzima beta- galactosidase 86
5.4.3 Avaliação da sobrevivência e alterações morfológicas de larvas de zebrafish expostas a D-galactose em diferentes concentrações de α- terpineol 89
5.4.4 Avaliação da frequência cardíaca em larvas de zebrafish expostas a D-galactose e a diferentes concentrações de α- terpineol 91
5.4.5 Avaliação da capacidade da D-Gal aumentar o estresse oxidativo e do α-terpineol restaurar o dano oxidativo induzido por D-galactose através de testes da catalase 91
6 DISCUSSÃO 95
7 CONCLUSÃO 116
8 PERSPECTIVAS 118
REFERÊNCIAS 119

1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento é um fenômeno biológico universal inevitável que afeta todos os organismos multicelulares (Sadowska-Bartosz; Bartosz, 2014). O avanço da idade é o fator de risco predominante para várias patologias humanas importantes, incluindo câncer, diabetes, doenças cardiovasculares e neurodegeneração (Slack, 2017). A Organização Mundial da Saúde estimou que as doenças cardiovasculares seriam responsáveis por mais de 23 milhões de mortes em 2030 (Wang *et al*., 2021). A DCV continua sendo a principal causa de morte em idosos, e o tratamento custoso para o sistema de saúde mundial é evidente. Portanto, devido aos seus efeitos notáveis no coração e no sistema arterial, o envelhecimento torna-se o fator de risco independente mais importante para essas doenças (Fajemiroye *et al*., 2018).

O peixe-zebra (*Danio rerio*) é identificado como um modelo gerontológico bem estabelecido para desvendar os mecanismos subjacentes de envelhecimento, doença e reparo e tem como marca uma progressão do envelhecimento gradual como nos mamíferos com marcadores semelhantes aos dos humanos (Cha *et al*., 2016). Além disso, possui altas semelhanças biológicas, estruturais, funcionais e genéticas com os humanos, emergindo rapidamente como um modelo atraente para pesquisa em doenças humanas (Chia *et al*., 2022). O peixe-zebra é um excelente modelo para triagem de medicamentos de alto rendimento, com boa relação custo-benefício, devido ao seu pequeno tamanho, alta fecundidade, fácil criação e estágios embrionários e larvares transparentes (Patton; Zon; Langenau, 2021). O teste FET (Fish Embryonic Toxicity), OECD 236, (OECD, 2013), realizado com o zebrafish, apresenta diversas vantagens que favorecem estudos sobre os efeitos farmacológicos de plantas.

Geralmente, os modelos de envelhecimento podem ser classificados em duas categorias: modelo de envelhecimento natural e modelo de envelhecimento acelerado. O modelo de envelhecimento natural consome tempo e gera um custo enorme. Existem vários tipos de modelos de envelhecimento acelerado, dentre eles, o modelo de envelhecimento induzido por D-galactose é o mais preferido devido à sua conveniência, menores efeitos colaterais e maior taxa de sobrevivência ao longo do período experimental (Wang *et al*.; 2022). Esse modelo foi recentemente testado em *zebrafish* adultos (Chen *et al*., 2023) e não havia sido explorado em embriões e larvas até o momento.

A expressão aumentada da enzima β-galactosidase (SABG) associada à senescência, que é considerada um marcador de envelhecimento generalizado, aumenta linearmente no tecido da pele de *zebrafish* entre 5 e 57 meses de idade (Kishi *et al*., 2003; Tsai *et al*., 2007). A produção de espécies reativas de oxigênio é a principal causa de dano intracelular induzido por

D-gal e a geração de produtos de glicação que aumentam a produção desses compostos, quando acumulados são produtos do metabolismo oxidativo por D-gal. O sistema antioxidante enzimático ocupa um papel de destaque contra a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio. As principais enzimas antioxidantes geralmente estão presentes em níveis mais elevados em peixes quando comparamos com mamíferos. A enzima CAT catalisa a conversão do H_2O_2 em água nos peroxissomos (D'Agostino *et al*., 2025).

Alguns compostos naturais representam novos agentes no antienvelhecimento, e inúmeros estudos relataram correlações entre antioxidantes naturais e capacidade antienvelhecimento. O Brasil é um importante produtor de frutas no mundo e algumas frutas típicas da região Nordeste do Brasil, como a *Anacardium ocidentalli*, *Spondia monbim*, *Mangifera indica*, *Malphigia emarginata* e *Carica papaya* são importantes fontes de componentes antioxidantes.

O uso de novas tecnologias da quimioinformática como o advento da triagem virtual (Virtual *screening*) tem facilitado a construção de uma biblioteca de compostos químicos e modelos computacionais capazes de analisar e retornar uma seleção de constituintes químicos com as propriedades desejadas. O α-terpineol, monoterpeno presente em óleos essenciais, apesar de ter seu uso testado recentemente em embriões de *zebrafish*, até o momento não temos resultados expostos na literatura, com testes de toxicidade. E apesar do composto, ter ação comprovada na literatura em estudos animais na hipertensão e doenças cardiovasculares, bem como a sua ação antioxidante (Moncada; Higgs, 2006; Fernandes- Santos *et al*., 2006; Ribeiro *et al*., 2010; Sabino *et al*., 2013), não temos disponibilidde de dados sobre o seu efeito em modelos de envelhecimento associados a doença cardiovascular em embriões e larvas de *zebrafish*. Apenas em um estudo utilizando o modelo de indução ao envelhecimento em células aórticas de ratos demonstrou atenuar os níveis da enzima beta galactosidase (Almeida, 2024).

Além das abordagens expostas anteriormente, nos momentos atuais, prevalece uma busca na comunidade científica pelo desenvolvimento de modelos *in vivo* que reproduzam o envelhecimento com capacidade de rastreio de alto rendimento que possam identificar de forma rápida e eficiente compostos antisenescentes com potencial terapêutico associados a doenças nesse ciclo de vida. Diante disso, o objetivo dessa pesquisa foi selecionar, em testes in silico, compostos presentes em cinco frutos do Nordestes do Brasil e parte de suas árvores, com melhores atividades nas vias enzimáticas envolvidas em doenças cardiovasculares associadas ao envelhecimento, bem como desenvolver in vivo um modelo de indução à senescência por D-galactose e avaliar a ação do α-terpineol sobre à senescência, o estresse oxidativo, e frequênia cardiaca em embriões e larvas de zebrafish.

2 OBJETIVOS

2.2 Objetivo geral

Selecionar, em testes in silico, compostos presentes em cinco frutos do Nordestes do Brasil e parte de suas árvores, com melhores atividades nas vias enzimáticas envolvidas em doenças cardiovasculares associadas ao envelhecimento, bem como desenvolver *in vivo* um modelo de indução à senescência por D-galactose e avaliar a ação do α-terpineol sobre à senescência, o estresse oxidativo, e frequênia cardiaca em embriões e larvas de *zebrafish*.

2.2 Objetivos específicos

a) identificar os compostos presentes em frutas e partes de suas árvores, típicas da região Nordeste do Brasil e parte de suas árvores, ativos em vias enzimáticas envolvidas em doenças cardiovasculares associadas ao envelhecimento com metodologias de triagem virtual de um banco de dados de produtos naturais;
b) analisar pela primeira vez a toxidade aguda do α-terpineol em embriões e larvas de *zebrafish*;
c) avaliar em estudo piloto as alterações morfológicas e taxa de mortalidade provocadas por várias concentraões D-gal, bem como a ação do αlpha – terpineol sobre tais efeitos.
d) determinar a funcionalidade do modelo desenvolvido de indução a senescência por D-gal em embriões e larvas de *zebrafish*, pelo aumento da enzima beta-galactosidase;
e) avaliar a ação do D-gal sobre o dano oxidativo, a frequência cardíaca, morfológica e sobrevivência das larvas;
f) avaliar a atividade do α-terpineol em reduzir a senescência induzida por D-gal em larvas de *zebrafish*;
g) avaliar a ação do α-terpineol sobre o dano oxidativo, a frequência cardíaca, morfologia e sobrevivência das larvas.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Envelhecimento e senescência

A senescência celular é um mecanismo fundamental de envelhecimento que tem sido implicado em muitas doenças relacionadas à idade, sendo uma causa significativa de disfunção dos tecidos. O acúmulo de células senescentes, que ocorre durante o envelhecimento, é visto no contexto das doenças cardiovasculares, obesidade e diabetes. A manutenção da integridade endotelial normal é uma abordagem terapêutica importante para reduzir o risco de doenças cardiovasculares relacionadas à idade, uma vez que a função endotelial reduzida com o envelhecimento contribui para o desenvolvimento de doenças do sistema cardiovascular (Wang *et al*., 2019).

A classificação da senescência celular inclui a senescência replicativa, a induzida por estresse e a senescência prematura. Células diferentes têm características de senescência celular com diferentes biomarcadores, destacando-se o aumento do envelhecimento associado à atividade da beta-galactosidase (Bo-Htay, 2018). A senescência crônica tem efeitos prejudiciais dentro células e tecidos. O conhecimento de que este envelhecimento pode causar doenças relacionadas instigou pesquisadores a desenvolver medicamentos que possam eliminar a senescência de células (Watanabe *et al*., 2017). As células senescentes em idosos não são capazes de manter nem funções fisiológicas do tecido, nem reparação tecidual, incluindo autofagia, cuja capacidade diminui com o envelhecimento (Yanaji *et al*., 2017; Schmitt, 2017; Rafi; Alladi, 2017).

Esse processo senescente é seguido pela depuração de células senescentes dentro daqueles processos considerados benéficos. No entanto, se a eliminação das células senescentes não ocorrer, elas se acumulam e podem levar ao câncer e ao envelhecimento. As investigações em amostras de animais demonstraram que células senescentes se acumulam, em animais velhos, em leucócitos e enterócitos da cripta intestinal, em fibroblastos dérmicos, hepatócitos e osteócitos (Korolchuk *et al*., 2017). Ao contrário da apoptose, na qual os fagócitos removem células sem causar inflamação, células senescentes sobrevivem por causa da estimulação do processo inflamatório no meio ambiente e remoção de compostos nocivos (Childs *et al*., 2014).

A senescência pode ser desencadeada por vários fatores, como estresse oxidativo, dano/encurtamento dos telômeros, dano ao DNA, disfunção mitocondrial, ruptura da cromatina, inflamação, desregulação epigenética e ativação do oncogene (Jun *et al*.; 2018). Durante o processo de envelhecimento fisiológico, foram identificados nove biomarcadores que se

destacam por sua relação direta com o envelhecimento. A alteração experimental desses biomarcadores pode acelerar o envelhecimento, enquanto sua melhoria pode retardá-lo (López-Otín; Blasco; Partridge; Serrano *et al*., 2013).

Em uma atualização recente, em 2023, foram incluídos três novos biomarcadores com seus mecanismos agrupados em três categorias: primários, antagônicos e integrativos (López-Otín; Blasco; Partridge; Serrano *et al*., 2013). Esses mecanismos funcionam de forma interconectada, de modo que a falha em um deles pode ter consequências negativas sobre os outros ao longo do tempo. A caracterização do envelhecimento inclui instabilidade genômica, atrito nos telômeros, alterações epigenéticas, perda de proteostase, macroautofagia desativada, detecção desregulada de nutrientes, disfunção mitocondrial, senescência celular, exaustão de células-tronco, alterações na comunicação intercelular, inflamação crônica e disbiose.

O estresse oxidativo em nível crônico é um fator relacionado a progressão do envelhecimento celular e exercem influência direta sobre alguns biomarcadores, mencionados acima. Espécies reativas de oxigênio, subproduto natural do metabolismo normal do oxigênio, parecem exercer um papel duplo no envelhecimento em animais geneticamente modificados (Lapointe; Hekimi, 2010), apesar de outros estudos demonstrarem seus efeitos deletérios (Skibska; Goraca, 2015). Essas moléculas regulam vários aspectos fisiológicos, especialmente os mitocondriais e, além deles, outras substâncias com efeitos sobre a mitocôndria causam alterações redox e alteração do metabolismo (Pole *et al*., 2016).

Fazendo uma abordagem sobre a inibição do ciclo celular, vários supressores e inibidores desse ciclo são conhecidos, por exemplo, p16, inibidor de quinase 2A, supressor múltiplo de tumor 1, p53, p21, p15 (p15INK4b), proteína quinase; dependente de ciclina inibidor de proteína serina/treonina quinase, supressor de tumor múltiplo), p27 (dependente de ciclina regulador de quinases), fator de ribosilação de ADP (ARF), proteína de retinoblastoma hipofosforilada (Yanagi *et al*., 2017; Watanabe *et al*., 2017). Ativação da supressão tumoral vias p53 e p21 e p16/retinoblastoma são vias proteicas ocorridas durante a senescência. A ativação é desencadeada pelo dano ao DNA, que pode ser resultado de DNA telomérico e não telomérico, danos ou estresse oxidativo (Barnnes *et al*., 2016).

Quanto à morfologia, as células senescentes são caracterizadas por serem achatadas e com características morfológicas ampliadas. Elas exibem vários marcadores, incluindo induzido por disfunção de telômeros, focos de heterocromatina associada à senescência, grânulos de lipofuscina, danos ao DNA, alterações da expressão genética. Outra importante característica das células senescentes é a liberação de fatores SASP (*Senescence-Associated Secretory Phenotype*), ou seja, fenótipo secretor associado a senescência (Özcan *et al*., 2016).

Como as células senescentes são caracterizadas pela parada irreversível do crescimento em G1 ou G2/M fase do ciclo celular, elas não são mais capazes de se dividirem. Estas células também possuem características bioquímicas especiais, por exemplo. a ausência da proteína Ki-67 proliferativo, atividade de senescência associada β-galactosidase (SA-β-GAL), expressão de supressores de tumor e inibidores do ciclo celular (Yanagi *et al*., 2017; Watanabe *et al*., 2017). Beta-galactosidase associada à senescência (SA-β-GAL), é uma isoforma da enzima beta-galactosidase, normalmente responsável pela quebra de beta-galactosídeos. A sua atividade está presente nos lisossomos de células senescentes. No entanto, o aumento da sua atividade é considerado um resultado da senescência (Yanagi *et al*., 2017).

Os danos ao DNA nuclear e mitocondrial aceleram a senescência, mas desde que os mecanismos de reparação sejam eficazes, o dano celular pode ser reparado. De outra forma, quando alguns dos mecanismos de reparo falham, o DNA danificado se acumulará, obstruindo a função celular e causando sua senescência. Indutores de senescência, como encurtamento dos telômeros, agentes tóxicos ou oncogenes, causam a formação de SAHF (*Senesence-Associated Heterochromatin Foci*), estruturas cromossômicas que se acumulam durante o processo de envelhecimento celular que contém proteínas formadoras de heterocromatina. Todas essas características celulares podem ser consideradas como marcas (ou possíveis biomarcadores) de senescência (Bernadotte, 2016; Zhang *et al*., 2007).

3.2 Sistema modelo *zebrafish* na senescência/ envelhecimento e risco associado a doenças

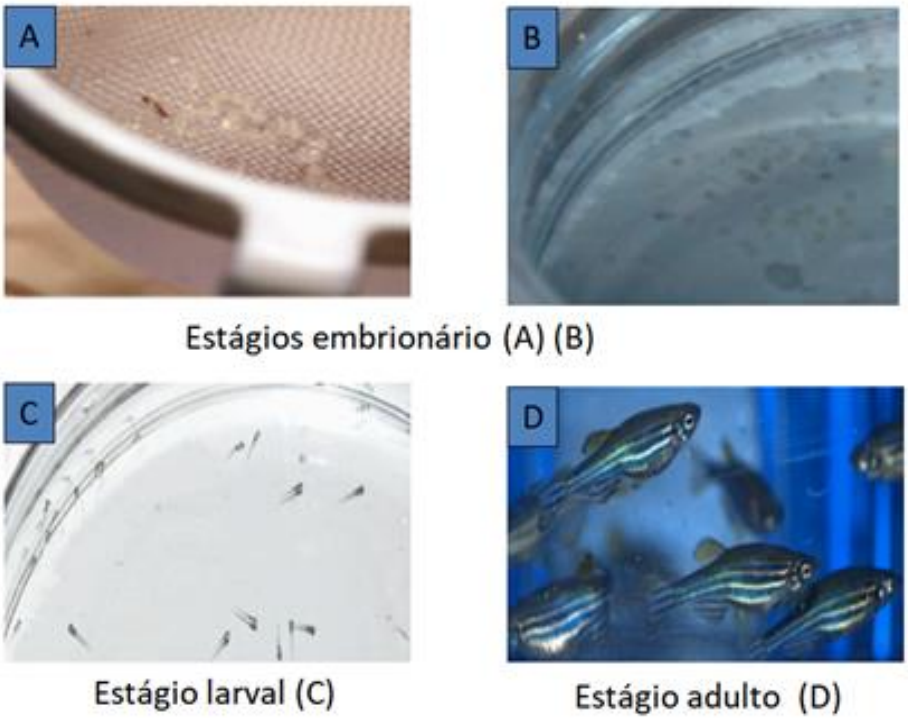
3.2.1 Características do desenvolvimento no modelo zebrafish

Conhecido pela sua popularidade no aquarismo, o *zebrafish* (*Danio rerio*) (Hamilton, 1822) foi inicialmente apreciado por sua beleza tropical. O pequeno teleósteo de água doce é pertencente à família *Cyprinidae*. O gênero *Danio* possui 44 espécies descritas que fazem parte da subfamília *Raborinae* e apresenta um padrão de coloração com listras horizontais claras e escuras alternadas. A distribuição natural do *zebrafish* é ao sul e sudeste da Ásia, principalmente Índia, Bangladesh e Nepal (Spence *et al*., 2008).

A reprodução do *zebrafish* é externa, ocorre através da deposição na água de espermatozoides e ovócitos maduros liberados pelos exemplares adultos, possuindo assim os seguintes estágios de desenvolvimento: estágios embrionários (A e B), estágio larval (C) e estágio adulto (D), conforme descrito na figura 1. A atividade reprodutiva inicia-se nas primeiras horas da manhã em que ocorre a luminosidade, após exposição ao escuro. Os ovócitos

são então fertilizados pelos espermatozoides gerando assim o embrião. Esta espécie apresenta uma fecundidade elevada, uma fêmea na idade adulta produz grandes quantidades de ovócitos maduros em cada postura, entre 50 a 200 podendo liberar até 1000 (Reed; Jennings, 2011).

Figura 1 – Estágios de desenvolvimento de *Danio rerio*



Fonte: Reed e Jennings, 2011.

No final da década de 1960, essa pequena espécie de peixe começou a ganhar destaque como um modelo de vertebrados, graças ao trabalho pioneiro de George Streisinger. Desde então, o *zebrafish* se estabeleceu como um modelo versátil e amplamente utilizado em diversas áreas de pesquisa, incluindo biologia do desenvolvimento (Selderslaghs et al., 2012; Roper & Tanguay, 2018) farmacologia e toxicologia (Lammer *et al*., 2009; Canedo & Rocha, 2020; Canedo *et al*., 2021), ecotoxicologia (Cristiano *et al*.; 2019; Ribeiro *et al*., 2020), ciências veterinárias (Nowik *et al*., 2015), biologia da evolução (Parichy, 2015) nanotecnologia e nanomedicina (Sieber *et al*., 2019; Pereira *et al*., 2019), doenças humanas (Dooley & Zon, 2000), vacinação (Bailone *et al*., 2020), segurança alimentar (Bailone *et al*., 2019), entre outras (Figura 2).

Além disso, o *zebrafish* é um modelo *in vivo* valioso para testes pré-clínicos em medicina personalizada (Baxendal et al., 2017) e nanomedicina (Sieber *et al*., 2019). Uma tendência interessante é o surgimento do *zebrafish* como um sistema modelo de vertebrado no

Sul Global (Trigueiro *et al*., 2020), o que está contribuindo para uma descentralização das publicações científicas e abrindo novas perspectivas para a pesquisa.

Figura 2 – Áreas de pesquisa abordadas com o uso do modelo *zebrafish*

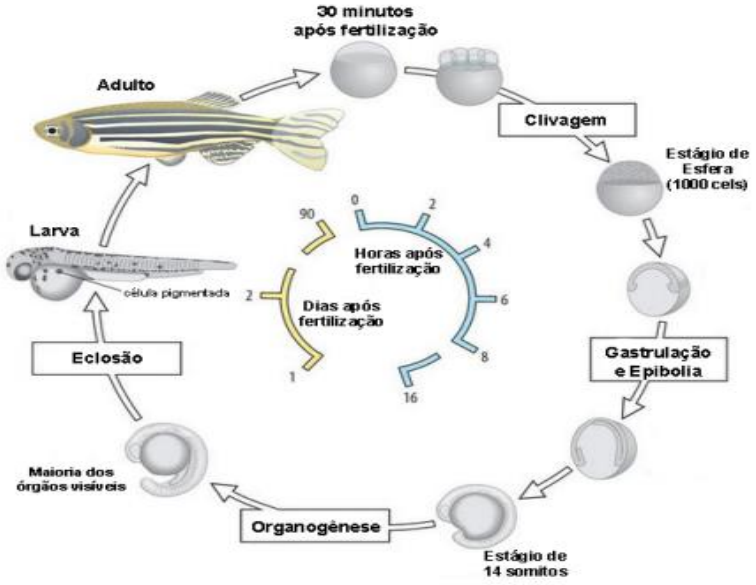


Fonte: elaborada pela autora, 2025.

Pesquisas têm demostrado que embriões e larvas de *zebrafish* apresentam respostas semelhantes às dos indivíduos adultos, sendo a substituição otimizada do ponto de vista do bem-estar, uma vez que garante a economia de recursos e minimiza a geração de resíduos (Lammer *et al*., 2009; Braunbeck *et al*., 2014; Sneddon et al., 2017). Ademais, os testes com embriões e larvas de *zebrafish* não implicam em sofrimento aos animais do ponto de vista regulatório, uma vez que não ocorre alimentação extra-coriônica nestas fases do desenvolvimento (Bayne *et al*., 2015).

Um dos principais motivos pela escolha dos embriões de *zebrafish* em pesquisas ocorre porque a indução de processos malformativos pode ser alcançada sem sacrificar nenhum animal, já que os embriões são transparentes e o seu desenvolvimento é externo ao corpo materno (Eimon, 2014) (Figura 1). Isso facilita a visualização de sua anatomia interna, com auxílio de uma lupa ou microscópio óptico permite-se observar diretamente os seus estágios de desenvolvimento. Os embriões podem ser vistos até mesmo a olho nu (Doke & Dhawale, 2013).

Figura 3 – Ciclo de vida de *Danio rerio*



Fonte: Adaptado de D'Costa; Shepherd, 2009.
Notas:
Legenda: A figura representa um esquema do ciclo de vida do *zebrafish*, como a fase 30 minutos após a fertilização, clivagem (2-4 hpf), estágio de esfera, gastrulação e epibolia (4-8 hpf), estágio de 14 somitos (16 hpf), organogênese (de 16 hpf -1dpf), maioria dos órgão formados e eclosão para larva (1-2 dpf), por fim, animal adulto (90 dpf).

Os embriões do *zebrafish* desenvolvem-se rapidamente, como observa-se na Figura 3, a primeira clivagem inicia-se aos 45 minutos, posteriormente a fertilização, e a embriogênese se completa com 96 horas após fertilização (hpf), já com a maioria dos órgãos formados e funcionando. As larvas eclodem em cerca de 48 a 72 hpf, gradualmente após a eclosão, vão consumindo a vesícula vitelina até o momento em que seu tubo digestivo e a boca completam seu desenvolvimento, por volta de 15 dias após a fecundação (Kimmel *et al*., 1995). As larvas com 72 hpf e 96 hpf apresentam uma complexidade de sistemas vitais em processo de desenvolvimento e alguns já totalmente desenvolvidos.

Embora possuam uma vida média relativamente curta de apenas 3 a 4 anos, eles ainda estão sujeitos a um envelhecimento gradual, similar aos humanos, e começam a apresentar sinais de envelhecimento por volta dos 2 anos. E, na verdade, muitas das marcas reconhecidas do envelhecimento demonstraram evoluir no *zebrafish,* abrangendo várias das teorias tradicionais do envelhecimento (Van Houcke *et al*., 2017; Kishi, 2011; Kishi *et al*., 2009).

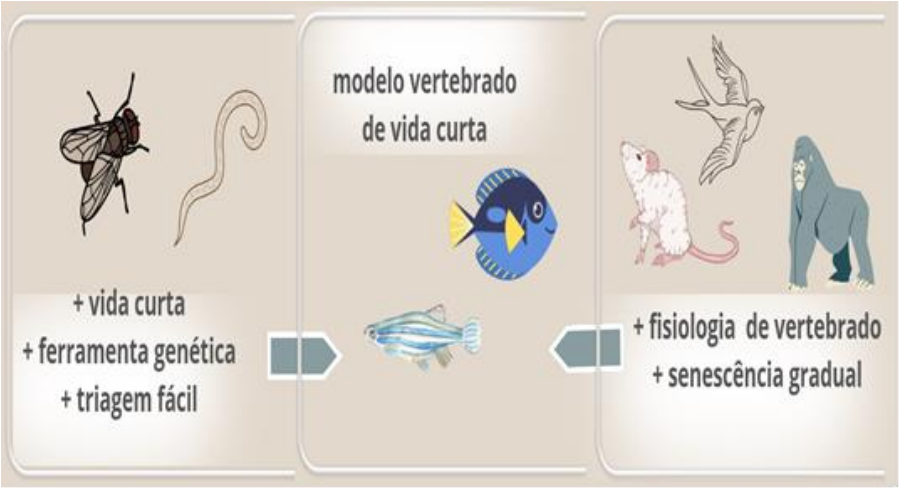
3.2.2 Processo de envelhecimento no modelo zebrafish

Vários modelos de organismos, desde invertebrados pequenos microscopicamente até primatas, têm sido utilizados em pesquisas que investigam os mecanismos do envelhecimento

(Lopez-Otin *et al*., 2013). Entre essas diferentes espécies, a taxa de declínio fisiológico varia, e o processo de senescência pode geralmente ser classificado de rápido a gradual e insignificante. Os invertebrados comumente demonstram um desenvolvimento rápido, vida curta e envelhecimento rápido, que são facilmente estudados por meio de ferramentas genéticas e moleculares. Portanto, modelos como *C. elegans* e *Drosophila*, não vertebrados de vida curta, fizeram e ainda fazem enormes contribuições para nossa compreensão do envelhecimento e permitem a triagem rápida de vários componentes de fármacos.

Os invertebrados não possuem, no entanto, vários órgãos/tecidos definidos, incluindo cérebro, sangue e órgãos internos, e às vezes são pouco representativos para a biologia humana e modelagem de doenças. Nesse sentido, várias espécies de teleósteos, entre os quais medaka (*Orizias latipes*) (Gopalakrishnan *et al*., 2013; Ding *et al*., 2010), killifish turquesa (*Nothobranchius furzeri*) (Di Cicco *et al*., 2011; Terzibasi *et al*., 2008) e peixe-zebra (*Danio rerio*) (Kishi *et al*., 2003;), ganharam muita atenção na gerontologia. A análise da figura 4, permite observar que como modelo de vertebrados, eles são mais diretamente relevantes para os humanos, embora ainda compartilhem a viabilidade de análise mutacional em larga escala com invertebrados (Gerhard, 2003). Diversas espécies de peixes, incluindo o *zebrafish*, permitem o estudo do envelhecimento gradual em um período relativamente curto. Além disso, permitem a modelagem desses processos de envelhecimento e das doenças associadas em vertebrados, utilizando uma gama de técnicas experimentais e ensaios comportamentais bem caracterizados.

Figura 4 – Caractéristicas de modelos animais em gerontologia comparados ao *zebrafish*



Fonte: elaborada pela autora, 2025.
Notas:

Legenda. A figura expõe as características de modelos animais em gerontológia comparados ao *zebrafish*. A análise comparativa entre o modelo *zebrafish*, como modelo vertebrado de vida curta, compartilhando características mutacionais de invertebrados e de vertebrados como modelagens de senescência gradual.

Particularmente no *zebrafish*, a pesquisa em gerontologia se beneficiou significativamente da extensa caracterização da biologia básica do peixe-zebra, impulsionada por uma riqueza de estudos genéticos e de desenvolvimento. De fato, a maior parte do genoma é sequenciada e demonstrou apresentar alta similaridade com os humanos, com ortólogos de muitos genes humanos (Barbazuk *et al*., 2000; Woods *et al*., 2000; Howe *et al*., 2013).

Muitas das alterações celulares e extracelulares relacionadas à idade que se acumulam ao longo da vida humana também foram identificadas em *zebrafish* mais velhos. Da mesma forma, esses teleósteos experimentam um declínio generalizado nas funções gerais do corpo. As suas habilidades reprodutivas diminuem com a idade (Carneiro *et al*., 2016) e quando está envelhecido geralmente exibe curvatura espinhal (Rosa *et al*., 2010), uma atividade locomotora basal reduzida (Philpott *et al*., 2012; Lemos *et al*., 2020), e diminuições na atividade de rotina e capacidade de natação (Philpott *et al*., 2012; Gilbert *et al*., 2014). Na verdade, eles são igualmente propensos à patologia associada ao envelhecimento e refletem notavelmente doenças humanas crônicas típicas relacionadas à idade (Khor *et al*., 2019).

Evidencia-se, também, a importância dos estudos de envelhecimento em *zebrafish* adultos, objetivando assim a comprovação da presença de tais características e sua associação com doenças relacionadas ao envelhecimento (Carneiro *et al*., 2016). O envelhecimento programado está relacionado à imunosenescência, inflamação associada ao envelhecimento e a disfunção do sistema endócrino que regula o relógio interno. A disfunção do sistema imunológico com o tempo está associada à inflamação, processo em inglês conhecido como *inflammaging*, bem como a predisposição a doenças como Alzheimer, câncer, doenças cardiovasculares (Tischer *et al*., 2016). Esse processo de imunosenescência foi comprovado em pesquisas científicas como no estudo que verificou o aumento no número de células imunes inatas na retina do *zebrafish* envelhecido (Damani *et al*., 2011).

A exploração adicional de imunossenescência e inflamação no envelhecimento do *zebrafish* devem ser priorizadas, uma vez que tais percepções podem contribuir significativamente para novas estratégias terapêuticas, por exemplo, em doenças neurodegenerativas, patologias vasculares e câncer (Tischer *et al*., 2016). Já o controle endócrino do relógio interno que pode ser regulado pela redução dos níveis de IGF-1, está associado ao aumento da longevidade e a níveis aumentados de melatonina e de acetilcolina (Van Houcke *et al*., 2017).

Quanto ao envelhecimento deteriorativo em *zebrafish*, tem-se as abordagens da teoria do envelhecimento pelos radicais livres, a teoria do envelhecimento pela instabilidade genômica, a teoria do telômero no envelhecimento e o declínio da protease no envelhecimento. A primeira teoria fala que a produção de espécies reativas de oxigênio mitocondriais, produzidos como subprodutos naturais do metabolismo, levam a danos cumulativos ao DNA, proteínas e lipídios e ao envelhecimento. E afirma que o acúmulo desses danos ao longo da vida devido a defeitos genômicos, desestabilização de macromoléculas, mudanças na composição lipídica das membranas mitocondriais e oxidação de proteínas mitocondriais, leva a uma redução no turnover mitocondrial e deficiências mitocondriais, afetando assim negativamente a apoptose e cross talk interorganelar (Green *et al*., 2011; Raffaello; Rizzuto, 2011; Wang; Klionsky, 2011).

O papel da instabilidade genômica sobre o envelhecimento explica que a integridade e estabilidade do DNA são constantemente desafiadas por agentes químicos e biológicos, bem como ameaças endógenas, como erros de replicação de DNA e EROs. E mesmo apesar do mecanismo de reparo de DNA, a instabilidade genômica aumenta com a idade. Da mesma forma, alterações epigenéticas, incluindo remodelamento da cromatina, modificações de histonas e etilação, acetilação e metilação do DNA, são conhecidos por afetar células e tecidos em todas as fases da vida (Cayuela *et al*., 2018; Raghunath *et al*., 2018).

Dentro da perspectiva de estudos que abordem o DNA, especificamente na abordagem telomeral, é importante ressaltar que o *zebrafish* emergiu como um modelo vertebrado importante para estudar a biologia dos telômeros no envelhecimento. Embora existam diferenças óbvias com os humanos, os níveis de expressão da telomerase são mais elevados no *zebrafish*, ambas as espécies mostram um declínio da telomerase (Van Houcke *et al*., 2017).

Ainda existe dentro dessas teorias o declínio da proteostase no envelhecimento. Comparável aos mecanismos de reparo do DNA, que falham cada vez mais em preservar a estabilidade genética com o avanço da idade, a homeostase das proteínas (proteostase) se altera com a idade. Tanto a estabilização de proteínas corretamente dobradas, realizada principalmente pela família de proteínas de choque térmico (Hsp), quanto à degradação de proteínas pelo proteassoma ou lisossoma, parecem se deteriorar com a idade, levando ao acúmulo de componentes danificados. A expressão crônica de proteínas desdobradas, mal dobradas ou agregadas contribui fortemente para o desenvolvimento de várias patologias relacionadas ao envelhecimento, como doença de Alzheimer e Parkinson, esclerose múltipla, degeneração macular relacionada à idade e catarata (Van Houcke *et al*., 2017).

Em embriões de *zebrafish*, além da telomerase, a betagalactosidase tem se detectado como um marcador da senescência, como no estudo conduzido por Kischi *et al*. (2008) em *zebrafish* com 6 dias pós- fertilização (dpf), que utilizou várias concentrações diferentes de peróxidos como o peróxido de hidrogênio (H2O2) ou hidroperóxido de terc-butila (BHP) durante um longo período de desenvolvimento para simular melhor o estresse oxidativo crônico a longo prazo. Além disso, a ampla disponibilidade de procedimentos experimentais específicos desse animal (abordagens de ganho e perda de função, técnicas de imagem *in vivo*) e recursos (clones, anticorpos, linhagens celulares, linhagens de peixes repórter) aumentaram significativamente os esforços na pesquisa de envelhecimento nesta espécie (Gerhard; Cheng, 2002).

Processos como sinalização redox, atividades de enzimas antioxidantes e metabolismo de lipídios são muito semelhantes em peixes, mas as principais enzimas antioxidantes geralmente estão presentes em níveis mais elevados em comparação com mamíferos (Cailliet *et al*., 2001; Gerhard; Cheng, 2002; Kelly *et al*., 1998; Winston, 1991). No entanto, o *zebrafish* também está sujeito à oxidação de proteínas e lipídios com o envelhecimento (Van Houcke *et al*.; 2017).

O sistema antioxidante enzimático, é composto principalmente pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa peroxidase (GPx), glutationa redutase (GR) e glutationa-S-transferase (GST) (Araújo, 2019; Cotinguiba *et al*., 2013). O sistema enzimático é subdividido em enzimas de biotransformação de fase I e fase II. Enzimas de fase I atuam na conversão de substâncias em metabólitos reativos, favorecendo sua eliminação por meio de conjugação com enzimas de fase II. As enzimas de fase II atuam, portanto, na eliminação dos produtos gerados na fase I, tornando estes produtos mais hidrofílicos e, logo, facilitando sua excreção (Leme *et al*., 2010).

A atividade da superóxido dismutase 2 (SOD2), a principal enzima antioxidante na mitocôndria, aumenta entre 3 e 12 meses de idade no *zebrafish*, o que é indicativo de alto metabolismo e produção de espécies reativas de oxigênio durante essa fase de rápido crescimento. Após a idade de 18 meses, uma tendência decrescente na atividade de SOD2 foi demonstrada em *zebrafish* mais velhos (Almaida-Pagan *et al*., 2014) e um claro aumento nos níveis de oxidação de proteínas ocorre com o avanço da idade neste animal.

Além disso, a peroxidação lipídica dentro das mitocôndrias está aparentemente ligada ao rápido crescimento até a idade adulta, quando ocorre um declínio na atividade da enzima antioxidante e aumento da disfunção mitocondrial até a senescência. Por último, a composição lipídica da membrana mitocondrial é afetada ao longo da vida, como também é o caso em

tecidos de mamíferos. Juntos, esses dados suportam o uso do *zebrafish* para estudos de disfunção mitocondrial durante o processo de envelhecimento, bem como respostas adaptativas a estressores oxidativos (Almaida-Pagan *et al*., 2014).

A enzima CAT catalisa a conversão do H_2O_2 em água nos peroxissomos (Krysko *et al*., 2010), e uma diminuição em seus níveis de atividade também foi descrita em larvas *zebrafish* após a exposição a substâncias tóxicas, possivelmente refletindo danos aos sistemas antioxidantes devido ao estresse oxidativo, uma vez que a substância induziu à produção de espécies reativas de oxigênio e aumentou a atividade de outras enzimas de defesa (Jiang *et al*., 2018).

Existem variações quanto a resposta da catalase durante o estresse oxidativo na senescência. Seu aumento pode ocorrer em resposta ao estresse oxidativo, como demonstrado em fibroblastos humanos senescentes tratados com H_2O_2 para induzir senescência, observando-se o aumento da expressão de catalase (e de SOD e HSP27), mas apenas depois que as características completas de senescência se manifestam (Chen *et al*., 2004). Após a suplementação de antioxidante pode ocorrer o seu aumento.

A suplementação de selênio em fibroblastos senescentes no estudo intitulado “Effect of selenium supplementation on glutathione peroxidase and catalase activities in senescent cultured human fibroblasts”, provocou aumento dos níveis da catalase (e GPx) em células senescentes. Sugerindo que a célula ainda tem capacidade de aumentar resposta antioxidante, se os cofatores necessários estiverem disponíveis (Ghneim; Al-Sheikh, 2011). Já em células envelhecidas do protozoário *Paramecium tetraurelia* observou-se que a atividade da catalase aumentou ligeiramente durante sua fase de maturidade e senescência (Croute *et al*., 1985).

Existem possíveis mecanismos propostos para explicar porque em alguns casos e em alguns estágios, a catalase aumenta durante a senescência ou após estresse oxidativo. O primeiro pode ser relacionado a uma resposta adaptativa. Pois, quando há acúmulo de H_2O_2, a célula ativa mecanismos de detecção de espécies reativas de oxigênio (por exemplo, ativação de fatores de transcrição sensíveis ao redox, como NRF2 em mamíferos, ou fatores semelhantes em plantas), que aumentam a expressão de genes antioxidantes, incluindo catalase. Essa resposta tenta restaurar o equilíbrio redox. Nível muito elevado de estresse oxidativos elevam H_2O_2, o que pode servir como um sinal para aumentar catalase.

Um segundo fator pode estar relacionado a disponibilidade de cofatores e capacidade de síntese, uma vez que o aumento da atividade enzimática depende não só da expressão do gene, mas de fatores como tradução proteica, estabilidade da proteína, presença de cofatores (por exemplo íons, selênio no caso de GPx, mas no caso da catalase há dependência de heme). Em

células senescentes ou com déficits nutricionais/oxidativos, o declínio desses recursos pode limitar a resposta. O estudo com selênio, descrito acima, demonstrou que quando esse nutriente chave está presente em níveis elevados, a resposta antioxidante incluindo catalase é mais efetiva.

Outro motivo pode estar relacionado à presença de isoformas diferentes com regulação distinta, por exemplo em plantas, existem diferentes isoformas de catalase que respondem de formas diferentes ao envelhecimento e ao estresse. Algumas isoformas constitutivas diminuem; outras, induzidas por estresse, aumentam ou são ativadas mais tarde. Exemplo: em *Arabidopsis*, CAT2 decai, CAT3 sobe em resposta ao aumento de espécies reativas de oxigênio no estágio mais tardio (Zimmermann *et al*., 2006).

O quarto fator pode ser atribuído a um limite da resposta ou falha adaptativa. Com o decorrer da senescência, podem ocorrer danos acumulados ao DNA, proteínas, mitocôndrias, peroxissomos etc., que afetem tanto a produção de catalase quanto sua atividade (por inativação, degradação ou alterações pós-translacionais). Em resumo, embora a célula crie tentativas de aumentar a catalase, com o tempo essa capacidade é reduzida. Estudos que mostram declínio ou pouca mudança em antioxidantes em determinados casos apontam para essa ocorrência (Płóciniczak *et al*., 2025).

Por fim, o último fator seria por hormese, ou efeitos de “estímulo leve”. Em alguns organismos (como leveduras), foi observado que um certo estresse oxidativo leve pode provocar uma resposta de hormese, onde espécies reativas de oxigênio induzem defesas antioxidantes que resultam em maior tolerância e mesmo extensão de vida. No caso específico, a inativação de catalases, em conjunto com restrição calórica, elevou H_2O_2, que por sua vez ativou SOD, o que ajudou contra superóxidos (Mesquita *et al*., 2010). Ainda assim, esse é um caso especial e nem sempre aplicável ou direto para senescência de células mamíferas.

O nível de MDA, malondialdeído, é também utilizado para avaliar o nível de peroxidação lipídica. Uma pesquisa com larvas de *zebrafish* induzidos ao estresse oxidativo constatou níveis de MDA significativamente maiores no grupo que foi exposto ao estresse oxidativo por uma dieta rica em colesterol do que no grupo controle (Deng *et al*., 2021).

