

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA

Péterson Alves Santos

**AVALIAÇÃO DO PERFIL TOXICOLÓGICO E NEUROPROTETOR DO EXTRATO  
AQUOSO E COMPOSTOS BIOATIVOS DA *ACHYROCLINE SATUREIODES* (Lam.)  
D.C., ASTERACEAE, NO MODELO DE *CAENORHABDITIS ELEGANS***

Porto Alegre

2024

Péterson Alves Santos

**AVALIAÇÃO DO PERFIL TOXICOLÓGICO E NEUROPROTETOR DO EXTRATO  
AQUOSO E COMPOSTOS BIOATIVOS DA *ACHYROCLINE SATUREIODES* (Lam.)  
D.C., ASTERACEAE, NO MODELO DE *CAENORHABDITIS ELEGANS***

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Farmacologia e Terapêutica.

Orientadora: Prof. Dra. Patrícia Pereira  
Coorientadora: Prof. Dra. Ionara R. Siqueira

Porto Alegre

2024

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Mirna Bainy Leal

---

Dr<sup>a</sup>. Larissa Marafiga Cordeiro

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Gabriela Goethel

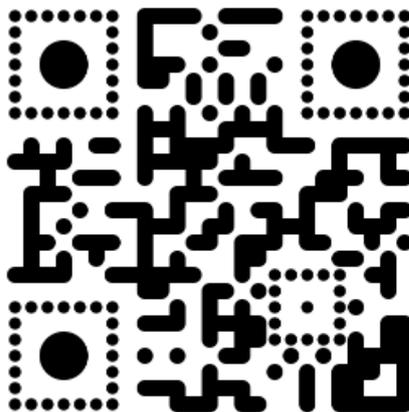
## DEDICATÓRIA

Antes dos agradecimentos, vou registrar algumas coisas:

Primeiro quero dizer que...

*“Fui simpática e ainda aguentei demais...”*

Pablo Vittar (2023)



Essa tese inicialmente é dedicada a mim mesmo (egocêntrico, eu? imagina), mas concluir essa etapa, mesmo depois de ouvir *muitos nãoos*, é certamente uma *deliciaaaa*. Nos agradecimentos eu vou falar sobre os envolvidos e das pessoas boas que passaram por mim. Mas aqui vou dedicar essa tese a mim mesmo, porque, o doutorado não foi apenas uma escolha minha do que fazer da vida em quatro anos, mas uma forma de me escolher. Em um período da minha vida em que a depressão, TEPT e ansiedade tomavam conta da minha mente. Algo que fosse feito por mim e para mim, foi com certeza fundamental para o meu processo de cura. então sim, meu doutorado foi terapêutico. Cheio de muitos altos e baixos, mas com toda certeza me deu sentido a seguir em frente, quando eu já estava desistindo.

Sei que essa etapa é apenas o começo da minha trajetória, hoje eu tenho 25 anos, mas tinha 21 quando entrei e olha onde estamos. E sim fiquei logo que entrei perdido e pensando: *“Assim mana? Que loucura”*. E depois do baque que foi entrar direto no doutorado, eu prometi que daria o meu melhor. E só eu sei o quanto eu tive que evoluir nesse período. As coisas que precisei abrir mão e os esforços que fiz nesse tempo. *Os corres que ninguém vê*. Mas como eu disse, foi uma ESCOLHA. E sempre me vinha a mente essa frase, em cada momento que tudo parecia que ia dar errado:

*“A dor te faz mais forte, as lágrimas fazem você ter mais coragem e as mágoas te tornam mais sábio, por isso agradeça o passado por ter tornado quem você é.”*

Então, é sobre isso, queria registrar que essa tese não é apenas uma etapa de formação profissional ou acadêmica, é um processo conjunto da minha evolução pessoal. Por trás de cada

experimento, de cada linha dessa tese tem um esforço enorme, meu e das pessoas importantes a minha volta.

## AGRADECIMENTOS

Ao concluir esta tese, gostaria de agradecer:

À minha mãe, meu pai, meu irmão e todos que eu considero a minha família. Pois mesmo sem entender o que faço, seguem me amando e me apoiando incondicionalmente.

À minha vó (Carmem Suzana Alves) e tia (Silaine Alves), em especial, pois elas que me apoiaram em inúmeros momentos nesse período de todas as formas possíveis. Cuidaram de mim e estavam lá em cada dificuldade. Mesmo sem compreender muito bem, segue orgulhosa, dizendo que sou o neto “*doutor com doutorado*”.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Patrícia Pereira, por ser essa pesquisadora, mãe e pessoa incrível que ela é. Por ter me aceitado quando eu mesmo duvidava de mim. Por ter me acolhido e me incentivado em todo meu processo. Pela confiança e cada investimento que fez e faz em mim. Por me dar tantas oportunidades de me tornar o pesquisador que estou me tornando. E por me fazer sempre pensar longe, mesmo que isso me leve para outro país. A senhora é incrível e minha maior referência profissional e pessoal. Obrigado pelo carinho, amizade e parceria (e *let's go* nos nossos projetos).