Crescentes linhas de evidência mostram que o estresse oxidativo ativa a transcrição de uma variedade de genes antioxidantes governado pelas principais vias de sinalização envolvidas nas respostas oxidativas celulares. Entre estes, fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) demonstrou ser um fator de transcrição crítico que se liga ao elemento de resposta antioxidante na região promotora de uma série de genes, codificando para a fase I e a fase II enzimas antioxidantes e proteínas citoprotetoras. Nrf2 é presumivelmente uma das vias mais

importantes para as células lidarem com o estresse oxidativo gerado a partir da exposição a produtos químicos exógenos e endógenos (Silva-Palacios *et al*., 2016; Zhang *et al*., 2015). Entre as várias enzimas citoprotetoras, por exemplo, heme oxigenase-1 (HO-1) demonstrou desempenhar um papel fundamental em manter a homeostase antioxidante durante o estresse celular.

A indução da expressão do gene HO-1 é regulada principalmente a nível transcricional, e a sua indução está ligada à transcrição do fator Nrf2, enquanto a translocação do fator nuclear Nrf2 requer a ativação de várias vias de transdução de sinal, incluindo proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs). As MAPKs são *downstream* efetoras nas respostas antioxidantes, e suas atividades são manifestadas na ativação de muitos fatores de transcrição, incluindo o Nrf2. Portanto, o Nrf2 é um importante regulador transcricional de numerosos genes antioxidantes e desintoxicantes, e MAPK desempenha um papel fundamental na transdução de vários sinais extracelulares para o núcleo. Três subfamílias de MAPKs foram descritas, incluindo proteína quinase regulada por sinal extracelular (ERK), c-Jun NH (2)-terminal quinase (JNK), e p38 MAPK. ERK2 e p38 MAPK também regulam positivamente a atividade do Nrf2 para iniciar a transcrição de genes antioxidantes (Shi; Zhou, 2010).

Modelos *in vitro* mostraram que ERK2 e p38 MAPK modulam a expressão de enzimas antioxidantes por ativação de Nrf2. Estudo em larvas de *zebrafish* expostos a um poluente ambiental (PFOS) constatou que as expressões do gene Nrf2 e heme oxigenase-1 (HO-1) foram significativamente reguladas positivamente em comparação com o grupo controle. E para MAPKs, quando investigados os perfis da expressão gênica de proteína quinase regulada por sinal extracelular (ERK), c-Jun NH (2) -terminal quinase (JNK) e p38, os níveis de expressão do gene ERK permaneceram inalterados, enquanto os genes JNK e p38 expressões foram significativamente reguladas positivamente, fatos que podem ser vinculados à apoptose celular induzida pelo poluente em larvas de peixe-zebra (Shi; Zhou, 2010).

3.2.3 Modelos de indução à senescência celular e ao envelhecimento do modelo zebrafish

Os modelos de envelhecimento, geralmente, podem ser classificados em duas categorias: modelo de envelhecimento natural e modelo de envelhecimento acelerado. O modelo de envelhecimento natural é demorado e demanda de um custo elevado, portanto modelos de envelhecimento acelerado são mais preferidos devido à sua fácil aplicação, menor duração de estudo e maior taxa de sobrevivência dos animais durante todo o período experimental. Existem vários tipos de modelos de envelhecimento acelerados que incluem

tratamento com hidroxiureia e induzida por D-galactose para estudos *in vitro*, induzidos por radiação, induzidos por *jet lag*, modelo camundongos Klotho, induzidos pela remoção do timo,e induzidos por D-galactose para estudos *in vivo* (Azman & Zakaria, 2019).

Apesar de existirem vários modelos para indução da senescência em células *in vitro* e em animais como o uso da D-galactose, esse método de indução em sistema modelo *zebrafish* passou a ser utilizado recentemente num modelo de sarcopenia em *zebrafish* adulto (Chen *et al*., 2023).

Vários estudos sustentam que a administração sistêmica crônica de D-gal pode ser utilizada como um modelo animal de envelhecimento (Budni *et al*., 2016; Chen *et al*., 2010; Cui *et al*., 2006; Dulcy *et al*., 2012; Gao *et al*., 2015; Hsieh *et al*., 2011). A D-galactose, um açúcar redutor, é uma substância que ocorre naturalmente no corpo e é completamente metabolizada em concentrações normais. No entanto, em concentrações mais altas, pode ser convertido em aldose, peróxido de hidrogênio e galactose oxidase, servindo como catalisador e resultando na geração de ânion superóxido e de radicais livres derivados de oxigênio. Esse açúcar também reage prontamente com as aminas livres de aminoácidos em proteínas e peptídeos, ambos *in vitro* e *in vivo*, para formar produtos de glicação avançada (Bo-Htay, 2018).

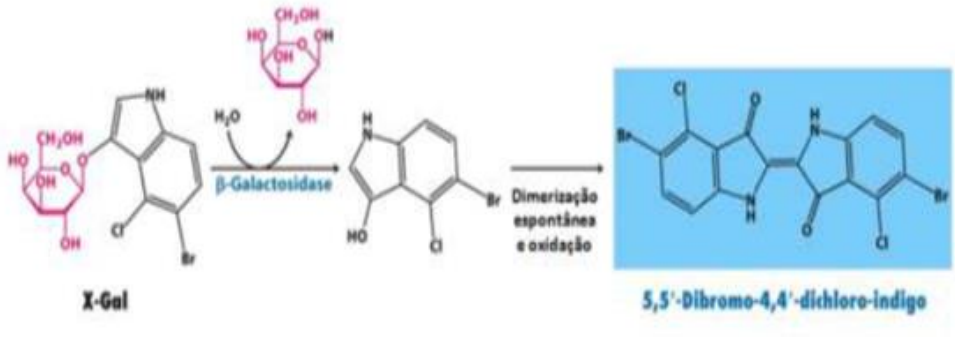
Pesquisadores na China utilizaram a D-galactose pela primeira vez na indução ao envelhecimento descobrindo que injeções desse açúcar podem reduzir a longevidade em roedores (Xu 1985; Zhang *et al*., 1990), *Drosophila* (Cui *et al*., 2004), neurônios cerebrais fetais de ratos cultivados e fibroblasto pulmonar fetal humano (Cui *et al*., 1997). Esses animais com vida reduzida apresentaram disfunção cognitiva e neurodegeneração (Shen *et al*., 2002; Sun *et al*., 2001; Xu & Zhao, 2002; Zhang *et al*., 1996), fertilidade reduzida (Qi *et al*., 2002), respostas de imunidade enfraquecida (Shang *et al*., 2001; Song *et al*., 1999), e aumento do estresse oxidativo (Gong & Xu, 1991).

Desde então, mais estudos sobre envelhecimento utilizaram esse modelo e o resultado foi favorável, pois foi demonstrado aumento nos marcadores de envelhecimento, como produtos finais de glicação avançada (AGE), receptores para produtos finais de glicação avançada produtos (RAGE), aldose redutase (AR), sorbitol desidrogenase (SDH), encurtamento do comprimento dos telômeros, atividade da telomerase, enzima de clivagem da proteína precursora de amiloide do sítio beta 1 (BACE-1), beta amiloide proteína (Ab1-42), genes associados à senescência (P16,P21, P53, P19Arf, P21Cip1/Waf1) e coloração com beta-galactosidase associada à senescência (SA-b-gal) (Shwe *et al*., 2018).

A expressão aumentada da enzima β-galactosidase (SABG) associada à senescência, que é considerada um marcador de envelhecimento generalizado, aumenta linearmente no

tecido da pele de *zebrafish* entre 5 e 57 meses de idade (Kishi et al., 2003; Tsai *et al*., 2007). Recentemente, níveis aumentados de SABG foram detectados da mesma forma em fatias de cérebro de peixes de 26 meses, em comparação com indivíduos de 8 meses (Arslan-Ergul *et al*., 2016). A confirmação da redução da atividade enzimática de β-galactosidase em *zebrafish* é realizada através do teste *in situ* para X-gal (5-Bromo-4-cloro-3-indoll β-D-galactopiranosídeo) (Figura 6). Trata-se de um substrato cromogênico que, ao interagir com a enzima, produz uma cor azul que pode ser facilmente detectada.

Figura 5 – Representação esquemática da reação durante o teste com X-gal



Fonte: Adaptada de Biochemistry, 7th edition, Berg et. al., 2012.

A figura 5 apresenta uma representação esquemática da reação que ocorre durante o teste com X-gal. Quando a molécula interage com a enzima ocorre a hidrólise da ligação glicosídica de β-D-galactose. Dessa reação se origina a molécula de 5-bromo-4-cloro-3-hidroxiindole, que em seguida sofre dimerização espontânea e oxida, formando 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo, um produto intensamente azul e insolúvel. A geração de ROS é a principal causa de dano intracelular induzido por D-gal (Kummar *et al*., 2011; Pazdro & Burgess, 2012). O metabolismo oxidativo por D-gal gera produtos de glicação avançada que quando acumulados aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio (Chang *et al*., 2016).

Como as larvas do *zebrafish* são opticamente transparentes, elas podem ser usadas para monitorar espécies reativas de oxigênio *in vivo*. Várias sondas fluorescentes foram adaptadas para uso em experimentos com esse animal, e existem outras sondas como laranja de acridina para detecção de necrose e iodeto de propídeo para apoptose. O corante fluorogênico comum dihidrodicloro diacetato de fluoresceína (H_2DCFDA), que é oxidado por espécies reativas de oxigênio para produzir verde diclorofluoresceína fluorescente, foi usado em embriões desse animal para demonstrar a produção de espécies reativas de oxigênio em resposta ao forbol12-miristato 13-acetato (Hermann *et al*., 2004). A mesma sonda foi usada em ensaio com uma

colocação de alto rendimento em que espécies reativas de oxigênio produzido em resposta ao peróxido de hidrogênio, trióxido de arsênio e fenetilisotiocianato, foram quantificados em larvas de *zebrafish*. A resposta de espécies reativas de oxigênio foi inibida na presença do antioxidante *N*-acetilcisteína. Portanto, embora H_2DCFDA tenha baixa seletividade para vários oxidantes, é um bom sensor geral de espécies reativas de oxigênio (Walker *et al*., 2012).

Estudo para estabelecimento de modelos de envelhecimento induzido por dano oxidativo também foi realizado pela adição de etanol (C_2H_5OH), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e 6-hidroxidopamina (6-OHDA) para embriões de *zebrafish*. Após ser tratado com etanol, H_2O_2 e 6-OHDA, as alterações morfológicas foram óbvias e as deformidades incluíam curvatura da coluna vertebral, sangramento cardíaco, sangramento hepático, deformidade do saco vitelino e edema pericárdico. E ainda a expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo Nrf2b, sod1 e sod2 e genes relacionados ao envelhecimento myl2a e selenbp1 foram regulados positivamente de forma significativa em comparação com o grupo controle. (Li *et al*., 2021).

O *zebrafish* é, em estado senescente, um modelo valioso na modelagem de doenças. Como tal, eles são indispensáveis em pesquisas futuras em gerontologia e certamente auxiliarão no estudo e tratamento de, por exemplo, câncer, doenças cardiovasculares e doença de Alzheimer - as principais causas de morte e incapacidade em nossa população idosa. Embora essas patologias permaneçam, até hoje, relativamente inexploradas no envelhecimento desse animal, um estudo indica que o seu coração envelhece paralelamente ao dos humanos e revela que o miocárdio, sua vascularização e sua função contrátil degradam entre 8 e 52 meses de idade (Sun *et al*., 2014).

Além disso, as condições de estresse nesses peixes idosos parecem provocar prejuízos no desempenho cardíaco, que são comparáveis ao que é observado em idosos (Sun *et al*., 2014). Notavelmente, a impedância elétrica de cardiomiócitos de *zebrafish* foi recentemente usada como um índice quantitativo para analisar a senescência. Assim, tanto a condutância do citoplasma quanto a capacitância da membrana celular mostraram aumentar monotonamente entre 3 e 18 meses de idade, levando a propriedades elétricas distintas em células de diferentes idades (Cha *et al*., 2016).

O envelhecimento cardíaco é caracterizado em animais e em humanos por alterações estruturais tanto em nível de órgão/tecido quanto celular. No geral, resultados de estudos em humanos e modelos animais demonstraram: (i) remodelação atrial, caracterizada por maior tamanho atrial (hipertrofia) e volume; (ii) hipertrofia ventricular esquerda (VE), relacionada a um aumento na espessura da parede ; (iii) um declínio no número de células marcapasso do nó sinoatrial (NSA) e na expressão de canais iônicos envolvidos em sua função; e (iv) um aumento

no número de fibroblastos cardíacos (as células que produzem a matriz extracelular do coração) (Stoyek *et al*., 2018). No zebrafish, as modificações funcionais relacionadas à idade são altamente associadas com mudanças fisiopatológicas no coração, não muito diferente do declínio progressivo das funções cardiovasculares, levando a aumento do risco de hipertensão, aterosclerose e enfarte do miocárdio em humanos.

No entanto, evidencia-se profundas diferenças anatômicas entre o coração do peixe-zebra e o coração humano. Até 120 horas pós fertilização o coração de larvas já está bem formado. Sendo uma distinção fundamental, o fato de que o coração do peixe-zebra não sofre septação. Permanecendo, portanto, com duas câmaras, composto de um trato de entrada, seio venoso, um único átrio e um único ventrículo que é separado do átrio por almofadas endocárdicas. Além disso, o miocárdio ventricular do peixe-zebra consiste em uma camada compacta externa e uma camada interna trabeculada, enquanto o ventrículo esquerdo humano saudável é caracterizado pela compactação da parede miocárdica. Á nível celular, os cardiomiócitos ventriculares do peixe-zebra não possuem um sistema tubular em T, que é um componente essencial do acoplamento excitação-contração (EC) no coração de mamíferos.

Apesar de poder-se argumentar que essas diferenças estruturais proeminentes deveriam ser acompanhadas por diferenças funcionais da mesma ordem, surpreendentemente, no que diz respeito à função eletrofisiológica, o coração de duas câmaras do peixe-zebra compartilha muitas propriedades com o coração humano. O peixe-zebra possui um sistema de condução cardíaca semelhante ao coração humano e a frequência cardíaca é controlada por um grupo de células marcapasso na região sinoatrial. A frequência cardíaca, bem como a forma do potencial de ação ventricular, são semelhantes ao correlato humano. Isso contrasta fortemente com outros sistemas de modelo, como camundongos, cujas frequências cardíacas e características de repolarização diferem fundamentalmente do coração humano (Stoyek *et al*., 2018).

Assim, o peixe-zebra é um modelo interessante e complementar para estudar distúrbios eletrofisiológicos, como a síndrome do QT longo. O intervalo QT no eletrocardiograma corresponde ao tempo total de despolarização mais a repolarização ventricular. O atraso na repolarização ventricular, predispõe a arritimias em humanos. O QT longo em zebrafish pode ser induzido pela farmacologia e pela genética. E pode ser medido través de eletrocardiograma ou por voltagens de cálcio. Sendo confiável associar os dois parâmetros com a frequência cardíaca e morfologia cardáca. Além disso, o peixe-zebra tem sido amplamente utilizado para estudar distúrbios de contratilidade, como a cardiomiopatia dilatada. Mutações em componentes do aparelho contrátil, como titina, tropomiosina, troponina T tipo 2, cadeia leve de miosina-2, demonstraram levar à dilatação ventricular e à redução do desempenho contrátil.

Se o peixe-zebra é um modelo verdadeiramente atraente para estudar a contratilidade e a disfunção contrátil depende de quão próximos os cardiomiócitos do peixe-zebra imitam o acoplamento EC do coração de mamíferos (Stoyek *et al*., 2018).

Em mamíferos, a excitação elétrica leva ao influxo de cálcio extracelular através do canal de Ca^{2+} tipo L (LTCC). Isso leva a um aumento local da concentração de cálcio que ativa o receptor de rianodina (RyR) na membrana do retículo sarcoplasmático (SR) para liberar uma quantidade maior de Ca^{2+}. Este processo de liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} (CICR) requer, no entanto, uma interface direta entre a célula e a membrana do RS, que é habilitada em cardiomiócitos de mamíferos por invaginações da membrana celular, os chamados túbulos T. O Ca^{2+} é removido principalmente do citosol pela recaptação no RS, bem como pelo efluxo trans-sarcolemal de Ca^{2+} através do trocador Na^{+}-Ca^{2+} (NCX) e uma Ca^{2+}-ATPase sarcolemal (Stoyek *et al*., 2018).

Diferenças fundamentais no ciclo de Ca^{2+} parecem existir entre cardiomiócitos de mamíferos e de peixe-zebra. Os túbulos T estão ausentes em cardiomiócitos de peixe-zebra e, consequentemente, o influxo transsarcolemal de Ca^{2+} é relatado como o principal contribuinte para o transiente de Ca^{2+} enquanto o CICR do SR parece desempenhar um papel menor. Evidencia-se que o desenvolvimento de força no miocárdio ventricular de peixe-zebra adulto requer não apenas o fluxo transsarcolemal de Ca^{2+}, mas também a ciclagem de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático intacto. Em contraste com os mamíferos, a FFR é fortemente negativa no coração do peixe-zebra. Esses aspectos precisam ser considerados ao usar o peixe-zebra para modelar doenças humanas de contratilidade miocárdica (Stoyek *et al*., 2018).

A quantificação de cálcio foi demonstrada em estudo em que uma grande produção de miócitos atriais e ventriculares saudáveis pôde ser obtida pela perfusão enzimática do coração canulado de peixe-zebra. Além disso, os miócitos ventriculares do peixe-zebra diferem daqueles de grandes mamíferos por terem maior densidade de I Ca,L e uma relação de contração-voltagem monofásica crescente, sugerindo que se deve ter cautela ao extrapolar o impacto funcional de mutações no manuseio e na contração do cálcio em cardiomiócitos do peixe-zebra (Zhang *et al*., 2011). Já a análise de pulsos de íons de cálcio que são gerados em resposta a forças mecânicas devido ao fluxo sanguíneo, podem ser visualizados no coração do peixe-zebra em batimento cardíaco usando um indicador de cálcio geneticamente codificado, como o GCaMP7a. Zhang *et al*. (2024) descrevem um método de análise de imagem usado para comparar a fase do ciclo cardíaco em filmes de corte z único do coração em batimento cardíaco, permitindo a fácil medição do sinal de cálcio través de uso de *softwere* FIJI 2.7.0 e MATLAB R2014a.

A frequência cardíaca do *zebrafish* é significativamente reduzida, com um aumento nas arritmias cardíacas ou batimentos cardíacos irregulares em animais de 52 meses em comparação com os de 8 meses. Há também um aumento das dimensões ventriculares endodiastólicas, concomitante com uma diminuição na complacência ventricular e relaxamento prejudicado durante envelhecimento. Além disso, peixes-zebra envelhecidos exibem maior densidade miocárdica do ventrículo e vasos do epicárdio menores do que o do peixe-zebra jovem. Consequentemente, a deterioração da função cardíaca neste tipo de animal envelhecido leva a condições patológicas como hipertrofia cardíaca e disfunção comparável a doenças cardiovasculares que se manifestam em humanos (Khor, *et al*., 2019).

3.2.4 Importância dos estudos translacionais em Danio rerio para a compreensão de mecanismos cardiovasculares e do envelhecimento

O *zebrafish* (*Danio rerio*) consolidou-se como um modelo experimental de elevado valor translacional, devido à sua alta similaridade genética com o ser humano, à transparência corporal nas fases embrionárias, ao rápido desenvolvimento, e à facilidade de manipulação genética e farmacológica. Descreve-se a seguir estudos que abordaram essa temática, alguns já mencionados anteriormente, que evidenciaram o papel translacional de estudos com *zebrafish*: Zhang *et al*. (2011), em estudo intitulado "*Calcium handling in zebrafish ventricular myocytes*", investigaram os mecanismos de regulação do cálcio intracelular em miócitos ventriculares isolados e demonstraram que o *zebrafish* apresenta transientes de Ca^{2+} e acoplamento excitação-contração altamente semelhantes aos observados no coração humano, dependentes de canais do tipo L e da atividade do retículo sarcoplasmático. Tais achados consolidaram o modelo como referência para pesquisas de disfunções contráteis e arritmogênicas, e para a triagem de agentes cardioprotetores.

Em estudo complementar, Hou *et al*. (2014), no trabalho "*Simultaneous mapping of membrane voltage and calcium in zebrafish heart in vivo reveals chamber-specific developmental transitions in ionic currents*", realizaram o mapeamento simultâneo da voltagem de membrana e dos fluxos de cálcio no coração de *zebrafish* em desenvolvimento. Os autores identificaram transições iônicas específicas entre átrio e ventrículo, evidenciando que, assim como em humanos, há uma maturação progressiva de correntes dependentes de cálcio para correntes dependentes de sódio. Tal constatação possui implicações diretas na compreensão das síndromes de QT longo e de distúrbios de condução elétrica.

Já o estudo de Vicente *et al*. (2022), "*Early calcium and cardiac contraction defects in a model of phospholamban R9C mutation in zebrafish larvae*", utilizou uma mutação homóloga à humana (PLN-R9C) para demonstrar alterações precoces no manuseio de cálcio e na contratilidade cardíaca. O modelo reproduziu de forma fidedigna o fenótipo clínico de cardiomiopatias hereditárias humanas, validando o *zebrafish* como plataforma translacional para testes de terapias gênicas e farmacológicas voltadas à correção de defeitos de fosfolambano e SERCA.

De forma complementar, Martínez-Sielva *et al*. (2024), em "*Suppression of contraction raises calcium ion levels in the heart of zebrafish larvae*", demonstraram que a supressão da contração cardíaca promove aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} e alterações nos transientes de cálcio, confirmando a forte interdependência entre a atividade mecânica e o controle iônico cardíaco. Esses achados são relevantes para a compreensão de miocardiopatias e arritmias humanas associadas a disfunções de acoplamento excitação–contração. Ademais, o estudo de Haverinen e Vornanen (2018) "*Expression of calcium channel transcripts in the zebrafish heart*", que permitiu a caracterização da expressão de transcritos de subunidades α de canais de cálcio do tipo L e T em átrios e ventrículos de *zebrafish* adultos, com proporções comparáveis às observadas no coração humano. Este mapeamento genético fornece uma base molecular de referência para investigações futuras sobre modificações nos canais de cálcio durante o envelhecimento e em modelos de senescência celular induzida.

Em conjunto, essas evidências reforçam o papel do *zebrafish* como um modelo translacional de alta relevância para a pesquisa cardiovascular e de envelhecimento. O estudo integrado de correntes iônicas, transientes de cálcio e contratilidade neste organismo contribui para a compreensão de mecanismos moleculares conservados, permitindo a extrapolação de resultados para o contexto humano. Outrossim, sua aplicabilidade em triagens de compostos antioxidantes, antissenescentes e cardioprotetores confere ao *zebrafish* um papel estratégico na identificação de novos alvos terapêuticos e na validação pré-clínica de fármacos voltados à promoção da saúde e longevidade cardiovascular.

3.2.5 Evidências translacionais e segurança clínica no uso de senolíticos e senomórficos

Os senolíticos podem ser definidos como compostos capazes de eliminar seletivamente células senescentes (inibição de vias antiapoptóticas como BCL-2/BCL-xL; bloqueio de interações pró-sobrevivência p53–FOXO4), enquanto os senomórficos se caracterizam por atuar modulando o fenótipo senescente (SASP), sem induzir apoptose, modulando vias como

mTOR e JAK/STAT. Ambos representam estratégias promissoras no campo da biogerontologia translacional, com impacto potencial na prevenção de doenças relacionadas à idade, como fibrose, disfunção cardiovascular e fragilidade tecidual.

Em modelos animais, diversos compostos demonstraram eficácia significativa como pode-se observar pela combinação dasatinibe + quercetina (D+Q) e o inibidor navitoclaxe (ABT-263), ambos reduziram a carga de células senescentes e melhoraram parâmetros funcionais em múltiplos tecidos, embora o navitoclaxe tenha levado a efeitos colaterais, como a presença de trombocitopenia, considerada sua principal limitação (Greenberg *et al*., 2024). Já o uso do peptídeo FOXO4-DRI levou a restauração da homeostase tecidual ao promover apoptose seletiva de células senescentes. Em contrapartida, compostos senomórficos, como rapamicina, ruxolitinibe e metformina, mostraram reduzir a SASP e o estresse oxidativo, prolongando a função celular em roedores (Baar *et al*., 2017; Haverinen; Vornanen, 2018; Saliev *et al*., 2025).

Os primeiros ensaios clínicos em humanos com D+Q evidenciaram viabilidade e segurança de curto prazo, com benefícios funcionais discretos e efeitos adversos leves (Justice *et al*., 2019). Já o UBX0101, inibidor p53/MDM2 de ação local, não demonstrou eficácia clínica em osteoartrite (Unity Biotechnology, 2020). Em contraste, fármacos senomórficos apresentam perfil de segurança conhecido, mas com respostas mais graduais, incluindo eventos adversos como estomatite (rapamicina), citopenias (ruxolitinibe) e desconforto gastrointestinal (metformina) (Qin *et al*., 2025). A transição dos modelos animais para humanos demonstra que a janela terapêutica e a seletividade tecidual são determinantes críticos. Senolíticos exibem alta potência, porém risco hematológico maior; senomórficos são mais seguros, embora menos específicos para eliminação celular. Estratégias recentes de entrega seletiva (como PROTACs e conjugação com β-galactosidase) buscam otimizar eficácia e segurança (Kramer *et al*., 2023).

3.3 Testes de quimioinformática para escolha do composto a ser usado nos estudos com *zebrafish*

Compostos fitoquímicos ajudam as plantas a sobreviverem às tensões ambientais e a protegê-las de infecções microbianas e poluentes ambientais e estão presentes em uma grande variedade de alimentos (Si & Liu, 2014; Zhang et al., 2015). Observa-se que alguns compostos antioxidantes presentes em frutas têm se destacado por apresentarem uma elevada capacidade de eliminação de radicais livres, e, portanto, no tratamento de doenças cardiovasculares. As frutas contêm vários fitonutrientes como carotenóides, fenólicos, flavonóides e antocianinas.

O Nordeste do Brasil possui uma vasta diversidade de frutas ricas em antioxidantes, como os presentes na acerola, caju, cajá, mamão e manga. A ingestão regular de vegetais e frutas pode vir a reduzir o estresse oxidativo e seus riscos associados. Os componentes antioxidantes das frutas e vegetais são responsáveis pela eliminação de radicais livres, RNS, espécies reativas de oxigênio e inibindo o processo de desencadear a geração de espécies reativas de oxigênio (Abbas & Wink, 2009; Kampkötter *et al*., 2008; Meléndez-Martínez *et al*., 2019).

Dados disponíveis na literatura comprovam ação de alguns compostos presentes em frutas típicas do Nordeste do Brasil e parte de suas árvores, como o estudo com a *Carica papaya* sobre o sistema de antioxidantes, que comprovou seu efeito sobre as atividades da glutationa redutase, GST, GPX, glicose-6-fosfato desidrogenase. Já em relação a estudos com a manga, observou-se algumas ações atribuídas ao seu composto mangiferina, como melhora na disfunção estimulada por ox-LDL de células endoteliais da veia umbilical humana, restauração na liberação de óxido nítrico, diminuição na geração de espécies reativas de oxigênio, e aumento na expressão de p-Akt, p-eNOS. Outras atividades como a hepatoprotetora, anticarcinogênica, anti-hiperglicêmica, anti-genotóxica e na prevenção da dislipidemia foram atribuídas à acerola. Foi observada a redução da lipoperoxidação no cérebro de ratos tratados com o uso do caju e a utilização de folhas do cajá demonstrou ação na disfunção erétil e cognitiva (Asghar *et al*., Batool *et al*., 2018; 2016; Duangjan *et al*., 2019; Jiang *et al*., 2019; Ojo *et al*., 2019; Oloyede, 2011; Prakash & Baskaran, 2018).

Historicamente, os produtos naturais têm sido documentados para seus usos terapêuticos, que podem ser aplicados ao tratamento de doenças, cura e prevenção de doenças (Hoch & Huang, 2000). No entanto, diante da diversidade estrutural desses compostos, ferramentas de quimioinformática têm sido empregadas para otimizar a seleção racional de candidatos bioativos. Portanto, novas ferramentas foram desenvolvidas para revolucionar o processo de triagem de produtos naturais ao projetar novos medicamentos. O uso dessas novas tecnologias de triagem e o advento da triagem virtual tem facilitado a construção de uma biblioteca de compostos químicos e modelos computacionais capazes de analisar e retornar uma seleção de constituintes químicos com as propriedades desejadas (Mackel, 2004).

Procedimentos de *docking* molecular, junto com seus diferentes sistemas de pontuação, são frequentemente usados para prever modos de ligação e afinidades entre compostos químicos e sítios de ligação de drogas em macromoléculas biológicas (Makarasen *et al*.; 2019; Vilar *et al*., 2019). Enquanto a triagem virtual é o processo de triagem de bibliotecas de moléculas pequenas *in silico* utilizada para identificar estruturas químicas que podem se ligar a um alvo

de uma droga (Nunes *et al*., 2019), tornando possível otimizar e selecionar o composto que deve ser submetidos a testes de atividade *in vitro* e *in vivo* (Jagoorhi *et al*., 2016).

Portanto, foi realizado previamente ao estudo com embriões, o estudo de quimioinformática que teve como objetivo utilizar, criar e combinar diversas metodologias de triagem virtual de um banco de dados de produtos naturais através de *docking* molecular e algoritmos de aprendizado de máquina, utilizando descritores moleculares. Identificando assim os compostos presentes em frutas e partes das árvores dessas frutas, típicas da região Nordeste do Brasil, ativos em vias enzimáticas envolvidas em doenças cardiovasculares associadas ao envelhecimento.

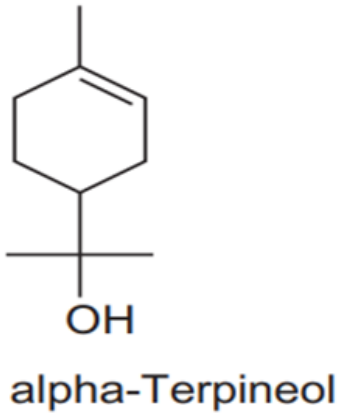
O estudo *in silico* foi iniciado por um estudo prévio dos compostos presentes na literatura científica e após a identificação de 67 compostos, procedeu-se um estudo de quimioinformática para identificar a participação dos principais compostos ativos dessas frutas, tipicamente consumidas no Nordeste do Brasil, sobre algumas vias de sinalização envolvidas no processo de envelhecimento e riscos associados a doenças cardiovasculares. Dentre as várias vias que estão envolvidas nesse processo, e após os resultados do estudo de quimioinformática, pôde-se trabalhar primeiramente com os seguintes modelos enzimáticos: NRF2, COX2, NADPH e iNOS. E, portanto, após os resultados do estudo e mediante alguns critérios adotados, o composto escolhido para os testes em embriões e em larvas de *zebrafish* foi o α-terpineol, e a via enzimática com melhores resultados foi a da NRF2.

3.4 Abordagens sobre as características e funções do α-terpineol

Os terpenoides são o maior grupo de metabólitos secundários de plantas. Existem dezenas de milhares de hidrocarbonetos de ocorrência natural e eles são uma das classes mais estruturalmente diversas de compostos naturais. Os terpenoides consistem em C = 5, 10, 15, 20, n> 40 unidades de carbono e são classificados como hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30), tetraterpenos ou carotenóides (C40) e politerpenos (Cn, n> 40) (Yazaki *et al*., 2017).

Investigações biológicas extensas revelaram uma ampla gama de atividades farmacológicas e fisiológicas dos terpenoides e seus derivados. Os monoterpenos são dímeros de isopreno, eles têm a composição $C_{10}H_{16}$. São compostos facilmente voláteis de cheiro agradável que constituem a base dos óleos essenciais das plantas e de frutas (Proshkina *et.al*., 2020). O terpineol é um álcool monoterpenoide cíclico, conforme pode ser observado na figura 6 (Bhatia *et al*., 2008).

Figura 6 – Estrutura do α-terpineol

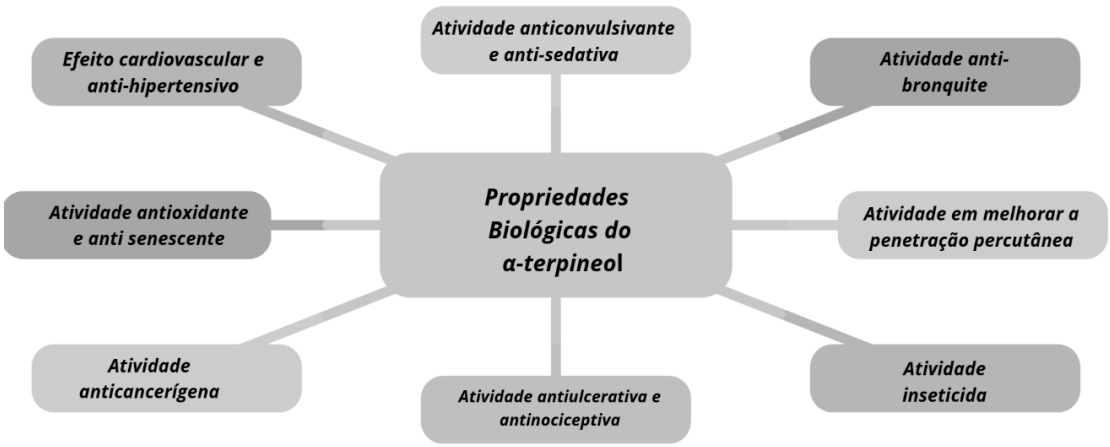


Fonte: Bhatia *et al*., 2008.

3.4.1 Efeito cardiovascular e anti-hipertensivo, antioxidante e antisenescente do α-terpineol

Segundo Khaleel *et al*. (2018), o terpineol é descrito na literatura apresentando várias propriedades, dentre elas, anticonvulsivante , antisedativa, melhora da perfusão cutânea, antinociceptiva, anti-bronquite, inseticida, anti-ulcerativa, anti-cancerígena, antioxidante, cardiovascular e anti-hipertensiva, como observa-se na figura 7. Não há disponibilidade de pesquisas relacionadas ao envelhecimento e sua associação com a doença cardiovascular, com o uso do composto em modelos de induçação à senescência por d-gal nesse aanimal. Sendo portanto, a nossa pesquisa pioneira em utilizar essa abordagem com o α-terpineol, estando disponível apenas um estudo em células, que comprovou o seu efeito em reduzir a atividade antisenescente.

Figura 7 – Propriedades biológicas do α-terpineol



Fonte: elaborada pela autora, 2025.

A hipertensão arterial é considerada o principal fator de risco para ataque cardíaco e acidente vascular cerebral (Nguelefack *et al*., 2009), portanto a sua presença está forte e diretamente relacionada aos riscos relativos de acidente vascular cerebral e doença cardíaca. Portanto, a hipertensão arterial, bem como as doenças cardiovasculares aumentam o risco de mortalidade e morbidade em todo o mundo (Mayet & Hughes, 2003; Wang *et al*., 2010). Foi demonstrado que a disfunção endotelial na hipertensão desencadeia um desequilíbrio entre a produção e a liberação desses fatores, aumentando a geração de espécies reativas de oxigênio e diminuindo a síntese e a biodisponibilidade de NO (óxido nítrico). A L-arginina é o precursor da síntese de NO pela NO sintase (NOS), uma enzima que existe em três isoformas: neuronal (nNOS), induzível (iNOS) e endotelial (eNOS). Além disso, a inibição da atividade da eNOS, em seguida, da biossíntese de NO por meio da administração de análogos da L-arginina, como o éster metílico da L-nitroarginina (L-NAME), leva à hipertensão (Moncada; Higgs, 2006; Fernandes- Santos *et al*., 2006).

Consequentemente, muitos relatórios foram elaborados para investigar os efeitos cardiovasculares e anti-hipertensivos de α-Terpineol em ratos com hipertensão induzida por L-NAME (Ribeiro *et al*., 2010; Sabino *et al*., 2013). A sua ação foi evidenciada usando o modelo de hipertensão induzida por L-NAME, sendo demonstrado que o composto foi capaz de induzir hipotensão dependente da dose em ratos acordados. Da mesma forma, quando os anéis mesentéricos foram usados, os pesquisadores mostraram que ele produzia efeitos vaso-relaxante, independentes de endotélio. Esse efeito pode ser atribuído, pelo menos em parte, à inibição dos canais de cálcio dependentes de voltagem. Além disso, o tratamento com o

composto por sete dias promoveu um efeito antioxidante induzido nos animais tratados com L-NAME (Sabino *et al*., 2013). O composto também melhorou os parâmetros nutricionais de ratos alimentados com uma dieta rica em gordura, sendo capaz de restabelecer a sensibilidade à insulina e reduzir os níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias TNF-α e IL-1β, quando comparadas ao grupo controle (SOUZA *et al*., 2020).

Os antioxidantes como enzimas, vitaminas e outros exercem um efeito benéfico à saúde do organismo humano, pois protegem as células dos danos oxidativos, uma vez que são capazes de neutralizar os radicais livres, atuando como antioxidantes (Adorjan & Buchbauer, 2010). O estresse oxidativo tem uma influência importante no desenvolvimento e na progressão de muitas doenças, como doenças cardiovasculares, inflamações, doenças neurodegenerativas e processos de envelhecimento. Além disso, o estresse oxidativo é caracterizado principalmente pela presença de alta biodisponibilidade de espécies reativas de oxigênio (Touyz, 2000).

O α-Terpineol apresentou atividade antioxidante sendo capaz de suprimir a produção de superóxido por monócitos estimulados por agonistas, mas não por neutrófilos (Brand *et al*., 2001). A ação antioxidante do α-terpineol reflete sua capacidade de atuar como conservante em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos, prevenindo a degeneração oxidativa de seus componentes (Bicas *et al*., 2001). Visto que a hipertensão arterial pode ser desenvolvida a partir do estresse oxidativo e atividade da enzima catalase age como um mensurador da atividade antioxidante, esse parâmetro pode ser utilizado para auxiliar o desempenho da defesa intracelular contra espécies ativas de oxigênio. Um estudo demonstrou que o α-terpineol age sobre a catalase, confirmando a sua potente atividade antioxidante contra radicais livres causadores de lesões (Sabino *et al*., 2013).

Células induzidas a senescência por D-galactose tratadas em 3 concentrações de α-terpineol foram capazes de reduzir a viabilidade celular, já o tratamento com 4 concentrações (1,54 x 10^{-7}; 1,54 x 10^{-6}; 1,54 x 10^{-5} e 1,54 x 10^{-4} mg/mL) foram capaz de diminuir o número de células senescentes quando comparadas ao grupo tratado com D-gal. Enquanto a ação antioxidante foi obtida apenas na concentração de 1,54 x 10-4 mg/mL (Almeida, 2024).

3.5 Testes de toxicidade em embriões de *zebrafish*

A capacidade de uma determinada substância provocar danos em um organismo vivo, definida como citotoxicidade, é de suma importância na formulação e comercialização de novos fármacos pelo possível potencial nocivo que pode advir de seus compostos, a fim de permitir a criação de propostas capazes de estabelecer o uso seguro de tais substâncias químicas

(Valadares, 2006). Portanto, é necessário determinar os pontos finais de toxicidade, a relação dose-resposta e os mecanismos pelos quais ela se dá (Sousa, 2019). Tais elementos são avaliados cientificamente por testes que mensuram a toxicidade aguda e/ou crônica, observando seus efeitos a curto prazo de doses elevadas e a longo prazo de doses moderadas a leves, respectivamente (Braunbeck *et al*., 2014).

Os testes de toxicologia em modelos animais têm grande vantagem em relação aos testes *in vitro*, uma vez que o animal está mais intimamente correlacionado com a toxicidade em humanos e, de maneira mais fiel, incorpora farmacocinética, absorção, distribuição e metabolismo. O modelo de toxicidade embrionária do *zebrafish*, devido à alta conservação genética com os humanos (87% de semelhança), tem sido amplamente utilizado em triagens do efeito tóxico de compostos bioativos e, mais recentemente, em avaliações toxicológicas de fitoterápicos (Jaysinghe & Jayawardena, 2019).

O embrião em desenvolvimento é geralmente considerado o estágio mais sensível do ciclo de vida de um peixe. Os ensaios de embriotoxicidade com *zebrafish* são geralmente realizados por meio da exposição direta de embriões a substâncias tóxicas. Estudos prévios revelam que a sensibilidade de embriões e larvas a agentes químicos é muito maior que para adultos. Devido à sua imobilidade, os embriões são mais afetados que os adultos e por apresentarem uma imaturidade fisiológica possuem baixos níveis de enzimas necessárias para a desintoxicação (Lemos *et al*., 2020). O teste FET (*Fish Embryonic Toxicity*), OECD 236, (OECD, 2013), realizado com o zebrafish, apresenta diversas vantagens que favorecem estudos sobre os efeitos farmacológicos de plantas: tamanho pequeno, ciclo de vida curto, rápido desenvolvimento, fecundidade, transparência dos ovos e embriões que permite observar os órgãos internos, como batimento cardíaco e crescimento do coração, dentre outros.

Movimentos espontâneos são respostas motoras não provocadas observáveis em embriões entre 17 e 27 hpf (Saint-Amant; Drapeau, 1998), e, portanto, mudanças na frequência destes movimentos são consideradas manifestações comportamentais iniciais de neurotoxicidade (Ogungbemi *et al*., 2020; Tao *et al*., 2020, Weichert *et al*., 2017). Por sua vez, a frequência cardíaca pode fornecer informações sobre doenças cardiovasculares causadas por concentrações de toxicantes abaixo daquelas que causam mudanças morfológicas (Cheng *et al*., 2020; Fraysse *et al*., 2006; Sun; Liu 2017). Ressalta-se , no entanto, que apesar de seu uso recente em embriões e larvas (Chinnappan *et al.,* 2025), não há registro na literatura de estudos com testes de toxidade.

4 METODOLOGIA

4.1 Estudo de quimioinformática

Nessa etapa do estudo utilizamos, criamos e combinamos diversas metodologias de triagem virtual de um banco de dados de produtos naturais através de docking molecular e algoritmos de aprendizado de máquina, utilizando descritores moleculares. Objetivando identificar assim os compostos presentes em frutas e partes das árvores dessas frutas, típicas da região Nordeste do Brasil, ativos em vias enzimáticas envolvidas em doenças cardiovasculares associadas ao envelhecimento, para escolha da substância e vias enzimáticas mais adequadas para serem utilizadas no nosso estudo pré-clínico (Menezes et al., 2025).

4.2 Coleta de dados experimentais

4.2.1 Identificação de plantas

Foram identificadas cuidadosamente as plantas e o número do voucher da espécime de Anacardium occidentale L. (Família: Anacardiaceae; Espécime Voucher: JPB 65089), Spondias mombin Linn. (Família: Anacardiaceae; Espécime Voucher: JPB 67035), Mangifera indica L. (Família: Anacardiaceae; Espécime Voucher: JPB 51877), Malpighia emarginata DC. (Família: Malpighiaceae; Espécime Voucher: JPB 64716) e Carica papaya L. (Família: Caricaceae; Espécime Voucher: JPB 36711). Os dados foram coletados do Herbário da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). (https://specieslink.net/col/JPB/ - Accessed on: 9 Dec. 2024).

4.2.2 Seleção de frutas

A seleção das cinco frutas: Anacardium occidentale L. (cajueiro), Spondias mombin Linn. (cajá), Mangifera indica L. (mangueira), Malpighia emarginata DC. (aceroleira) e Carica papaya L. (mamoeiro) foi baseada em seus compostos bioativos bem documentados com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anti-senescentes, particularmente relevantes no contexto do envelhecimento e doenças cardiovasculares (DCVs). Abaixo há um resumo com relatos científicos que justificaram a escolha das frutas e partes de suas plantas seleconadas para o estudo in silico:

1. *Anacardium occidentale* L. (Cajueiro): O cajueiro é rico em compostos fenólicos, flavonoides e taninos, que demonstraram fortes atividades antioxidantes e anti-inflamatórias. Esses compostos ajudam a reduzir o estresse oxidativo, um fator chave no envelhecimento e DCVs. A presença de ácidos anacárdicos no cajueiro foi associada a efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, cruciais na prevenção de danos vasculares associados ao envelhecimento (Toyomizu *et al*., 2003).

2. *Spondias mombin* Linn. (Cajá): O cajá é conhecido por seu alto teor de polifenóis, flavonoides e vitamina C, que contribuem para suas fortes propriedades antioxidantes. Esses compostos são eficazes em neutralizar radicais livres e reduzir o estresse oxidativo, implicado no envelhecimento e DCVs. Um estudo de Olajide *et al*. (2004) destacou os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes do extrato de *Spondias mombin*, que podem ser benéficos na redução de danos vasculares relacionados à idade. A fruta também demonstrou propriedades cardioprotetoras, provavelmente devido à sua capacidade de modular vias de estresse oxidativo (Akinmoladun *et al*., 2007).

3. *Mangifera indica* L. (Mangueira): A mangueira é uma rica fonte de mangiferina, um composto antioxidante e anti-inflamatório potente. A mangiferina demonstrou modular várias vias envolvidas no estresse oxidativo e inflamação, tornando-a uma candidata promissora para doenças relacionadas à idade. Pesquisa de Muruganandan *et al*. (2005) demonstrou que a mangiferina reduz o estresse oxidativo e a inflamação em modelos animais, sugerindo seu potencial na prevenção de danos vasculares relacionados à idade. Extratos de manga também demonstraram melhorar os perfis lipídicos e reduzir marcadores de estresse oxidativo em estudos com humanos, apoiando ainda mais seu papel na saúde cardiovascular (Evans *et al*., 2014).

4. *Malpighia emarginata* DC. (Aceroleira): A aceroleira é excepcionalmente rica em vitamina C e outros antioxidantes, como carotenoides e antocianinas. Esses compostos são conhecidos por proteger contra o estresse oxidativo e a inflamação, contribuindo para o envelhecimento e DCVs. Um estudo de Mezadri *et al*. (2008) destacou a alta capacidade antioxidante da acerola, atribuída ao seu teor de vitamina C e outros compostos bioativos. A fruta demonstrou reduzir marcadores de estresse oxidativo em modelos animais, sugerindo seu potencial na prevenção de danos vasculares relacionados à idade (Assis *et al*., 2008).

5. *Carica papaya* L. (Mamoeiro): O mamoeiro é rico em papaína, flavonoides e vitamina C, contribuindo para suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Esses compostos ajudam a reduzir o estresse oxidativo e a inflamação, críticos na patogênese do envelhecimento

e DCVs. Um estudo de Somanah *et al*. (2012) demonstrou que o extrato de mamão reduz o estresse oxidativo e a inflamação em modelos animais, sugerindo seu potencial na prevenção de danos vasculares relacionados à idade. O mamão também demonstrou melhorar a função endotelial e reduzir marcadores de estresse oxidativo em estudos humanos, apoiando ainda mais seu papel na saúde cardiovascular (Pandey *et al*., 2014).

4.2.3 Coleta de dados para construção dos modelos

Várias enzimas com atividades biológicas, disponíveis e dados de estrutura 3D foram selecionadas e investigadas neste estudo. Os compostos químicos foram selecionados com atividade conhecida para as seguintes enzimas: NRF2 (CHEMBL1075094), COX-2 (CHEMBL230), iNOS (CHEMBL4EM1) e NADPH (CHEMBL1614380). Esses compostos foram usados no banco de imagens para a construção de modelos preditivos (https://www.ebi.ac.uk/chembl/) (Gaulton *et al*., 2012). Os detalhes dos bancos podem ser encontrados na Tabela 1.

Os compostos foram classificados com base no pIC_{50} [-log IC_{50} (mol / l)]. O valor IC_{50} representa a concentração necessária para 50% de inibição. Porém, para a enzima Nrf2, foram utilizados dados de ativação, pois a ativação dessa proteína obteria o efeito desejado. Os compostos presentes nas frutas e partes das árvores da *Anacardium ocidentalli* L., *Spondia monbim*, *Mangifera indica* L., *Malphigia emarginata* e *Carica papaya* usados para predição foram avaliados por triagem virtual para identificar moléculas com potencial atividade para as enzimas envolvidas no envelhecimento e doenças cardiovasculares, de acordo com os fluxos de trabalho apresentados por Fourches *et al*. (2010). Estruturas tridimensionais foram geradas por Chemaxon Standardiser v.18.17.0, (www.chemaxon.org).

Tabela 1 – Conjunto de moléculas dos bancos de dados ChEMBL para cada enzima selecionada no estudo

Database	Active molecules	Inactive molecules	Total
NRF2	163 (Activity)	85 (No activity)	248
COX2	2.018 ($pIC_{50} \geq 5.50$)	1.702 ($pIC_{50} < 5.50$)	3.720
Inos	396 ($pIC_{50} \geq 5.50$)	367 ($pIC_{50} < 5.50$)	763
NADPH	159 ($pIC_{50} \geq 4.75$)	35 ($pIC_{50} < 4.75$)	194

Fonte: elaborada pela autora, 2025.

4.2.3.1 Modelagem da relação quantitativa estrutura-atividade (QSAR)

Todos os compostos estudados com atividade biológica conhecida e os compostos usados para predição de atividade foram importados para o *software* Dragon 7.0 (Mauri *et al*., 2006), para geração do descritor. O *software* Knime 3.5.3 (KNIME 3.5.3, Konstanz Information Miner Copyright, 2018, www.knime.org) foi utilizado para realizar as análises e gerar os modelos preditivos. O algoritmo Random Forest (RF), WEKA (Hall *et al*., 2009), foi usado para construir modelos preditivos. A validação cruzada foi realizada para estimar o poder preditivo dos modelos desenvolvidos.

Os desempenhos externos dos modelos selecionados foram analisados quanto à sensibilidade (taxa positiva verdadeira ou taxa ativa), especificidade (taxa negativa verdadeira ou taxa inativa) e precisão (previsibilidade geral). Além disso, a sensibilidade e especificidade da curva de caractere operacional do receptor (ROC) foram usadas porque descreve o desempenho real de forma mais clara do que a precisão. Os modelos também foram analisados por meio do coeficiente de correlação de Matthews (MCC), que pode avaliar o modelo globalmente, com base nos resultados obtidos na matriz de confusão. Valores de MCC acima de 0,5 foram considerados satisfatórios (Matthews, 1975).

4.2.3.2 Análise combinada baseada em ligante e estrutura

Quatro modelos de predição foram construídos para realizar triagem virtual baseada em ligantes. Para construir esses modelos, foram calculados descritores moleculares para moléculas com atividade conhecida para as proteínas NRF2, COX-2, iNOS e NOX-1 obtidas no banco de dados ChEMBL. Os poderes preditivos dos modelos de RF foram avaliados usando especificidade, sensibilidade, precisão, exatidão (AUC), valor previsto positivo (VPP) e valor previsto negativo (VPN), bem como desempenho e robustez usando a curva característica de operação do receptor (ROC) e coeficiente de correlação de Mathews (MCC). As curvas ROC são representações gráficas da taxa de verdadeiros positivos versus a taxa de falsos positivos descoberta durante a varredura de um banco de dados. A área formada nestas curvas ROC, a AUCROC, representa a probabilidade de um composto ativo ser classificado antes de um composto inativo.

PPV refere-se à proporção de valores previstos corretamente em relação ao número total de valores positivos no conjunto de dados. Segue o mesmo raciocínio da definição de precisão. VPN refere-se a uma definição contrária ao VPP. Além disso, a sensibilidade e a especificidade

da curva de caráter operacional do receptor (ROC) foram usadas para descrever o desempenho real de forma mais clara do que a precisão. Os modelos também foram analisados por meio do coeficiente de correlação de Matthews (MCC), que pode avaliar o modelo globalmente com base nos resultados obtidos na matriz de confusão.

O acoplamento também foi realizado, e análise de consenso com resultados de predição de atividade de *docking* biológico e molecular foram realizadas para identificar compostos potenciais e multitarget, demonstrando as probabilidades de serem potenciais ativos para mais de uma proteína com base no modelo de RF e *docking*. Neste caso, utilizamos todos os resultados de previsão de atividade biológica e os combinamos com os resultados de *docking.* Além de selecionar os compostos ativos, esta análise combinada permitiu a seleção dos compostos mais potentes, combinando duas importantes metodologias baseadas no ligante e na estrutura. Para esta análise foi utilizada a seguinte fórmula:

$$Prob_{Comb} = \frac{(ProbDc + (1 + ESP) \times P_{Activity}}{2 + ESP}, If\ Prob_{Comb} > 0.5$$

Onde ProbDc é a probabilidade de um composto estar ativo na análise de acoplamento molecular, ESP é o valor de especificidade do modelo de RF e Pact é o valor de probabilidade de um composto estar ativo no modelo de RF. A probabilidade combinada (Probcomb), baseada no ligante e na estrutura, pode aumentar o poder preditivo dos modelos e diminuir o número de falsos positivos. Para que as moléculas sejam consideradas potencialmente ativas, os valores de probabilidade devem ser iguais ou superiores a 0,5. Quanto maior o valor de Probcomb, maior será o potencial da molécula.

Após a validação dos modelos, eles foram utilizados para analisar o conjunto de 67 compostos presentes nos frutos ou partes das plantas (*Anacardium ocidentalli*, *Spondias mombin*, *Mangifera indica*, *Malpighia emarginata* e *Carica papaya*) quanto à atividade contra as proteínas selecionadas. O banco de compostos foi então selecionado para escolher compostos potencialmente ativos para as proteínas investigadas. A classificação foi realizada para selecionar alguns compostos como primeira escolha, selecionando compostos que deveriam ter um valor de atividade acima de 0,6 e serem ativos para NRF2 e outras enzimas. Esta enzima foi escolhida entre as demais enzimas devido ao seu papel na ativação da cascata enzimática com ação antioxidante durante o aumento do estresse oxidativo.

4.2.3.3 Docking molecular: análises das interações formadas entre iNOS e NFR2

O *docking* molecular foi realizado utilizando o *software* Molegro Virtual Docker v 6.0.1 (MVD) e dois alvos foram selecionados. As estruturas 3D das proteínas utilizadas neste estudo foram obtidas do *Protein Data Bank* (PDB), utilizando os seguintes códigos: PDB ID 7X5E para NRF2 e PDB ID 4NOS para iNOS. Foram analisadas as interações formadas em iNOS e NFR2. Como a COX-2 não apresenta compostos com atividade acima de 0,7 e a NOX-1 não apresenta estrutura cristalográfica para análises de *docking*, não foi possível analisar as interações nessas proteínas.

Inicialmente, todas as moléculas de água foram removidas da estrutura cristalina. Em seguida, o desvio quadrático médio (RMSD) foi calculado a partir das posturas, indicando o grau de confiabilidade do ajuste. O RMSD prevê o modo de conexão próximo à estrutura experimental e é considerado bem-sucedido se o valor for menor que 2,0 Å. Angströms (Å) é uma unidade de comprimento equivalente a 0,2 nanômetros ou 200 picômetros, pois 1 angström (Å) = 10^{-10} metros. Essa unidade é frequentemente usada para expressar o tamanho de átomos e moléculas em física e química. Finalmente, o algoritmo de pontuação MolDock foi usado como função de pontuação para prever as melhores interações entre ligante e receptor. Valores mais negativos do que os ligantes cristalográficos foram considerados resultados excelentes.

4.2.3.4 Simulações de dinâmica molecular com mangiferina, cianidim-3-glicosídeo, alfa-terpineol e heterodímero NRF2-MAFG ligado ao PDB CSMBE1: (7X5E)

Após a análise do potencial de atividade dos compostos em estudo, foram selecionados os compostos com os maiores valores de probabilidade de atividade em relação aos alvos em estudo, os quais correspondem a mecanismos importantes para avaliar a atividade antioxidante. Esse complexo NRF2-MafG (Musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog G) é uma small Maf protein (pequena proteína Maf), que não possui domínio de ativação transcricional próprio, atua como parceiro obrigatório de dimerização para fatores CNC-bZIP, como o NRF2. O NRF2 forma um heterodímero com MafG , reconhece e se liga eficientemente a elementos a ARES (Antioxidant Response Elements) no Dna , ativando a transcrição de genes antioxidantes e citoprotetores. Simulações de Dinâmica Molecular com os compostos mangiferina, cianidim-3-glicosídeo e alfa-terpineol foram realizadas para estimar a flexibilidade das interações entre proteínas e ligantes usando o *software* GROMACS 5.0 (Programa Horizonte 2020 da União Europeia, Suécia) (Abraham *et al*., 2015; Berendsen *et al*., 1995).

As Topologias de proteínas e ligantes também foram preparadas usando o campo de força GROMOS96 54a7 A simulação de DM foi realizada usando o modelo de água SPC com carga pontual, estendido em uma caixa cúbica (BONDI, 1964). O sistema foi neutralizado pela adição de íons (Cl^- e Na^+) e minimizado, para remover maus contatos entre moléculas complexas e o solvente. O sistema também foi balanceado a 300K, usando o algoritmo V-rescale de 100 ps, representado por NVT (número constante de partículas, volume e temperatura), seguido de equilíbrio a 1 atm de pressão, usando o algoritmo de Parrinello-Rahman como o NPT (partículas de pressão e temperatura constantes), até 100 ps.

As simulações de DM foram realizadas em 5.000.000 passos, a 10 ns. Para determinar a flexibilidade da estrutura e se o complexo é estável próximo à estrutura experimental, os valores de RMSD de todos os átomos de Cα foram calculados em relação às estruturas iniciais. Os valores de RMSF também foram analisados, para entender os papéis desempenhados pelos resíduos próximos ao sítio de ligação do receptor. Os gráficos RMSD e RMSF foram gerados no *software* Grace (Grace Development Team, http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/) (Nachbagauer *et al*., 2021).

4.2.3.4.1 Desvio quadrático médio (RMSD) dos átomos de Cα do heterodímero da enzima NRF2-MAFG ligada ao PDB CSMBE1 e complexada aos compostos mangiferina, cianidina-3-glicosídeo, alfa-terpineol e resveratrol

Os valores de RMSD do inglês "*Root Mean Square Desvio*" de todos os átomos de Cα foram calculados em relação às estruturas iniciais para determinar a flexibilidade da estrutura e se o complexo é estável próximo à estrutura experimental. O PDB disponível para a NRF2, foi complexada ao heterodímero NRF2-MAFG alvo ligado ao PDB CsMBE1: (7X5E) (Sengoku *et al*., 2022). A enzima heterodímera NRF2-MAFG ligada ao PDB CsMBE1: (7X5E) foi escolhida para a análise porque os compostos em estudo, mangiferina, cianidina-3-glicosídeo e alfa-terpineol, apresentaram maior afinidade por essa proteína. Em seguida, o RMSD foi calculado para os átomos de Cα da enzima complexada e as estruturas de cada ligante separadamente.

4.2.3.4.2 Flutuações quadráticas médias (RMSF) dos átomos do heterodímero da enzima NRF2-MAFG ligada ao PDB CSMBE1: (7X5E) e complexada aos compostos mangiferina, cianidina-3-glicosídeo, alfa-terpineol e resveratrol

Os valores de RMSF do inglês "*Root Mean Square Flutuation*" também foram analisados para compreender o papel desempenhado por resíduos relacionados ao sítio de ligação do receptor. Para compreender a flexibilidade de resíduos e aminoácidos que contribuem para a mudança conformacional no heterodímero da enzima NRF2-MAFG ligado ao PDB CsMBE1: (7X5E) (Sengoku *et al*., 2022), foram calculadas as flutuações quadráticas médias (RMSF) de cada aminoácido na proteína. Resíduos com altos valores de RMSF sugerem maior flexibilidade, e baixos valores de RMSF refletem menor flexibilidade.

4.2.3.4.3 Desvio quadrático médio (RMSD) dos átomos de c do heterodímero da enzima NRF2-MAFG ligada ao PDB CSMBE1 e complexada aos compostos mangiferina, cianidina-3-glicosídeo, alfa-terpineol e resveratrol

Os valores de RMSD de todos os átomos de Ca foram calculados em relação às estruturas iniciais para determinar a flexibilidade da estrutura e se o complexo é estável próximo à estrutura experimental. Os gráficos de RMSD foram gerados no *software* Grace (Equipe de Desenvolvimento Grace, http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/) (Nachbagauer *et al*., 2021).

4.2.3.4.4 Flutuações quadráticas médias (RMSF) dos átomos do heterodímero da enzima NRF2-MAFG ligada ao PDB CSMBE1: (7X5E) e complexada aos compostos mangiferina, cianidina-3-glicosídeo, alfa-terpineol e resveratrol

Os valores de RMSF também foram analisados para compreender o papel desempenhado pelos resíduos relacionados ao sítio de ligação do receptor. O gráfico de RMSF foi gerado no *software* Grace (Equipe de Desenvolvimento Grace, http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/) (Nachbagauer *et al*., 2021).

4.2.4 Estudo com embriões e zebrafish adulto

Embriões e adultos de *D. rerio* da linhagem tipo selvagem AB foram fornecidos pela Unidade de Produção de Organismos Modelos Não Convencionais (UniPOM), localizada no Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal da Paraíba (João Pessoa, Brasil). Animais adultos foram mantidos em tanques com sistema de recirculação de água com filtragem física, química e biológica, temperatura de 26 ± 1 ºC e fotoperíodo de 14:10h claro/escuro controlados e com monitoramento regular dos parâmetros de qualidade da água

(temperatura, pH, níveis de amônia e nitrito). Os animais foram alimentados três vezes por dia ad libitum, sendo 2 vezes com ração granulada (ColorBits, Tetra, Alemanha) e uma vez com spirulina orgânica (Fazenda Tamanduá, Patos, Brasil).

No dia anterior ao teste com embriões, os peixes adultos foram transferidos para um dispositivo de acasalamento (proporção de 1 fêmea: 2 machos) de 7 L, que consiste de um tanque de acrílico acoplado a um aerador, cujo fundo é coberto com uma rede de nylon e uma válvula de abertura que possibilita a coleta ágil e eficiente dos embriões. Após a desova, os embriões com aproximadamente 1 hora pós-fertilização (hpf) foram retirados, lavados e acondicionados em meio embrionário adaptado E3 (NaCl 5.0 mM, KCl 0.17 mM, CaCl 0.33 mM e $MgSO_4$ 0.33 mM) e analisados em microscópio de luz invertida (Televal 31, Zeiss, Alemanha) para determinação do estágio de desenvolvimento embrionário e seleção dos embriões viáveis. Embriões inviáveis e remanescentes dos testes foram eutanasiados com eugenol (1,5 mL/L) e, posteriormente, armazenados a uma temperatura de - 20 °C até que sejam encaminhados para incineração.

O projeto foi submetido ao Comissão de Ética em Uso em Animais (CEUA) da UFPB/ Campus I conforme as normas editadas pela comissão pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pelo CEUA/UFPB, conforme parecer Nº 7193170122.

4.2.4.1 Substâncias e soluções nutritivas

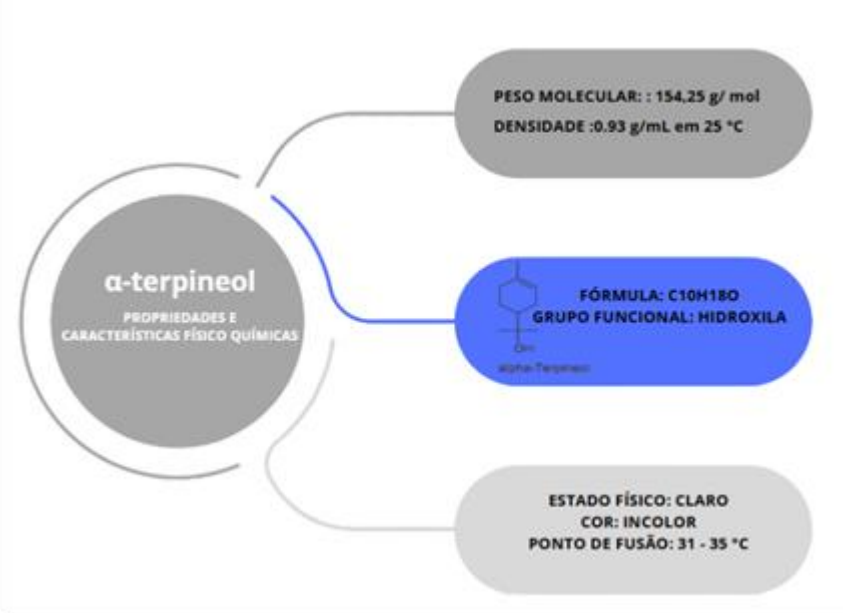
Para a realização dos protocolos experimentais foram utilizadas as seguintes substâncias: α-terpineol, resveratrol, álcool, sal sódico de heparina, ferrocianeto de potássio, ferrocianato de potássio, $MgCl_2$, D-galactose, substrato cromogênico X-gal (5-Bromo-4-cloro-3-indoll β-D-galactopiranosídeo), que foram obtidos da Sigma-Aldrich Brasil Ltda (São Paulo-SP, Brasil). Todos os demais reagentes necessários foram de grau analítico.

4.2.4.2 Preparação da solução de D-galactose, do α -terpineol e do resveratrol

A D-galactose é um monossacarídeo com fórmula química de $C_6H_{12}O_6$, tem peso molecular de 180, 156 g/mol e foi diluída em meio E3. O resveratrol ($C_{14}H_{12}O_3$, CAS 501-36-0, pureza 99%) foi diluído em DMSO e α- terpineol ($C_{10}H_{18}O$, CAS 98-55-5, pureza 90%) em etanol, ambos foram adquiridos pela Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). O α-terpineol possui peso molecular de 154,25 g/ mol e densidade relativa de 0,935 g/cm3, equivalente a 0,935 g/

mL e a 935.000 mg/L. No seu estado físico é claro, cor incolor e ponto de fusão de 31-35° C (Figura 8). A solução estoque foi preparada diluindo a substância pura em etanol na proporção de 1:1, obtendo, portanto, a concentração 467.500 mg/L. O resveratrol possui massa molar de 228 g. mol $^{-1}$. A solução estoque de resveratrol foi preparada na concentração de 10 mg de resveratrol em 1 mL de DMSO.

Figura 8 – Propriedades e características físico-químicas do α-terpineol



Fonte: elaborada pela autora, 2025.

4.2.5 Protocolos utilizados em embriões e larvas de zebrafish

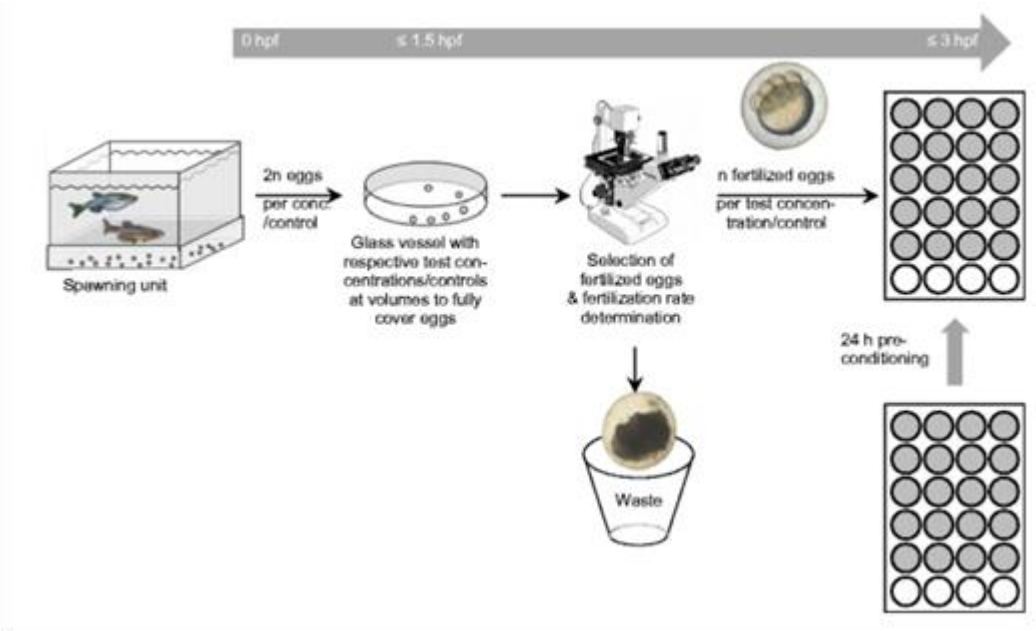
4.2.5.1 Teste de toxicidade aguda

4.2.5.1.1 Determinação dos parâmetros de toxicidade (CL_{50}, LOAEL e NOAEL)

Os testes de toxicidade aguda *com o α -terpineol* foram realizados de forma pioneira pela nossa equipe, conduzidos de acordo com o guia da OECD 236 (*Fish mbryo acute toxicity* FET *test*) adaptado para placas de 96 poços (Figura 9). Foi estabelecida a concentração de 100 mg/L como a concentração limite, de acordo com a recomendação da OECD 236. Embriões

(até 3 hpf, n=20/grupo/concentração) foram distribuídos individualmente em placas de 96 poços (0,3 ml/poço), expostos às concentrações de 0; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 mg/L , representando 0; 0,00625; 0,0125; 0,025; 0,05; 0,1 em mg/mL do α-terpineol. Foram realizados dois grupos controle nas mesmas condições, sendo um com embriões expostos somente em meio E3 (n = 20) e o outro exposto ao etanol 0,01% (n=20).

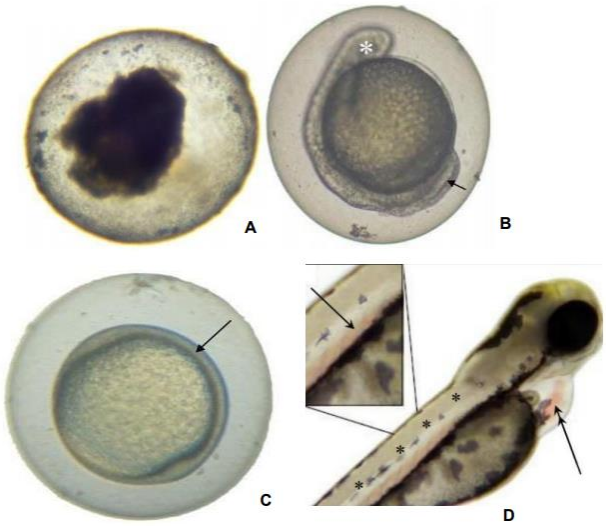
Figura 9 – Ilustração da distribuição das soluções de α-terpineol no ensaio de toxidade aguda em embriões de *Danio Rerio*



Fonte: Adaptado de OECD 236.

Os embriões foram mantidos em uma câmara para embriões (Sciencelabor). A temperatura foi mantida em 26 ± 1 ºC e fotoperíodo de 14h claro: 10h escuro. O tempo de exposição foi de 96h. A cada 24 h os embriões foram observados sob um microscópio de luz invertida, num aumento de 50 x, para verificar o surgimento de *endpoints* letais e subletais por um período total de 96 h. Os indicadores de letalidade foram: coagulação de ovos fertilizados, ausência na formação de somitos, ausência de batimentos cardíacos e não destacamento da cauda (Figura 10). Os dados de mortalidade e de efeitos não letais foram utilizados para cálculo da CL_{50} através de uma análise de *probit* (Finey, 1971).

Figura 10 – Indicadores de letalidade em embriões e larvas de *zebrafish*



Fonte: Adaptado da OECD 236.
Notas:
Legenda: A figura mostra os indicadores de letalidade em embriões e larvas de zebrafish. (A) Ovo coagulado; (B) Não destacamento da cauda (C); Ausência de somitos; (D) Ausência de batimentos.

4.2.5.1.2 Movimentos espontâneos da cauda e frequência cardíaca

As análises foram realizadas em três repetições biológicas independentes. Para medir essas variáveis utilizou-se três concentrações abaixo da CL_{50}, em que nenhum efeito tenha sido observado nos grupos expostos, para indicar se estes poderiam ser indicadores de toxicidade mais sensíveis do que o "endpoint" (ponto final) observado. As concentrações de α-terpineol de 0, 1,56, 3,12 e de 6,25 mg/L , representando 0; 0,00156; 0,00312; 0,00625 em mg/mL foram utilizadas para avaliar os batimentos da cauda e os batimentos cardíacos.

Movimentos espontâneos da cauda de 10 embriões escolhidos aleatoriamente foram observados individualmente por 1 min a 24 hpf (± 1 h) como citado por OGUNGBEMI et al., 2020 e TAO et al., 2020. Por sua vez à 48 hpf (± 1 h), os batimentos cardíacos observados por outro 1 min adaptando o protocolo citado por Fraysse *et al*. (2006); e Sun e Liu, (2017). Ambas as variáveis foram contadas manualmente em menos de 60 min para evitar diferenças de idade entre embriões ao final das observações.

4.2.5.2 Estabelecimento do modelo de indução a senescência por D-galactose em larvas de zebrafish

4.2.5.2.1 Teste piloto de efeitos sobre a taxa de mortalidade (%) de embriões (6 hpf) expostos à D-Gal

No período de realização dos primeiros testes para avaliar os efeitos sobre a taxa de mortalidade (%) com D-gal com D-gal nas concentrações de 400, 350, 300, 250, 200 Mmol/L, ainda não havia sido disponibilizado na literatura, resultados dos testes com d-gal em *zebrafish* adultos, para que pudéssemos adaptar protocolos ou concentrações. Portanto, utilizou-se nesses testes iniciais uma adaptação do protocolo do modelo de indução a senescência com uso do peróxido, utilizado por Li *et al*. (2021) para obtermos a CL_{50} de D-gal.

Para tal, os embriões foram expostos a soluções em 4 concentrações de D-gal em placas de cultura de células de 6 ou 24 poços, num total de 10 embriões para cada concentração e mais 10 para o grupo E3 (Total n=50 embriões). Foram observados por 24, 48, 72, 96 e 120 horas num microscoópio para cálculo da taxa de mortalidade, taxa de má formação e da CL_{50}. Todas as alterações morfológicas foram anotadas, seguindo o protocolo adotado por Li *et al*. (2021).

4.2.5.3 Avaliação das alterações morfológicas subletais em embriões 6 HPF até 6 DPF induzidos por D-gal e tratados com α - terpineol

Sequencialmente, foram realizados testes com duas concentrações de α- terpineol de 0,468 mg/l (0,e de 4,68 mg/l e com D-gal na concentração de 200 mMol/l (36,03 mg/ml) para observação apenas das alterações morfológicas, também com adaptação do protocolo de Li *et al*. (2021). No entanto, não desenvolveu-se nesse momento, testes para avaliação da senescência. Os embriões foram divididos nos seguintes grupos: Grupo 1: meio E3 (controle negativo), grupo 2: D-gal 200 mMol, grupo 3: D-gal 200 mMol (36,03 mg/ml) + terpineol alto (4,68 mg/L), grupo 4: D-gal 200 mMol (36,03 mg/ml) + terpineol baixo (0,468 mg/L), grupo 5: terpineol alto (4,68 mg/L), grupo 6: terpineol baixo (0,468 mg/L).

A exposição foi feita em embriões 6 hpf até 6 dpf (140 hpf) de forma estática (sem renovação das soluções) em 30 poços, sendo 1 embrião por poço em 0,3 mL de solução controle ou teste. Foram utilizadas 10 larvas para cada grupo, no total de 60 larvas.

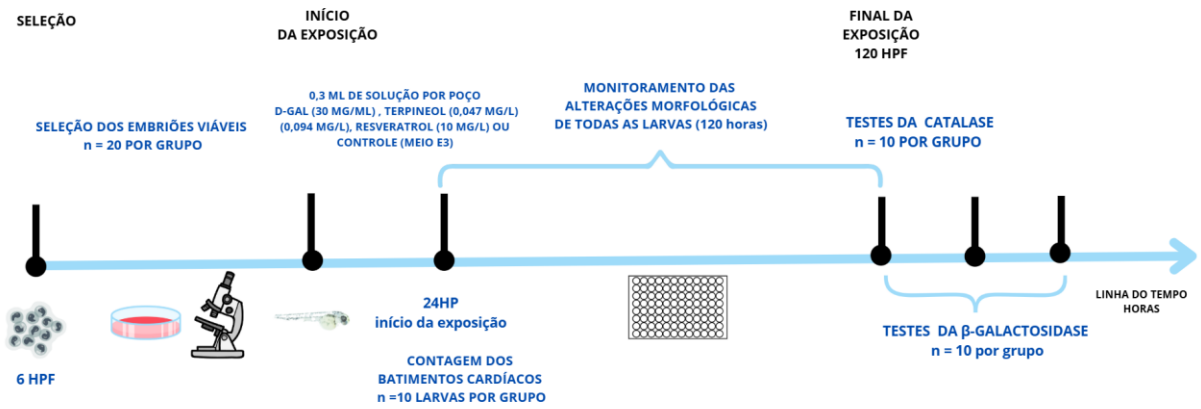
4.2.5.4 Avaliação da funcionalidade do modelo de indução a senescência por D-gal e atuação dos compostos sobre a morfologia e sobrevivência, senescência, dano oxidativo e frequência cardíaca em larvas de zebrafish

Após a etapa de avaliação apenas das alterações morfológicas subletais em embriões 6 hpf até 6 dpf induzidos por D-gal e tratados com α- terpineol, realizamos testes de avaliação

da senescência com avalaiação da atividade da SABG seguindo o mesmo protocolo. No entanto, os resultados obtidos nesta etapa não foram satisfatórios, em relação a coloração produzida pelo corante cromogênico x-gal que demonstram a atividade da SABG em *zebrafish*. Pois em condições normais, levaria a produção de uma coloração azul, mas evidenciou-se um tom de azul muito escuro, quase preto, não compatível com a coloração disponível na literatura impedindo a leitura de pixel adequada. Esses resultados podem ter sido influenciados pela concentração dos compostos utilizados e pelo tempo total de exposição dos embriões.

Portanto, tais resultados serviram como parâmetro para o início da próxima etapa, com, com utilização de novo protocolo para indução a senescência nesse animal e desenvolvimento do novo modelo, ajustanndo assim a concentração e o tempo de exposição. A figura 11 explana o delineamento desta fase do estudo, que será descrita nos tópicos a seguir:

Figura 11 – Delineamento experimental do modelo de indução a senescência por D-gal



Fonte: elaborada pela autora, 2025.

4.2.5.4.1 Grupos experimentais e condições de exposição

A literatura não expõe dados de testes com o α- terpineol em *zebrafish*, com atividade antienvelhecimento em embriões de ZF. Já o resveratrol tem sua atividade validada no antienvelhecimento induzido por D-gal em vários modelos animais, mas não há também exposição de dados em estudos com embriões de zebrafish, induzidos ao envelhecimento por D-galactose.

Já em relação ao resveratrol, a literatura disponibiliza dados sobre a CL_{50} , que é de 75,33 mg/L com ensaio em estágio embriolarval 96 h de duração e com 168 h de duração de

50,87 mg/L (Cavalcante, 2017). A concentração de resveratrol utilizada no nosso estudo foi de 10 mg/L (0,01 mg/mL) , embasada no estudo de Jiang *et al*., 2023, sendo diluído em DMSO. Já os demais passos como formação dos grupos e teste para verificação da atividade SA-beta-gal, com uso de x-gal, foram adaptados de um modelo para avaliação da senescência utilizado por Kish *et al*. (2008).

As concentrações de 0,000468 e de 0,00468 mg/mL de α- terpineol foram testadas no novo protocolo estabelecido para o desenvolvimento do modelo, porém levaram a resultados negativos em relação a redução da atividade da SABG. Portanto, as concentrações dos testes para a avaliação da capacidade do alfa-terpineol foram modificadas para 0,000047 e 0,000094 mg/mL. Para tanto, cinco grupos experimentais foram formados como se descreve a seguir, sendo 20 embriões por cada grupo, num total de 100 embriões (48 hpf). Grupo 1: Meio E3 (controle negativo); grupo 2: D-gal (167 mM /30 mg/mL); grupo 3: D-gal (167 mM /30 mg/mL) + alfa-terpineol (baixa concentração, 0,000047 mg/mL); grupo 4: D-gal (167 mM /30 mg/mL) + alfa-terpineol (alta concentração, 0,000094 mg/mL); grupo 5: D-gal (167 mM /30 mg/mL + resveratrol 0,01 mg/mL).

A exposição em regime semi-estático foi realizada em placas de 96 poços, por 72 horas com um embrião por poço, utilizando 0,3 mL de solução teste ou controle por poço. Ao final do período de exposição , dez larvas de cada grupo foram destinadas à verificação da atividade da β-galactosidase e outras dez para a quantificação da atividade da enzima catalase conforme descrito adiante.

4.2.5.4.2 Monitoramento de alterações morfológicas

Durante o período de exposição, o monitoramento das alterações morfológicas foi realizado diariamente, 24 horas após o início da exposição até o final da exposição. Foram analisadas as 20 larvas de cada grupo, sendo 100 larvas no total, registrando-se as alterações letais e não letais descritas em Von Hellfeld *et al*. (2020). No caso da presença de alterações, as larvas foram fotografadas com câmera digital Moticam 5+ (Motic, Canada) acoplada a um estereomicroscópio (Olympus), num aumento de 50 x, garantindo uma imagem representativa de cada tipo de efeito observado. Na ausência de alterações, apenas uma larva de cada grupo foi fotografada no último dia de monitoramento.

4.2.5.4.3 Análise de atividade da βeta-galactosidase

Para a etapa de fixação, ao final da exposição, dez larvas escolhidas aleatoriamnete de cada grupo (50 larvas), foram transferidas para microtubos de 1,5 mL, adicionou-se 1,0 mL de formaldeído em solução salina tamponada com fosfato (PBS), e os tubos foram mantidos em geladeira. Durante a lavagem, o formaldeído foi removido com pipeta automática, substituindo-o por 1 mL de PBS (pH 7,4) a 4 ºC, repetindo-se por três vezes, com intervalos de 1 h. Posteriormente, foi realizada uma lavagem adicional de 1 h em PBS (pH 6,0).

Já para a etapa de coloração , no dia posterior, o formaldeído foi removido, e 500 µL de solução de coloração (5 mM de ferrocianeto de potássio, 5 mM de ferricianeto de potássio, 2 mM de MgCl2 e 1 mg/mL de X-gal em PBS foram adicionados. As larvas foram incubadas em estufa a 37 °C. O registro fotográfico e análise dos dados ocorreu na manhã seguinte à coloração, na qual as larvas foram transferidas para microtubos contendo 1 mL de PBS (pH 6,0). Das 10 larvas, cada uma foi fotografada individualmente na mesma posição (vista lateral, com a nadadeira dorsal voltada para a direita), utilizando os mesmos parâmetros de captura. Após o registro fotográfico, as larvas foram mantidas congeladas para, posteriormente, serem encaminhadas para incineração.