À minha Coorientadora, Prof<sup>a</sup> Ionara Rodrigues Siqueira, pela confiança em mim depositada e por todo o suporte e contribuições dadas durante esse período.

Ao Prof<sup>o</sup> José Angel Fontenla, por ter me aceito na Universidade de Santiago de Compostela. Jamais vou esquecer a sua disponibilidade para orientação e a generosidade em me receber em seu laboratório. *Muchas Gracias*

À Dra. Pricila Pflüger, minha coautora, amiga e uma pessoa incrível, que foi muito importante para minha adaptação no meu período no exterior em Santiago de Compostela. *Gracias* ao Antônio, Raúl e Jacobo por terem feito parte dessa etapa na Espanha.

A todos os meus colegas, os que ainda estão e os que já passaram pelo LABNET.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa de Doutorado no Brasil. E ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa SWE que possibilitou meu período no exterior.

Muito Obrigado!

## RESUMO

*Caenorhabditis* é um modelo amplamente reconhecido por sua aplicabilidade na investigação das vias moleculares associadas a doenças neurodegenerativas, permitindo a observação direta da degeneração neuronal, além da avaliação de comportamentos locomotores e cognitivos. As primeiras avaliações sobre o extrato aquoso da *Achyrocline satureioides* (ASAE) focaram na avaliação dos possíveis efeitos tóxicos durante o desenvolvimento de *C. elegans* e no potencial antioxidante do extrato. Além disso, foi analisado o impacto do extrato no processo de envelhecimento e sua influência sobre o sistema nervoso, destacando o potencial antienvelhecimento e neuroprotetor da planta. Os resultados indicaram que ASAE apresenta baixa toxicidade em *C. elegans* e um efeito dual no sistema redox/antioxidante. Em concentrações menos tóxicas, o extrato modulou o sistema antioxidante sem perturbar os padrões fisiológicos, aparentemente através da ativação transcricional nuclear dos genes *daf-16* e, parcialmente, *skn-1*, após 24 horas de exposição. Ademais, o extrato demonstrou um efeito neuroprotetor robusto e modulador do sistema dopaminérgico, promovendo melhorias significativas nos padrões de saúde e aumentando a longevidade dos organismos após exposição crônica. Os efeitos observados indicam que as melhorias na saúde e longevidade são mediadas pelas vias de sinalização associadas a *daf-16* e *skn-1*, mas independentes da via *daf-2*, sugerindo um mecanismo específico para o aumento da *healthspan*. As análises *in silico* dos compostos bioativos do ASAE indicam um potencial terapêutico significativo. A Achyrobichalcona (ACB), por exemplo, mostrou ser metabolizável e com capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, sugerindo um efeito promissor no sistema nervoso central. Além disso, a 3-O-Metilquercetina (3OMQ) apresentou propriedades similares às de fármacos clinicamente utilizados, destacando-se como um composto com propriedades neuroprotetoras e antienvelhecimento. Considerando a similaridade genética entre *C. elegans* e humanos, especialmente nos genes *daf-16* e *skn-1*, este modelo se mostra particularmente poderoso para o estudo do envelhecimento. Conclui-se que os resultados obtidos com *Achyrocline satureioides* em *C. elegans* não apenas corroboram o potencial neuroprotetor e antienvelhecimento do extrato, como também sugerem que os constituintes da planta, como a ACB e a 3OMQ, possuem significativo potencial para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas direcionadas a doenças neurodegenerativas. Assim, este estudo contribui para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na modulação do envelhecimento e da neuroproteção, oferecendo novas perspectivas para a pesquisa e desenvolvimento de terapias baseadas em compostos naturais.

Palavras-chave: *Achyrocline satureioides*, *Caenorhabditis elegans*; estresse oxidativo; envelhecimento, neuroproteção; modelagem molecular.

## ABSTRACT

*Caenorhabditis* is a widely recognized model for its applicability in the investigation of molecular pathways associated with neurodegenerative diseases, allowing direct observation of neuronal degeneration, in addition to the evaluation of locomotor and cognitive behaviors. The first evaluations of ASAE focused on the evaluation of possible toxic effects during the development of *C. elegans* and on the antioxidant potential of the extract. In addition, the impact of the extract on the aging process and its influence on the nervous system were analyzed, highlighting the antiaging and neuroprotective potential of the plant. The results indicated that ASAE has low toxicity in *C. elegans* and a dual effect on the redox/antioxidant system. At less toxic concentrations, the extract modulated the antioxidant system without disturbing physiological patterns, apparently through nuclear transcriptional activation of the *daf-16* and, partially, *skn-1* genes, after 24 hours of exposure. Furthermore, the extract demonstrated a robust neuroprotective effect and modulation of the dopaminergic system, significantly improving health patterns and extending the lifespan of organisms following chronic exposure. The observed effects suggest that the improvements in health and longevity are mediated by signaling pathways associated with *daf-16* and *skn-1* but are independent of the *daf-2* pathway, indicating a specific mechanism for increased healthspan. In silico analyses of the bioactive compounds in ASAE indicate significant therapeutic potential. For example, Achyrochalcone (ACB) showed the ability to be metabolized and cross the blood-brain barrier, suggesting a promising effect on the central nervous system. Additionally, 3-O-Methylquercetin (3OMQ) exhibited properties like clinically used drugs, highlighting its potential as a neuroprotective and anti-aging compound. Given the genetic similarity between *C. elegans* and humans, particularly in the *daf-16* and *skn-1* genes, this model proves particularly powerful for aging studies. It is concluded that the results obtained with *Achyrocline satureioides* in *C. elegans* not only corroborate the neuroprotective and anti-aging potential of the extract but also suggest that plant constituents, such as ACB and 3OMQ, have significant potential for the development of therapeutic interventions targeting neurodegenerative diseases. Thus, this study contributes to the understanding of the molecular mechanisms involved in aging and neuroprotection, offering new perspectives for research and development of therapies based on natural compounds.

**Keywords:** *Achyrocline satureioides*, *Caenorhabditis elegans*; oxidative stress; aging; neuroprotection; molecular modeling.

## APRESENTAÇÃO

Esta tese está estruturada em capítulos. O Capítulo I abrange uma introdução geral, referencial teórico, objetivos gerais e específicos. Os capítulos II, III e IV apresentam os artigos científicos (publicado, submetido e em elaboração, respectivamente). No Capítulo V encontra-se a discussão geral e conclusão.

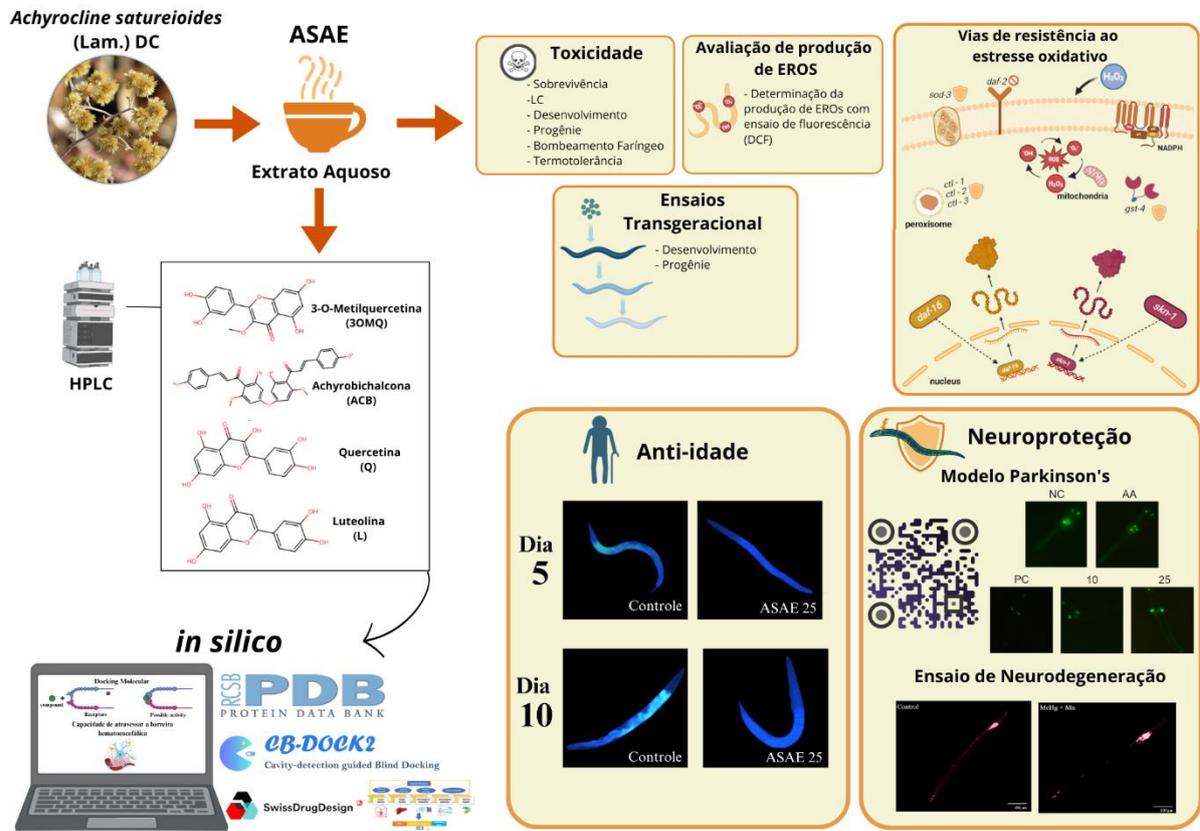
O capítulo II apresenta o artigo 1, publicado na revista *Journal of Toxicology and Environmental Health*, título “Toxicological assessment of the *Achyrocline satureioides* aqueous extract in the *Caenorhabditis elegans* alternative model”. Este artigo reporta resultados de experimentos desenvolvidos no Laboratório de Neurofarmacologia e Toxicologia Pré-Clinica do ICBS da UFRGS, cujo objetivo foi avaliar a segurança, perfil toxicológico e efeito antioxidante do extrato aquoso da *Achyrocline satureioides*, em sua formulação tradicional em múltiplos ensaios em *Caenorhabditis. elegans*.