Das 10 larvas fotografadas de cada grupo, foram selecionadas as 3 larvas com o posicionamento mais lateralizado possível para garantir a padronização das medições. A intensidade da coloração das larvas foi medida como Unidades Arbitrárias de azul, utilizando o *software* gratuito ImageJ (https://imagej.net/software/imagej). A análise considerou parâmetros relacionados à média de pixels na escala do canal *Red* (vermelho) , *Green* (verde) e *blue* (azul) dentro da área selecionada (todo o plano corporal da larva, excluindo apenas as nadadeiras e o saco vitelínico), quantificando o brilho presente na região analisada. Foram aplicados testes estatísticos globais em 3 canais de cor vermelha, verde e azul para verificar se há pelo menos uma diferença significativa entre os grupos em cada canal de cor.

Os testes de Levene e Bartlett indicam heterocedasticidade, isto é, variâncias diferentes entre os grupos, pois os p-valores desses testes foram extremamente baixos (próximos a zero), o que permite rejeitar a hipótese nula de igualdade de variâncias. Como consequência, testes como a ANOVA tradicional e o teste de Tukey tornam-se inadequados, pois pressupõem homocedasticidade (variâncias iguais). Após análise das médias e testes estatísticos nos 3 canais, utilizou-se apenas os valores da mediana do canal blue (azul), considerando que é a coloração produzida pelo corante x-gal, e reflete a atividade da enzima beta-galactosidase.

Foram aplicados testes estatísticos globais para verificar se há pelo menos uma diferença significativa entre os grupos em cada canal de cor. Como os dados apresentaram heterocedasticidade e distribuição possivelmente não normal, optou-se por testes não

paramétricos. O teste de Dunn com correção de Bonferroni foi utilizado por ser adequado nesse cenário, especialmente com grandes amostras e múltiplos grupos. Como aproximação, utilizou-se o teste de Mann-Whitney para pares, com correção de Bonferroni.

4.2.5.4.4 Avaliação da frequência cardíaca

Os batimentos cardíacos podem fornecer informações sobre alterações cardiovasculares em concentrações abaixo daquelas que causam mudanças morfológicas (Cheng *et al*., 2020; Fraysse *et al*., 2006; Sun; Liu, 2017). Os batimentos cardíacos foram contados 24 horas após o início da exposição em 10 larvas/grupo escolhidas aleatoriamente, num total de 50 larvas. A contagem foi realizada manualmente durante 20 segundo entre cada larva, utilizando o aplicativo gratuito para Android BPM Counter.

4.2.5.4.5 Avaliação do dano oxidativo

Ao final do período de exposição, 50 larvas, sendo 10 larvas/grupo, foram rapidamente congeladas e armazenadas a -20 °C até o momento da análise. Os grupos de larvas foram homogeneizados com água destilada fria na proporção de 1 larva para 20 µL de solvente. Os homogeneizados foram centrifugados a 2500–3000 × g, por 10 min, a 4 °C, e os sobrenadantes pós-mitocondriais (SPM) resultantes foram utilizados para as medições.

A quantificação de proteínas solúveis no sobrenadante foi determinada pelo método fotométrico desenvolvido por Bradford (1976). Inicialmente, uma curva padrão foi construída utilizando albumina sérica bovina e a absorbância das amostras foi medida em um comprimento de onda de 595 nm, utilizando o leitor de microplacas Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific). As análises foram realizadas em quadruplicata para cada amostra.

Para avaliar a atividade da catalase, 15 µL de SPM foram adicionados a 135 µL de uma solução de reação contendo peróxido de hidrogênio (30 mM) e 150 µL de tampão fosfato (0,05 mM). A absorbância da mistura a 240 nm foi monitorada a cada 10 segundos, durante 2 minutos, conforme a metodologia de Claiborne (1986). O ensaio enzimático foi realizado com quatro réplicas técnicas.

4.3 Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o *software* Python (versão 3.9).4ª bibliotecas NumPy, Pandas, SciPy e Statsmodels foram empregadas para manipulação dos dados e realização das análises estatísticas. Os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão. As diferenças entre os tratamentos foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) de uma via, utilizando a função f_oneway da biblioteca SciPy, seguida pelo teste de Tukey, implementado na biblioteca Statsmodels ($p < 0,05$), para comparar as médias dos diferentes tratamentos.

Para análise estatística da quantificação da enzima beta-galactosidase, utilizou-se os testes não paramétricos de Dunn (ou aproximações como Mann-Whitney com correção de Bonferroni) ,por serem mais robustos e confiáveis para comparações múltiplas com dados não paramétricos. uma vez que os dados apresentaram heterocedasticidade e distribuição possivelmente não normal. A análise estatística foi aplicada as imagens com o objetivo de verificar a existência de diferenças significativas nos valores de intensidade dos canais de cor (R, G, B) entre diferentes grupos experimentais. Os pixels brancos (com valores RGB = 255, 255, 255) foram desconsiderados em todos os cálculos, pois representam fundo ou ausência de informação útil. O resultado obtido é um valor numérico que reflete de forma objetiva a intensidade da cor na área avaliada. Considerou-se aqui apenas o canal blue (azul) que reflete a coloração obtida pelo corante azul , indicando a atividade da enzima beta-galactosidase.

5 RESULTADOS

5.1 Testes prévios de quimioinformática

As frutas e suas árvores, típicas do Nordeste do Brasil, *Anacardium ocidentalli* L. (caju), *Spondia monbim* (cajá), *Mangifera indica* L. (manga), *Malphigia emarginata* (acerola) e *Carica papaya* (mamão) foram analisadas nesse estudo prévio para escolha do α-terpineol, composto utilizado no estudo, nos testes em embriões e posteriormente em *zebrafish* adultos. Investigou-se os 67 compostos dispostos na literatura científica como constituintes dessas cinco frutas e de suas árvores e sua ação sobre as vias descritas acima, através de estudo de quimioinformática.

Esses compostos foram utilizados para predição e foram avaliados por triagem virtual para identificar moléculas com potencial atividade nas enzimas envolvidas no processo de envelhecimento. Várias enzimas disponíveis com atividades biológicas e dados de estrutura 3D foram selecionadas e investigadas. Descritores moleculares foram calculados para moléculas com atividade conhecida para as enzimas NRF2, COX-2, iNOS e NADPH.

5.1.1 Análise combinada com base em ligante e estrutura

5.1.1.1 Modelagem quantitativa da relação estrutura-atividade (QSAR) e docking molecular

A tabela 2 descreve os parâmetros dos modelos, em termos de poder preditivo e robustez. Quatro modelos de predição foram construídos para realizar a triagem virtual baseada em ligantes. Os resultados mostraram que os modelos apresentam excelente classificação, desempenho e robustez, com a maioria das métricas acima de 0,7, e o coeficiente de correlação de Mateus(CCM) que apresentou valores igual ou superior a 0,5.

Tabela 2 – Resumo dos parâmetros correspondentes aos resultados obtidos para todos os modelos

Parametros / Enzima	Validação	Especificidade	Sensibilidade	Acurácia	VPP	VPN	CCM	ROC
NRF_2	Test	0.76	0.75	0.76	0.86	0.61	0.50	0.83
	Cross	0.63	0.78	0.73	0.80	0.60	0.41	0.81
COX-2	Test	0.71	0.83	0.78	0.77	0.78	0.55	0.84
	Cross	0.70	0.81	0.73	0.76	0.76	0.52	0.84
***i*NOS**	Test	0.74	0.87	0.81	0.78	0.84	0.62	0.87
	Cross	0.74	0.85	0.80	0.78	0.82	0.60	0.87
NADPH	Test	0.91	0.76	0.82	0.92	0.73	0.67	0.90
	Cross	0.66	0.89	0.80	0.79	0.82	0.58	0.78

Fonte: elaborada pela autora, 2025.

A tabela 2 mostra os resultados da probabilidade combinada entre o modelo de predição e a análise de *docking* molecular (Probcomb) para atividade potencial contra as enzimas investigadas de todos os compostos. Os compostos considerados ativos (com Probcomb igual ou superior a 0,50) e a probabilidade de atividade biológica (ProbAc) estão destacados em cinza. Após a validação dos modelos, eles foram utilizados para analisar o conjunto de 67 compostos presentes nos frutos ou partes das plantas (*Anacardium ocidentalli*, *Spondias mombin*, *Mangifera indica*, *Malpighia emarginata* e *Carica papaya*) quanto à atividade contra as proteínas selecionadas.

O banco de compostos foi então selecionado para escolher compostos potencialmente ativos para as proteínas investigadas. Após realizar a análise combinada, identificamos 48 moléculas potencialmente ativas para duas ou mais proteínas do conjunto de compostos analisados, destacados em negrito na Tabela 3. Usando Probcomb, foram selecionados 14 compostos ativos para COX-2 com chances de 50-63%; 42 compostos ativos para iNOS com chances de 50-75%; e 56 compostos potencialmente ativos para NRF2 com chances de 50-77%.

Nas análises de probabilidade de atividade biológica na ausência de docking (ProbAct), selecionamos 12 compostos ativos contra NOX-1 com chances de 53-75%. Destacamos cinco compostos com atividade Probcomb ou ProbAct (para NOX-1) acima de 0,6: (-)-epicatequina, anteraxantina, ácido clorogênico, fenchona e palmitato de isopropila. Também foram

identificados, entre os 48 compostos considerados multialvo, com atividade para duas ou mais proteínas.

Dez compostos apresentaram atividade biológica contra três proteínas: β-cubebeno, (E)-β-cariofileno, óxido linaloico, anteraxantina, eugenol, fenchona, germacreno-D, metil galato, α-terpinoleno e β-selineno. Observou-se que a maioria desses compostos apresentou boa atividade (acima de 0,6) para o fator nuclear NRF2, e outros apresentaram atividade ótima (acima de 0,7), como cianidina-3-glicosídeo, mangiferina, violaxantina e zeaxantina. Três compostos apresentaram atividade ótima para inativar NOX-1, como (-)-epicatequina, anteraxantina e ácido clorogênico, e os compostos humuleno e malvidina-3,5-diglicosídeo apresentaram atividade ótima para inativar iNOS.

Tabela 3 – Resultados da probabilidade combinada entre o modelo de predição e a análise de *docking* molecular (Probcomb) para atividade potencial contra as enzimas dos compostos investigados

ID	Compostos	Pcomb		Pact		Múltiplos alvos
		COX2	iNOS	Nrf2	NOX1	
1	Geranil acetona	**0.62**	0.31	**0.57**	0.43	**2**
2	**β-Cubebeno**	**0.63**	**0.60**	**0.52**	0.23	**3**
3	(-)-Epicatequina	0.47	**0.55**	0.40	**0,73**	**2**
4	**(E)-β-Cariofileno**	**0.52**	**0.59**	**0.53**	0.29	**3**
5	(E,E)-Farnesol	0.36	**0.51**	**0.53**	0.48	**2**
6	**(Z)-Óxido linaloico**	**0.57**	**0.54**	**0.66**	0.40	**3**
7	3,4 Ácido Diidroxibenzoico	0.24	0.32	0.55	0.13	1
8	**Anteraxantina**	0.09	**0.50**	**0.50**	**0.75**	**3**
9	Apigenina	0.45	0.47	0.55	0.38	1
10	Bisabolol	0.35	**0.62**	**0.59**	0.32	**2**
11	Canfeno	0.36	**0.53**	**0.58**	0.46	**2**
12	Carvone	0.43	0.51	0.44	0.49	1
13	Ácido Clorogênico	0.15	**0.56**	0.45	**0.73**	**2**
14	Cianidanol	0.28	**0.63**	**0.54**	0.36	**2**
15	Cianidina-3-glicosídeo	0.29	**0.50**	**0.77**	0.47	**2**
16	Ácido Dodecanoico	0.33	0.49	**0.63**	**0.56**	**2**
17	**Eugenol**	**0.51**	**0.55**	**0.60**	0.30	**3**
18	**Fenchone**	0.40	**0.50**	**0.55**	**0.66**	**3**
19	Ácido Ferúlico	0.18	0.32	**0.57**	**0.53**	**2**
20	Ácido Gálico	0.48	**0.57**	**0.65**	0.44	**2**
21	Geranial	**0.52**	**0.63**	0.47	0.43	**2**
22	**Germacreno-D**	**0.57**	**0.58**	**0.50**	0.38	**3**
23	Humuleno	0.31	**0.75**	**0.50**	0.24	**2**
24	Isomangiferina	0.27	**0.60**	**0.64**	0.44	**2**
25	Palmitato de isopropila	0.12	0.49	0.31	0.69	1
26	Kaempferol	0.31	**0.64**	**0.58**	0.44	**2**
27	Ácido lignocérico	0.42	**0.50**	**0.67**	0.45	**2**
28	Limoneno	0.27	**0.57**	**0.60**	0.44	**2**
29	Linalol	0.27	0.29	0.52	0.17	1
30	Luteína	0.31	0.33	0.63	0.40	1
31	Licopeno	0.18	0.41	0.69	0.19	1
32	Malvidina-3-O-glicosídeo (*)(*)	0.18	**0.71**	**0.65**	0.24	**2**

33	Mangiferina-6-galato	0.48	**0.55**	**0.65**	0.29	**2**
34	Mangiferina	**0.50**	0.40	**0.72**	0.43	**2**
35	Mentona	0.41	0.56	0.49	0.44	1
36	Mentil acetato	0.38	0.44	**0.55**	**0.56**	**2**
37	**Metil galato**	**0.50**	**0.52**	**0.63**	0.45	**3**
38	Mirceno	0.19	**0.53**	**0.61**	0.44	**2**
39	Nicotina	0.26	**0.52**	**0.59**	0.46	**2**
40	Ocimeno	0.24	**0.56**	**0.62**	0.44	**2**
41	Octanal	**0.52**	0.43	**0.53**	0.47	**2**
42	Ácido Palmítico	0.26	0.41	0.64	0.48	1
43	p-Cimeno	0.40	0.39	0.35	0.73	1
44	Pelargonidina	0.47	**0.51**	**0.53**	0.37	**2**
45	Fitoeno	0.14	**0.51**	0.30	**0.56**	**2**
46	Benzoato de propila	0.28	**0.57**	0.23	**0.59**	**2**
47	Rametina	0.30	**0.59**	**0.63**	0.49	**2**
48	Ácido esteárico	0.29	0.43	0.61	0.49	1
49	Terpinen-4-ol	0.29	**0.58**	**0.59**	0.41	**2**
50	trans- Cariofileno	0.40	**0.52**	**0.54**	0.27	**2**
51	Vanilina	0.19	0.34	**0.57**	**0.59**	**2**
52	Violaxantina	0.22	0.34	**0.71**	0.11	1
53	Zeaxantina	0.42	0.39	**0.73**	0.17	1
54	**α- Terpinoleno**	**0.56**	**0.56**	**0.56**	0.46	**3**
55	α-Gurjuneno	**0.52**	**0.48**	**0.52**	0.24	**2**
56	α-Felandreno	**0.27**	**0.66**	**0.57**	0.45	**2**
57	α-Pineno	**0.30**	**0.43**	**0.54**	0.33	**1**
58	α-Terpineno	**0.38**	**0.48**	**0.57**	0.46	**1**
59	α-Terpineol	**0.45**	**0.54**	**0.60**	0.42	**2**
60	β-Criptoxantina	**0.48**	**0.42**	**0.68**	0.17	**1**
61	β-Ciclocitral	**0.29**	**0.41**	**0.63**	0.37	**1**
62	β-Ionono	**0.41**	**0.54**	**0.53**	0.35	**2**
63	β-Felandreno	**0.23**	**0.55**	**0.49**	0.35	**1**
64	β-Pineno	**0.46**	**0.46**	**0.54**	0.32	**1**
65	**β-Selineno**	**0.55**	**0.58**	**0.51**	0.32	**3**
66	γ-Selineno	**0.53**	**0.54**	**0.49**	0.32	**2**
67	γ-Terpineno	**0.44**	**0.49**	**0.58**	0.46	**1**

Fonte: elaborada pela autora, 2025.

Os compostos considerados ativos (com Probcomb igual ou superior a 0,50) e a probabilidade de atividade biológica (ProbAc) estão destacados em cinza. Seus respectivos valores e o multialvo em duas ou mais enzimas estão destacados em negrito. O nome dos compostos com atividade para 3 proteínas estão destacados em negrito. Já os valores dos compostos com excelente atividade (acima de 0,7) para inativar Nox1 estão destacados em laranja, para inativar iNOS estão destacados em verde e para ativar NRF2 estão destacados em azul (Tabela 4).

Tabela 4 – Compostos selecionados com melhor atividade (≥0,6) enzimática para 2 ou mais enzimas, incluindo a NRF2, presentes em cada fruta estudada e comprovação de estudos científicos nas vias enzimáticas do envelhecimento e doenças cardiovasculares

ID	Compostos de Frutas/ Plantas	ME	CP	SM	MI	AO	Pcomb COX-2	Pcomb iNOZ	Pcomb NRF_2	pAct NOX1	Multi alvos	PE	DCV
1	(z)- Óxido linaloico						**0.57**	**0.54**	**0.66**	0.40	3	–	–
2	Cianidina-3-glucosídeo						0.29	**0.50**	**0.77**	0.47	2	✓	–
3	Ácido Dodecanoico						0.33	0.49	**0.63**	**0.56**	2	–	✓
4	Eugenol						**0.51**	**0.55**	**0.60**	0.30	3	✓	✓
5	Ácido Galico						0.48	**0.57**	**0.65**	0.44	2	✓	✓
6	Isomangiferina						0.27	**0.60**	**0.64**	0.44	2	–	–
7	Ácido Lignocérico						0.42	**0.50**	**0.67**	0.45	2	–	–
8	Limoneno						0.27	**0.57**	**0.60**	0.44	2	✓	✓
9	Malvidina-3,5-Diglicosídeo						0.18	**0.71**	**0.65**	0.44	2	–	–
10	Mangiferina-6-galato						0.48	**0.55**	**0.65**	0.29	2	–	–
11	Mangiferina						**0.50**	0.40	**0.72**	0.43	2	✓	✓
12	Metil galato						**0.50**	**0.52**	**0.63**	0.45	3	–	✓
13	Mirceno						0.19	**0.53**	**0.61**	0.44	2	–	✓
14	Ocimeno						0.24	**0.56**	**0.62**	0.44	2	–	–
15	Ramnetina						0.30	**0.59**	**0.63**	0.49	2	–	✓
16	α-Terpineol						0.45	**0.54**	**0.60**	0.42	2	✓	✓

Fonte: elaborada pela autora, 2025.

Notas:

Legenda: Os compostos presentes nos diferentes frutos ou partes de suas plantas são destacados de acordo com a cor: vermelho (*Malpighia emarginata* DC.), laranja (*Carica papaya* L.), amarelo (*Spondias mombin* Linn.), verde (*Mangifera indica* L.), marrom (*Anacardium occidentale* L.); A confirmação de estudos científicos envolvendo compostos nas vias enzimáticas de doenças cardiovasculares e/ou processo de envelhecimento é marcada com um "✓"; ID = identificação; PE = processo de nvelhecimento; DCV = doenças cardiovasculares; O melhor valor da enzima NRF2 é destacado em vermelho. Os melhores valores da enzima iNOS são destacados em azul.

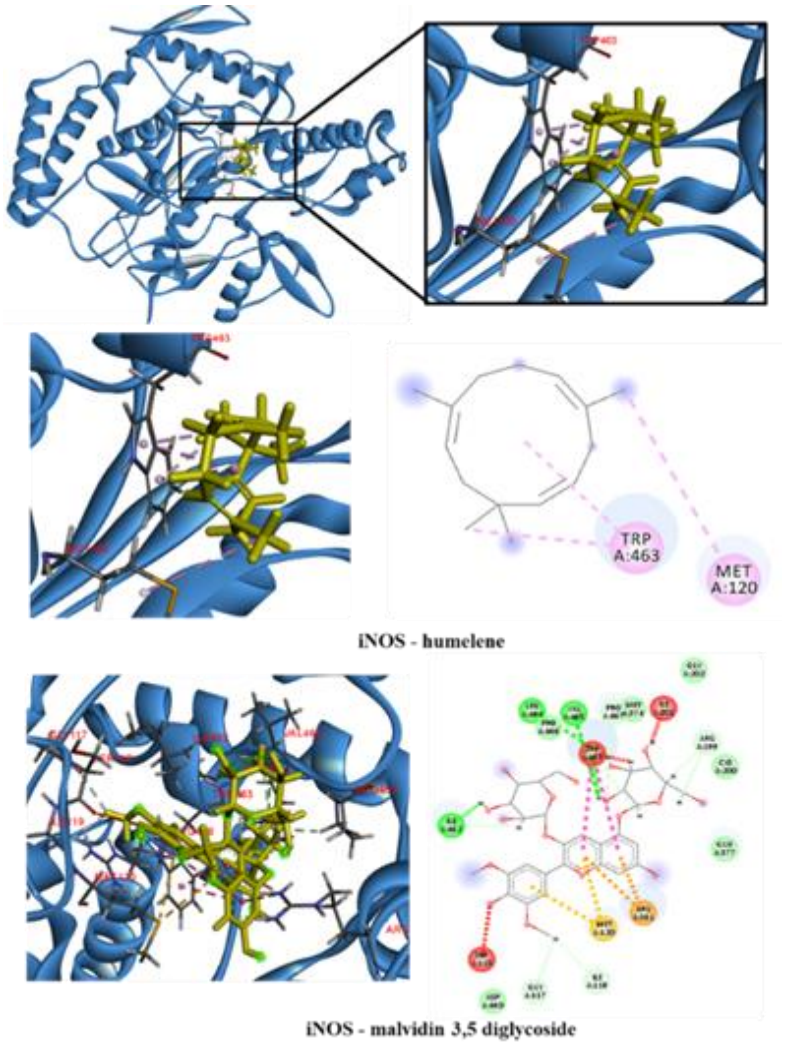
Outra classificação foi realizada para selecionar alguns compostos como primeira escolha (Tabela 4). Para os critérios de classificação, os compostos deveriam ter um valor de atividade acima de 6,0 e ser ativos para NRF2 e outra enzima. NRF2 foi escolhida entre as outras enzimas devido ao seu papel na ativação da cascata enzimática com ação antioxidante durante o aumento do estresse oxidativo. Portanto, 16 compostos foram selecionados: (z)- óxido linaloico; cianidina-3-glicosídeo; ácido dodecanóico; eugenol; ácido gálico; isomangiferina; ácido lignocérico; limoneno; malvidina-3,5-diglicosídeo; mangiferina-6-galato; mangiferina; metil galato; mirceno; ocimeno; rametina e α-terpineol (Tabela 1). Destaque para Malvidina-3,5-diglicosideo em azul com valor de 0,71 para a Inos e para a Cianidina-3-glicosideo com valor de 0,77 para a NRF2.

5.1.1.1.1 Análise de interação no sítio ativo da INOS e COX-2

Foram selecionados alguns dos melhores resultados para analisar as interações no sítio ativo. Os critérios de seleção foram resultados do Probcomb acima de 0,7. Foram analisadas as interações formadas em iNOS e NFR2. Como a COX-2 não apresenta compostos com atividade acima de 0,7 e o NOX-1 não apresenta estrutura cristalográfica para análises de *docking*, não foi possível analisar as interações nessas proteínas.

A Figura 12 destaca as interações 3D e 2D de dois compostos potencialmente ativos contra iNOS. Foram investigadas as interações entre os aminoácidos do sítio ativo da enzima iNOS e os compostos humuleno (humulene) e malvidina-3,5-diglicosídeo (malvidin 3,5 diglycoside) . Observa-se que o composto humuleno apresentou duas interações hidrofóbicas com os aminoácidos Met^{120} e Trp^{463}. O composto malvidina-3,5-diglicosídeo apresentou diversas ligações de hidrogênio com os aminoácidos Ser^{118}, Arg^{199}, Ile^{201}, Arg^{381}, Ile^{462}, Leu^{464} e Val^{465}; Interações de Van der Waals com os aminoácidos Ile^{119} e Gly^{117} e ligações eletrostáticas com os aminoácidos Met^{120} e Arg^{381}. O composto malvidina-3,5-diglicosídeo provou ser uma molécula muito estável no sítio ativo da iNOS.

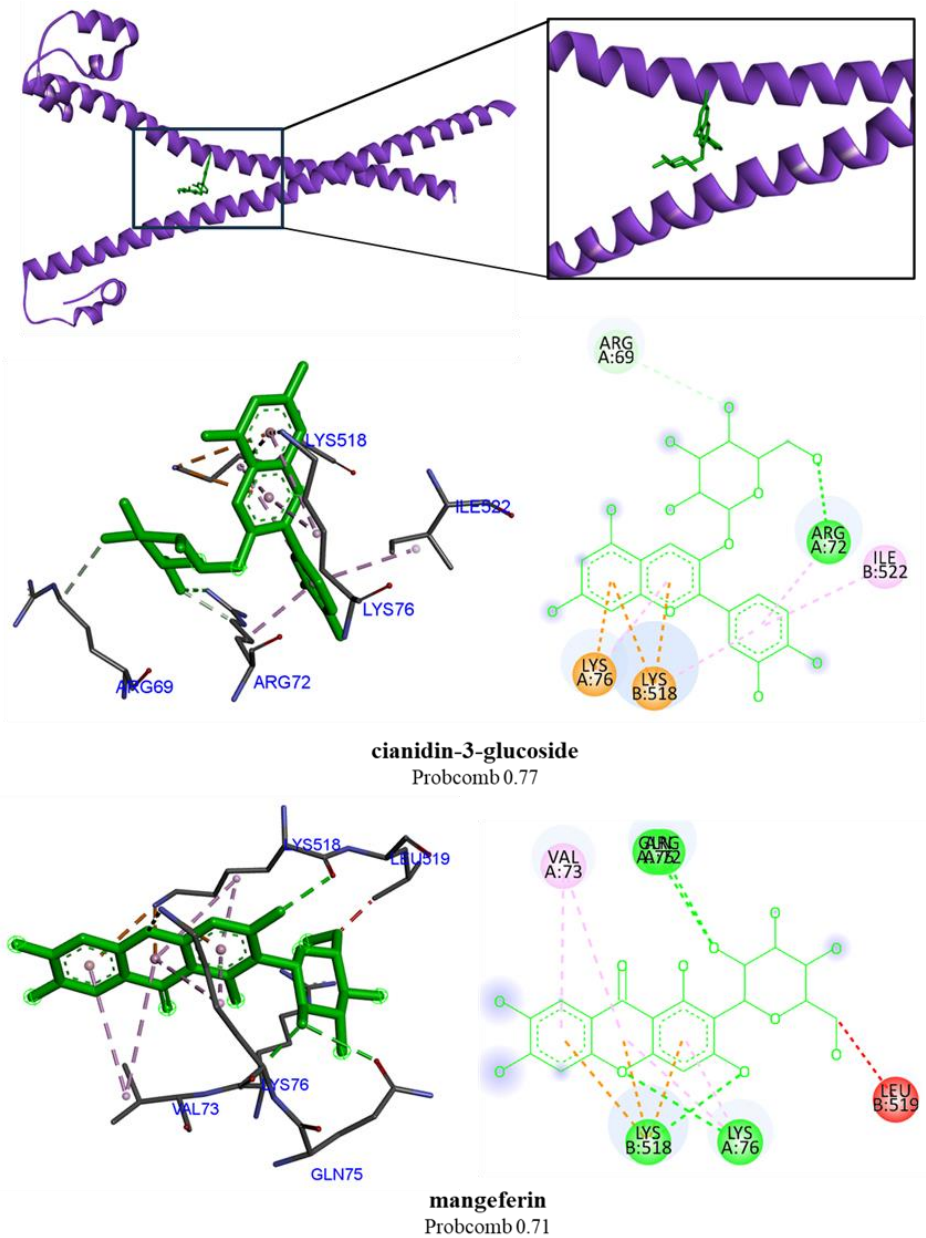
Figura 12 – Interações 3D e 2D de dois compostos (humuleno; malvidina 3,5 diglicosídeo) potencialmente ativos contra iNOS.



Fonte: elaborada pela autora, 2025.
Notas:
Legenda: Os compostos descritos em inglês na figura referem-se ao humuleno (humulene) e a malvidina-3,5-diglicosídeo (malvidin 3,5 diglycoside). As ligações de hidrogênio são destacadas em verde, as interações de Van der Waals são destacadas em verde claro, as interações hidrofóbicas são destacadas em rosa, as interações eletrostáticas são destacadas em laranja e as interações estéricas são destacadas em vermelho.

Dentre os quatro compostos que obtiveram valores de Probcomb 0,7 para NFR2, selecionamos dois para analisar as interações no sítio ativo desta proteína: cianidina-3-glicosídeo e mangiferina. A cianidina-3-glicosídeo (cianidin-3-glucoside) formou uma ligação de hidrogênio com Arg^{72}, uma interação de Van der Waals com o aminoácido Arg^{69}, uma interação hidrofóbica com o aminoácido Ile^{522} e duas interações eletrostáticas com os aminoácidos Lys^{76} e Lys^{518}. Enquanto a mangiferina (mangeferin) formou uma ligação de hidrogênio com os aminoácidos Lys^{76}, Lys^{518} e Arg^{752}, uma interação hidrofóbica com Va^{173} e uma interação estérica com Leu^{515} (Figura 13).

Figura 13 – Interações 3D e 2D de dois compostos (cianidina-3-glicosídeo; mangiferina) potencialmente ativos contra NFR2



Fonte: elaborada pela autora, 2025.
Notas:
Legenda: Os compostos descritos em inglês na figura, referem-se a cianidina-3-glicosídeo (cianidin-3-glucoside) e a mangiferina (mangeferin). As ligações de hidrogênio são destacadas em verde, as interações de Van der Waals são destacadas em verde claro, as interações hidrofóbicas são destacadas em rosa, as interações eletrostáticas são destacadas em laranja e as interações estéricas são destacadas em vermelho.

5.2 Simulações de dinâmica molecular

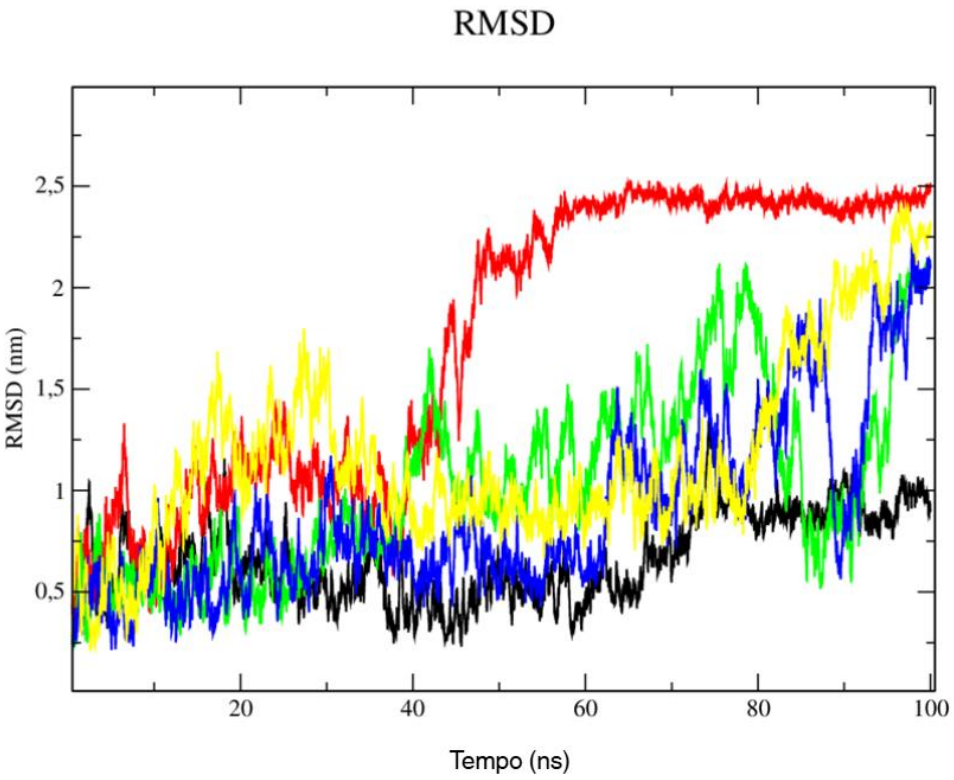
Após análise do potencial de atividade dos compostos em estudo, foram selecionados os compostos com maiores valores de probabilidade de atividade frente aos alvos em estudo, que correspondem a mecanismos importantes de avaliação da atividade antioxidante. Simulações de dinâmica molecular foram realizadas com os compostos testes Mangiferina, Cianidina-3-glicosídeo e alfa-terpineol para avaliar a flexibilidade da enzima e a estabilidade das interações na presença de fatores como solvente, íons, pressão e temperatura.

Em relação ao heterodímero alvo NRF2-MAFG ligado ao CsMBE1 PDB: (7X5E) a análise da métrica RMSD (Root Mean Square Deviation ou Desvio Quadrático Médio) da proteína (Figura 14) mostrou que o complexo mais estável correspondeu ao referente à enzima (preto), conforme este apresentou valores de RMSD inferior, sendo observado também que este apresentou baixa ocorrência de flutuações até o período de 70 ns, no qual foram observados valores de RMSD de 0,5 nm, aumentando para 1,0 nm.

O composto alfa-terpineol (azul) foi o segundo composto mais estável, tendo apresentado valores de RMSD mais próximos dos valores apresentados pelo complexo proteico, correspondentes a 0,7 nm, sendo observada instabilidade neste complexo a partir do tempo de 60 nm com valores de 1,5 nm a 70ns e 2,1nm a 90ns. A cianidina-3-glicosídeo (verde) foi o terceiro complexo mais estável com valores de RMSD de 0,7 nm até um período de 40 ns em que foram observados picos de instabilidade de até 2,1 nm.

O composto controle resveratrol demonstrou estabilidade apenas no início da simulação até 10 ns com valor de RMSD de até 0,8 nm, após esse período apresentou flutuações que atingiram valores de RMSD de até 1,8nm em 30ns e 2,5nm em 90ns. A mangiferina (vermelho) foi o composto mais instável, pois apresentou maiores valores de RMSD ao longo da simulação, sendo observadas flutuações nos períodos de 5ns com RMSD de 1,3nm, 30ns com RMSD de 1,5nm, 40ns com RMSD de 2,1nm e 90ns até o tempo total de simulação com RMSD de 2,5 nm. A estabilidade do heterodímero NRF2-MAFG ligado à proteína CsMBE1 PDB: (7X5E) é essencial para manter os compostos ligados ao sítio ativo.

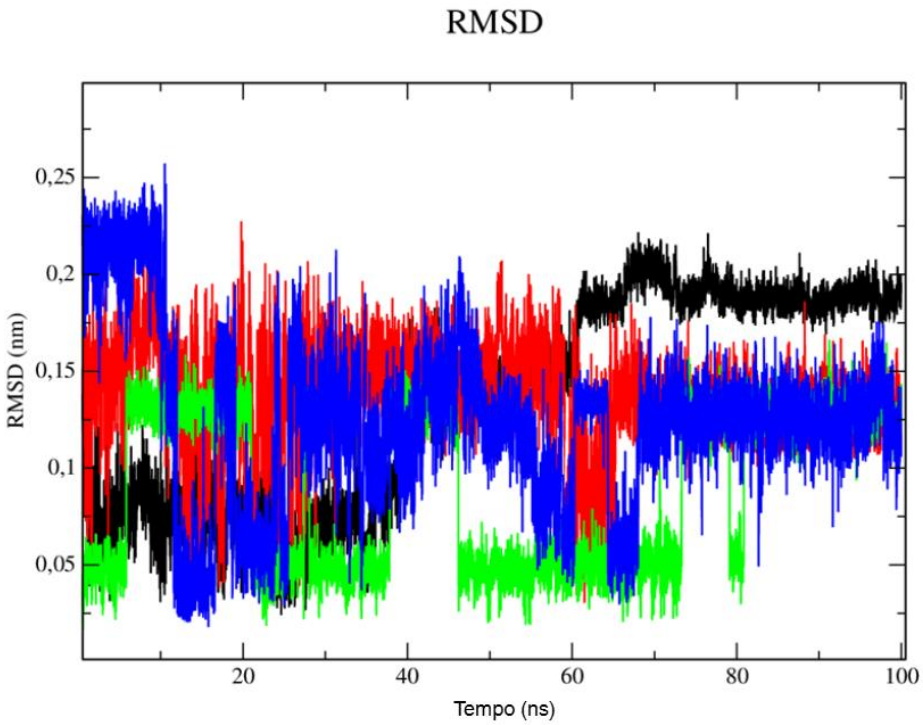
Figura 14 – RMSD dos átomos Cα da enzima heterodímero NRF2-MAFG ligado ao CsMBE1 PDB: (7X5E) (preto) e complexado aos compostos Mangiferina (vermelho), Cianidina-3-glicosídeo (verde), Alfa terpineol (Azul) e Resveratrol (amarelo)



Fonte: dados da pesquisa, 2025.

Ao analisar a estabilidade dos ligantes na presença de solventes (Figura 15), verificou-se que, conforme visto nos resultados referentes ao RMSD da proteína, no RMSD do ligante, o alfa terpineol (verde) foi o composto que apresentaram os menores valores de RMSD, correspondentes a 0,05nm, enquanto a cianidina-3-glicosídeo (vermelho), o composto controle Resveratrol (azul) e a mangiferina (preto) foram os compostos mais instáveis, pois apresentaram os maiores valores de RMSD, correspondendo a respectivamente 0,20 nm, 0,25 nm e 0,23 nm. Portanto, sugere-se que o alfa-terpineol tende a permanecer no sítio ativo mesmo na presença de diferentes fatores como temperatura, pressão, solvente e íons.

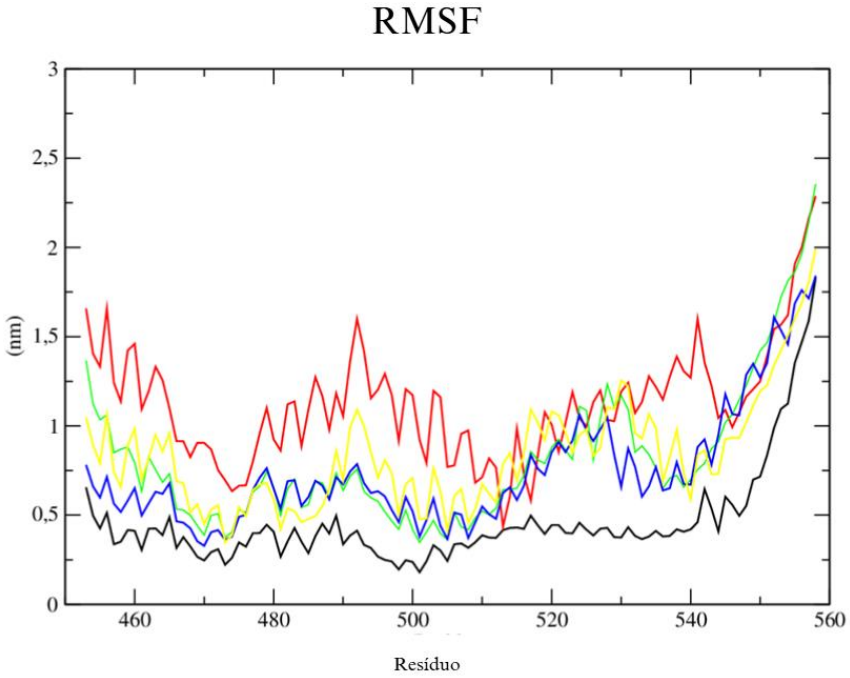
Figura 15 – RMSD dos átomos de Cα dos compostos Mangiferina (preto), Cianidina-3-glicosídeo (vermelho), Alfa-terpineol (verde) e Resveratrol (azul)



Fonte: dados da pesquisa, 2025.

Para entender a flexibilidade de resíduos e aminoácidos que contribuem para a mudança conformacional no heterodímero da enzima Nrf2-MafG ligado ao CsMBE1 PDB: (7X5E), as flutuações quadráticas médias, (RMSF) root mean square flutuation, de cada aminoácido na proteína foram calculadas. Resíduos com valores elevados de RMSF sugerem mais flexibilidade e valores baixos de RMSF refletem menos flexibilidade. Considerando que aminoácidos com flutuações acima de 03nm contribuem para a flexibilidade da estrutura do canal verificou-se que entre os aminoácidos presentes na proteína resíduos nas posições 453-460 462-468 475-484 486-494 503, 506 e 508-558 contribuem para a mudança conformacional da proteína complexada com os compostos Mangiferina, Cianidina-3-glicosídeo, alfa-terpineol e Resveratrol (Figura 16).

Figura 16 – RMSF dos átomos da enzima heterodímero NRF2-MAFG ligado ao CsMBE1 PDB: (7X5E) (preto) e complexado aos compostos Mangiferina (vermelho), Cianidina-3-glicosídeo (verde), Alfa terpineol (Azul) e Resveratrol (amarelo)



Fonte: dados da pesquisa, 2025.