O capítulo III apresenta a versão do artigo intitulado “*Achyrocline satureioides*: *in silico* and *in vivo* evaluation the potential neuroprotective effect of the aqueous extract in *Caenorhabditis elegans*”, submetido à revista *Phytotherapy Research*. Este artigo reposta resultados obtidos no Laboratório de Farmacologia do Sistema Nervoso Central da Universidade de Santiago de Compostela (USC), Santiago de Compostela, Espanha, durante o período do doutorado sanduíche. O trabalho teve por objetivo a prospecção *in silico* dos compostos majoritários de *Achyrocline satureioides*, bem como a avaliação do extrato aquoso desta espécie em modelos de neurodegeneração dopaminérgica e colinérgica em *Caenorhabditis. elegans*.

No capítulo IV é apresentado o artigo final da tese, em fase de elaboração. Este manuscrito descreve os efeitos do extrato aquoso e três compostos majoritários da *Achyrocline satureioides*, sobre o envelhecimento, sistema nervoso e vias transcricionais em *Caenorhabditis elegans*.

No capítulo V, os protocolos experimentais e esquemas dos ensaios *in vivo*, bem como o registro do algoritmo construído para ensaios *in silico* automatizados, são apresentados.

# RESUMO GRÁFICO DA TESE



## SUMÁRIO

CAPÍTULO I .....	13
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1 <i>Achyrocline satureioides</i> .....	15
2.2 Flavonoides .....	16
2.3 Envelhecimento humano e doenças do sistema nervoso central.....	17
2.4 <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	19
3. OBJETIVOS.....	28
3.1 Objetivo Geral .....	28
3.2 Objetivos Específicos .....	28
CAPÍTULO II .....	29
Toxicological assessment of the <i>Achyrocline satureioides</i> aqueous extract in the <i>Caenorhabditis elegans</i> alternative model .....	29
CAPÍTULO III .....	53
<i>Achyrocline satureioides</i> : <i>in silico</i> and <i>in vivo</i> evaluation the potential neuroprotective effect of the aqueous extract in <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	54
CAPÍTULO IV .....	96
<i>Achyrocline satureioides</i> and bioactives increase lifespan and improve healthspan through the <i>daf-16/snk-1</i> pathways and neuroprotective potential in <i>C. elegans</i> .....	97
CAPÍTULO V .....	132
Seção experimental 1: Evaluation toxicological and neurotoxicological parameters in <i>Caenorhabditis elegans</i> : protocols .....	132
Seção experimental 2: Open source based on RDkit in Python language for massive screening of compounds and bioactives .....	133
4. DISCUSSÃO GERAL .....	134
5. CONCLUSÃO GERAL .....	136
6. COLABORAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS .....	137
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	140

## CAPÍTULO I

### 1. INTRODUÇÃO

O envelhecimento populacional é um fenômeno demográfico global caracterizado pelo aumento da proporção de pessoas idosas em comparação com pessoas jovens. Esse processo é impulsionado por dois fatores principais: a diminuição da taxa de natalidade e o aumento da expectativa de vida, sendo que este segundo fator tem resultado em uma maior prevalência de doenças crônicas e degenerativas, típicas da idade avançada, como doenças cardiovasculares, diabetes e demências. Esses problemas de crônicos de saúde normalmente requerem cuidados contínuos e especializados, sobrecarregando os sistemas de saúde e aumentando os custos associados as necessidades de assistência prolongada (Silva et al., 2019; Nascimento e Diógenes, 2020; Li, 2023; Ma, 2024; Silva, 2024)

Entre as principais doenças do envelhecimento estão aquelas que afetam o sistema nervoso central, como a doença de Alzheimer (DA), doença de Parkinson (DP) e acidente vascular encefálico (AVE). As doenças neurodegenerativas têm um impacto social e econômico significativo. Existe uma correlação entre o surgimento dessas condições e o aumento ou piora de padrões da senescência fisiológica, como perda de mobilidade e declínio cognitivo. O tratamento e o manejo de pacientes com doenças degenerativas requerem investimento por parte das famílias, bem como sistema de saúde, incluindo custos diretos, como consultas, hospitalizações, medicamentos, terapias e mesmo cuidados básicos. Além disso, a incapacidade dos pacientes para o trabalho resulta em perda de renda para os indivíduos e suas famílias, além de diminuir a produtividade econômica geral da sociedade (Zhao et al., 2010; Dimunová et al., 2021; Chaudhuri et al., 2024).