5.3 Teste de toxicidade aguda em embriões

5.3.1 Determinação dos parâmetros de toxicidade

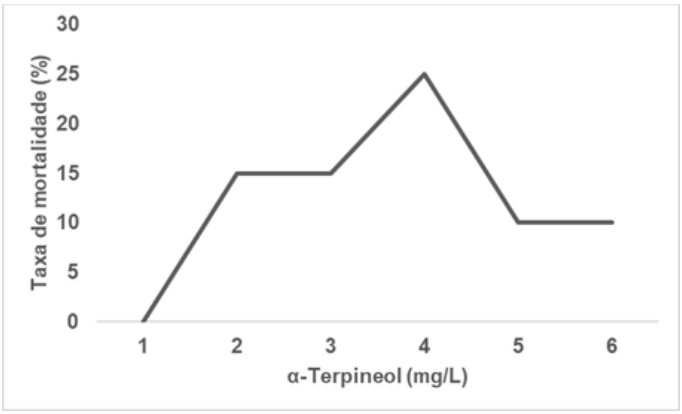
5.3.1.1 CL_{50}, LOAEL

Após a análise dos resultados encontrados nos testes de quimioinformátiaca, avaliamos pela primeira vez, teste de toxicidade do composto selecionado, α-terpineol, para utilização de concentrações seguras, nos testes futuros com o modelo de indução a senescência proposto, já que não há até o momento, disponibilidade de resultados na literatura. Portanto, a faixa de toxicidade foi determinada e novas exposições foram realizadas para determinar a CL_{50} (concentração letal mediana) e LOAEL (*Lowest Observable Adverse Effect Level*), em três repetições biológicas independentes. Os resultados seguem expostos nas figuras 18, 19 e 20.

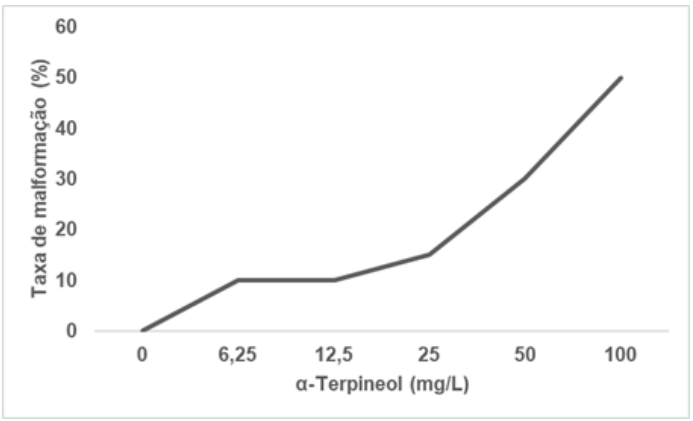
A figura 17 mostra as taxas de mortalidade e de má formação. O α-terpineol nas exposições testadas não causou mortalidades acima de 50%, portanto conclui-se que a LC_{50} está

acima de 100 mg/L , ou seja, 0,1 mg/mL (Figura 17 A). A taxa de má formação aumentou de modo concentração-dependente. A alteração morfológica mais presente foi o edema de saco, que apareceu em todas as concentrações (Figura 17 B). Portanto, dos parâmetros de toxicidade, foi possível identificar que a LOAEL foi a concentração de 6,25 mg/L, ou seja, 0,00625 mg/ mL.

Figura 17 – Teste de toxicidade do desenvolvimento em embriões de *zebrafish* expostos ao α-terpineol nas concentrações de 6,25; 12,5; 25; 50; 100 mg/L



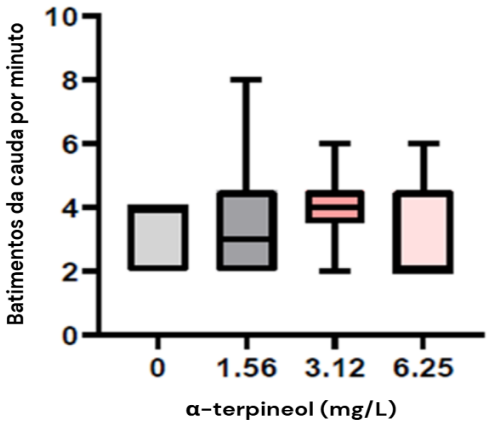
A



B

Fonte: dados da pesquisa, 2025.
Notas:
Legenda: A figura expõe o Teste de toxicidade do desenvolvimento em embriões de *zebrafish* expostos ao α-terpineol nas concentrações de 6,25; 12,5; 25; 50; 100 mg/L, ou 0,00625; 0,0125; 0,025; 0,05; 0,1 mg/mL, com n=120 larvas, sendo 20 p/ grupo . A.Taxa de mortalidade. B. Taxa de má formação. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA one way, seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05.

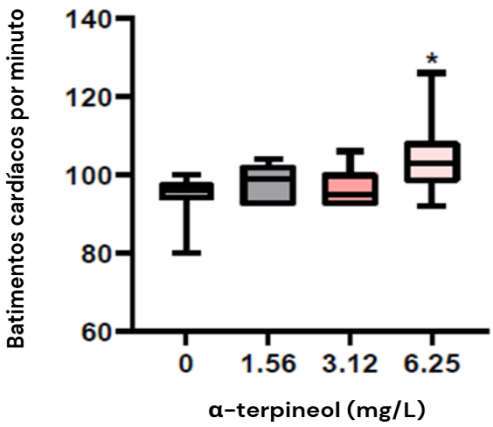
Figura 18 – Batimentos das caudas de 10 embriões de *zebrafish* (24 hpf) expostos ao α-terpineol nas concentrações de 1,56, 3,12 e 6,25 mg/L



Fonte: dados de pesquisa, 2025
Notas:
Legenda: A figura expõe o teste de batimentos da cauda por minuto de embriões de *zebrafish* expostos ao α-terpineol nas concentrações de 0; 1,56; 3,12; 6,25 mg/l, ou 0; 0,00156; 0,00312; 0,00625 mg/mL, com n=80 larvas, sendo 20 p/ grupo. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA one way, seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05.

A figura 18 representa o número de batimentos das caudas de embriões (24 hpf) nas diversas concentrações de α-terpineol, sendo que o grupo controle (Meio E3), representado pela concentração 0, obteve-se um valor de mediana de 4, já as demais concentrações de 1,56 mg/ L (0,00156 mg/mL), 3,12 mg/L (0,00312 mg/mL) e de 6,25 mg/mL ((0,00625 mg/mL) os valores das medianas foram respectivamente de 3, 4 e 2 batimentos da cauda por minuto. Observa-se que não houve diferença significativa nos valores de batimentos da cauda de larvas de embriões de *zebrafish* quando comparamos o grupo controle com os demais grupos expostos as três concentrações de α-terpineol.

Figura 19 – Batimentos cardíacos por minuto de embriões de *zebrafish* (48 hpf) expostos ao α-terpineol nas concentrações de 1,56, 3,12 e 6,25 mg/L



Fonte: dados de pesquisa, 2025.
Notas:
Legenda: A figura expõe o teste de batimentos cardíacos por minuto de embriões de *zebrafish* expostos ao α-terpineol nas concentrações de 0; 1,56; 3,12; 6,25 mg/L, ou 0; 0,00156; 0,00312; 0,00625 mg/Ml, com n=80 larvas, sendo 20 p/ grupo. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA one way, seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05.

A figura 19 representa o número de batimentos cardíacos por minuto (48 hpf) nas diversas concentrações de α-terpineol de 1,56; 3,12 e 6,25 mg/L (0,00156; 0,00312; 0,00625 mg/mL) e o grupo controle representado pela concentração 0 (exposto ao Meio E3). Observa-se que os valores de mediana para as concentrações 0; 1,56; 3,12; e 6,25 mg/L (0,00156; 0,00312; 0,00625 mg/mL) foram respectivamente de 96, 99, 95 e 103 batimentos cardíacos por minuto. No entanto observa-se uma diferença significativa no grupo de embriões expostos a concentração de 6,25 mg/l (0,00625 mg/mL) de α-terpineol quando comparado ao grupo controle.

Os testes utilizados foram Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade dos dados, e o teste não-paramétrico Kruskall Wallis seguido do post teste de Dunn para avaliar as diferenças entre os grupos ($p<0,05$).

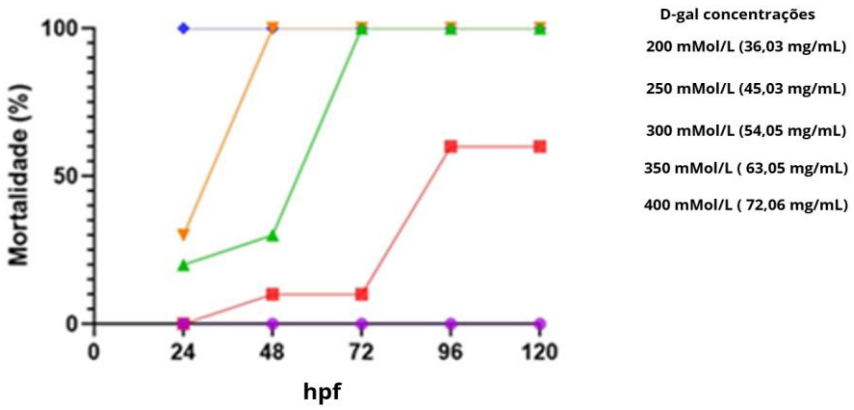
5.4 Modelo para indução ao envelhecimento por D-galactose em embriões de *zebrafish*

5.4.1 Teste piloto de efeitos sobre a taxa de mortalidade (%) de embriões de embriões (6 hpf) expostos à D-Gal

Até o momento da realização dos testes apresentados a seguir com D-galactose em 2022, não havia disponibilidade de estudos na literatura com modelos de indução por D-gal em *zebrafish*, cujos resultado em adultos, foram publicados posteriormente a nossa análise. Portanto, iniciamos os testes para avaliar a taxa de mortalidaade e alterações morfológicas utlizando várias concentrações de D-gal, 400, 350, 300, 250, 200 Mmol/L (72,06; 63,05; 54,05; 45,03; 36,03 mg/mL) para obter a concentrações que fosse abaixo da CL_{50}, que seguem expostos na figura 20, a seguir.

Figura 20 – Efeitos sobre a taxa de mortalidade (%) de embriões (6 hpf) expostos à D-gal nas concentrações de 200; 250; 300;350 e 400 Mmol/L por 120 hpf e imagens microscópicas representativas das larvas dos grupos controle e d-gal.

A



B1 B2 B3



Fonte: dados da pesquisa, 2025.
Notas:
Legenda: a figura 20 A expõe a taxa de mortalidade no desenvolvimento de embriões e larvas de *zebrafish* (6hpf) expostos à D-gal em diversas concentrações até 120 hpf (200; 250; 300; 350; 400 Mmol/L), ou seja, 72,06; 63,05; 54,05; 45,03; 36,03 mg/mL. A figura 20 B expõe imagens microscópicas representativas das larvas dos diversos grupos. B1: larva do Grupo 1 controle sem alterações subletais; B2; B3 : larvas do Grupo 2 expostas a D-gal com alterações subletais adicionais: ESV: edema de saco vitelínico; AE: atraso na eclosão; RD; retardo no desenvolvimento e com alterações subletais com potencial de regeneração: ESC-escoliose ; LOR: lordose. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA one way, seguido do pós-teste de Tukey. Diferença significativa com *p < 0,05 quando comparado o grupo d- gal 200 Mmol/l com os demais grupos

A figura 20 A apresenta a taxa de mortalidade no desenvolvimento de embriões e larvas de *zebrafish* (6 hpf) expostos à D-gal até 120 hpf em diversas concentrações de 200 Mmol/L (36,03 mg/mL); 250 Mmol/L (45,03 mg/mL); 300 Mmol/L (54,05 mg/mL); 350 Mmol/L (63,05 mg/mL); 400 Mmol/L (72,06 mg/mL). A figura 2 B mostra imagens microscópicas representativas das larvas dos diversos grupos.

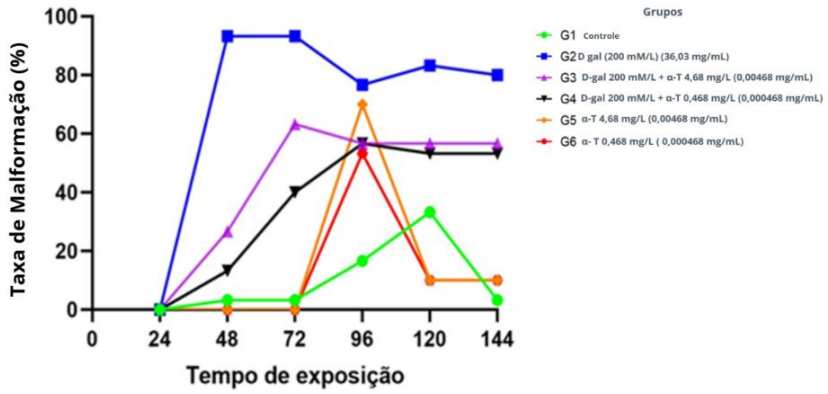
Observa-se que a concentração de letalidade foi de 250 mMol/l (45,03 mg/ml) levando a letalidade de mais de 50% das larvas e provocou alterações morfológicas em grande parte da amostra. Enquanto a concentração de 200 mMol/L (36,03 mg/mL) não causou letalidade, mas foi capaz de provocar alterações subletais (atraso no desenvolvimento, atraso na eclosão, ausência ou redução na pigmentação, má formação da notocorda, deformação/ edema do saco vitelínico, reabsorção reduzida da gema, escoliose e lordose) expostas nas imagens microscópicas da Figura 20 B2 e B3.

Já as concentrações mais altas, iguais ou acima de 300 mMol/l (54,05 mg/mL) levaram a mortalidade de 100% das larvas e as demais alterações descritas acima. A larva exemplificada na imagem 20 B1 pertence ao grupo controle, onde não observamos nenhum tipo de alteração morfológica, nem letalidade.

5.4.1.1 Distribuição das alterações morfológicas subletais em embriões 6 hpf até 6 dpf induzidos por D-gal e tratados com α- terpineol

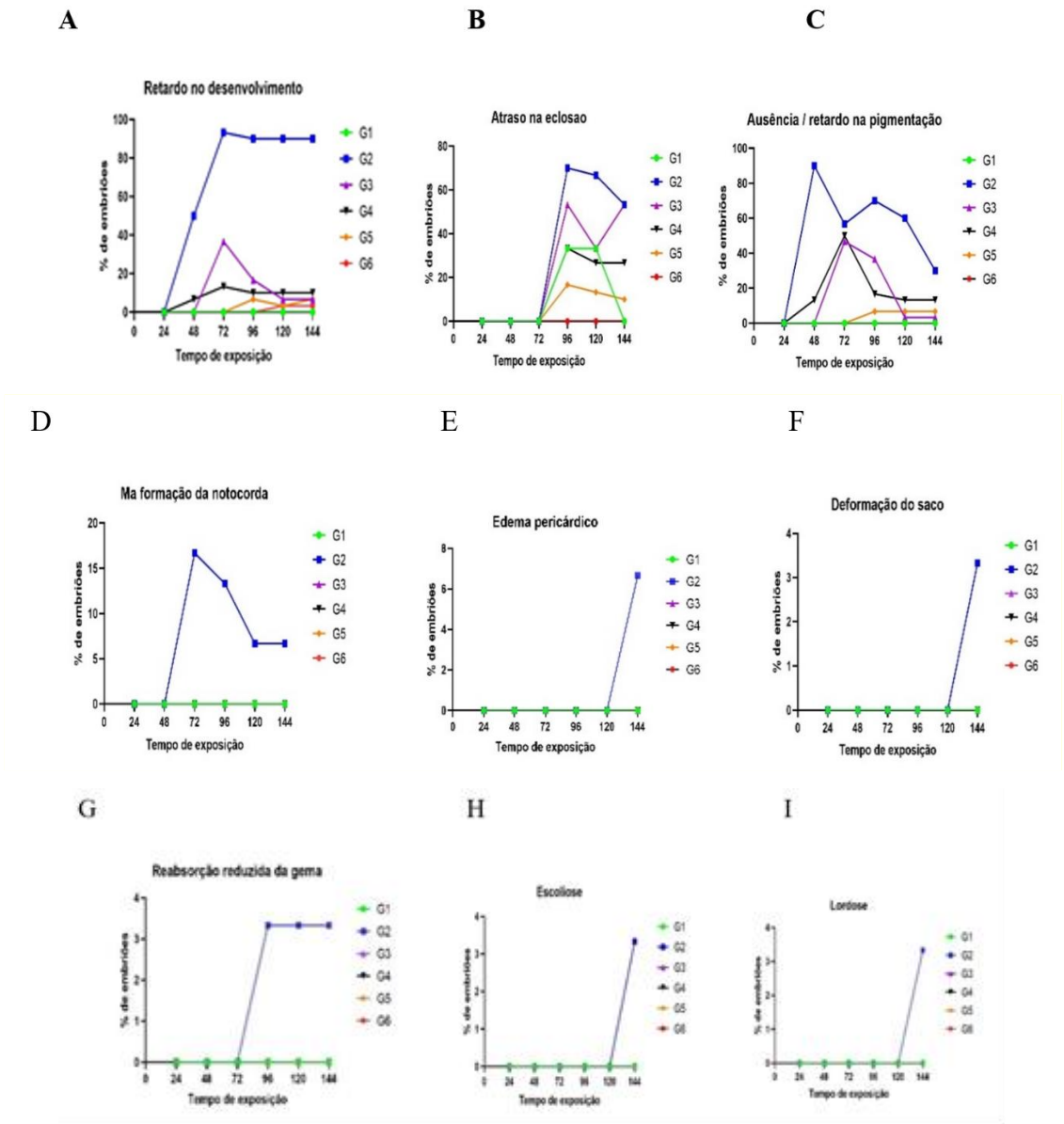
Após a realização da etapa descrita anteriormente, foram realizados testes com duas concentrações de α- terpineol de 0,468 mg/L (0,000468 mg/mL)e de 4,68 mg/L (0,00468 mg/Ml) e com D-gal na concentração de 200 mMol/L (36,03 mg/mL) para observação das alterações morfológicas e ação do α- terpineol, porém sem a realização ainda de teste para confirmação da senescência (Figuras 22 e 23).

Figura 21 – Distribuição das alterações morfológicas subletais em embriões 6 hpf até 6 dpf expostos a D-gal e tratados com α- terpineol



Fonte: dados de pesquisa, 2025.
Notas:
Legenda: testes foram realizados em embriões e larvas 6 hpf até 6 dpf n=60 larvas, sendo 10 p/ grupo; Grupo 1: meio E3 (controle negativo); Grupo 2: D-gal (200 mM/L: 36,03 mg/mL); Grupo 3: D-gal 200 mM/L(36,03 mg/mL)+ α-terpineol 4,68 mg/L (0,00468 mg/mL); Grupo 4: D-gal 200 mM/L(36,03 mg/mL) + α-terpineol baixo 0,468 mg/L(0,000468 mg/mL); Grupo 5: α-terpineol alto 4,68 mg/L(0,00468 mg/mL); Grupo 6: α-terpineol baixo 0,468 mg/L (0,000468 mg/mL). Os resultados foram analisados pelo teste χ 2, vs. o grupo controle: * $p < 0,05$, encontrando-se diferença significativa entre os demais grupos e o grupo controle.

Figura 22 – Distribuição dos tipos de alterações morfológicas subletais em embriões 6 hpf até 6 dpf expostos a D-gal e tratados com α- terpineol



Fonte: dados de pesquisa, 2025.
Notas:
Legenda: A figura 22 expõe as alterações morfológicas em larvas de *zebrafish* expostas a D-gal e α- terpineol até 144 hpf tipificadas como sub letais adicionais: A: retardo no desenvolvimento; B: atraso na eclosão; C: ausência ou redução na pigmentação; D: má formação na notocorda; E: edema pericárdico; F: deformação/ edema do saco vitelínico e G: reabsorção reduzida da gema. E outras alterações subletais com potencial de regeneração: H: escoliose e I: lordose.

A figura 21 representa a distribuição das alterações morfológicas subletais e figura 22 a tipificação das alterações dos diversos grupos. Grupo 1: meio E3 (controle negativo); grupo 2: D-gal (200 mMol/L: 36,03 mg/mL); grupo 3: D-gal 200 mMol/L(36,03 mg/ mL) + α -terpineol alto: 4,68 mg/L (0,00468 mg/mL); grupo 4: D-gal 200 mMol/L (36,03 mg/ mL) + α- terpineol baixo: 0,468 mg/L(0,000468 mg/mL); grupo 5: α- terpineol alto :4,68 mg/l (0,00468 mg/mL) ;

grupo 6: α- terpineol baixo: 0,468 mg/L (0,000468 mg/mL) com exposição em embriões 6 hpf até 6 dpf, de forma estática.

A análise das alterações morfológicas em larvas de *zebrafish* expostas a D-gal e α-terpineol até 144 hpf evidenciam as seguintes alterações tipificadas como sub letais adicionais tais como retardo no desenvolvimento; atraso na eclosão; ausência ou redução na pigmentação; má formação na notocorda; edema pericárdico; deformação/ edema do saco vitelínico e reabsorção reduzida da gema. E as escolioses e lordoses que são classificadas como alterações subletais com potencial de regeneração. As alterações A, B e C da figura 22 foram comuns a todos os grupos, já as demais alterações foram comuns apenas ao grupo tratado com D-gal.

A seguir está apresentada a descrição dos grupos (G) com resultados do tempo de início das alterações (hpf), seguido do número de alterações (tipos), seguido dos percentuais de embriões com alterações no início e final da exposição (%). Os grupos apresentaram os seguintes resultados, G1: 72 hpf /1tipo (33,3/ 3,33%); G2: 48 hpf /9 tipos (93,3/80%); G3: 72 hpf/ 3 tipos (63,33/ 56,67%); G4: 24 hpf/ 3 tipos (56,67/ 53,33); G5: 96 hpf/ 3 tipos (70/10%); G6:96 hpf/1 tipo (43,33/10%).

A análise em relação ao percentual de embriões que apresentaram alterações finais, permite destacar que o grupo tratado apenas com D-gal foi o que apresentou maior valor (80%), quando comparado aos demais grupos E3, G3, G4, G5 e G6 (3,33%; 56,67%; 53,33%;10%; 10%) respectivamente ($p < 0,05$). Além disso, os grupos expostos apenas ao α-terpineol nas duas concentrações (G5 e G6) apresentaram tipos finais de alterações similares ao meio E3. Enquanto os grupos expostos a D-gal (200 mM/L:36,03 mg/mL) nas duas concentrações de α - terpineol (G3 e G4) foram similares entre eles e diferentes do grupo exposto ao D-gal, sendo maior que o E3 ($p < 0,05$).

Já em relação ao número de alterações tipificadas, observa-se similaridade entre o grupo E3 (1tipo) e os demais grupos G2 e G3 (1 e 3 tipos) respectivamente, diferentes das apresentadas pelo grupo D-gal (9 tipos) ($p < 0,05$). Já em relação ao início das alterações morfológicas do G2, tratado com D-gal, observa-se um início mais precoce (48 hpf) e que perduraram em 80% dos embriões até o final do experimento, enquanto os demais apresentaram início das alterações mais tardias (entre 72-96 hpf) que perduraram tempo menor, atingindo apenas 3% (Grupo E3) e 10% (Grupo 5 e 6), tratados apenas com α- terpineol. A exceção, observa-se apenas no grupo G4 (D-gal 200 mM/L :36,03 mg/ mL + α-terpineol baixo 0,468 mg/l (0,00468 mg/mL), onde o início foi a partir das 24 hpf, início mais precoce que o do grupo D-gal.

Ressalta-se, ainda, na observância da figura 22 que a D-galactose quando administrada sozinha foi capaz de provocar mais sete efeitos sub letais persistentes até o final do experimento, além do retardo no desenvolvimento (90%), como o atraso na eclosão (53,3%) e ausência ou redução na pigmentação (30%). Os demais efeitos, peculiares apenas a esse grupo, apresentaram os seguintes percentuais: Má formação na notocorda (6,67%), edema pericárdico (6,67%), edema/deformidade do saco vitelínico (3,33%), reabsorção reduzida da gema (3,33%), escoliose (3.33%) e lordose (3,33%). Observa-se que as alterações "atraso na eclosão" foi a única apresentada no grupo E3, e os demais grupos com exceção do grupo tratado apenas com D-gal apresentaram apenas mais duas "ausência ou redução na pigmentação" e "retardo no desenvolvimento".

Vale ressaltar que o grupo 3 tratado com D-gal 200 mM/L (36,03 mg/ ml) + α -terpineol (4,68 mg/l) apesar de apresentar dois tipos de alterações a mais que o grupo E3, sendo as mesmas tipificadas como "ausência ou redução na pigmentação" (43%) e "retardo no desenvolvimento" (36,67%), reduziram esse percentual a 72 hpf, chegando ao final do experimento para 3,33% e 6,67% respectivamente, permanecendo apenas a alteração atraso na eclosão.

Verifica-se também no grupo 4, uma pequena redução nos percentuais iniciais e finais das alterações "atraso na eclosão" iniciado nas 48 hpf (33%; 26,67 %) "ausência / retardo na pigmentação" (16,67 %;13,33 %) e "retardo no desenvolvimento" (13,33%; 10%) iniciados a partir das 72 hpf. Constatando-se, portanto, um maior percentual de redução nas alterações até o final do experimento para o grupo 3, quando comparado ao grupo 4, que foi tratado com a menor concentração de α- terpineol ($p < 0,05$). Já o grupo 6, que foi tratado com terpineol na concentração baixa 0,468 mg/l, apresentou similaridade ao grupo E3, de ter até o final da exposição, apenas uma larva com um tipo de alteração (retardo no desenvolvimento) e permaneceu dessa forma até às 144 hpf, enquanto o grupo 5, não apresentou similaridade ao E3.

5.4.2 Avaliação da funcionalidade do modelo de indução a senescência por D-gal em larvas de zebrafish e da ação do α- terpineol pela mensuração da atividade da enzima beta-galactosidase

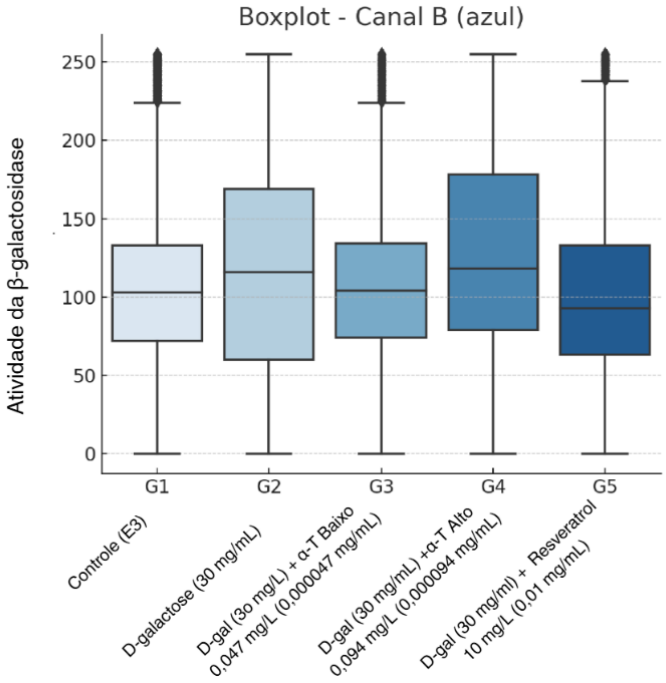
Baseado nos resultados encontrados nos testes de avaliação da taxa de mortalidade e alterações morfológicas provocadas pela D-galactose, foram montados alguns protocolos e testadas outras concentrações de D-gal e do alpha -terpineol , além das expostas anteriormente,

no entanto os resultados não foram conclusivos, pois as larvas ficaram com a coloração muito escura, atípica para o padrão metodológico exposto na literatura com uso do x-gal.

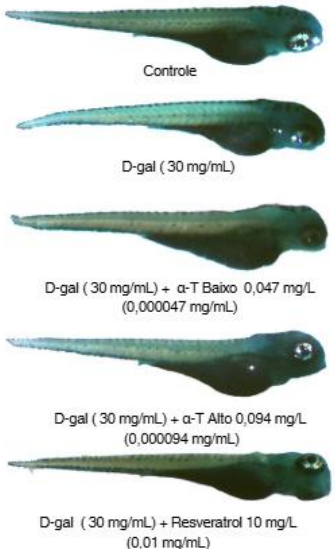
Portanto, após novos testes, seguindo novo protocolo, desenvolvemos o modelo de indução a senescência por D- galactose, cujos resultados serão expostos a seguir, com figuras que expõem dados sobre a avaliação da senescência, avaliação da sobrevivência, avaliação da atividade da atividade da catalase e da frequência cardíaca.

Figura 23 – Avaliação da atividade da enzima β-galactosidase em larvas de peixe-zebra tratadas com D-galactose e diferentes concentrações de alfa-terpineol por 72 horas

A



B



Fonte: dados de pesquisa, 2025.

Notas:

Legenda: A) Avaliação da atividade da enzima β-galactosidase em larvas de peixe-zebra tratadas com D-galactose e diferentes concentrações de alfa-terpineol no período de 72 horas mensurada pela intensidade da coloração de Unidades Arbitrárias de azul dos diferentes tratamentos. A intensidade está expressa como mediana ± desvio-padrão (n = 15/ 3 por grupo). B) Imagens representativas das larvas dos diferentes grupos experimentais. As diferentes tonalidades de azul foram produzidas pelo x- gal, substrato cromógeno evidencindo o aumento da enzima beta-galactosidase. Controle: Meio E3 (controle negativo); D-gal: D-galactose 30 mg/mL (167 mM); D-gal(30 mg/mL) + α-T Baixo: 0,047 mg/L(0,000047 mg/mL) ou D-gal 30 mg/mL + α-T Alto: 0,094 mg/L(0,000094 mg/mL) ou D-gal (30 mg/mL) + resveratrol:10 mg/L (0,01 mg/mL) (controle positivo).. Testes estatísticos de Dunn com correção de Bonferroni orm aplicados.

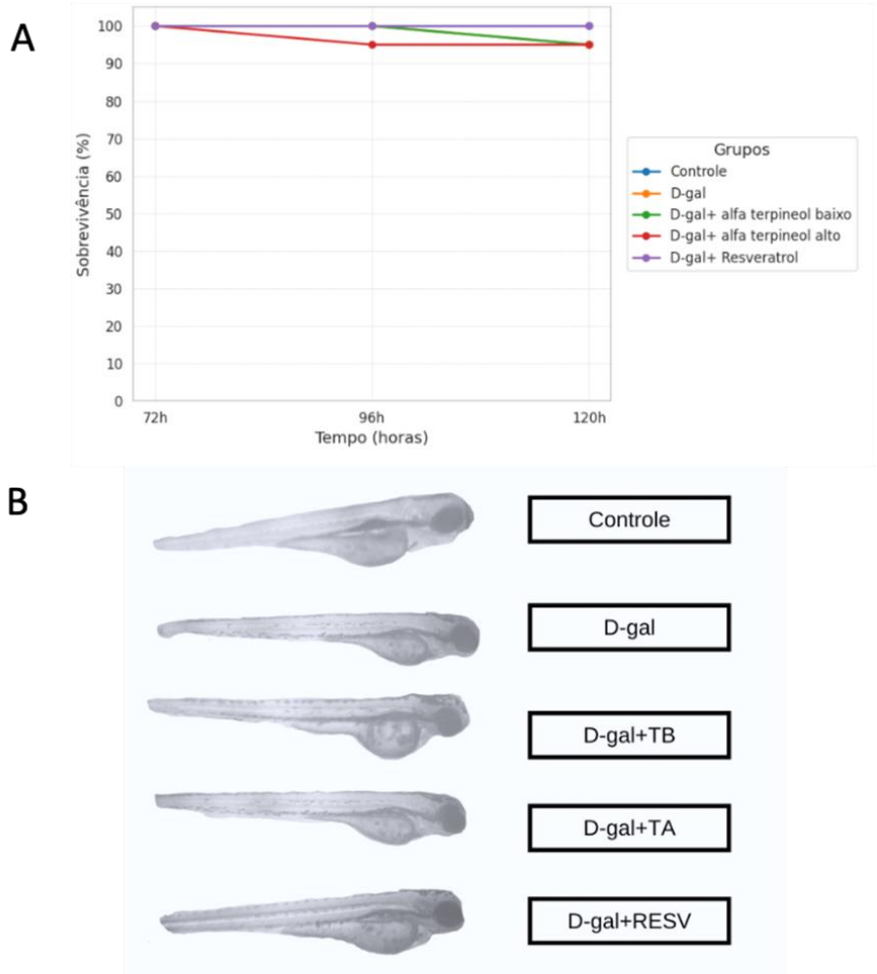
A figura 23 apresenta a atividade da enzima beta galactosidase nos diversos grupos de larvas de peixe-zebra (n=15) nos diversos tratamentos até 120 horas pós-fertilização (hpf). E a figura B mostra imagens representativas das larvas dos diferentes grupos experimentais, evidenciando as diferentes tonalidades de azul produzidas pelo x- gal, substrato cromógeno utilizado como marcador do aumento da enzima beta-galactosidase. A análise dessa figura revela resultados valiosos para o estudo.

Os resultados revelaram aumento da atividade da enzima beta- galactosidase no grupo 2 tratado com d-gal 30 mg/Ml com valor de mediana(VM) de 116, quando comparada ao grupo controle tratado com meio E3 (VM=103), comprovando aumento da senescência com o uso do açúcar. Já o grupo 3(VM=104) tratado com D-gal + α-Terpineol baixo (0,000047 mg/mL) apresentou similaridade ao grupo E3 e o grupo 5 (VM=93) tratado com D-gal + RESV (0,01 mg/mL) conseguiu ser menor que o E3, revelando que ambos atenuaram a senescência induzida por D-gal. Enquanto que o grupo 4 tratado com D-gal (30 mg/mL) + α- terpineol alto (0,000094 mg/mL) (VM=118) apresentou similaridade com o grupo tratado apenas com D-gal, não sendo efcaz em atenuar a senescência.

5.4.3 Avaliação da sobrevivência e alterações morfológicas de larvas de zebrafish expostas a D-galactose em diferentes concentrações de α- terpineol

A necessidade de avaliar se as concentrações de D-gal são seguras e se são capazes de comprometer a morfologia para esse modelo de indução a senescência proposto, conduziu aos resultados dos testes expostos na figura 24.

Figura 24 – Efeitos sobre a taxa de sobrevivência (%) e sobre alterações morfológicas de larvas expostas ao tratamento com D-galactose e ao α- terpineol em diferentes concentrações por 72 horas.



Fonte: elaborada pela autora, 2025.
Notas:
Legenda: A) Sobrevivência (%) das larvas de *zebrafish* durante o período de exposição por 72 horas expressa como média (n = 100, sendo 20 por grupo), mostrando taxas > 95% em todos os grupos. B) Imagens representativas das larvas dos diferentes grupos experimentais ao final do período de exposição (120 hpf), evidenciando padrão morfológico normal em todos os tratamentos. Controle: Meio E3 (controle negativo); D-gal: D-galactose 30 mg/mL (167 mM); D-gal(30 mg/mL) + TB : α-T Baixo 0,047 mg/L(0,000047 mg/mL) ;D-gal 30 mg/mL + TA: α-T Alto 0,094 mg/L(0,000094 mg/mL);D-gal (30 mg/mL) + resveratrol:10 mg/L (0,01 mg/mL) (controle positivo). Os resultados foram analisados pelo teste χ 2, vs. o grupo controle: $p < 0,05$, não encontrando-se diferença significativa entre os demais grupos e o grupo controle, quanto a taxa de sobrevivência e padrão morfológico.

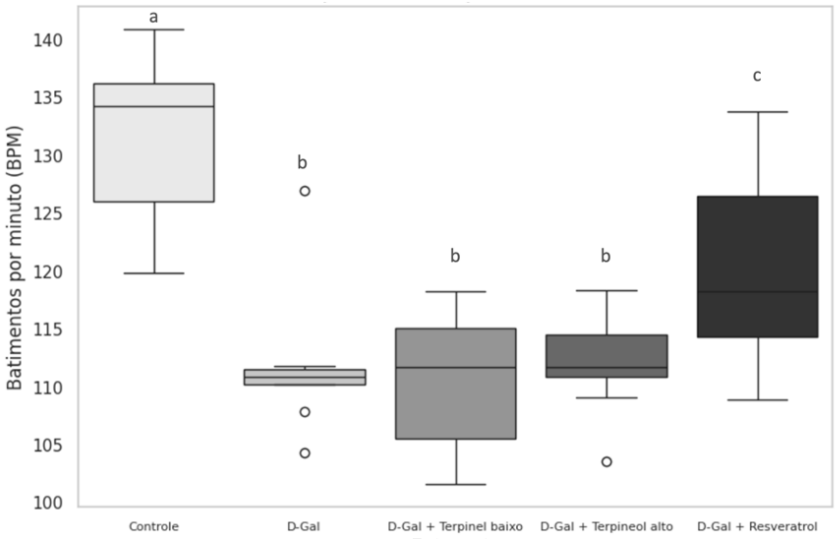
A figura 24 apresenta informações valiosas sobre a taxa de sobrevivência e morfologia de larvas de peixe-zebra expostas a D-galactose e demais compostos em diferentes concentrações. A figura 24 A expõe dados percentuais da sobrevivência das larvas de *zebrafish* durante o período de até 120 hpf. Já a 24 B refere-se a imagens representativas das larvas dos diferentes grupos experimentais ao final do período de exposição (120 hpf).

Observa-se que em todos os grupos a taxa de sobrevivência foi acima de 95 % (Figura 25A) e as imagens mostradas ao final do período de exposição (120 hpf) revelam um padrão morfológico normal em todos os grupos experimentais (Figura 24 B).

5.4.4 Avaliação da frequência cardíaca em larvas de zebrafish expostas a D-galactose e a diferentes concentrações de α- terpineol

Tendo-se obtido os resultados expostos nas tabelas anteriores em relação ao modelo de senescência induzido por D-gal, foi avaliado sequencialmente se o modelo levaria a prejuízos no sistema cardiovascular, especificamente na frequência cardíaca e se os compostos antioxidantes seriam capazes de restaurar o dano cardáco, caso houvesse. Portanto, no intuito de responder a essas questões realizou-se testes para avaliação da frequência cardíaca, com os resultados expostos na figura 25.

Figura 25 – Efeitos sobre a frequência cardíaca de larvas de *zebrafish* expostas ao tratamento com D-galactose e a diferentes concentrações de alfa-terpineol por 72 horas.



Fonte: elaborada pela autora, 2025.
Notas:
Legenda: Os resultados estão expressos como média ± desvio-padrão (n = 50, sendo 10 por grupo). Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA one way, seguido do pós-teste de Tukey. Diferença significativa com $*p < 0,05$. Controle: Meio E3 (controle negativo); D-gal: D-galactose 30 mg/mL (167 mM); D-gal(30 mg/mL) + α-T Baixo: 0,047 mg/L(0,000047 mg/mL) ou D-gal 30 mg/mL + α-T Alto: 0,094 mg/L(0,000094 mg/mL) ou D-gal (30 mg/mL) + resveratrol:10 mg/L (0,01 mg/mL) (controle positivo).

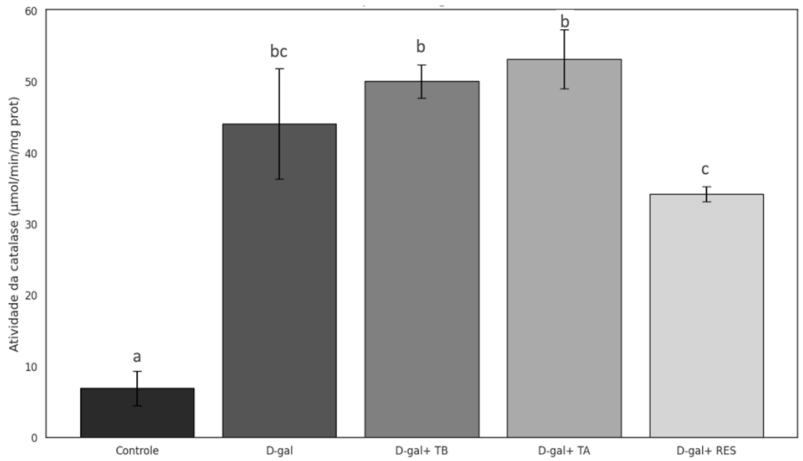
A análise da figura 25, que representa os efeitos sobre os batimentos cardíacos de larvas de *zebrafish* expostas a diferentes tratamentos, oferece um panorama claro sobre como as

alterações nas condições experimentais influenciam a frequência cardíaca dessas larvas. O grupo controle apresenta a mediana de batimentos cardíacos basais (134 BPM), indicando uma frequência saudável, possivelmente favorecida pelas condições do meio E3. O grupo de tratamento com D-Galactose foi capaz de alterar a frequência cardíaca demonstrando dano ao sistema, com valores em torno de (111 BPM) , similarmente ocorreu com os grupos 3 tratados com D-Gal + Terpineol Baixo (α-T Baixo: 0,000047 mg/mL) e o 4 ,tratado com D-Gal + Terpineol alto (0,000094 mg/mL), com redução dos batimentos cardíacos de 112 BPM e de 112 BPM, respectivamente, sendo similares ao grupo tratado com D-gal, demonstrando que os compostos não influenciaram na reparação do dano. Entretanto, o tratamento com D-Gal + Resveratrol apesar de provocar um aumento na frequência cardíaca (118 BPM) quando comparado aos grupos D-Gal, não conseguiu apresentar similaridade estatística com o grupo controle.