Neste contexto, na ausência de terapias que retardem ou impeçam a progressão de doenças relacionadas idade, especialmente as neurodegenerativas, alternativas têm sido buscadas. Muitas plantas e substâncias bioativas que desempenham um papel na extensão da expectativa de vida saudável e na prevenção de disfunções associadas ao envelhecimento. Alguns extratos e formulações de plantas foram capazes de melhorar os padrões de saúde e aumentar a expectativa de vida de muitas populações, como por exemplo o Ginseng, na China. Numerosos nutracêuticos e compostos isolados de plantas, podem auxiliar em diversas condições e patologias do envelhecimento. À medida que os estudos avançam, há uma mudança no sentido de incorporar a expectativa de saúde saudável - “*healthspan*” - como uma medida de resultado chave nos estudos sobre o envelhecimento (Palliyaguru et al., 2019).

*Healthspan*, definido como o período que um indivíduo vive sem fragilidade ou doença, é um foco crítico na investigação biomédica que visa melhorar a qualidade de vida à medida

que os indivíduos envelhecem (Seals et al., 2015). Várias intervenções, incluindo enriquecimento ambiental, modificações no estilo de vida e restrições alimentares, têm-se mostrado promissoras no prolongamento da expectativa de saúde, bem como no atraso de doenças relacionadas com a idade (Queen et al., 2020; Onken et al., 2020). Dentre as estratégias estudadas, está a busca por novos compostos bioativos de origem vegetal.

A avaliação da qualidade, eficácia e segurança de plantas medicinais e fitoterápicos é um processo complexo, levando em consideração que há inúmeras variáveis envolvidas no contexto da sua produção, comercialização e uso. Na Europa, por exemplo, a regulamentação das plantas medicinais e fitoterápicos é amplamente difundida em alguns países. Os órgãos reguladores realizam a farmacovigilância, visando a liberação ou até mesmo o impedimento da comercialização. No Brasil, essa farmacovigilância existe no que diz respeito a lista de plantas medicinais e fitoterápicos incluídos nas políticas públicas do Sistema Único de Saúde (SUS), visando principalmente a qualidade e eficácia destes produtos. Porém, é importante ressaltar a falta de correlação entre o uso de plantas medicinais e fitoterápicos aos eventos adversos, com descrição detalhada que permita o uso seguro das plantas e seus compostos. Sendo assim a avaliação da toxicidade e segurança de espécies vegetais em uso terapêutico, torna-se uma necessidade emergente (Wegener; Deitelhoff e Silber-Mankowsky, 2015; Leal e Tellis, 2015).

*Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. (*A. satureioides*), da família Asteraceae, popularmente conhecida como “macela”, “marcela” ou “marcelinha do campo” é uma planta amplamente utilizada na medicina popular tradicional da América do Sul, sendo nativa desta região (Sabini et al., 2012). Suas propriedades farmacológicas vêm sendo estudadas principalmente na última década, sugerindo atividades anti-inflamatórias, antipiréticas, antivirais, imunomoduladoras, anticonvulsivantes e até mesmo antitumorais (Sabini et al., 2012; Bianchini et al., 2020; Salgueiro, 2016; Souza et al., 2018).

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o perfil de toxicidade do extrato aquoso de *A. satureioides* e seus principais constituintes, por meio de modelos *in vivo* e *in silico*. Modelos animais, como os nematódeos *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), têm sido fundamentais nos estudos toxicológicos e de segurança, avaliações do sistema antioxidantes, da expectativa vida e de saúde, na avaliação dos efeitos das intervenções nos parâmetros relacionados ao envelhecimento e estudos de doenças neurodegenerativas (Bansal et al., 2015; Essmann et al., 2020;). Esse modelo *in vivo* fornece informações valiosas sobre o impacto de possíveis terapias na expectativa de saúde e serve como uma plataforma para pesquisas translacionais destinadas a melhorar a expectativa de saúde humana (Leiser et al., 2016; Mishra & Howlett, 2021). Os estudos *in silico* se tornaram uma importante ferramenta no direcionamento de compostos

bioativos. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o perfil de toxicidade do extrato aquoso de *A. saturoioides* e seus principais constituintes, por meio de modelos *in vivo* e *in silico*.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Achyrocline saturoioides*

*Achyrocline saturoioides* exibe propriedades antioxidantes devido à presença de polifenóis (Khangholi et al., 2015). Esses polifenóis inibem a autooxidação da glicose e a glicação do colágeno (Khangholi et al., 2015). Passada de geração em geração o seu uso etnofarmacológico é registrado desde os povos originários (tupis e guaranis). Amplamente utilizada na medicina popular para aliviar dores, inflamações, cólicas abdominais e como tranquilizante e sedativo (Santin et al., 2010). Além disso, estudos destacaram os potenciais efeitos antiúlcera, apoiando ainda mais seu uso tradicional no tratamento de várias doenças (Santin et al., 2010). Descobriu-se que a planta inibe a expressão de TLR4 em neutrófilos, indicando suas propriedades imunomoduladoras (Adjei-Fremah et al., 2016; Pérez-Cano et al., 2014). Essa modulação da expressão de TLR4 pode ter implicações nas respostas inflamatórias e na função imunológica geral. No entanto, é essencial observar que alguns estudos relataram atividade mutagênica associada a extratos aquosos (Sarkar, 2024; Cavalcante et al., 2003; Vargas et al., 1991). Isso destaca a importância de mais pesquisas para entender completamente os riscos e benefícios potenciais do uso desta planta para fins medicinais.

Os bioativos presentes na planta, possuem propriedades antioxidantes que podem ajudar a prevenir a formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) (Ramkisson et al., 2012). AGEs são compostos que contribuem para o envelhecimento e várias doenças relacionadas à idade. Ao inibir a formação de AGE, os polifenóis podem ajudar a mitigar os efeitos do envelhecimento. Outros efeitos já foram observados, como anti-inflamatórios, analgésicos e citoprotetores (Oliveira et al., 2012; Arredondo et al., 2004). Essas propriedades podem ser benéficas no combate ao envelhecimento, pois a inflamação e o estresse oxidativo são fatores-chave no processo senil. Além das propriedades imunomoduladoras, como evidenciado por seus efeitos em leucócitos humanos (Cosentino et al., 2008), também podem contribuir para seu potencial efeito antienvelhecimento. Uma resposta imunológica equilibrada é crucial para um período de vida saudável (*healthspan* em humanos), e compostos que modulam a função imunológica podem ajudar a manter a resiliência contra danos relacionados ao envelhecimento.

## 2.2 Flavonoides

Flavonoides são compostos orgânicos do grupo dos polifenóis, conhecidos especialmente pelas suas atividades antioxidantes, devido a sua estrutura bioativa para o combate dos radicais livres (Arredondo et al., 2004). Em seu estudo Souza et al. (2002), apontou que os flavonoides em maior concentração presentes na *A. satureioides* são a quercetina, luteolina e 3-O-metilquercetina, isolando esses compostos das inflorescências dessa espécie (Souza et al., 2002).

A quercetina é um dos compostos flavonoides de constituição aglicona, com inúmeras atividades biológicas, entre as quais pode-se destacar suas propriedades anti-inflamatória, antimicrobiana e antioxidante (Simões et al., 2007; Valério et al., 2009). Esta última foi avaliada por Duarte-Almeida (2006), no qual o composto isolado mostrou uma taxa de mais de 30% de sequestro de radicais DPPH das soluções padrão a 50 µM. Esta proporção foi superior aos outros compostos também avaliados pelo autor (Duarte – Almeida et al., 2006).

Estudos mostram que o consumo de quercetina está entre 50 e 500 mg por dia na dieta humana normal, sendo que a suplementação com até 500 mg do extrato (95% de pureza) três vezes ao dia, não causou efeitos adversos. Todavia, um estudo *in silico*, realizado em três diferentes softwares apontou um possível efeito mutagênico e carcinogênico, provavelmente relacionado à sua estrutura química. Dois destes softwares apontaram uma possível habilidade do composto de atravessar a barreira hematoencefálica. Essa possível propriedade poderia explicar a ação neuroprotetora, avaliada em estudos farmacológicos com a *A. satureioides* (Hahn, Bonafanti & Claudino, 2016; Martínez-Busi, 2019).

A luteolina é um bioativo polifenólico de origem vegetal, presente na *A. satureioides*. É extraída em uma quantidade inferior à quercetina que apresenta efeitos antioxidantes, imunomoduladores e neuroprotetores (Souza et al., 2002). A imunomodulação e a neuroproteção foram evidenciadas pela sua capacidade de inibição sobre as células T e sobre a liberação de citocinas inflamatórias pela micróglia, inibindo assim a ativação e proliferação da neuroinflamação. Sua atividade sobre o processo de metabolização energética protege as mitocôndrias celulares de danos induzidos por citotoxicidade de substâncias plasmáticas (Theoharides et al., 2015).

A 3-O-Metilquercetina é o bioativo majoritário da *A. satureioides*, exhibe propriedades antivirais, anti-inflamatórias e antioxidantes, juntamente com a capacidade de regular funções imunológicas (Zhou et al., 2010). O estudo de Ko et al. (2004) demonstrou que o composto possui efeitos broncodilatadores e inibe fosfodiesterases, ações relevantes no tratamento da hiper-reatividade brônquica. Além disso, 3-O-Metilquercetina demonstrou a capacidade de