5.4.5 Avaliação da capacidade da D-Gal aumentar o estresse oxidativo e do α-terpineol restaurar o dano oxidativo induzido por D-galactose através de testes da catalase

O modelo de indução a senescência por D-galactose é um modelo bem caracterizado pelo aumento do dano oxidativo, portanto foram feitos testes com a catalase para avaliar se o açúcar D-gal aumenta o estresse oxidativo e α-terpineol restaura o dano oxidativo (Figura 26).

Figura 26 – Efeitos sobre a atividade catalásica em larvas de *zebrafish* expostas a D-galactose e diferentes concentrações de α- terpineol (n=50) por 72 horas.



Fonte: elaborada pela autora, 2025.
Notas:
Legenda: efeitos sobre a atividade catalásica em larvas de *zebrafish* expostas a D-galactose e diferentes concentrações de α- terpineol por 72 horas. Os resultados estão expressos como média ± desvio-padrão (n = 50/ sendo 10 por grupo) como micromoles por minuto por miligrama de proteína (µmol min/mg/proteína). Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA one way, seguido do pós-teste de Tukey. Diferença significativa com $*p < 0,05$. Os valores de atividade enzimática são expressos em µMol/g/pt. Os dados foram analisados por one-way ANOVA seguido de teste post hoc de Tukey. Controle: Meio E3 (controle negativo); D-gal: D-galactose 30 mg/mL (167 mM); D-gal(30 mg/mL) + α-T Baixo: 0,047 mg/L (0,000047 mg/mL) ou D-gal 30 mg/mL + α-T Alto: 0,094 mg/L(0,000094 mg/mL) ou D-gal (30 mg/mL) + resveratrol:10 mg/L (0,01 mg/mL) (controle positivo).

A análise dos dados apresentados na figura 26 sobre a atividade catalásica em larvas de *zebrafish* expostas a D-galactose e a diferentes concentrações de α-terpineol revela alguns dados interessantes. O grupo controle (Meio E3) apresenta a atividade catalásica mais baixa (8 µmol/min/mg.prot), quando comparado ao grupo tratado com D-gal (30 mg/mL) que apresentou valor de 45 µMol/min/mg.prot, demonstrando que a adição do açúcar aumentou a atividade catalásica em comparação com o controle. Este aumento é esperado, dado que a D-galactose pode induzir estresse oxidativo, provocando uma resposta adaptativa nas larvas.

Entretanto, os grupos D-gal (30 mg/mL) expostos ao α-terpineol baixo (α 0,000047 mg/mL) e ao α-terpineol alto (0,000094 mg/mL) demonstraram similaridade estatística de atividade catalásica com o grupo exposto apenas ao D-gal, com valores respectivos de 52 e 56 µMol/min/mg.prot. Demonstrando impossibilidade de atenuação do dano oxidativo pelo composto antioxidante. O grupo D-gal + resveratrol demonstra uma atividade catalásica reduzida (39 µMol/min/mg.prot) em relação aos grupos com α-terpineol nas duas concentrações, porém não apresenta similaridade com o grupo controle, sem propiciar atenuação total do dano oxidativo.

6 DISCUSSÃO

O envelhecimento é o fator de risco independente mais importante para doenças cardiovasculares, devido aos seus efeitos notáveis no coração e no sistema arterial (Wang *et al*., 2021). Evidências científicas mostram que as propriedades de *Anacardium ocidentalli*, *Spondias mombin*, *Mangifera indica, Malpighia emarginata* e *Carica papaya*, frutas típicas do Nordeste do Brasil, podem atuar positivamente nas vias de DCV relacionadas à idade (Alfhili; Aljuraiban, 2021; Almeida, 2024; Batool *et al*., 2018; Cheng *et al*. 2021; Duangjan *et al*., 2019; El-Far *et al*., 2022; Guo *et al*., 2020; Jiang *et al*., 2018; Khurana *et al*., 2014; Lee *et al*., 2020; Mnafgui *et al*., 2016; Ojo *et al*., 2019 ; Papanastasiou *et al*., 2017; Pastrana *et al*., 2010; Prakash; Baskaran, 2018; Rivera- Sivasinprasasn *et al*., 2016; Sousa *et al*., 2020; Tian *et al*., 2020; Umadevi *et al*., 2012; Wang *et al*., 2021).

A quimioinformática oferece novas ferramentas facilitadoras no processo de escolha de alvos para estudos *in vivo*, o estudo de quimioinformática na busca de detectar compostos ativos nas vias enzimáticas atuantes na doença cardiovascular associadas ao envelhecimento (NRF2, iNOS, NOX E COX), identificou 48 compostos potencialmente ativos presentes nas frutas e partes de suas árvores, com múltiplos alvos nessas vias. Sendo 16 escolhidos com atividade maior ou igual a 0,6, incluindo os ativos para enzima NRF2. Os compostos anteraxantina, malvidina-3,5-diglicosídeo e violaxantina apresentaram atividade para três tipos de proteínas (igual ou acima de 0,5), incluindo um valor acima de 0,7, que pode ter atividade contra proteínas envolvidas no desenvolvimento de doenças cardiovasculares e no processo de envelhecimento, dado pela primeira vez relatado na literatura. Maior ênfase é dada ao composto Cianidina-3-glicosídeo, que apresenta um valor de atividade de 0,77.

Foi possível observar que a maioria dos compostos apresentou maior atividade da enzima NRF2 acima de 0,6, indicando que esse fator nuclear é possivelmente um dos principais mecanismos de ativação do potencial redox, comprovado em estudos *in vitro* e *in vivo*, corroborando com os dados de Almeida *et al*. (2020). Também se observou que dois compostos apresentaram boa atividade para inativar iNOS, como a isomangiferina e a Malvidina-3,5-diglicosídeo. Apesar do menor valor de atividade (acima ou igual a 0,5), os compostos das frutas e partes de suas árvores apresentaram atividade para ativar ou inativar as demais enzimas.

Foram selecionados, então, alguns dos melhores resultados (Probcomb acima de 0,7) para analisar as interações no sítio ativo da iNOS e NFR2 e as interações entre os aminoácidos do sítio ativo da enzima iNOS e os compostos que apresentaram melhores valores para essa enzima, humuleno e malvidina-3,5-diglicosídeo, são próximos aos aminoácidos relatados na

literatura por Li e colaboradores (2014). Já para NRF2 foram encontrados os aminoácidos cianidina-3-glicosídeo e a mangiferina. Tais análises são importantes, pois além da identificação de novos compostos, a análise da ligação permite identificar quais compostos naturais têm o potencial de ativar a via Nrf2 e/ou inibir a expressão de iNOS, sugerindo um efeito terapêutico e dependendo do tipo de ligação e sua força, podem também prever a potência e a duração do efeito do composto, ajudando a otimizar seu uso. Ao compreender os mecanismos de interação, é possível desenvolver estratégias terapêuticas futuras, mais eficazes e personalizadas para pacientes com doença cardiovascular no envelhecimento.

Simulações de dinâmica molecular foram realizadas com os compostos de teste mangiferina, cianidina-3-glicosídeo e o alfa-terpineol, pois foi um composto que apresentou ótimos resultados no estudo *in silico* e comprovação na literatura de sua ação nas doenças cardiovasculares associadas ao envelhecimento. Nessa etapa avaliou-se a flexibilidade da enzima e a estabilidade das interações na presença de fatores como solvente, íons, pressão e temperatura. Essas informações são valiosas, uma vez que complementam os resultados de *docking* e permite avaliar se os compostos permanecem fortemente ligados às enzimas estudadas na presença de fatores encontrados na espécie humana e nos modelos animais em estudo.

Para isso, foi escolhida para análise a enzima: heterodímero NRF2-MAFG ligado ao CsMBE1 PDB: (7X5E) (Sengoku *et al*., 2022), pois os compostos em estudo Mangiferina, Ciandim-3-glicosídeo e Alfa-terpineol apresentaram maior afinidade por esta proteína. Em seguida, o RMSD foi calculado para os átomos de Cα da enzima complexada e para as estruturas de cada ligante, separadamente. A análise da RMSD demonstrou que o composto alfa-terpineol foi o segundo composto mais estável, apresentando valores de RMSD mais próximos dos valores apresentados pelo complexo proteico, e a Cianidina-3-glicosídeo foi o terceiro composto mais estável.

O composto controle resveratrol demonstrou estabilidade apenas no início da simulação. Enquanto a mangiferina foi o composto mais instável. Já ao analisar a estabilidade dos ligantes na presença de solventes, verificou-se que o alfa-terpineol foi o composto que apresentou os menores valores de RMSD, enquanto a cianidina-3-glicosídeo, o composto controle resveratrol e a mangiferina demonstraram ser os compostos mais instáveis.

Considerando que aminoácidos com flutuações acima de 0,3 nm contribuem para a flexibilidade da estrutura do canal, verificou-se que entre os aminoácidos presentes na proteína, resíduos nas posições 453–460, 462–468, 475–484, 486–494, 503, 506 e 508–558 contribuem para a mudança conformacional da proteína. Esses dados são cruciais para otimizar o *design* de

drogas, por exemplo, desenvolver drogas que se liguem melhor a proteínas alvo, aproveitando ou explorando a flexibilidade de certas regiões. Bem como compreender o mecanismo de ação, como, por exemplo, explicar como a droga afeta a proteína em nível estrutural e como isso se relaciona com a atividade biológica.

Logo, as análises com Mangiferina, Cianidina-3-glicosídeo e alfa-terpineol ligados ao alvo NRF2-MAFG foram importantes para complementar os resultados de *docking* e permitiram demonstrar que o alfa-terpineol foi o composto mais estável em relação ao alvo heterodímero ligado ao Nrf2-MafG, que também apresentou maior estabilidade, sugerindo que o composto tende a permanecer no sítio ativo mesmo na presença de fatores adversos.

Evidencia-se na literatura cientifica que os terpinoides são uma fonte subestimada de potenciais geroprotetores que podem influenciar efetivamente os mecanismos do envelhecimento e das doenças relacionadas à idade (Proshkina, 2020). Diante dos ótimos resultados expostos pelo estudo *in silico* com o α-terpineol, esse composto foi escolhido para estudos *in vivo*. Além do fato de não apresentar estudos disponíveis na literatura até o momento com a sua utilização em modelos *zebrafish* com indução ao envelhecimento por D-gal *in vivo*, nem em testes de toxicidade.

O composto é um óleo essencial encontrado em espécies de plantas tais como, *Melaleuca alternifolia*, *Salvia officinalis* e *Carthamus tinctorius*, também no mamão no terceiro estágio de maturação do fruto e na polpa da acerola. Possui efeito anti-convulsivante, antisedativo, melhora da perfusão cutânea, antinociceptivo, anti-bronquite, inseticida, anti-ulcerativo, anticancerígeno, antioxidante, melhora no sistema cardiovascular e anti-hipertensivo (Khaleel *et al*., 2018). Recentemente foi demonstrado o seu poder seneolítico em células aórticas de ratos induzidos a senescência por d-galactose (Almeida, 2024). Já em embriões de *zebrafish*, o composto reduziu efetivamente as anormalidades de desenvolvimento de embriões expostos ao MPTP, indutor de Parkisson, e também não afetou adversamente os estágios de desenvolvimento dos embriões de zebrafish (Chinnappan et al., 2025). Embora o monoterpeno ter demonstrado um leque de atividades biológicas promissoras, possui limitações importantes relacionadas à sua farmacocinética e toxicidade que precisam ser consideradas para um potencial uso terapêutico.

A literatura especifica que o α-terpineol demonstra baixa solubilidade em água, já que é um composto lipofílico. Apesar de ser diluído em álcool, a exposição em meio aquoso com DMSO, pode ter limitado a sua biodisponibilidade e absorção pelo organismo. Ademais, a sua volatilidade pode ter influenciado a sua estabilidade e a forma de administração, o que representa um desafio para o desenvolvimento de medicamentos sistêmicos. Ao passo que a sua

cristalização a baixas temperaturas, dificultaria a sua administração, situação que foi contornada com a preparação de uma solução estoque.

Na ausência de testes de toxicidade disponíveis na literatura com esse modelo animal, realizamos testes pioneiros utilizando o modelo de toxicidade embrionária do *zebrafish*, FET (*Fish Embryonic Toxicity*) (OECD, 2013). Essa modelagem têm sido amplamente utilizada em triagens do efeito tóxico de compostos bioativos e, mais recentemente, em avaliações toxicológicas de fitoterápicos (Hill *et al*., 2005; Jaysinghe; Jayawardena, 2019), devido a sua alta conservação genética com os humanos (87% de semelhança).

Dentro dessa abordagem, foram realizados, também, testes de movimentos espontâneos, como os de batimentos da cauda, que servem como indicadores de toxicidade mais sensíveis do que o "*endpoint*" (ponto final) observado. Enfatizando que mudanças na frequência desses movimentos são consideradas manifestações comportamentais iniciais de neurotoxicidade como tem sido bem relatado pela literatura (Ogungbemi *et al*., 2019; Ogungbemi et al., 2020; Tao *et al*., 2020; Weichert *et al*., 2017). Aliado a esse procedimento, foram feitos testes de frequência cardíaca, que poderia fornecer informações sobre doenças cardiovasculares causadas por concentrações de toxicantes abaixo daquelas que causam mudanças morfológicas (Cheng *et al*., 2020; Fraysse *et al*., 2006; Sun; Liu, 2017).

Explorando os resultados obtidos nessa fase, assinala-se que apesar dos dados encontrados revelarem que a LC_{50} do composto está acima de 100 mg/L (0,1 mg/mL), considerada baixa, os testes de toxidade aguda do α-terpineol em embriões e larvas de *zebrafish* nas concentrações de 1,56, 3,12 e 6,25 mg/l (0,0015; 0,0031; 0,0062 mg/mL) resultou numa LOAEL de 6,25 mg/L (0,0062 mg/mL). Embora o número de movimentos espontâneos da cauda não ser afetado nessas concentrações, não importando em prejuízos ao desenvolvimento neurológico dos embriões, o número de batimentos cardíacos por minuto (48 hpf) apresentou diferença significativa comparada ao controle na concentração 6,25 mg/l (0,0062 mg/mL), representando efeitos negativos sobre a função cardíaca. Recomenda-se, portanto, a não utilização de valores iguais ou acima dessa concentração do α-terpineol em testes futuros com esse modelo animal.

Os resultados de toxicidade com o α- terpineol foram comparados aos dados de pesquisas realizados com outros tipos de animais marinhos, como de artêmias, onde verificou-se elevada toxicidade (Rocha *et al*., 2019), e de salmão e trutas, que revelaram baixa toxicidade (Stroh *et al*., 1998). Os dados obtidos de toxicidade com o α- terpineol na nossa pesquisa, apontam para novas perspectivas para uso em estudos futuros em modelos *zebrafish*, que até então, não estavam disponíveis na literatura científica.

É válido abordar que apesar d α- terpineol ter toxicidade em elevadas concentrações em outros animais, mesmo nessas condições o composto pode vir a causar irritação na pele e nas vias respiratórias. Como comprovam dados de estudo recente que avaliou o perfil toxicogenético do α-terpineol em células vegetais, mostrando efeitos citogenotóxicos em certas concentrações, indicando a necessidade de mais pesquisas sobre a segurança a longo prazo (Khaleel *et al*., 2018). Portanto, a consideração desses aspectos é cruscial para uso de testes que visem estabelecer concentrações para uso em humanos, principalmente no contexto da doença cardiovascular associada ao envelhecimento.

Existe atualmente, uma necessidade urgente de aumentar a compreensão dos mecanismos subjacentes ao processo de envelhecimento e encontrar intervenções terapêuticas antienvelhecimento eficazes. Visto que o envelhecimento é um processo caracterizado pelo acúmulo de mudanças biológicas que ocorrem gradualmente, levando a um declínio funcional do ser humano ao longo do tempo, e que o aumento da expectativa de vida deve ser acompanhado pelo aumento de anos de vidas saudáveis, ao invés de anos adicionais com deficiências e presença de doenças.

Outrossim, existe uma necessidade premente de desenvolver modelos *in vivo* que reproduzam o envelhecimento com capacidade de rastreio de alto rendimento, identificando de forma rápida e eficiente compostos antisenescentes com potencial terapêutico associados a doenças nesse ciclo de vida, principalmente as doenças cardiovasculares. Em decorrência de efeitos notáveis de seus efeitos no coração e no sistema arterial, tornando o envelhecimento, o fator de risco independente mais importante para essas doenças.

O *zebrafish* mostrou-se ser um excelente modelo com boa relação custo-benefício nos nossos experimentos, devido ao seu pequeno tamanho, com uso de concentrações de compostos e soluções em pequenas quantidades, e a sua alta fecundidade, disponibilizando assim rapidez na obtenção de embriões. A fácil criação e estágios embrionários e larvares transparentes, também foram fatores facilitadores, pois dispensaram a utilização de técnicas mais custosas e complexas, quando comparado a outros animais, corroborando com vários achados da literatura, como o descrito por Patton *et al*. (2021).

Ademais, algumas outras vantagens levaram ao uso desse modelo animal, visto que ele tem despontado nas pesquisas que investigam os mecanismos do envelhecimento, conforme afirma Lopez-Otin *et al*. (2013). Além do fato da gerontologia ter se beneficiado significativamente da extensa caracterização da biologia básica do *zebrafish*, sendo a maior parte do seu genoma sequenciada e possuir alta similaridade com os humanos (Barbazuk *et al*., 2000; Woods *et al*., 2000). Outros pontos favoráveis para o uso desse animal, são que: ele está

sujeito a um envelhecimento gradual como nos humanos e começam a apresentar sinais de envelhecimento por volta dos 2 anos (enquanto no método em questão foi induzido ao envelhecimento em uma semana, pelo favorecimento da fisiologia do animal).

Muitas das características reconhecidas do envelhecimento demonstraram evoluir nele, abrangendo várias das teorias tradicionais do envelhecimento, conforme afirmam Kishi *et al*. (2009); Kishi (2011), e Van Houcke *et al*. (2015). A ampla disponibilidade de procedimentos experimentais específicos desse animal e recursos aumentaram significativamente os esforços na pesquisa de envelhecimento nesta espécie, como relata Gerhard (2003). Processos como sinalização redox, atividades de enzimas antioxidantes e metabolismo de lipídios são muito semelhantes em peixes, mas as principais enzimas antioxidantes geralmente estão presentes em níveis mais elevados em comparação com mamíferos (Cailliet *et al*., 2001; Gerhard, Cheng, 2002; Kelly *et al*., 1998; Winston, 1991); E por fim, ele está sujeito à oxidação de proteínas e lipídios com o envelhecimento (Van Houcke *et al*., 2017).

Não obstante a existência de vários modelos para indução da senescência em células *in vitro* e em animais com o uso da D-galactose, esse método de indução só passou a ser utilizado recentemente num modelo de envelhecimento associado a sarcopenia, em *zebrafish* adulto (Chen *et al*., 2023). Ao passo que em larvas, não temos a confirmação da senescência pelo uso apenas do D-gal como modelo de envelhecimento, apenas com cloreto de alumínio para indução ao Alzheimer, associados a variadas concentrações de d-gal e com confirmações de testes que validam tal modelo (Luo *et al*., 2024). Logo, constata-se que apesar do uso do modelo de indução à senescência por D-gal vir aumentando, nosso estudo se torna pioneiro, pois nunca havia sido testado em embriões e larvas de *zebrafish*.

Segundo evidências consolidadas na literatura científica, a avaliação de alterações morfológicas são muito relevantes na definição de novos modelos de senescência em *zebrafish*, bem como também, a taxa de mortalidade. Em decorrência desse fato, foram desenvolvidos os primeiros testes para avaliar a taxa de mortalidade com D-gal, adaptando a avaliação de alterações morfológicas dos protocolos usados por alguns pesquisadores para desenvolvimento de alguns modelos em *zebrafish* como o renomado “modelo de peixe-zebra do metabolismo oxidativo da dopamina induzido pela neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA)” usado pelo Dr. Maiquan Li da Universidade de Zhejiang, para estudar o efeito do glicosídeo de fenetil etanol na prevenção da síndrome de Parkinson.

Em sua relevante contribuição, Liu Jiao, Ph.D. da Universidade Médica de Nanjing, usou o colesterol 27-hidroxil para influenciar o comportamento neural e a senescência em peixes-zebra jovens. Enquanto o grupo de pesquisa Li Hongyan da Universidade Oceânica de

Qingdao estudou peixes-zebra e propôs que CA2, MYL2A, MYL2B e SELENBP1 poderiam ser usados como marcadores moleculares de senescência. Esses grupos avaliaram previamente a capacidade da substância causar alterações morfológicas e letalidade e usaram vários marcadores de senescência.

Todavia, apesar de priorizar nesses primeiros testes as alterações morfológicas e taxa de letalidade causada por D-gal, não foi possível utilizar marcadores de senescência, devido a alguns fatores de ordem logística. Portanto, os protocolos iniciais para os testes de taxas de mortalidade com D-gal, relacionados ao início da exposição, idade do embrião e do tempo total de exposição, bem como análise das alterações, foram baseados nos modelos de senescência utilizando álcool e peróxido desenvolvidos por Li *et al*., 2021, na mesma linha dos protocolos relatados anteriormente. Reitera-se que no período havia ausência de dados literários com protocolos com o uso de D-gal em zebrafish, uma vez que o primeiro trabalho foi publicado em 2023, com o uso de d-gal em *zebrafish* adulto (Chen et al., 2023) .

A escolha das concentrações de D-gal testadas nesse protocolo inicial, baseou-se nas usadas em estudos com diversas células de animais e de humanos, justificado pelo pequeno tamanho dos embriões. Todavia, as possibilidades das respostas no período, seriam imprevisíveis, considerando-se variáveis como concentração, início e tempo total da exposição, visto que o D-gal é um açúcar, diferente do uso de peróxido e álcool, e o uso de embriões de zebrafish é considerado um modelo mais sensível a substancias tóxicas.

Foram iniciados, portanto, testes as seguintes concentrações de D-gal 400; 350; 300; 250 e 200 Mmol/L ou seja, 72,06; 63,05; 54,05; 45,03; 36,03 mg/mL, respectivamente. As exposições foram feitas em embriões 6hpf, por 120 hpf (5 dias), durante os protocolos iniciais, cada grupo de 20 embriões foi analisado criteriosamente pelo microscópio e fotografado, para verificação de alterações morfológicas e obtenção da CL_{50} de D-gal. Alguns testes com concentrações maiores acima de 400 Mmol/L (72,06 mg/mL) foram também realizados, sem exposição de dados, já que induziu a mortalidade de todos os animais.

Mediante tais evidências, foram expostos os resultados dos testes das 5 concentrações observando-se que as concentrações de D-gal acima de 300 mMol/L (54,06 mg/mL) levaram a letalidade da maioria das larvas e provocavam alterações morfológicas em grande parte da amostra, provando que o açúcar nessas concentração compromete o desenvolvimento dos embriões. Importa destacar, no entanto, que a concentração a partir de 200 mMol/L (36,03 mg/mL) não causou a letalidade das larvas, apesar de provocar alterações subletais (edema pericárdico, atraso no desenvolvimento, atraso na eclosão, ausência ou redução na pigmentação, má formação da notocorda, deformação do saco vitelínico, reabsorção reduzida da gema,

escoliose e lordose) na maioria das larvas, dados que corroboraram com os achados de Li *et al*. (2021), confirmando que o D-gal nessa concentração provocou alterações similares a provocada por outros agentes indutores da senescência.

Dando sequência aos experimentos e seguindo o mesmo protocolo anterior, foi investigado quais seriam as respostas, em relação apenas a alterações morfológicas dos embriões (6 hpf) com o uso do alpha-terpineol em duas concentrações de 0,46 mg/L; 4,68 mg/L (0,00046 mg/mL; 0,0046 mg/mL), frente a exposição ao D-gal (120 hpf) na concentração de 200 mMol/L (36,03 mg/mL). Visto que o uso de D-gal no estudo provocou o fenômeno da curvatura da coluna, considera-se que provavelmente esse efeito poderia ter sido causado por condições musculares anormais, o que é consistente com as características humanas na morfologia, corroborando com resultados demonstrados na literatura. Dentre as similaridades relacionadas às alterações morfológicas encontradas no grupo D-gal no uso desse protocolo durante o nosso estudo e os citados acima, pode-se destacar a lordose e a escoliose (Kishi *et al*., 2008; Li *et al*., 2021; Tsai *et al*., 2007).

Pode-se afirmar que tanto os animais *zebrafish* envelhecidos naturalmente, exibem curvatura espinhal (Rosa *et al*., 2010), bem como aqueles submetidos a indução ao envelhecimento acelerado com utilização de D-gal. Apesar da exposição dos embriões ao D-gal e ao α- terpineol 4,68 mg/L (0,0046 mg/mL), poder ter permitido que eles tivessem uma menor diversidade de alterações (3), estadiamento do aparecimento das alterações quando comparados aos demais grupos (72 hpf) e redução da permanência de duas alterações, a um percentual mínimo (3,33% e 6,67%), configurando uma tentativa do terpineol restaurar o dano morfológico, porém não observou-se similaridade estatística com as alterações apresentadas no grupo E3. Quando comparamos o uso do composto na reversão de alterações morfológicas provocadas por um indutor de Parkison em embriões e larvas de *zebrafish*, constata-se dados similares ao nosso estudo, uma vez que o composto foi capaz de causar atenuação das anormalidades fenotípicas e aumentar a taxa de eclosão (Chinnappan et al., 2025).

Posteriormente, testou-se esse mesmo protocolo, incluindo, porém, testes de senescência com avaliação da atividade da enzima SA-β-gal. Todavia, os resultados não foram expostos, uma vez que a atividade da enzima não pôde ser corretamente avaliada, devido a uma anormalidade na coloração de azul com o uso do x-gal, caracterizando-se muito escura em todo o corpo das larvas, com resultados diferentes do padrão apresentado pela literatura, além de comprometer o padrão fotográfico.

Consequentemente, reformulou-se o protocolo, com o intuito de evitar tais efeitos indesejados, com redução do tempo de exposição e em diferente estágio de desenvolvimento

dos animais, uma vez que nos estudos anteriores o início da exposição ocorreu em embriões 6 hpf. Desenvolvendo-se assim o protocolo final para o desenvolvimento do modelo de senescência com larvas de *zebrafish* expostas a d-gal por 72 horas e confirmando-se a senescência com a concentração de 167 mM ou 30 mg/mL. Fazendo uma análise comparativa a outros estudos, observa-se que no estudo de Chen *et al*., 2023, com o uso de D-gal num modelo de sarcopenia induzido por d-gal em *zebrafish* adulto, os animais apresentaram sinais consideráveis de senescência no músculo esquelético após a imersão por 4 semanas em solução de D-gal a 0,8 mg/mL, mas com tempo e modo de exposição bem diverso do nosso estudo, dada a idade do animal. Além disso, o marcador para confirmação da senescência utilizado no estudo foi diferente do utilizado no nosso estudo. Já quando partimos para a comparação com modelo em larvas de *zebrafish*, temos um estudo que induziu ao Alzheimer com uso conjunto de cloreto de alumínio e d-gal, com confirmação da senescência nas concentrações de d-gal proximas a que utilizamos. Apesar disso, difere quanto ao uso adicional do cloreto de alumínio ao d-gal , quanto a sua metodologia e quanto a presença de alterações morfológicas no grupo senescente em seus seus resultados (Luo et. al., 2024). Toda essa discussão torna-se relevante na construção de protocolos para novos modelos de indução a senescêcia, devido a necessidade da padronização de novos modelos de senescência induzidos por d-gal nesse modelo animal.

Já comparando apenas a presença de alterações morfológicas, sem confirmação da senescência, encontradas nos resultados dos protocolos iniciais da nossa pesquisa com concentrações maiores de D-gal, constata-se semelhanças com os resultados de Rosa *et al*. (2010), ressaltando-se que provavelmente essas alterações podem ter sido provocadas por prováveis mudanças estruturais musculares, causadas por D-gal. Possivelmente, o açúcar pode ter modificado estruturalmente os animais causando lordose , escoliose, edema. No que concerne a pesquisas com células de outros animais e humanas *in vitro*, relata-se que a indução à senescência com D-gal confirmados pelo aumento da enzima SA-β-gal, foi efetivada usando concentrações diferenciadas (8,0 mg/mL; 9,91 mg/mL; 18,02 mg/mL) das do nosso estudo (36,03 mg/mL). Esses achados com alterações morfológicas encontradas no grupo D-gal corroboram com os resultados anteriores e os expostos na literatura com estudos com larvas submetidas a senescência por diversos métodos de indução. (Kishi et al., 2008; Li et al., 2021, Tsai et al., 2007).

Convém pontuar que nesses estudos descritos pela literatura, em tecidos de animais tratados com d-gal, observou-se degeneração celular, aumento da vacuolização citoplasmática, aumento da lipofuscina, ao passo que em estudos *in vitro* em células humanas e de mamíferos, aumento do tamanho e achatamento celular, maior granulosidade citoplasmática, redução da

densidade celular e alteração de adesão ao substrato, alteração no citoesqueleto d actina e reorganização celular (Azman; Zakaria, 2019).

Reforça-se que a escolha do método de envelhecimento, de indução à senescência por D-gal, adotado nesta pesquisa pode ser justificado por ser baseado na teoria do estresse metabólico, e por vir merecendo destaque na literatura, dentre os modelos experimentais *in vitro* propostos para investigar a senescência celular e por suas diversas vantagens (Azman; Zakaria, 2019). Por conseguinte, os dados da nossa pesquisa revelam que o modelo proposto exibiu uma alta taxa de sobrevivência entre os animais, e mostrou ser de simples execução com um tempo curto, e custo relativamente baixo, devido as baixas concentrações necessárias de todos os compostos e reagentes utilizadas no modelo, quando comparado a outros animais maiores. Dentro desta perspectiva, é evidenciado que o trabalho corrobora com as abordagens experimentais em estudos em animais e *in vitro* (Budni *et al*., 2017; Chen *et al*., 2023; Cui *et al*., 2006; Gao *et al*., 2015; Dulcy *et al*., 2012; Hsieh *et al*., 2011) que testificam o aumento na sua escolha, baseado na sua conveniência, menos efeitos colaterais e maior taxa de sobrevivência ao longo do período experimental (Azman; Zakaria, 2019), quando comparado a outros modelos animais.

Enfatiza-se, ainda, que em relação aos efeitos danosos da d-gal, a literatura registra que o açúcar redutor, que se combina com a glicose para formar o nutriente lactose, é digerido e absorvido em condições normais pelo corpo. No entanto, pode provocar distúrbios metabólicos e, eventualmente, levar ao envelhecimento no caso de acúmulo excessivo, podendo se converter em aldose, peróxido de hidrogênio e galactose oxidase, resultando na geração de ânion superóxido e de radicais livres derivados de oxigênio. Portanto, a inflamação, apoptose, parada do ciclo celular o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio são características do modelo de envelhecimento acelerado, induzido pela D-(+)-galactose (Dgal) (Hu *et al*., 2015).

Em consonância com esse entendimento, é comprovado que o estresse oxidativo crônico reduz a expectativa de vida em muitas espécies e leva ao envelhecimento acelerado, e que ele está relacionado a condições de perda muscular neurodegeneração, alterações do sistema cardiovascular, sistema nervoso, condições relacionadas ao envelhecimento (Kish *et al*., 2008), com fenótipos que se assemelham aos sinais naturais do envelhecimento, incluindo danos endoteliais, conforme relata Azman e Zakaria (2019). Ademais, pode-se destacar outro diferencial, quando compara-se o uso desse modelo de envelhecimento no zebrafish com outros animais como ratos, camundongos, que são moldados por injeção in vivo, o que tende a causar danos adicionais aos mesmos, podendo induzir à inflamação abdominal. Ao passo que no peixe-zebra, que é um animal aquático, a exposição é realizada por imersão nos compostos,

podendo ter favorecido a alta eficiência de absorção, descrita na literatura por Zhao *et al*. (2021).

Para comprovação de senescência no nosso trabalho, foi utilizada como uma ferramenta metodológica, testes com o corante cromogênico x-gal, que pela intensificação da coloração azul, testifica o aumento da enzima β- galactosidase, como tem sido observado vastamente na literatura (Kischi *et al*., 2008). Adiciona-se ainda que apesar de ser um marcador generaizado da senescência, a expressão aumentada da enzima SA-β-gal associada à senescência, é um marcador de envelhecimento que tem aumentando linearmente no tecido da pele de zebrafish entre 5 e 57 meses de idade (Kishi *et al*., 2003; Tsai *et al*., 2007) e ser detectado da mesma forma em fatias de cérebro de peixes de 26 meses, em comparação com animais de 8 meses (Arslan-Ergul *et al*., 2016).

Considerando portanto, os dados obtidos no desenvolvimento do nosso modelo pela ação do açúcar d-galactose (30 mg/mL) no aumento da enzima beta-galatosidase, observa-se o reforço na associação desse composto a efeitos negativos que potencialmente levam ao envelhecimento celular, como bem descrito na literatura. No entanto, deve-se considerar que além desse marcador universal de senescência, vários estudos sobre envelhecimento com D-gal tem demonstrando aumento no uso de outros marcadores de envelhecimento, como produtos finais de glicação avançada (AGE), receptores para produtos finais de glicação avançada produtos (RAGE), aldose redutase (AR), sorbitol desidrogenase (SDH), encurtamento do comprimento dos telômeros, atividade da telomerase, enzima de clivagem da proteína precursora de amiloide do sítio beta 1 (BACE-1), beta amiloide proteína (Ab1-42), genes associados à senescência (P16,P21, P53, P19Arf, P21Cip1/Waf1) (Shwe *et al*., 2018).

Enfatiza-se, nessa abordagem, que a valorização dos dados do nosso estudo, seria mais expressiva com o uso de marcadores da expressão dos genes p53 e p21, identificadores de danos ao DNA, que ativam a via de apoptose após danos ao DNA e causam apoptose celular e envelhecimento biológico. Uma vez que a p53 é uma proteína de estresse que é rapidamente regulada positivamente após estimulação celular, ativando o gene p21, inibindo assim a atividade de ciclinaA/ECDK2 e impedindo a fosforilação de RB e a progressão do ciclo celular. Marcadores da p53/p21 e de várias vias de senescência celular induzidas por estresse oxidativo envolvem as mudanças da expressão do gene p53/p21. Consequentemente, quando a D-gal foi utilizada como um indutor da senescência , o peróxido poderia induzir danos ao DNA e ativar a via de sinalização p53/p21 por meio do estresse oxidativo.

Contextualizando ainda para o aprimoramento dos resultados, a realização da análise da atividade telomeral, que surge como uma restrição metodológica, contribuiria de forma

exponencial, uma vez que o encurtamento telomeral traduz danos ao DNA nuclear e mitocondrial que aceleram a senescência. Conquanto, os mecanismos de reparação são eficazes, o dano celular pode ser reparado. Ou seja, quando esses mecanismos falham, o DNA danificado se acumulará, obstruindo a função celular e causando senescência. Todas essas características celulares podem ser consideradas como marcas (ou possíveis biomarcadores) de senescência (Bernadotte, 2016; Zhang *et al*., 2007).

Ainda, de notável importância para a pesquisa, seria a análise quantificada de espécies reativas de oxigênio, subproduto natural do metabolismo normal do oxigênio, e que parecem exercer um papel duplo no envelhecimento (Lapointe, Hekimi, 2010), apesar de outros estudos demonstrarem seus efeitos deletérios (Skibska; Goraca, 2015). Essa espécies regulam vários aspectos fisiológicos, especialmente os mitocondriais e além deles outras substâncias mitocondriais efetoras causam alterações redox e alteração do metabolismo (Pole *et al*., 2016). Tais análises, portanto minimizariam a chance de ocorrência de falsos positivos na interpretação da atividade da enzima SA-β-gal.

Outra abordagem que vêm ganhando evidência no cenário de pesquisas no envelhecimento associado a doenças é o o uso de senolíticos e senomórficos. Uma vez que senolíticos eliminam seletivamente células senescentes ao induzir sua apoptose (ex.: inibição de vias antiapoptóticas como BCL-2/BCL-xL; bloqueio de interações pró-sobrevivência p53–FOXO4). Por outro lado, os senomórficos não as eliminam, mas atenuam o fenótipo senescente, em especial a SASP (senescence-associated secretory phenotype), modulando vias como mTOR e JAK/STAT. Em roedores, senolíticos são capazes de reduzirem a carga de células senescentes e melhorarem a função tecidual (metabolismo, fragilidade, fibrose, vasculatura). enquanto senomórficos diminuem SASP/ inflamação e preservam função em múltiplos órgãos. Em síntese, a escolha entre apoptose (senólise) ou modulação (senomorfia) depende do tecido-alvo, janela de segurança e objetivo terapêutico (Saliev; Singh, 2025).

Algumas novas estratégias têm sido comprovadas de ação senoterapêutica de alguns outros compostos (Smer-Barreto *et al*., 2023) e alguns têm destaque por atuarem como senolíticos. Dentre eles, evidencia-se um papel peculiar para a quercetina e fisetina (Chaib *et al*., 2022; Robbins *et al*., 2021). Ambas mostraram potencial para mitigar fenótipos de envelhecimento e doenças associadas em roedores e outros modelos. Em suma, as evidências translacionais apontam que a modulação ou remoção de células senescentes é tecnicamente viável e biologicamente relevante, mas ainda requer padronização de biomarcadores e definição de protocolos de dose e periodicidade antes de ampla aplicação clínica. O teste prévio de toxicidade com terpineol realizada no nosso estudo, confirmam os resultados encontrados nessa

fase posterior, uma vez que as alterações morfológicas e na frequência cardíaca com o α-terpineol nos nossos testes de toxicidade foram observadas apenas em concentrações bem mais elevadas de 6,25 mg/L (0,0062 mg/mL), enquanto o uso de concentrações menores se comportaram mais similares ao grup E3.

Avaliando-se, portanto, a ação dos compostos utilizados na nossa pesquisa, num enfoque de geroprotetores, os resultados aqui obtidos evidenciam o provável poder do α-terpineol no grupo 3 D-gal + α-Terpineol baixo 0,047 mg/L (0,000047 mg/mL) e do 5 (D-gal + resveratrol 10 mg/L (0,01 mg/mL) reduzirem a senescência induzida por d-gal (30 mg/ml). Esses dois compostos foram pela primeira vez testados em larvas de *zebrafish* no modelo de envelhecimento induzido por D-gal, bem como confirmados, pela redução da atividade da enzima beta -galactosidase nos referidos tratamentos. A coloração do canal azul reduzida no tecido corporal das larvas induzidas a senescência e tratadas com os compostos, confirma a redução desse processo de senescência nos animais. Outro estudo comprovou destaque para a ação do α-terpineol em 4 concentrações (0,00000015 mg/mL; 0,0000015 mg/mL; 0,000015 mg/mL; 0,00015 mg/mL) em diminuir o número de células aórticas senescentes de ratos quando comparadas ao grupo tratado apenas com D-gal (Almeida, 2024). A concentração de 0,000015 mg/mL foi a que se aproximou mais da utilizada no nosso estudo com poder contra a senescência (0,000047 mg/mL).

Alguns pontos suscetíveis de aperfeiçoamento nessa linha de investigação da nossa pesquisa, podem ser mencionados aqui, pois a redução da atividade da beta galactosidase na concentração menor de α-terpineol, merece ser associada a testes complementares com outros marcadores para comprovação da sua ação em vias senolíticas ou senomórficas. Por exemplo, avaliando-se, se há inibição de vias antiapoptóticas como marcadores para BCL-2/BCL-xL ou bloqueio de interações pró-sobrevivência como marcadores para p53–FOXO4. De igual modo, a análise de marcadores para observar se o composto modula as vias mTOR e JAK/STAT tornaria nossos dados mais robustos. Por conseguinte, compostos que possuem essas ações, são de grande interesse nas pesquisas que abordam envelhecimento e saúde, uma vez que a redução de células senescentes podem potencialmente reverter ou melhorar condições relacionadas a idade, promover a regeneração tecidual e aumentar a longevidade saudável em humanos. apesar do estudo utilizar células de ratos.

A enzima CAT catalisa a conversão do radical livre H2O2 em água nos peroxissomos (Krysko *et al*., 2010), logo, foi investigado o seu comportamento no modelo para avaliar o poder de dano oxidativo do D-gal e os prováveis papéis reparadores dos antioxidantes. No entanto,

deve-se considerar que vários fatores podem interferir no comportamento catalásico e no seu aumento perante o estresse oxidativo na senescência

Podendo ser uma resposta adaptativa pelo acúmulo de peróxido, e mecanismos de detecção de espécies reativas de oxigênio, na tentativa de restaurar o equilíbrio redox, como ocorreu em estudo com fibroblastos senescentes por Chen *et al*. (2004). A disponibilidade de co-fatores capacidade de síntese, como o co-fator heme,o limite de resposta que ocorre durante o processo de senescência, pelos danos as mitocôndrias, DNA, proteínas etc., que podem vir a afetar a produção da catalase, justificando que mesmo na presença de antioxidantes, a célula pode tentar aumentar a catalase, mas não obter êxito.