suprimir a produção de óxido nítrico, sugerindo seu potencial anti-inflamatório. (Jiang et al., 2006). Ademais, estudos destacaram os efeitos inibitórios seletivos de 3-O-Metilquercetina na fosfodiesterase subtipo 3, o que pode ter implicações na saúde pulmonar e miocárdica (Ko et al., 2003). O composto também demonstrou ações relaxantes na traqueia isolada de porquinhos-da-índia, sugerindo aplicações potenciais no tratamento de condições como constipação, inflamação, tumores e asma (Ko et al., 2002). A 3-O-metilquercetina foi investigada por suas propriedades de permeação e retenção em camadas da pele, mostrando diferenças em comparação com a quercetina, o que pode impactar suas aplicações tópicas (Schwingel et al., 2018). Também foram reportadas atividades antibacterianas e antifúngicas da 3-O-metilquercetina, indicando seu potencial como fungicida natural (Kitonde et al., 2019). Demonstrou propriedades neuroprotetoras e foi capaz de reduzir a atividade da caspase-3 em 48% em binding e dinâmica molecular (Alshawaf et al., 2022). A 3-O-metilquercetina apresenta efeito inibitório na produção de ácido úrico, sendo que suas propriedades anti-inflamatórias podem contribuir para seus efeitos neuroprotetores, dado o papel da inflamação em distúrbios neurológicos (Adachi et al., 2019). Além disso, os efeitos protetores da 3-O-metilquercetina contra citotoxicidade, formação de espécies reativas de oxigênio, danos à membrana e danos ao DNA em células (Kumar et al., 2016). Estudos também destacaram a atividade antiproliferativa da 3-O-metilquercetina, sugerindo seu potencial na inibição do crescimento celular anormal, o que é relevante em condições como tumores cerebrais e doenças neurodegenerativas (Talib et al., 2012). Diferenças estruturais entre a 3-O-metilquercetina e a quercetina demonstraram influenciar sua atividade antiproliferativa, indicando que modificações específicas podem aumentar sua eficácia no direcionamento de células cancerígenas, o que pode ser extrapolado para mecanismos neuroprotetores (Silva, 2023). Além disso, o efeito protetor da 3-O-metilquercetina contra a citotoxicidade induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em células ressalta seu potencial na mitigação de danos relacionados ao estresse oxidativo, uma característica comum em distúrbios neurodegenerativos (Kumar et al., 2016).

### 2.3 Envelhecimento humano e doenças do Sistema Nervoso Central

O envelhecimento é um processo complexo que envolve uma série de alterações fisiológicas, bioquímicas e estruturais que ocorrem ao longo do tempo. Diversos fatores, como o estresse oxidativo, a senescência celular e a formação de produtos de glicação avançada (AGEs), contribuem negativamente para o envelhecimento humano (d'Avila et al, 2020).

O estresse oxidativo desempenha um papel fundamental no envelhecimento, causando danos progressivos às células e tecidos. A produção excessiva de espécies reativas de oxigênio

(EROs) pode levar a danos no DNA, proteínas e lipídios, contribuindo para o envelhecimento celular e tecidual (Gao et al., 2014). O estresse oxidativo tem sido associado a uma variedade de doenças relacionadas à idade, como doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e câncer (Boulch et al., 2018). A senescência celular é outro processo importante no envelhecimento. As células senescentes param de se dividir e entram em um estado de crescimento celular irreversível, secretando uma série de citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento, conhecidas como o fenótipo secretor associado a senescência (SASP) (Ycaza et al., 2021). O acúmulo de células senescentes no organismo ao longo do tempo contribui para o envelhecimento e o desenvolvimento de doenças relacionadas à idade (Lee et al., 2008). Os produtos de glicação avançada (AGEs) são compostos resultantes da ligação não enzimática de açúcares redutores com proteínas, lipídios ou nucleotídeos. A formação de AGEs aumenta com a idade e tem sido associada a complicações em várias doenças crônicas, como diabetes, doenças cardiovasculares e doenças neurodegenerativas (Yu et al., 2009). Os AGEs podem induzir estresse oxidativo e adição, contribuindo para o processo de envelhecimento (Ando et al., 2013).

Doenças do SNC, como DP e DA estão intimamente ligadas ao envelhecimento e ao estresse oxidativo, que é um fator-chave na patogênese de doenças crônicas, incluindo distúrbios neurodegenerativos. Esse dano oxidativo contribui para a progressão de condições como DP e DA, onde os neurônios são particularmente vulneráveis (Khan et al., 2019). A neuroinflamação, marcada por uma resposta inflamatória aumentada no SNC, é outro fator crítico no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. A micróglia ativada libera citocinas pró-inflamatórias, contribuindo para a patogênese de condições como DA e DP (Hong et al., 2016). O estado inflamatório crônico no cérebro exacerba o dano neuronal e acelera a progressão da doença (Gao e Hong, 2008). Há uma interação entre o estresse oxidativo e a neuroinflamação, que caracteriza a progressão fisiopatológica dos distúrbios neurodegenerativos. O estresse oxidativo desencadeia respostas inflamatórias, e estas, por sua vez, amplificam o estresse oxidativo, criando um ciclo vicioso de dano neuronal. (Zhao et al., 2019). O envelhecimento é um fator de risco significativo para doenças neurodegenerativas, com mudanças relacionadas à idade no cérebro tornando os neurônios mais suscetíveis a danos oxidativos e insultos inflamatórios (Terrabuio et al., 2023).

O estresse oxidativo é um fator crucial na senescência celular, um processo ligado ao envelhecimento e a doenças associadas à idade (Gao et al., 2014). Ele contribui para o acúmulo de proteínas danificadas, causado por danos ao DNA. A relação entre estresse oxidativo, senescência celular e doenças envolve vias como ativação de p53 e p21Cip1 e liberação de

TGF- $\beta$  (Yu et al., 2009; Lee et al., 2012). Entender esses mecanismos pode fornecer informações para o desenvolvimento de terapias para condições relacionadas à idade. Portanto, compreender o impacto do envelhecimento em vários tecidos, incluindo o cérebro, é crucial para elaborar intervenções para promover o envelhecimento saudável (Zhuang et al., 2019).