Os resultados com aumento da atividade catalásica, encontrados no desenvolvimento do modelo de indução a senescência por D-gal, podem ser interpretados como uma resposta compensatória ao estresse oxidativo persistente, como demonstrado no trabalho de Chen *et al*. (2004) com aumento da expressão de catalase (e de SOD e HSP27) em fibroblastos humanos induzidos a senescência com H_2O_2, mas apenas depois que as características completas de senescência se manifestaram. Tais resultados do alpha -terpineol não ter reduzido a atividade da catalase nos grupos tratados com d-gal, não invalida a sua ação antioxidante, observada em outros estudos, podendo inferir que o composto pode atuar em outras vias, como por exemplo estimular defesas endógenas, como a via do NRF2, ou atuando na redução de outros marcadores (ROS, NOX).

Já um aumento dos seus níveis de atividade também foi descrito em larvas de *zebrafish* após a exposição a substâncias tóxicas, mas após as primeiras 24-48 horas, uma vez que a substância induziu à produção de espécies reativas de oxigênio e aumentou a atividade de outras enzimas de defesa, possivelmente refletindo danos aos sistemas antioxidantes devido ao estresse oxidativo (Jiang *et al*., 2018). Alterações substanciais em *zebrafish* adultos induzidos ao envelhecimento com D-galactose, incluindo redução da área transversal do músculo esquelético, aumento da fibrose tecidual, diminuição da motilidade, aumento das espécies reativas de oxigênio no músculo esquelético foram encontrados nesses animais (Chen *et al*., 2023).

Tem sido bem descrito que o estresse oxidativo é um fator patogênico chave no desenvolvimento e progressão de diversas doenças, incluindo doenças cardiovasculares, inflamatórias, neurodegenerativas e processos de envelhecimento, caracterizado pela presença de espécies reativas de oxigênio em alta biodisponibilidade (Touyz, 2000). Sendo também de conhecimento da comunidade científica que os antioxidantes desempenham um papel crucial

na manutenção da saúde humana, protegendo as células contra danos oxidativos ao neutralizar radicais livres e mitigar o estresse oxidativo (Adorjan; Buchbauer, 2010).

Contudo, espécies reativas de oxigênio parecem ter um duplo efeito, atuando primeiramente, como ativadores de uma resposta compensatória homeostática que aumenta com a idade para manter a sobrevivência, através da indução de vários mecanismos de defesa, sobrevivência celular e, a partir de certo ponto, como um fator exacerbador dos danos associados ao envelhecimento (Lapointe; Hekimi, 2010). Portanto, a manutenção dos níveis de espécies reativas de oxigênio durante o envelhecimento pode levar a benefícios inerentes ao controle do destino celular (Lennicke; Cochemé, 2021). A quantificação de espécies reativas de oxigênio no estudo, e de outras enzimas antioxidantes em todos os grupos, em tempos diferentes do tratamento, como no início e no final, traria mais robustez aos dados, complementando assim os testes com a atividade da catalase, com testes com a comprovação do aumento de espécies reativas de oxigênio no grupo D-gal e redução nos grupos tratado com o α-terpineol e com o resveratrol.

Reitera-se ainda que determinadas condições do nosso estudo merecem ser interpretadas cuidadosmente, como o resultado que constatou o aumento da enzima catalase nos dois grupos tratados com α-terpineol, com comportamento similares ao do grupo D-gal. Pois tais dados podem ter sido influenciados pelo fato de que concentrações em excesso de antioxidantes, também poderiam levar ao aumento do estresse oxidativo. Seria recomendável, portanto testes com o uso do alpha-terpineol nas duas concentrações isoladas.

Não obstante aos resultados obtidos com alpha terpineol, outros resultados se diferenciam dos dados achados no nosso trabalho, constituindo ao composto um papel de destaque na literatura, pela sua atividade antioxidante significativa, como os descritos a seguir: Redução de espécies reativas de oxigênio em embriões e larvas de *zebrafish* induzidos ao Parkison e tratados com o composto na concentração de 0,000046 mg/mL (Chinnappan et al., 2025); Supressão na produção de superóxido por monócitos estimulados por agonistas, embora não tenha apresentado efeito similar em neutrófilos (Brand *et al*., 2001); Seu uso como agente conservante eficaz em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos, prevenindo a degradação oxidativa de seus componentes (Bicas *et al*., 2001); Ação na concentração de 0,00015 mg/mL em células endoteliais aórticas de ratos induzidos a senescência por D-galactose (Almeida, 2024), assinalando que esse resultado obteve-se com uma concentração maior do que as utilizadas no estudo e em células; efeito antioxidante induzido em ratos tratados com L-NAME (Sabino *et. al*., 2013).

Considerando-se o fato da indisponibilidade de dados científicos sobre o efeito do resveratrol contra os danos advindos do estresse oxidativo nesse modelo de indução ao envelhecimento em sistema modelo *zebrafish*, torna-se relevante uma breve discussão sobre o seu efeito nesse animal e nas mesmas concentrações utilizadas na nossa pesquisa 0,01 mg/L (10 mg/L). Logo, o estudo referido na literatura comprovou a sua ação contra o dano cardíaco, destacando-se que o composto mitigou efetivamente o estresse oxidativo e a apoptose em células do coração de larvas de *zebrafish*, induzidos pelo fungicida PEN (Jiang *et al*., 2023), enfatizando que o tempo de exposição foi diferente do da nossa pesuisa e não avaliou danos provocados pela senescência.

Linhas de investigação com uso de outras concentrações de resveratrol, demonstraram que o composto protegeu contra defeitos cardíacos, inibindo o estresse oxidativo no *zebrafish* exposto a PM2,5 e álcool, indicando o uso potencial de resveratrol como tratamento antioxidante (Almeida *et al*., 2021; Ren *et al*., 2020; Wang *et al*., 2019). Não obstante os efeitos positivos observacionais do resveratrol descritos na literatura, infere-se que no estudo ele não foi capaz de atenuar o estresse oxidativo, urgindo a necessidade do uso de um outro controle positivo eficaz e/ou utilizando-se mais duas concentrações do composto. Seguindo a mesma linha de raciocínio da hipótese da ação do α-terpineol, vislumbramos a probabilidade do resveratrol, ter atuado como pro- oxidante, nessa concentração, ou não está na concentração adequada para o tempo de exposição. Estudos com controles positivos são imprescindíveis, para melhor interpretação dos resultados.

De modo sintetizado pode-se inferir que, apesar dos dados comprobatórios desses agentes como antioxidantes, as concentrações utilizadas com esses dois compostos no nosso estudo, não foram capazes de reparar o dano oxidativo causado por D-gal, com o uso apenas de um método de avaliação da capacidade antioxidante, aferido pela atividade da catalase. O uso de testes adicionais comprovando com outros marcadores suas ações antioxidantes, levariam a comprovação da ação ampla e total, associada a ação antisenescente dos compostos, constatada pelo aumento da beta galactosidase no grupo D-gal e redução nos demais grupos.

Torna-se essencial salientar que aliado ao fato do modelo desenvolvido ser um método novo, com indisponibilidade de mais estudos sobre a magnitude do dano oxidativo causado pela d-galactose, temos algumas peculiaridades biológicas inerentes ao modelo *zebrafish*, remetendo assim a necessidade de mais testes, utilizando outras concentrações dos antioxidantes, bem como de outros marcadores do estresse oxidativo, como SOD, GPX, e marcadores da expressão do NRF2, que vamos abordar com mais propriedade a seguir. Esses testes contribuiriam para

que pudéssemos ter a possibilidade de resultados positivos na ação desses compostos contra o dano oxidativo no envelhecimento induzido por D-gal.

O NRF2 é indubitavelmente uma das vias mais cruciais para as células lidarem com o estresse oxidativo gerado a partir da exposição a produtos químicos exógenos e endógenos (Silva-Palacios *et al*., 2016; Zhang *et al*., 2015), por ser um fator que liga ao elemento de resposta antioxidante na região promotora de uma série de genes, codificando para a fase I e a fase II enzimas antioxidantes e proteínas citoprotetoras. Portanto, é considerado o principal regulador do sistema enzimático antioxidante, pela indução da transcrição de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPx) (Halliwell, 2024). De modo geral, este sistema é o principal mecanismo de defesa contra a produção de EROs. Dados confirmados na literatura científica da regulação positiva da expressão desse gene em larvas de *zebrafish* expostos a um poluente ambiental constataram que as expressões do gene Nrf2 e heme oxigenase-1 (HO-1) foram maiores significativamente em comparação com o grupo controle. Alguns compostos antioxidantes podem reduzir significativamente o estresse oxidativo induzido pelo envelhecimento em corações de ratos envelhecidos induzidos por D-galactose, induzindo a via NRF2 como relata Bo-Htay *et al*. (2018) em seu estudo de revisão.

Foi constatado por nosso estudo de quimioinformática que o α-terpineol está ativo nessa via e na inativação da iNOS, apresentando ótimos resultados relacionados a dinâmica molecular do heterodímero NRF2-MAF-G ligado ao composto. Portanto, a realização de testes para avaliar a expressão especificamente do NRF2b em larvas de *zebrafish*, por RT-qPCR, western blot, consolidaria o ciclo dos achados da quimioinformática e a sua associação com os estudos *in vivo*, tornando o trabalho mais robusto integrando a quimioinformática com a biologia experimental.

Contextualizando a associação do envelhecimento com associação a danos sistêmicos. Demonstra-se que em consequência dos danos deletérios das doenças cardiovasculares no coração e no sistema arterial, o envelhecimento torna-se o fator de risco independente, mais importante para essas doenças (Fajemiroye *et al*., 2018). Aliado a esse fato, temos um componente importante, das doenças cardiovasculares aumentarem o risco de mortalidade e morbidade em todo o mundo (Mayet; Hughes, 2003; Wang *et al*., 2010).

Concernente ao envelhecimento especificamente do sistema cardiovascular no *zebrafish*, há evidências científicas que demonstram que o coração do *zebrafish* envelhece paralelamente ao dos humanos e sabe-se que o miocárdio, sua vascularização e sua função contrátil degradam com o avanço da idade (Sun *et al.,* 2017). Além disso, *zebrafish*

envelhecidos exibem maior densidade miocárdica do ventrículo e vasos do epicárdio menores do que o do *zebrafish* jovem. Consequentemente, hipertrofia cardíaca e disfunção comparável a doenças cardiovasculares que se manifestam em humanos (Khor, *et. al*., 2019).

Alguns métodos são utilizados como marcadores da função cardíaca em *zebrafish*, como a impedância elétrica de cardiomiócitos, usada como um índice quantitativo para analisar a senescência. Assim, tanto a condutância do citoplasma quanto a capacitância da membrana celular mostraram aumentar monotonamente em célula entre 3 e 18 meses de idade (Cha *et al*., 2016). Portanto, é comprovado que no *zebrafish*, as modificações funcionais relacionadas à idade são altamente associadas com mudanças fisiopatológicas no coração, não muito diferente do declínio progressivo das funções cardiovasculares, levando ao aumento do risco de hipertensão, aterosclerose e enfarte do miocárdio presentes em humanos.

Complementando a abordagem sobre marcadores, o uso da frequência cardíaca do *zebrafish*, se destaca, e tem demonstrado ser significativamente reduzida, com um aumento nas arritmias cardíacas ou batimentos cardíacos irregulares em animais de 52 meses em comparação com os de 8 meses. Há também um aumento das dimensões ventriculares endodiastólica, concomitante com uma diminuição na complacência ventricular e relaxamento prejudicado durante o envelhecimento.

Apesar de poder-se argumentar que essas diferenças estruturais proeminentes entre o coração humano e o de *zebrafish*, esse animal possui um sistema de condução cardíaca semelhante ao coração humano e a frequência cardíaca é controlada por um grupo de células marcapasso na região sinoatrial. A frequência cardíaca, bem como a forma do potencial de ação ventricular, são semelhantes ao correlato humano. Isso contrasta fortemente com outros sistemas de modelo, como camundongos, cujas frequências cardíacas e características de repolarização diferem fundamentalmente do coração humano.

Assim, o peixe-zebra é um modelo interessante e complementar para estudar distúrbios eletrofisiológicos, como a síndrome do QT longo, onde a fase de repolarização após o batimento é anormalmente lenta, onde, onda Q, representa o início da despolarização ventricular, e o fim da repolarização (onda T). Evidencia-se em estudo disponível na literatura que o desenvolvimento de força no miocárdio ventricular de peixe-zebra adulto requer não apenas o fluxo transsarcolemal de Ca^{2+}, mas também a ciclagem de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático intacto. Em contraste com os mamíferos, a relação de força de contração do miocárdio e relacionada a frequência de estimulação é fortemente negativa no coração do peixe-zebra. Esses aspectos precisam ser considerados ao usar o peixe-zebra para modelar doenças humanas de contratilidade miocárdica (Stoyek *et al*., 2018).

A análise da frequência cardíaca na pesquisa frente a ação da D-galactose, permite constatar que esse açúcar impactou negativamente na função cardíaca, demonstrando parcialmente, a relação da senescência provocada por D-gal com a doença cardiovascular, uma vez que diminuiu a frequência cardíaca, talvez pelo fato de ser um agente potencialmente estressante. Esses dados corroboram com a evidência de que o ritmo cardíaco anormal é a disfunção cardíaca mais comum no peixe-zebra, incluindo bloqueio atrioventricular, contração prematura, taquicardia e bradicardia (Shen *et al*., 2019). Pesquisas comprovam o poder de impacto negativo da D-galactose no sistema cardíaco de animais, bem como o efeito benéfico do α-terpineol nesse sistema em outros modelos animais.

A literatura expõe dados amplos e concisos sobre a ação do D-gal sobre o sistema cardiovascular, como relata-se a seguir. A D-gal administrada em ratos induzidos ao envelhecimento aumentou o peso total do coração e do ventrículo esquerdo, um fenômeno comum associado a condições como elevação da pressão arterial e envelhecimento e foi capaz de ativar outras vias de envelhecimento como a via inflamatória, bem como danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA) e vias de resposta e reparo (Azman; Zakaria, 2019).

Há evidências científicas do dano do D-gal, provocando disfunção endotelial em vasos sanguíneos de pequeno calibre e em artérias de grande calibre, como a aorta. Além disso, pesquisas demonstram que o D-gal induz remodelamento patológico em órgãos essenciais, incluindo coração, rins e fígado (Azman *et al*., 2021; El-Far *et al*., 2020; Wang *et al*., 2022). Estudos recentes conduzidos por Rezende e colaboradores demonstraram que a exposição prolongada ao D-gal (8 semanas) leva à disfunção erétil, caracterizada pelo aumento da atividade da beta-galactosidase associada à senescência (SA-β-gal) no tecido peniano, elevação dos níveis de espécies reativas de oxigênio e redução da resposta vasodilatadora à acetilcolina (Rezende *et al*., 2021).

É relevante destacar que apesar da administração de D-galactose induzir a redução da frequência cardíaca dos embriões no nosso estudo, também é comprovada que ela reduz a função mitocondrial cardíaca. Estudos demonstraram que a integridade mitocondrial diminui com o envelhecimento, evidenciando a importância da disfunção mitocondrial na senescência celular. Além da perda de integridade mitocondrial, a disfunção mitocondrial relacionada à idade é caracterizada pelo aumento da formação de espécies reativas de oxigênio mitocondriais (MitoROS), diminuição do potencial de membrana mitocondrial (MMP) e eficiência da biogênese mitocondrial, alterações na dinâmica mitocondrial e controle de qualidade deficiente por autofagia, como descrito por Bo-Htay *et al*. (2018).

Portanto, a quantificação aumentada de espécies reativas de oxigênio mitocondrial no grupo D-gal do nosso modelo traria mais respaldo as nossas análises confirmando a associação do modelo ao dano oxidativo. Ademais para melhoria dos nossos resultados seria necessário a realização de testes como a impedância elétrica de cardiomiócitos, uma vez que é considerada um índice quantitativo para analisar a senescência, e ainda análise de canais de cálcio de cardiomiócitos.

É conhecido o papel benéfico de alguns compostos antioxidantes e terpenoides sobre o sistema cardiovascular. O efeito do α-terpineol foi também comprovado usando o modelo de hipertensão induzida por L-NAME, sendo demonstrado que o composto foi capaz de induzir hipotensão dependente da dose em ratos jovens acordados. Da mesma forma, quando os anéis mesentéricos foram usados, os pesquisadores mostraram que ele produzia efeitos vaso-relaxante, independentes de endotélio. Esse efeito pode ser atribuído, pelo menos em parte, à inibição dos canais de cálcio dependentes de voltagem (Sabino *et al*., 2013).

O uso do composto melhorou também os parâmetros nutricionais de ratos alimentados com uma dieta rica em gordura, sendo capaz de restabelecer a sensibilidade à insulina e reduzir os níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias TNF-α e IL-1β, quando comparadas ao grupo controle (Souza *et al*., 2020). Esses resultados apresentam-se diferente dos encontrados na nossa pesquisa, uma vez que evidenciamos que o tratamento com o α-terpineol nas duas concentrações utilizadas não conseguiu reverter os efeitos negativos da D- galactose. Destaca-se ainda a ausência de dados disponíveis comparativos sobre o efeito desse monoterpeno no modelo *zebrafish*, no modelo de envelhecimento induzido por D-gal. No entanto, em modelo de indução ao Parkisson em embriões e laravas de *zebrafish* o composto nas concentrações de 0,000007 mg/mL; 0,000015 mg/mL e de 0,000046 mg/mL foi capaz de restaurar a bradicardia induzida pelo uso de MPTP (Chinnappan et al., 2025), diferentemente do nosso estudo.

O resveratrol, conhecido fitoquímico antioxidante, tem demostrado efeito protetor em diferentes doenças cardíacas (Cheng *et al*., 2020; Hu *et al*.,2021). Algumas limitações devem ser consideradas no nosso estudo, pois não teve um controle positivo eficaz, o que prejudicou a melhor interpretação das análises. Pelo fato desse composto nunca ter sido usado nesse modelo de envelhecimento com associação ao dano cardiovascular, o uso de duas ou mais concentrações de resveratrol poderiam ter preenchido essa lacuna. Por outro lado, estudos que avaliem o efeito desse composto no reparo ao dano cardíaco associado ao envelhecimento, induzido por D-gal em larvas de *zebrafish* não foram achados disponíveis na literatura. De outra forma, merece destaque relatar, a luz da literatura vigente, a sua ação em atenuar má formações

cardíacas induzidas por substâncias químicas ambientais em larvas de *zebrafish* (Almeida *et al*., 2021; Ren *et al*., 2020).

Algumas pontos passíveis de aprimoramento podem ser apontados, nessa abordagem sobre os efeitos do composto antioxidante, pois apesar da redução da β-galactosidase após tratamento com α-terpineol ser considerada efeito antissenescente, não se observou restauração do estresse oxidativo, nem melhora funcional cardíaca. Por conseguinte, algumas análises otimizariam os nossos resultados, como a utilização de testes para avaliar se há inibição de vias antiapoptóticas, como marcadores para BCL-2/BCL-xL ou bloqueio de interações pró-sobrevivência, como marcadores para p53–FOXO4. De igual modo, a análise de marcadores para observar se o composto modula as vias mTOR e JAK/STAT, relacionados ao aumento do SASP. Além do uso de marcadores da expressão de genes relacionados ao aumento estresse oxidativo (NRF2b), quantificação de EROs celular e especificamente em cardiomiócitos e do envelhecimento em cardiomiócitos (p53 e p21), e da atividade de outras enzimas antioxidantes (SOD, GPX), além da mensuração da CAT e das mesmas no início e no final do experimento.

A ampliação do escopo experimental deste estudo foi condicionada por fatores temporais, logísticos e estruturais, incluindo o prazo institucional para conclusão e defesa da tese, os impactos da pandemia de COVID-19, a limitação de recursos financeiros e de infraestrutura laboratorial compartilhada. Adicionalmente, a complexidade metodológica e a necessidade de expertise para a padronização dos ensaios de senescência no modelo zebrafish demandaram maior tempo de validação experimental. Esses aspectos justificam a delimitação do número de testes realizados.

7 CONCLUSÃO

No estudo de quimioinformática identificou-se 48 compostos potencialmente ativos encontrados nos frutos ou partes de árvores de *Anacardium occidentale* L., *Spondias mombin* Linn., *Mangifera indica* L., *Malpighia emarginata* DC. e *Carica papaya* L. na ativação de NRF2 e inibição das vias NOX-1, iNOS e COX-2 com múltiplos alvos, demonstrando atividade contra proteínas envolvidas no desenvolvimento de doenças cardiovasculares no processo de envelhecimento, relatadas pela primeira vez na literatura. Os compostos anteraxantina, malvidina-3,5-diglicosídeo e violaxantina merecem destaque, pois podem possuir atividade contra proteínas envolvidas no desenvolvimento de doenças cardiovasculares e no processo de envelhecimento, dado pela primeira vez relatado na literatura. Ainda se evidencia os ótimos resultados apresentados pelo alfa-terpineol no estudo in silico, emergindo como o composto mais estável. Essas descobertas representam um avanço significativo na compreensão do potencial desses compostos em futuras análises farmacológicas relacionadas ao envolvimento do complexo NRF2-Maf-G. O estudo combinou quimioinformática com experimentação *in vivo*, o que é uma abordagem moderna e integrativa.

Em relação aos estudos experimentais *in vivo*, pode-se afirmar que o modelo de envelhecimento induzido por D-gal, pela primeira vez testado em embriões e larvas de *zebrafish*, destaca-se com pontos relevantes como um modelo de envelhecimento acelerado induzido em *zebrafish*, referente ao fato de ser simples, rápido, acessível e inovador, sobretudo pela aplicação em embriões e larvas, o que amplia o uso do modelo para estudos de senescência precoce. Destaca-se alguns resultados positivos como os referentes ao aumento da enzima beta-galactosidase, no grupo D-gal, aumento do estresse oxidativo, confirmado pelo aumento dos níveis da catalase e alteração da função cardíaca, demonstrada pela redução da frequência cardíaca. Alguns outros aspectos favoráveis podem ser destacados como as ações benéficas do alpha terpineol e do resveratrol, uma vez que foram testados pela primeira vez em embriões de *zebrafish*, nesse modelo de envelhecimento, sendo capazes de reduzir os valores da enzima beta-galactosidase.

Em síntese, recomenda-se a utilização deste modelo como uma nova ferramenta científica para estudos de envelhecimento cardiovascular, especialmente em fases iniciais de investigação, podendo ser complementado por abordagens moleculares e funcionais adicionais para aprofundamento mecanístico. Uma vez que a literatura expõe de forma consolidada, que a redução de células senescentes podem potencialmente reverter ou melhorar condições relacionadas a idade, como a pré-disposição a doenças cardiovasculares, e promover a

regeneração tecidual, aumentando a probabilidade do aumento da longevidade saudável em humanos.

8 PERSPECTIVAS

Visto a funcionalidade do modelo de envelhecimento acelerado induzido por D-gal em embriões e larvas de *zebrafish* e os resultados antissenescentes do composto alpha terpineol terem as suas limitações expostas nas conclusões, recomenda-se o uso do modelo proposto com uso de algumas dessas abordagens :

a) realização de testes para avaliar se haveria inibição de vias antiapoptóticas, como marcadores para BCL-2/BCL-xL ou bloqueio de interações pró-sobrevivência, como marcadores para p53–FOXO4;
b) análise de marcadores para observar se o composto modularia as vias mTOR e JAK/STAT, relacionados ao aumento do SASP;
c) uso de marcadores da expressão de genes relacionados ao aumento estresse oxidativo (NRF2b), que trariam evidência sobre o papel antioxidante dos compostos e confirmaria, se haveria ligação da via, com a ação pró oxidante provocado pelo D-gal, além de propiciar um desfecho conclusivo dos resultados obtidos com a quimioinformática e sua relação com estudos *in vivo*;
d) quantificação de ROS celular e especificamente em cardiomiócitos, além da mensuração de cálcio nos mesmos;
e) mensuração da atividade de outras enzimas antioxidantes (SOD, GPX), além da mensuração da CAT e das mesmas no início e no final do experimento.
f) testes para comprovação de envelhecimento em cardiomiócitos com o uso de marcadores genéticos para expressão da p53 e p21, aliando o aumento do estresse oxidativo aos danos cardiovasculares;
g) utilização de mais uma concentração de alpha terpineol, e um controle positivo provavelmente eficaz, com mais duas concentrações de resveratrol, propondo assim o aumento de mudanças positivas em suas ações.

REFERÊNCIAS

ABBAS, S.; WINK, M. Epigallocatechin gallate from green tea (*Camellia sinensis*) increases lifespan and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 75, i. 3, p. 216-221, 2009.

ABRAHAM, M. J.; MURTOLA, T.; SCHULZ, R.; PÁLL, S.; SMITH, J. C.; HESS, B.; LINDAHL, E. GROMACS: High Performance Molecular Simulations through Multi-Level Parallelism from Laptops to Supercomputers. **SoftwareX**, [*s.l.*], v. 1, p. 19-25, 2015.

ADORJAN B.; BUCHBAUER G. Biological properties of essential oils: an update review, **Flavour and Fragrance Journal**, [*s.l.*], v. 25, p. 407-426, 2010.

AKINMOLADUN, AFOLABI CLEMENT *et al*. Chemical constituents and antioxidant activity of *Alstonia boonei*. **African Journal of Biotechnology**, [*s.l.*], v.6, i. 10, 2007.

ALFHILI, M. A.; ALJURAIBAN, G. S. Lauric acid, a dietary saturated medium-chain fatty acid, elicits calcium-dependent eryptosis. **Cells**, [*s.l.*], v. 10, i. 12, 2021.

ALMAIDA-PAGÁNA, P. F.; LUCAS-SÁNCHEZ, A.; TOCHERA, D. R. Changes in mitochondrial membrane composition and oxidative status during rapid growth, maturation and aging in zebrafish, *Danio rerio*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA): Molecular and Cell Biology of Lipids**, Amsterdam, v. 1841, Issue 7, p. 1003-1311, 2014.

ALMEIDA, A. J. P. O. **Efeito de terpenos no envelhecimento cardiovascular: o papel da senescência e do estresse oxidativo**. 2024. Tese de Doutorado (Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamentos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, 2024.

ALMEIDA, E. R., *et al*. Micronized resveratrol shows anticonvulsant properties in pentylenetetrazole-induced seizure model in adult zebrafish. **Neurochemical Research**, New York, v. 46, i. 2, p. 241-251, 2020.

ARAUJO, G. F. **Avaliação do estresse oxidativo de exposições unitárias e combinadas de carbamazepina, acetamiprida e cádmio em peixes *Danio rerio***. 2019. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública e Meio Ambiente) – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019.

ARSLAN-ERGUL, A.; ERBABA, B.; KAROGLU, E. T.; HALIM, D. O. ADAMS, M. M. Short-term dietary restriction in old zebrafish changes cell senescence mechanisms. **Neuroscience**, Oxford, 2016.

ASGHAR, N.; NAQVI, S. A. R.; HUSSAIN, Z.; RASOOL, N.; KHAN, Z. A.; SHAHZAD, S. A.; SHERAZI, T. A. Compositional difference in antioxidante and antibacterial activity of all parts of the *Carica papaya* using different solventes. Chemistry Central Journal, [*s.l.*], v. 10, n. 5, 2016.

ASSIS, S. A. D.; FERNANDES, F. P.; MARTINS, A. B. G.; OLIVEIRA, O. M. M. D. F. Acerola: importance, culture conditions, production and biochemical aspects. **Fruits**, [*s.l.*], v. 63, i. 2, p. 93-101, 2008.

AZMAN, K. F.; ZAKARIA, R. D-galactose-induced accelerated aging model: an overview. **Biogerontology**, Boston, v. 20, i. 6, p. 763-782, 2019.

BAILONE, R. L.; AGUIAR, L. K. D.; ROCA, R. D. O.; BORRA, R. C.; CORRÊA, T.; JANKE, H.; FUKUSHIMA, H. C. S. *Zebrafish* as an animal model for food safety research: trends in the animal research. **Food Biotechnology**, [*s.l.*], v. 33, i. 4, p. 283-302, 2019.

BARBAZUK, W. B. *et al*. The syntenic relationship of the *zebrafish* and human genomes. **Genome Research**, New York, v. 10, i. 9, p. 1351-1358, 2000.

BARNES, P. J. Mechanisms of development of morbidity in the elderly. **The European Respiratory Jornal**, Sheffield, v. 45, i. 3, p. 790-806, 2015.

BATOOL, N.; ILYAS, N.; SHABIR, S.; SAEED, M.; MAZHAR, R.; AMJID, M. W. A minireview of therapeutic potential of *Mangifera indica* L. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, Karachi, v. 31, n. 4, p.1441-1448, 2018.

BAXENDALE, S.; VAN EEDEN, F.; WILKINSON, R. The power of *zebrafish* in personalized medicine. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, [*s.l.*], v. 1007, p. 179-197, 2017.

BAYNE, K; RAMACHANDRA, G. S.; RIVERA E. A., WANG, J. The Evolution of Animal Welfare and the 3Rs in Brazil, China, and India. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, [*s.l.*], v. 54, n. 2, p. 181-191, 2015.

BERG, J.M; TYMOCZKO, J. L; STRYER, L; **Biochemistry**. 7th ed. New York: WH Freeman and Company; 2012.

BERNADOTTE A, MIKHELSON VM, SPIVAK IM. Markers of cellular senescence. telomere shortening as a marker of cellular senescence. **Aging**, Albany, v. 8, p. 3-11, 2016.

BERENDSEN, H. J. C.; VAN DER SPOEL, D.; VAN DRUNEN, R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. **Computer Physics Communications**, [*s.l.*], v. 91, p. 43-56, 1995.

BHATIA, S. P.; MCGINTY, D.; LETIZIA, C. S.; API, A. M. Fragrance material rereview on Fenchyl alcohol. **Food and Chemical Toxicology**, [*s.l.*], v. 46, p.157-159, 2008.

BICAS, J. L.; NERI-NUMA, I. A.; RUIZ, A. L.; DE CARVALHO, J. E.; PASTORE, G. M. Evaluation of the antioxidant and antiproliferative potential of bioflavors, **Food and Chemical Toxicology**, [*s.l.*], v. 49, n. 7, p. 1610-1615, 2011.

BO-HTAY, C.; PALEE, S.; APAIJAI, N.; CHATTIPAKORN, S. C.; CHATTIPAKORN, N. Effects of D-galactose-induced ageing on the heart and its potential interventions. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, Oxford, v. 22, n. 3, p. 1392-1410, 2018.

BONDI, A. Van der Waals volumes and radii. **The Journal of Physical Chemistry**, [*s.l.*], v. 68, p. 441-451, 1964.
BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAND, C. *et al*. The water-soluble components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) suppress the production of superoxide by human monocytes, but not neutrophils, activated *in vitro*. **Inflammation Research**, [*s.l.*], v. 50, i. 4, p. 213-219, 2001.

BRAUNBECK, T.; KAIS, B.; LAMMER, E.; OTTE, J.; SCHNEIDER, K.; STENGEL, D; STRECKER, R. The fish embryo test (FET): origin, applications, and future. **Environmental Science and Pollution Research International,** [*s.l.*], v. 22, p. 16247-16261, 2014.

BUDNI, J.; PACHECO, R.; SILVA, S.; GARCEZ, M. L.; MINA, F.; BELLETTINI-SANTOS, T.; MEDEIROS, J.; VOSS, B. C.; STECKERT, A. V.; VALVASSORI, S. S.; QUEVEDO, J. Oral administration of D-galactose induces cognitive impairments and oxidative damage in rats. **Behavioral Brain Research**, [*s.l.*], v. 302, p. 35-43, 2016.

BUDNI, J.; GARCEZ, M. L.; MINA, F.; BELLETTINI-SANTOS, T.; SILVA, S.; LUZ, A. P. D.; SCHIAVO, G. L.; BATISTA-SILVA, H.; SCAINI, G.; STRECK, E. L.; QUEVEDO, J. The oral administration of D-galactose induces abnormalities within the mitochondrial respiratory chain in the brain of rats. **Metabolic Brain Disease,** [*s.l.*], v. 32, i. 3, p. 811-817, 2017.

CAILLIET, G. M.; ANDREWS, A. H.; BURTON, E. J.; WATTERS, D. L.; KLINE, D. E.; FERRY-GRAHAM, L. A. Age determination and validation studies of marine fishes: do deep-dwellers live longer? **Exp Gerontol**., [*s.l.*], v.36, p. 739-764, 2001.

CANEDO, A.; ROCHA, T. L. Zebrafish (*Danio rerio*) using as model for genotoxicity and DNA repair assessments: historical review, current status and trends. **The Science of the Total Environment**, [*s.l.*], v. 762, 2021.

CANEDO, A.; JESUS, L. W. O.; BAILÃO, E. F. L. C.; ROCHA, T. L. Micronucleus test and Nuclear Abnormality assay in zebrafish (*Danio rerio*): past, present and future trends. **Environment Pollution**, [*s.l.*], v. 290, 2021.

CARNEIRO, M. C.; HENRIQUES, C. M.; NABAIS, J.; FERREIRA, T.; CARVALHO, T.; FERREIRA, M. G. Short telomeres in key tissues initiate local and systemic aging in zebrafish. **Plos Genetic**, New York, 2016.

CAVALCANTE, A. K. **Avaliação da ecotoxicidade do resveratrol no estágio embriolarval de peixes da espécie *Danio rerio***. 2017. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

CAYUELA, M. L.; KLAES, K. B.; FERREIRA, M. G.; HENRIQUES, C. M.; VAN EEDEN, F.; VARGA, M.; VIERSTRAETE, M. J. The zebrafish as an emerging model to study DNA damage in ageing, cancer and other diseases. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, Lausanne, v. 6, i. 178, 2019.

CHA, J.; PARK, Y.; YUN, J.; KIM, H. W; PARK, C.; KANG, G.; JUNG, M.; PAK, B.; JIN, S.W.; LEE, J. Cell electrical impedance as a novel approach for studies on senescence not based on biomarkers. **Biomed Research International**, New York, 2016.

CHAIB, S.; TCHKONIA, T.; KIRKLAND, J. L. Cellular senescence and senolytics: the path to the clinic. **Nature Medicine**, [*s.l.*], v. 28, n. 8, p. 1556-1568, 2022.

CHANG, Y. M. *et al*. Anti-apoptotic and pro-survival effect of alpinate oxyphyllae fructus (AOF) in a D-galactose-induced aging heart. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 17, i. 4, p. 466, 2016.

CHEN, J.; STOEBER, K.; KINGSBURY, S.; OZANNE, S. E.; WILLIAMS, G. H.; HALES, C.N. Loss of proliferative capacity and induction of senescence in oxidatively stressed human fibroblasts. **The Journal of Biological Chemistry**, [*s.l.*], v. 279, i. 47, p. 49439-49446, 2004.

CHEN, T. F.; HUANG, R. F.; LIN, S. E.; LU, J. F.; TANG, M. C.; CHIU, M. J. Folic acid potentiates the effect of memantine on spatial learning and neuronal protection in an Alzheimer's disease transgenic model. **Journal of Alzheimer's Disease**, [*s.l.*], v. 20, i. 2, 2010.

CHENG, B.; JIANG, F; SU, M.; ZHOU, L.; ZHANG, H., CAO, Z.; LIAO, X.; XIONG, G.; XIAO, J.; LIU F.; LU, HUIQIANG. Effects of lincomycin hydrochloride on the neurotoxicity. **Ecotoxicol Environ Saf**, [*s.l.*], 2020.

CHENG, B., ZHANG, H., JIA, K., ET AL. Effects of spinetoram on the developmental toxicity and immunotoxicity of zebrafish. **Fish Shellfish Immunol**., [*s.l.*], v. 96, 2020.

CHENG, J; REN, C; CHENG, R; LI, Y; LI, P; WANG, W; LIU, L. Mangiferin ameliorates cardiac fibrosis in D-galactose-induced aging rats by inhibiting TGF-β/p38/MK2 signaling pathway. **Korean J Physiol Pharmacol**., [*s.l.*], v. 25, i. 2, p. 131-137, 2021.

CHEN, Z. L.; GUO, C.; ZOU, Y. Y.; FENG, C.; YANG, D. X.; SUN, C. C.; WEN, J.; JIAN, Z. J.; ZHAO, Z; XIAO, Q.; ZHENG, L.; PENG, X. Y.; ZHOU, Z. Q.; TANG, C. F. Aerobic exercise enhances mitochondrial homeostasis to counteract D-galactose-induced sarcopenia in zebrafish. **Exp Gerontol**., [*s.l.*], v. 180, 2023.

CHIA, K. L, *et al*. Zebrafish as a model organism forneurodegenerative disease. **Front Mol Neurosci.** v. 15, 2022.

CHILDS, B. G.; BAKER, D. J.; KIRKLAND, J. L.; CAMPISI, J.; VAN DEURSEN, J. M. Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? **European Molecular Biology Organization Reports**, Oxford, v. 15, p. 1139-1153, 2014.

CHINNAPPAN, D.; KRISHNAN, M.; KUPPAMUTHU, A.; ELANGOVAN, N. Developmental and Neuroprotective Effects of α-Terpineol in MPTP-Induced Parkinsonism in Zebrafish Larvae. **Neurochem Res**. v.50, n.3, 2025.

CLAIBORNE, A. **CATALASE ACTIVITY**. CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research. CRC Pess: Boca Raton, USA, 1986.

COTINGUIBA, G. G. *et al*. Método de avaliação da defesa antioxidante: uma revisão de literatura. **Journal of Health Sciences**, [*s.l.*], v.15, i. 3, 2013.

CRISTIANO, W.; LACCHETTI, I.; MANCINI, L.; CORTI, M.; DI DOMENICO, K.; DI PAOLO, C.; HOLLERT, H.; CARERE, M. Promoting zebrafish embryo tool to identify the effects of chemicals in the context of water framework directive monitoring and assessment. **Microchemical Journal**, [*s.l.*], v. 149, 2019.

CROUTE, F.; VIDAL, S.; DUPOUY, D.; SOLEILHAVOUP, J.P.; SERRE, G. Studies on catalase, glutathione peroxidase and superoxidismutase activities in aging cells of *Paramecium tetraurelia*. **Mech Ageing Dev**., [*s.l.*], v. 29, i. 1, p. 53-62, 1985.

CUI, X.; LI, W.; ZHANG, B. Studies on cell senescence induced by D-galactose in cultured neurons and fibroblasts. **Chin J Appl Physiol,** [*s.l.*], v. 13, p. 131-133, 1997.

CUI, X.; WANG, L.; ZUO, P.; HAN, Z.; FANG, Z.; LI, W.; LIU, J. D-galactose-caused life shortening in *Drosophila melanogaster* and *Musca domestica* is associated with oxidative stress. Biogerontology., [*s.l.*], v. 5, p. 317-325, 2004.

CUI, X.; ZUO, P.; ZHANG, Q.; LI, X.; HU, Y.; LONG, J.; PACKER, L.; LIU, J. Chronic systemic D-galactose exposure induces memory loss, neurodegeneration, and oxidative damage in mice: protective effects of R-alpha-lipoic acid. **Journal of Neuroscience Research**, [*s.l.*], v. 84, i. 3, p. 647-654, 2006.

D'AGOSTINO, M. *et al*. MiR-200c inhibition and catalase accelerate diabetic wound healing. **J Biomed Sci**., Basel, v. 32, n. 1, 2025.

DAMANI, M.R.; ZHAO, L.; FONTAINHAS, A. M.; AMARAL, J.; FARISS, R. N.; WONG, W. T. Age-related Alterations in the Dynamic Behavior of Microglia. **Aging Cell**, v. 10, i. 2, p. 263-276, 2011.

DENG, Y.; M. A, J.; WENG, X.; WANG, Y.; LI, M.; YANG, T.; DOU, Z.; YIN, Z.; SHAN, J. Kaempferol-3-O-glucuronide ameliorates non-alcoholic steatohepatitis in high-cholesterol-diet-induced larval zebrafish and HepG2 cell models via regulating oxidation stress. **Life**, 2021.

DI CICCO, E.; TOZZINI, E. T.; ROSSI, G.; CELLERINO, A. The short-lived annual fish Nothobranchius furzeri shows a typical teleost aging process reinforced by high incidence of age-dependent neoplasias. **Exp Gerontol**., v. 46, n. 4, p. 249-256, 2011.

DING, L.; KUHNE, W.W.; HINTON, D.E.; SONG, J.; DYNAN, W.S. Quantifiable biomarkers of normal aging in the Japanese medaka fish (Oryzias latipes). **PLoS One**, v. 5. i.10, 2010.

DOKE, S.K.; DHAWALE, S.C. Alternatives to animal testing: A review. **Saudi Pharm J**., v. 23, i. 3, p. 223-229, 2013.

DOOLEY, K.; ZON, L.I. Zebrafish: a model system for the study of human disease. **Current Opinion in Genetics and Development**, [*s.l.*], v. 10, n. 3, 252-256, 2000.

DUANGJAN, C.; RANGSINTH, P.; GU, X.; WINK, M.; TENCOMNAO, T. Lifespan extending and oxidative stress resistance properties of a leaf extracts from *Anacardium occidentale* L. in *Caenorhabditis elegans*. **Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [*s.l.*], 2019.

DULCY, C. P.; SINGH, H. K.; PREETHI, J.; RAJAN, K. E. Standardized extract of *Bacopa monniera* (BESEB CDRI-08) attenuates contextual associative learning deficits in the aging rat's brain induced by D-galactose. **J Neurosci Res**., [*s.l.*], v. 90, i.10, p. 2053-2064, 2012. EIMON, P. M. Studying Apoptosis in the zebrafish. **Methods in Enzymology**, [*s.l.*], p. 395-431, 2014.

EL-FAR, A.H.; MOHAMED, H.H.; ELSABAGH, D.A.; MOHAMED, S.A.; NORELDIN, A.E.; AL JAOUNI, S.K.; ALSENOSY, A.A. Eugenol and carvacrol attenuate brain d-galactose-induced aging-related oxidative alterations in rats. **Environ Sci Pollut Res Int**., v. 29, i. 31, p. 47436-47447, 2022.

FAJEMIROYE, J. O.; CUNHA, L. C.; SAAVEDRA-RODRÍGUEZ, R.; RODRIGUES, K. L.; NAVES, L. M.; MOURÃO, A. A.; SILVA, E. F.; WILLIAMS, N. E. E.; MARTINS, J. L. R.; SOUSA, R. B.; REBELO, A.C. S.; REIS, A. A. S.; SANTOS, R. S.; FERREIRA-NETO, M. L.; PEDRINO, G. R. Aging-induced biological changes and cardiovascular diseases. **Biomed Research International**, New York, 2018.

FERNANDES-SANTOS, C. *et al*. Beneficial effects of angiotensin II AT1 blocker on cardiovascular adverse remodeling due to nitric oxide synthesis blockade. **Int. J. Morphol.**, v. 24, n. 3, p. 309-318, 2006.

FOURCHES, D., MURATOV, E.; TROPSHA, A. Curation of chemogenomics data. **Nature Chemical Biology**, New York, v. 11, i. 8, p. 535, 2015.

FRAYSSE, B.; MONS, R.; GARRIC, J. Development of a zebrafish 4-day embryo-larval bioassay to assess toxicity of chemicals**. Ecotoxicology and Environmental Safety**, [*s.l.*], v. 63, p. 253-267, 2006.

GAO. L.; PENG, X. M.; HUO, S. X.; LIU, X. M.; YAN, M. Memory Enhancement of Acteoside (Verbascoside) in a senescent mice model induced by a combination of D-gal and AlCl3. **Phytotherapy Research**, London, v. 29, i. 8, p.1131-1136, 2015.

GAULTON, A. *et al*. ChEMBL: a large-scale bioactivity database for drug discovery. **Nucleic Acids Research**, London, v. 40, p. 1100-1107, 2012.

GERHARD, G. S.; CHENG, K. C. A call to fins! Zebrafish as a gerontological model. **Aging Cell**., [*s.l.*], v. 2, p. 104-111, 2002.

GERHARD, G. S. Comparative aspects of zebrafish (*Danio rerio*) as a model for aging research. **Experimental Gerontology**, Oxford, v. 38, p. 1333-1341, 2003.

GHNEIM, H. K.; AL-SHEIKH, Y. A. Effect of selenium supplementation on glutathione peroxidase and catalase activities in senescent cultured human fibroblasts. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 59, i. 2-4, p. 127138, 2011.

GILBERT, M. J.; ZERULLA, T. C.; TIERNEY, K. B. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model for the study of aging and exercise: physical ability and trainability decrease with age. **Experimental Gerontology**, Oxford, v. 50, p. 106-113, 2014.

GONG, G.; XU, F. Study of aging model in mice. **J China Pharm Univ**, [*s.l.*], v. 22, p. 101-103, 1991.

GOPALAKRISHNAN, S. *et al*. Medaka fish exhibits longevity gender gap, a natural drop in estrogen and telomere shortening during aging: a unique model for studying sex-dependent longevity. **Front Zool**., [*s.l.*], v. 10, i. 78, 2013.

GREEN, D. R.; GALLUZZI, L.; KROEMER, G. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. **Science**, New York, v. 333, i. 6046, p.1109-1112, 2011.

GREENBERG *et al*. Navitoclax safety, tolerability, and effect on biomarkers of senescence and neurodegeneration in aged nonhuman primates. **Heliyon**, [*s.l.*], v. 10, i. 16, 2024.

GUO, L.; CAO, J. H.; WEI, T. T.; LI, J. H.; FENG, Y. K.; WANG, L. P.; SUN, Y.; CHAI, Y. R. Gallic acid attenuates thymic involution in the D-galactose induced accelerated aging mice. **Immunobiology**, [*s.l.*], v. 225, i. 1, 2020.

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

HAVERINEN, J.; VORNANEN, M. Expression of calcium channel transcripts in the zebrafish heart. **Journal of Experimental Biology**, [*s.l.*], v. 221, i. 10, 2018.

HERMANN, A. C.; MILLARD, P. J.; BLAKE, S. L.; KIM, C. H. Development of a respiratory burst assay using zebrafish kidneys and embryos. **J. Immunol. Methods**, [*s.l.*], v. 292, p.119-129, 2004.

HILL, A. J.; TERAOKA, H.; HEIDEMAN, W.; PETERSON, R. E. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. **Toxicol Sci**., [*s.l.*], v. 86, i. 1, p. 6-19, 2005.

HOCH, J.A.; HUANG, S. Screening methods for the identification of novel antibiotics. U.S. Patent 6,043,045, March 28, 2000.

HOU, J. H. *et al*. Simultaneous mapping of membrane voltage and calcium in zebrafish heart in vivo reveals chamber-specific developmental transitions in ionic currents. **Frontiers in Physiology**, Lausanne, v. 5, i. 344, p. 1-14, 2014.

HOWE, K.; *et al*. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, London, v.7446, i.496, p.498-503, 2013.

HSIEH, H.M.; WU, W.M.; HU, M.L. Genistein attenuates D-galactoseinduced oxidative damage through decreased reactive oxygen species and NF-κB binding activity in neuronal PC12 cells. **Life Sciences**, v. 88, i.1-2, p.82-88, 2011.

HU, W.; JING, P.; WANG, L.; ZHANG, Y.; YONG, J.; WANG, Y. Thepositive effects of Ginsenoside Rg1 upon the hematopoietic microenvironment in a D-galactose-induced aged rat model. **BMC Complement Altern Med**., [*s.l.*], v. 15, p. 119, 2015.

JAGHOORI, M. M.; BLEIJLEVENS, B.; OLABARRIAGA, S. D. 1001 Ways to run AutoDock Vina for virtual screening. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, Amsterdam, v. 30, n. 3, p. 237-249, 2016.

JAYASINGHE, C. D.; JAYAWARDENA, U. A. Toxicity assessment of herbal medicine using zebrafish embryos: a systematic review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [*s.l.*], v. 2019, 2019.

JIANG, X.; WANG, J.; LIU, J.; ZHU, H.; HU, JIAN.; SUN, XINGZHEN.; ZHOU, WENDI. Resveratrol ameliorates penconazole-induced cardiotoxicity by inhibition of oxidative stress and apoptosis in zebrafish larvae. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 256, 2023.

JIANG, J.; SHI, Y.; YU, R.; CHEN, L.; ZHAO, X. Biological response of zebrafish after short-term exposure to azoxystrobin. **Chemosphere**, [*s.l.*], v. 202, p. 56-64, 2018.

JIANG, F.; ZHANG, DE-LONG.; JIA, M.; HAO, W.; YONG-JUN. Mangiferin inhibits high-fat diet induced vascular injury via regulation of PTEN/AKT/eNOS pathway. **Journal of Pharmacological Sciences**, Kyoto, v. 137, i. 3, p. 265-273, 2018.

JUN, J. I.; LAU, L. F. Cellular senescence controls fibrosis in wound healing. **Aging**, Albany, v. 2, p. 627-631, 2018.

JUSTICE, J. N. *et al*. Senolytics in idiopathic pulmonary fibrosis: a first-in-human pilot study. **EBioMedicine**, [*s.l.*], v. 40, p. 554-563, 2019.

KAMPKÖTTER, A. C. *et al*. Increase of stress resistance and lifespan of Caenorhabditis elegans by quercetin. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, [*s.l.*], v. 149, i. 2, p. 314-323, 2008.

KELLY, K. A.; HAVRILLA, C. M.; BRADY, T.C.; ABRAMO, K. H.; LEVIN, E. D. Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. **Environ Health Perspect**., [*s.l.*], v. 106, i. 7, p. 375-384, 1998.

KHALEEL, CHRISTINA.; TABANCA, NURHAYAT.; BUCHBAUER, GERHARD. α-Terpineol, a natural monoterpene: a review of its biological properties. **Open Chemistry**, [*s.l.*], v. 16, i. 1, p. 349-361, 2018.

KHOR, E.; NOOR, S. M.; WONG, P. Understanding the role of ztor in aging-related diseases using the zebrafish model. **In Vivo**, Athenas, v. 33, p.1713-1720, 2019.

KHURANA, S.; HOLLINGSWORTH, A.; PICHE, M.; VENKATARAMAN, K.; KUMAR, A.; ROSS, G. M.; TAI, T. C. Antiapoptotic actions of methyl gallate on neonatal rat cardiac myocytes exposed to H2O2. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. Austin, v. 2014, 2014.

KIMMEL, C. B. *et al*. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Dev Dyn**, [*s.l.*], v. 203, n. 3, p. 253-310, 1995.

KISHI, S. *et al*. The zebrafish as a vertebrate model of functional aging and very gradual senescence. **Experimental Gerontology**, Oxford, v. 38, p. 777-786, 2004.

KISHI, S. Functional aging and gradual senescence in zebrafish. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1019, p. 521-526, 2004.

KISHI, S.; BAYLISS, P.E.; UCHIYAMA, J.; KOSHIMIZU, E.; QI, J.; NANJAPPA, P.; IMAMURA, S.; ISLAM, A.; NEUBERG, D.; AMSTERDAM, A.; THOMAS, M.R. The Identification of Zebrafish Mutants Showing Alterations in Senescence-Associated Biomarkers. **PLoS Genetics**, v. 4, 2008.

KISHI, S.; SLACK, B. E.; UCHIYAMA, J.; ZHDANOVA, I. V. F. Zebrafish as a genetic model in biological and behavioral gerontology: where development meets aging in vertebrates: a mini review. **Gerontology**. 2009.

KISHI, S. The search for evolutionary developmental origins of aging in zebrafish: a novel intersection of developmental and senescence biology in the zebrafish model system. **Birth Defects Research Part C**: Embryo Today: Reviews, [*s.l.*], v. 93, n. 3, p. 229-248, 2011.

KOROLCHUK, V.I., MIWA, S., CARROLL, B., VON ZGLINICKI, T. Mitochondria in cell senescence: Is mitophagy the weakest link? **EbioMedicine**, [*s.l.*], v. 21, p. 7-13, 2017.

KRAMER, D. et al. Moving senolytics closer to the clinic in IPF. **EbioMedicine**, [*s.l.*], 2023.

KRYSKO, O.; STEVENS, M.; LANGENBERG, T.; FRANSEN, M.; ESPEL, M.; E.; BAES, M. Peroxisomes in zebrafish: distribution pattern and knockdown studies. **Histochemistry and Cell Biology**, [*s.l.*], v. 134, p. 39-51, 2010.

KUMAR, A.; PRAKASH, A; DOGRA, S. *Centella asiatica* attenuates D-galactose-induced cognitive impairment, oxidative and mitochondrial dysfunction in mice. **International Journal of Alzheimer's Disease**, London, 2011.

LAMMER, E.; CARR, G. J.; WENDLER, K.; RAWLINGS, J. M.; BELANGER, S. E.; BRAUNBECK, T. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (Danio rerio) a potential alternative for the fish acute toxicity test?. Comparative biochemistry and physiology. **Toxicology and Pharmacology**, [*s.l.*], v. 149, i. 2, p. 196-209, 2009.

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

LEME, C. V. D. *et al*. GSTM1 and GSTT1 genes analysis in head and neck cancer patients. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 56, i. 3, p. 299-303, 2010.

LEMOS, C. G.; VALE, J. P. C.; FERREIRA, M. K. A.; SILVA, A. W.; MENEZES, J. E. S. A.; SANTOS, H. S. Avaliação da atividade locomotora e teste de toxicidade do eugenol utilizando zebrafish (*Danio rerio*) adulto. Ambiente: Gestão e Desenvolvimento. Dossiê. Simpósio de Meio Ambiente e Energia (SiMAE). 1. **Anais** [...]., 2020.

LENNICKE, C.; COCHEMÉ, H. M. Redox metabolism: ROS as specific molecular regulators of cell signaling and function. **Molecular Cell**, [*s.l.*], v. 81, i. 18, p. 3691-3707, 2021.

LI, E.; WANG, Y.; LI, Q.; LI, L.; WEI, L. Protective effects of sal B on oxidative stress-induced aging by regulating the keap1/nrf2 signaling pathway in zebrafish. **Molecules**, Basel, v. 26, 2021.

LI, J.; ZHANG, C., LIU, Y., CHEN. K., CHEN, G. A comparative study of anti-aging properties and mechanism: resveratrol and caloric restriction. **Oncotarget**, [*s.l.*], v. 8, n. 39, p. 65717-65729, 2017.

LÓPEZ-OTÍN. *et al*. Hallmarks of aging: an expanding universe. **Cell**, Cambridge, v. 186, i. 2, p. 243-278, 2023.

LOPEZ-OTIN, C., BLASCO, M.A., PARTRIDGE, L., SERRANO, M., KROEMER, G. The hallmarks of aging. **Cell**, Cambridge, v. 153, i. 6, p. 1194-1217, 2013.

LUO, L.; YAN, T.; YANG, L.; ZHAO, M. Aluminum chloride and D-galactose induced a zebrafish model of Alzheimer's disease with cognitive deficits and aging. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, [*s.l.*], v. 23, p. 2230-2239, 2024.

MACKEL, H. **Capturing the spectra of silicon solar cells**. PhD Thesis, The Australian National University: Canberra, December 2004.

MAKARASEN, A.; KUNO, M.; PATNIN, S.; REUKNGAM, N.; KHLAYCHAN, P.; DEEYOHE, S.; INTACHOTE, P.; SAIMANEE, B.; SENGSAI, S.; BOONSRI, P. Molecular docking studies and synthesis of amino-oxy-diarylquinoline derivatives as potent non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. **Drug Res**., [*s.l.*], v. 69, p. 671-682, 2019.

MNAFGUI,K.; HAJJI, R.; DERBALI, F.; GAMMOUDI, A.; KHABBABI, G.; ELLEFI, H.; ALLOUCHE, N.; KADRI, A.; GHARSALLAH, N. Anti-inflammatory, antithrombotic and cardiac remodeling preventive effects of eugenol in isoproterenol-induced myocardial infarction in wistar rat. **Cardiovasc Toxicol**., [*s.l.*], v. 16, i. 4, p. 336-344, 2016.

MARTÍNEZ-SIELVA, A. *et al*. Suppression of contraction raises calcium ion levels in the heart of zebrafish larvae. **Biosensors**, [*s.l.*], v. 14, i. 5, p. 219, 2024.

MATTHEWS, B. W. Comparison of the predicted and observed secondary structure of T4 phage lysozyme. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 405, i. 2, p. 442-451, 1975.

MAYET J.; HUGHES A. Cardiac and vascular pathophysiology in hypertension. **Heart**, [*s.l.*], v. 89, p. 1104-1109, 2003.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; MAPELLI-BRAHM, P.; STINCO, C. M. The colourless carotenoids phytoene and phytofluene: from dietary sources to their usefulness for the functional foods and nutricosmetics industries. **J. Food Compos**., [*s.l.*], v. 67, p. 91-103, 2018.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; STINCO, C. M.; MAPELLI-BRAHM, P. Skin carotenoids in public health and nutricosmetics: the emerging roles and applications of the UV radiation-absorbing colourless carotenoids phytoene and phytofluene. **Nutrients**, v. 11, i. 5, 2019.

MENEZES, G. M. S.; MAIA, M. D. S.; SOUSA, N. F.; SANTOS, A. C. D.; CAHINO, L. M.; SCOTTI, M. T.; MEDEIROS, I. A. Multiple targets directed screening of compounds from northeastern Brazilian fruits with activity in oxidative stress pathways associated with vascular damage throughout ageing. **Natural Product Research**, Milton Park, p. 1-5, 2025.

MESQUITA, A.; WEINBERGER, M.; SILVA, A.; SAMPAIO-MARQUES, B.; ALMEIDA, B.; LEÃO, C.; COSTA, V.; RODRIGUES, F.; BURHANS, W. C.; LUDOVICO, P. Caloric restriction or catalase inactivation extends yeast chronological lifespan by inducing H2O2 and superoxide dismutase activity. **Proc. Natl. Acad. Sci**., [*s.l.*], v. 107, i. 34, p. 15123-15128, 2010.

MEZADRI, T.; VILLANO, D.; FERNANDEZ-PACHON, M. S.; GARCIA-PARRILLA, M. C.; TRONCOSO, A. M. Antioxidant compounds and antioxidant activity in acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruits and derivatives. **J Food Comp Anal**., [*s.l.*], v. 21, p. 282-290, 2008.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology, Br. **J. Pharmacol**., [*s.l.*], v. 147, p. 193-201, 2006.

MURUGANANDAN, S.; SRINIVASAN, K.; GUPTA, S.; GUPTA, P.K.; LAL, J. Effect of mangiferin on hyperglycemia and atherogenicity in streptozotocin diabetic rats**. J Ethnopharmacol**., Lausanne, v. 97, i. 3, p. 497-501, 2005.

NACHBAGAUER, R. *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. **Nat. Med**., [*s.l.*], v. 27, p. 106-114, 2021.

NOWIK, N.; PODLASZ, P.; JAKIMIUK, A.; KASICA, N.; SIENKIEWICZ, W.; KALECZYC, J. Zebrafish: an animal model for research in veterinary medicine. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, [*s.l.*], v. 18, n. 3, p. 663-674, 2015.

NUNES, R. R.; FONSECA, A. L. D.; PINTO, A. C. D. S.; MAIA, E. H. B.; SILVA, A. M. D.; VAROTTI, F. D. P.; TARANTO, A. G. Brazilian malaria molecular targets (BraMMT): Selected receptors for virtual high-throughput screening experiments. **Memórias do Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 114, 2019.

OECD. **Fish embryo toxicity test**. Organization for Economic Co-Operation and Development, Paris, 2013.

OGUNGBEMI, A.; LEUTHOLD, D.; SCHOLZ, S.; KÜSTER, E. Hypo-or hyperactivity of zebrafish embryos provoked by neuroactive substances: a review on how experimental parameters impact the predictability of behavior changes, **Environ. Sci. Eur**. v. 31, i. 1, 2019.

OGUNGBEMI A.O.; TEIXIDO E.; MASSEI, R.; SCHOLZ, S.; KÜSTER, E. Optimization of the spontaneous tail coiling test for fast assessment of neurotoxic effects in the zebrafish embryo using an automated workflow in KNIME. **Neurotoxicol. Teratol**., [*s.l.*], v. 81, 2020.

OJO, O. A.; AFON, A. A.; OJO, A. B..; AJIBOYE, B. O.; OKESOLA, M. A.; ARULEBA, R. T.; ADEKIYA T. A.; OYINLOYE, B. E. *Spondias mombim* L. (Anacardiaceae): Chemical fingerprints, inhibitory activities, and molecular docking on key enzymes relevant to erectile dysfunction and Alzheimer's diseases. **J Food Biochem**., [*s.l.*], v. 43, 2019.

OLAJIDE, O. A.; ADEROGBA, M. A.; ADEDAPO, A. D.; MAKINDE, J. M. Effects of *Anacardium occidentale* stem bark extract on *in vivo* inflammatory models. **J Ethnopharmacol**., Lausanne, v. 95, i. 2-3, p. 139-42, 2004.

OLOYEDE, O; FRANCO, J., ROOS, D; ROCHA, J.; ATHAIDE, M.; BOLIGON, A. Antioxidative properties of ethyl acetate fraction of unripe pulp of *Carica papaya* in mice. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, [*s.l.*], v. 3, p. 409-425, 2011.

ÖZCAN S, ALESSIO N, ACAR MB, MERT E, OMERLI F, PELUSO G ET AL. Unbiased analysis of senescence associated secretory phenotype (SASP) to identify common components following different genotoxic stresses. **Aging**, Albany, v. 8, p. 1316-1329, 2016.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Austin, v. 3, i. 1, p. 2-12, 2010.

PAPANASTASIOU, S. A.; BALI, E. M. D.; IOANNOU, C. S.; PAPACHRISTOS, D. P.; ZARPAS, K. D.; PAPADOPOULOS, N. T. Toxic and hormetic-like effects of three components of citrus essential oils on adult Mediterranean fruit flies (Ceratitis capitata). **PloS One**, [*s.l.*], v. 12, i. 5, 2017.

PARICHY, D. M. The natural history of model organisms: advancing biology through a deeper understanding of zebrafish ecology and evolution. **eLife**, [*s.l.*],v. 4, 2015.

PATTON, E. E.; ZON, L. I.; LANGENAU, D. M. Zebrafish disease models in drug discovery: from preclinical modelling to clinical trials. **Nature Reviews. Drug Discovery**., London, v. 20, n. 8, p. 611-628, 2021.

PAZDRO, R.; BURGESS, J. R. The antioxidant 3H-1,2-dithiole-3-thione potentiates advanced glycation end-product-induced oxidative stress in SH-SY5Y cells. **Experimental Diabetes Research**, [*s.l.*], 2012.

PEREIRA, A. C.; GOMES, T.; MACHADO, M. R. F.; ROCHA, T. L. The zebrafish embryotoxicity test (ZET) for nanotoxicity assessment: from morphological to molecular approach. **Environmental Pollution**, [*s.l.*], v. 252, p. 1841-1853, 2019.

PHILPOTT, C.; DONACK, C. J.; COUSIN, M. A.; PIERRET, C. Reducing the noise in behavioral assays: sex and age in adult zebrafish locomotion. **Zebrafish**, Larchmont, v. 9, i. 4, p. 191-194, 2012.

POLE, A.; DIMRI, M.; DIMRI, G. P. Oxidative stress, cellular senescence and ageing. **AIMS Mol Sci.**, [*s.l.*], v. 3, p. 300-324, 2016.

PŁÓCINICZAK, A.; BUKOWSKA-OLECH, E.; WYSOCKA, E. The complexity of oxidative stress in human age-related diseases: a review. **Metabolites**, [*s.l.*], v. 15, p. 479, 2025.

PRAKASH, A.; BASKARAN, R. Acerola, an untapped functional superfruit: a review on latest frontiers. **J Food Sci Technol**., [*s.l.*], v. 55, i. 9, p. 3373-3384, 2018.

PROSHKINA, E.; PLYUSNIN, S.; BABAK, T.; LASHMANOVA, E.; MAGANOVA, F.; KOVALMOSKALEV. A.terpenoids as potential geroprotectors. **Antioxidants**, Basel, v. 9, i. 6, p. 529, 2020.

QI, Y.; ZHAO, W.; LIU, D.; WANG, J.; JIN,W. Effect of xixin on the morphological changes of testis of aged mice induced by D-galactose. **Chin J Reg Anat Oper Surg**, [*s.l.*], v. 11, p. 137-139, 2002.

QIN, Y. *et al*. Cellular senescence in health, disease, and lens aging. **Pharmaceuticals**, Basel, v. 18, i. 3, p. 412, 2025.

RAFFAELLO, A.; RIZZUTO, R. Mitochondrial longevity pathways. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1813, i. 1, p. 260-268, 2011.

RAFI, M. A., ALAVI, A. Debate on human aging and lifespan. **Bioimpacts**, [*s.l.*], v. 7, p. 135-137, 2017.

RAGHUNATH, A.; SUNDARRAJ, K.; NAGARAJAN, R.; ARFUSO, F.; BIAN, J.; KUMAR, A.P.; SETHI, G.; PERUMAL, E. Antioxidant response elements: discovery, classes, regulation applications. **Redox Biol**., [*s.l.*], v. 17, p. 297-314, 2018.

REED, B.; JENNINGS, M. Guidance on the housing and care of zebrafish *Danio rerio*. **Research Animals Department**, [*s.l.*], 2011.

REN, F.; JI, C.; HUANG, Y., ANIAGU, S.; JIANG, Y.; CHEN, T. AHR-mediated ROS production contributes to the cardiac developmental toxicity of PM2.5 in zebrafish embryos. **Science of the Total Environment**, 2019.

REZENDE, M. S. A. *et al*. D-(+)-Galactose-induced aging: a novel experimental model of erectile dysfunction. **PLoS One**, [*s.l.*], v. 16, i. 4, p. e0249487, 2021.

RIBEIRO, T. P.; PORTO, D. L.; MENEZES, C. P.; ANTUNES, A. A. Unravelling the cardiovascular effects induced by α-terpineol: a role for the nitric oxide–cGMP pathway, **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, [*s.l.*], v. 37, i. 8, p. 811-816, 2010.

RIBEIRO, R. X.; BRITO, R. S.; PEREIRA, A. C.; MONTEIRO, K. B. E. S.; GONÇALVES, B. B.; ROCHA, T. L. Ecotoxicological assessment of efuents from Brazilian wastewater treatment plants using zebrafish embryotoxicity test: A multi-biomarker approach. **The Science of the Total Environment**, [*s.l.*], v. 735, 2020.

RIVERA-PASTRANA, D. M.; ELHADI M. Y.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. Phenolic and carotenoid profiles of papaya fruit (*Carica papaya* L.) and their contents under low

temperature storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [*s.l.*], v. 90, i. 14, p. 2358-2365, 2010.

ROBBINS, P. D. *et al*. Senolytic drugs: reducing senescent cell viability to extend health span. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, [*s.l.*], v. 61, i. 1, p. 779-803, 2021.

ROCHA, S. M.; SOUSA, J. R. C.; NASCIMENTO, M. L. L. B.; SOUSA, J. M. C.; MAGALHÃES, J. L. Avaliação da toxicidade do alfa-terpineol encapsulado em nanopartículas de sílica aminofuncionalizadas. Congresso Brasileiro de Química. 59. **Anais** [...]. [*s.l.*]. 2019.

ROPER, C.; TANGUAY, R. L. **Zebrafish as a model for developmental biology and toxicology**. *In*: Handbook of developmental neurotoxicology. 2th. ed. p. 143-151, 2018.

ROSA, C.E. *et al*. GH overexpression modifies muscle expression of anti-oxidant enzymes and increases spinal curvature of old zebrafish. **Exp Gerontol**. v.45, n.6, p. 449–456, 2010.

RUTZ, A. *et al*. The LOTUS initiative for open knowledge management in natural products research. **eLife**, , [*s.l.*], 2022.

SABINO, C. K. *et al*. Cardiovascular effects induced by α-Terpineol in hypertensive rats. **Flavour and Fragrance Journal**, [*s.l.*], v. 28, p.333–339, 2013.

SADOWSKA-BARTOSZ, I & BARTOSZ, G. Effect of antioxidants supplementation onaging and longevity. **BioMed research international**. 2014.

SAINT-AMANT L, DRAPEAU P. Time course of the development of motor behaviors in the zebrafish embryo. **J Neurobiol**., v. 37, i. 4, p. 622-632, 1998.

SALIEV, T.; SINGH, P. B. Targeting Senescence: a review of senolytics and senomorphics in anti-aging interventions. **Biomolecules**, [*s.l.*], v. 15, i. 6, p. 860, 2025.

SCHMITT R. Senotherapy: growing old and staying young? **Pflugers Arch**, Berlim, v. 469, p. 1051-1059, 2017.

SELDERSLAGHS, I. W., BLUST, R.; WITTERS, H. E. Feasibility study of the zebrafish assay as an alternative method to screen for developmental toxicity and embryotoxicity using a training set of 27 compounds. **Reproductive Toxicology**, [*s.l.*], v. 33, n. 2, p. 142-154, 2012.

SENGOKU, T.; SHIINA, M.; SUZUKI, K.; HAMADA, K.; SATO, K.; UCHIYAMA, A.; KOBAYASHI, S.; OGUNI, A.; ITAYA, H.; KASAHARA, K. Structural basis of transcription regulation by CNC family transcription factor, Nrf2. **Nucleic Acids Research**, London, v. 50, p. 12543-12557, 2022.

SHANG, Y; GONG, M; ZHOU, X. LI, S; WANG, B. Improving effects of SSF on memory deficits and pathological changes of neural and immunological systems in senescent mice. **Acta Pharmacol Sin**, Pequim, v. 22, p. 1078-1083, 2001.

SHEN, R. *et al*. The cardiovascular toxicity induced by high doses of gatifloxacin and ciprofloxacin in zebrafish. **Environ. Pollut**., [*s.l.*], v. 254, 2019.

SHEN YX, XU SY, WEI W, SUN XX, YANG J, LIU LH, DONG C Melatonin reduces memory changes and neural oxidative damage in mice treated with D-galactose. **J Pineal Res.**, v. 32, p. 173-178, 2002.

SHI, X.; ZHOU, B. The role of Nrf2 and MAPK pathways in PFOS-induced oxidative stress in zebrafish embryos. **Toxicological Sciences**, v. 115, i. 2, 391-400, 2010.

SHWE, T; PRATCHAYASAKUL, W; CHATTIPAKORN, N; CHATTIPAKORN, S. C. Role of D-galactose-induced brain aging and its potential used for therapeutic interventions. **Experimental Gerontology**, Oxford, v.101, p. 13-36, 2018.

SI, H.; LIU, D. Dietary antiaging phytochemicals and mechanisms associated with prolonged survival. **Journal of Nutritional Biochemistry**, [*s.l.*], v. 25, 2014.

SIEBER, S. *et al*. Zebrafish as a preclinical *in vivo* screening model for nanomedicines. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, 2019.

SILVA-PALACIOS, A.; KÖNIGSBERG, M.; ZAZUETA, C. Nrf2 signaling and redox homeostasis in the aging heart: A potential target to prevent cardiovascular diseases? Ageing. **Res Rev**., [*s.l.*], v. 26, p.81-95, 2016.

SIVASINPRASASN, S; PANTAN, R.; THUMMAYOT, S.; TOCHARUS, J.; SUKSAMRARN, A.; TOCHARUS, C. Cyanidin-3-glucoside attenuates angiotensin II-induced oxidative stress and inflammation in vascular endothelial cells. **Chem Biol Interact.**,, [*s.l.*], v. 2797, i. 16, p. 30510-30515, 2016.

SKIBSKA, B., GORACA, A. The protective effect of lipoic acid on selected cardiovascular diseases caused by age-related oxidative stress. **Oxid Med Cell Longev**. [*s.l.*], 2015.

SLACK, C. Ras signaling in aging and metabolic regulation. **Nutrition and Healthy Aging**. v. 4, 2017.

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

SNEDDON, L. U.; HALSEY, L. G.; BURY, N. R. Considering aspects of the 3Rs principles within experimental animal biology. **The Journal of Experimental Biology**, v. 220, p. 3007-3016, 2017.

SOMANAH, J.; BOURDON, E.; BAHORUN, T. Extracts of Mauritian *Carica papaya* (var. solo) protect SW872 and HepG2 cells against hydrogen peroxide induced oxidative stress. J. **Food Sci. Technol**., [*s.l.*], v. 54, p. 1917-1927, 2017.

SONG, X.; BAO, M.; LI, D.; LI, Y. M. Advanced glycation in D-galactose induced mouse aging model. **Mech Ageing Dev**, [*s.l.*], v. 108, p. 239-251, 1999.

SOUSA, G. M. *et al*. The effect of α-terpineol enantiomers on biomarkers of rats fed a high-fat diet. **Heliyon**, v. 6, i. 4, 2020.

SOUSA, M. A. **Estudo bioeletroquímico sobre o zebrafish (*D. rerio*) de duas séries de derivados aminoguanidínicos**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Instituto de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2019.

SPENCE, R.; GERLACH, G.; LAWRENCE, C.; SMITH, C. The behaviour and ecology of the zebrafish. *Danio rerio*. **Biol. Rev**., [*s.l.*], v. 83, p. 13-34, 2008,

STOYEK, M. R.; ROG-ZIELINSKA, E. A.; QUINN, A. T. Age-associated changes in electrical function of the zebrafish heart. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 138; p. 91-104, 2018.

STROH, J. *et al*. Evaluation of the acute toxicity to juvenile pacific coho salmon and rainbow trout of some plant essential oils, a formulated product, and the carrier. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 60, p. 923-930, 1998.

SUN Y, WANG D, ZHU J, ZHANG H. Effects of cistanche desertica polysacchrides on the constitution of protein and anti-oxidative capacity of lune in aging mice. **Chin Pharmacol Bull**., [*s.l.*], v. 17, p. 101-103, 2001,

SUN, Y.; FANG, Y.; XU, X.; LU, G. AND CHEN, Z. Evidence of an association between age-related functional modifications and pathophysiological changes in zebrafish heart. **Gerontology**, v. 61, p. 435-447, 2014.

SUN, G., LIU, K. Developmental toxicity and cardiac effects of butyl benzylphthalate in zebrafish embryos. **Aquat. Toxicol.** v. 192, 2017.

TAO, J.; BAI, C.; CHEN, Y.; ZHOU, H.; LIU, Y.; SHI, Q.; PAN, W.; DONG, H.; LI, L.; XU, H.; TANGUAY, R.; HUANG, C.; DONG, Q. Environmental relevant concentrations of benzophenone-3 induced developmental neurotoxicity in zebrafish. **The Science of the Total Environment**, [*s.l.*], 2020.

TERZIBASI, E.; *et al*. Large differences in aging phenotype between strains of the short-lived annual fish Nothobranchius furzeri. **PLoS One**, v. 3, i. 12, 2008.

TISCHER, J. *et al*. Inhomogeneous distribution of Iba-1 characterizes microglial pathology in Alzheimer's disease. **Glia**, v. 64, i. 9, p. 1562-1572, 2016.

TIAN, J.; ZHANG, R.; WENG, Y.; QIN, Q.; ZHANG, X.; LIU, A.; LIN, N. Myrcene enhances the cardioprotective effect through matrix remodelling in an experimental model of heart failure. **Archives of Medical Science**, [*s.l.*], 2020.

TOUYZ, R.M. Oxidative stress and vascular damage in hypertension, **Curr. Hypertens. Rep**., v. 2, i. 1, p. 98-105, 2000.

TOYOMIZU, M.; NAKAI, Y.; NAKATSU T & AKIBA Y. Inhibitory effect of dietary anacardic acid supplementation on cecal lesion formation following chicken coccidial infection. **Animal Sci**., [*s.l.*], v. 74, p. 105-109, 2003.

TRIGUEIRO, N.; CANEDO, A.; A. G. A. D.; LUCHIARI, A. C.; ROCHA, T. L. Zebrafish as an emerging model system in the global south: two decades of research in Brazil. **Zebrafish**, Larchmont, v. 17, i. 6, p. 412-425, 2020.

TSAI, S. B. *et al*. Differential effects of genotoxic stress on both concurrent body growth and gradual senescence in the adult zebrafish. **Aging Cell**, [*s.l.*], v. 6, p.209-224, 2007.

UMADEVI, S.; GOPI, V.; SIMNA, S. P.; PARTHASARATHY, A.; YOUSUF, S. M. J.; ELANGOVAN, V. Studies on the cardio protective role of gallic acid against age-induced cell proliferation and oxidative stress in H9C2 (2-1) cells. **Cardiovasc Toxicol**., [*s.l.*], v. 12, i. 4, p. 304-311, 2012.

VALADARES, M. C. Avaliação de Toxicidade Aguda: Estratégias após a "Era do teste Dl50". **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 3, n. 2, p. 93-98, 2006.

VAN HOUCKE, J. *et al*. Successful optic nerve regeneration in the senescent zebrafish despite age-related decline of cell intrinsic and extrinsic response processes. **Neurobiol Aging**., [*s.l.*], v. 60, p. 1-10, 2017.

VICENTE, J. A. *et al*. Early calcium and cardiac contraction defects in a model of phospholamban R9C mutation in zebrafish larvae. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, [*s.l.*], v. 166, p. 20-32, 2022.

VILAR, S.; SOBARZO-SÁNCHEZ, E.; URIARTE, E. *In silico* prediction of P-glycoprotein Binding: insights from molecular docking studies. **Curr. Med. Chem**., v. 26, i. 1746-1760, 2019.

VON HELLFELD, R. *et al*. Adverse effects in the fish embryo acute toxicity (FET) test: a catalogue of unspecific morphological changes versus more specific effects in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Environmental Sciences Europe, [*s.l.*], v. 32, i. 122, 2020.

WALKER, S. L. *et al*. Automated reporter quantification *in vivo*: high-through put screening method for reporter-based assays in zebrafish. **PLoS ONE**, v. 7, 2012.

WATANABE, S; KAWAMOTO, S. OHTANI, N; HARA, E. Impact of senescence-associated secretory phenotype and its potential as a therapeutic target for senescence-associated diseases. **Cancer Sci**., v. 108, p. 563-569, 2017.

WANG, F. *et al*. Protection role of resveratrol against alcohol-induced heart defect in *zebrafish* embryos. **Chinese Medical Journal**, Pequim, v. 132, n. 8, p. 990-993, 2019.

WANG, K.; KLIONSKY, D.J. Mitochondria removal by autophagy. **Autophagy**, [*s. l.*], v. 7, i. 3, p.297-300, 2011.

WANG, Y.; LI, Q.; LI, L.; WEI, L. Protective effects of sal b on oxidative stress-induced aging by regulating the keap1/nrf2 signaling pathway in zebrafish. **Molecules**, Basel, i. 26. 2021.

WANG, G.; ZHANG, Z.; AYALA, C.; Hospitalization costs associated with hypertension as a secondary diagnosis among insured patients aged 18-64 years. **Am. J. Hypertens**., [*s. l.*], v. 23, i. 3, p. 275-281, 2010.

WANG, Y.; YIN, L.; HU, B.; TSE, L.A.; LIU, Y.; MA, H.; LI, W. Association of heart rate with cardiovascular events and mortality in hypertensive and normotensive population: a nationwide prospective cohort study. **Annals of Translational Medicine**, [*s. l.*], v. 9, n. 11, p. 917, 2021.

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

WEICHERT, F. G. ET AL. Assessing the ecotoxicity of potentially neurotoxic substances - Evaluation of a behavioural parameter in the embryogenesis of Danio rerio. **Chemosphere**. v. 186, p. 43-50, 2017.

WINSTON, G.W. Oxidants and antioxidants in aquatic animals. **Comp Biochem Physiol C Comp Pharmacol Toxicol**, v.100, n. 1-2, p.173-176, 1991.

WOODS, I. G. *et al*. A comparative map of the *zebrafish* genome. **Genome Research**, [*s.l.*], v. 10, i. 12, p.1903-1914, 2000.

XU, F. **Sub-acute toxicity of D-galactose**. *In*: Proceedings of the Second National Conference on Aging Research, Herbin, 1985.

XU, X. H.; ZHAO, T. Q. Effects of puerarin on D-galactose induced memory deficits in mice. **Acta Pharmacol Sin**., Pequim, v. 23, p. 587-590, 2002.

YANAGI, S.; TSUBOUCHI, H.; MIURA, A.; MATSUO, A.; MATSUMOTO, N.; NAKAZATO, M. The impacts of cellular senescence in elderly pneumonia and in age-related lung diseases that increase the risk of respiratory infections. **Int J Mol Sci**., [*s.l.*], 2017.

ZHANG, H.; DAVIES, K.J.A.; FORMAN, H.J. Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 88, p. 314-336, 2015.

ZHANG R, CHEN W, ADAMS PD. Molecular dissection of formation of senescence-associated heterochromatin foci. **Molecular and Cellular Biology**, Philadelphia, v. 27, p. 2343-2358, 2007.

ZHANG, R. J.; VERMOT, J.; GHERARDI, R.; FUKUI, H.; CHOW, R. W. Calcium signal analysis in the *zebrafish* heart via phase matching of the cardiac cycle. **Bio-protocol**, Sunnyvale, v. 14, i.10, 2024.

ZHANG, X.; LI, W.; ZHANG, B. Biochemical changes in D galactose induced subacute toxicity and mimetic aging in mice. **Chinese Journal of Pharmacoly and Toxicology**, [*s.l.*], v. 4, p. 309-310, 1990.

ZHANG, X, ZHANG B, YANG X, ZHANG W, LI L Behavior and memory changes in D-galactose-induced aging rat model. **Chinese Journal of Gerontology**, [*s.l.*], v. 16, p. 230-232, 1996.

ZHANG, Y-J.; GAN, R-Y.; LI, S.; ZHOU, Y.; LI, A-N., XU, D-P., ET AL. Antioxidant Phytochemicals for the Prevention and Treatment of Chronic Diseases. **Molecules**, Basel, v. 20, p.21138-21156, 2015.

ZHANG, Y.; KAWAKAMI, K.; SUN, X. Calcium handling in *zebrafish* ventricular myocytes. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v. 300, i. 1, p. 56-66, 2011.

ZHAO, X.; GONG, L.; WANG, C.; LIU, M.; HU, N.; DAI, X.; PENG, C.; LI, Y. Quercetin mitigates ethanol-induced hepatic steatosis in *zebrafish* via P2X7R-mediated PI3K/ Keap1/Nrf2 signaling pathway. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 268, 2021.

ZIMMERMANN, P.; HEINLEIN, C.; ORENDI, G.; ZENTGRAF, U. Senescence-specific regulation of catalases in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 29, n. 6, p. 1049-1060, 2006.