#### 2.4 *Caenorhabditis elegans*

*C. elegans* é um nematódeo de vida livre encontrado no mundo inteiro. Foi inserido como modelo experimental por Sydney Brenner em 1963 (Wood 1988) e sua disseminação no meio científico aumenta gradativamente. Atualmente é reconhecido como um dos modelos mais utilizados para avaliação de efeitos tóxicos e impactos ambientais causados por compostos químicos (Kumar et al., 2015). Caracterizado pelo baixo custo e pela rentabilidade esse modelo tem se mostrado cada vez mais versátil. Sua manutenção é fácil, é um dos poucos modelos com seu genoma totalmente sequenciado, linhagem celular completamente descrita, ciclo de vida curto e alta procriação.

O nematódeo *C. elegans* possibilita a avaliação *in vivo* com os recursos e métodos *in vitro*. Esse invertebrado possui genoma e processos biológicos muito semelhantes aos dos mamíferos. Capaz de fornecer dados metabólicos dos processos digestivos, reprodutivos, endócrinos, sensoriais e neuromusculares (Hunt, 2016). São encontrados como homólogos no genoma de *C. elegans* quase 60-80% dos genes humanos e adicionalmente 40% de genes associados com doenças humanas tem ortólogos que são encontrados no nematódeo, qualificando o modelo para estudos fisiológicos (Leung et al., 2008; Rodriguez et al., 2013).

##### 2.4.1 Diferenciação sexual, Reprodução e Ciclo de Vida do *C. elegans*

São vermes hermafroditas em sua maioria, sendo que menos de 0.1% serão diferenciados em machos. Por serem hermafroditas, eles realizam a autofecundação e anatomicamente quando são adultos jovens e alcançam a idade reprodutiva apresentam duas regiões gonodais (proximal e distal em relação a cabeça do animal) e um útero intermediário a essas regiões aonde os ovos fecundados ficam retidos até a liberação ao meio externo (figura 1).

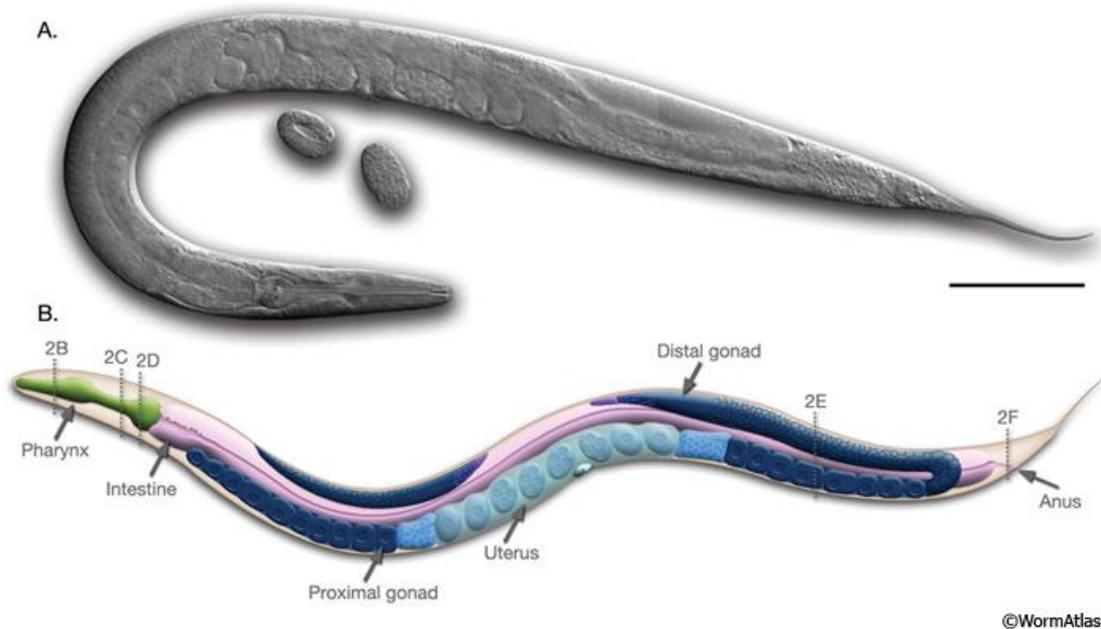


Figura 1. *C. elegans* hermafrodita (a) registro por microscopia e (b) esquema da anatomia interna. Fonte: WormAtlas (<https://www.wormatlas.org/>)

Os machos (0.8-1 mm) são menores que os hermafroditas (1-1.2 mm), são mais ágeis para terem melhor desempenho na reprodução. Possuem apenas uma região gonodal e um local de armazenamento dos espermatozoides (vesícula seminal), como não produzem oócitos apenas espermatozoides, eles não têm útero. A cauda dos machos é adaptada para a cópula, com raios sensoriais e espículas que auxiliam na transferência de espermatozoides para a hermafrodita (figura 2).

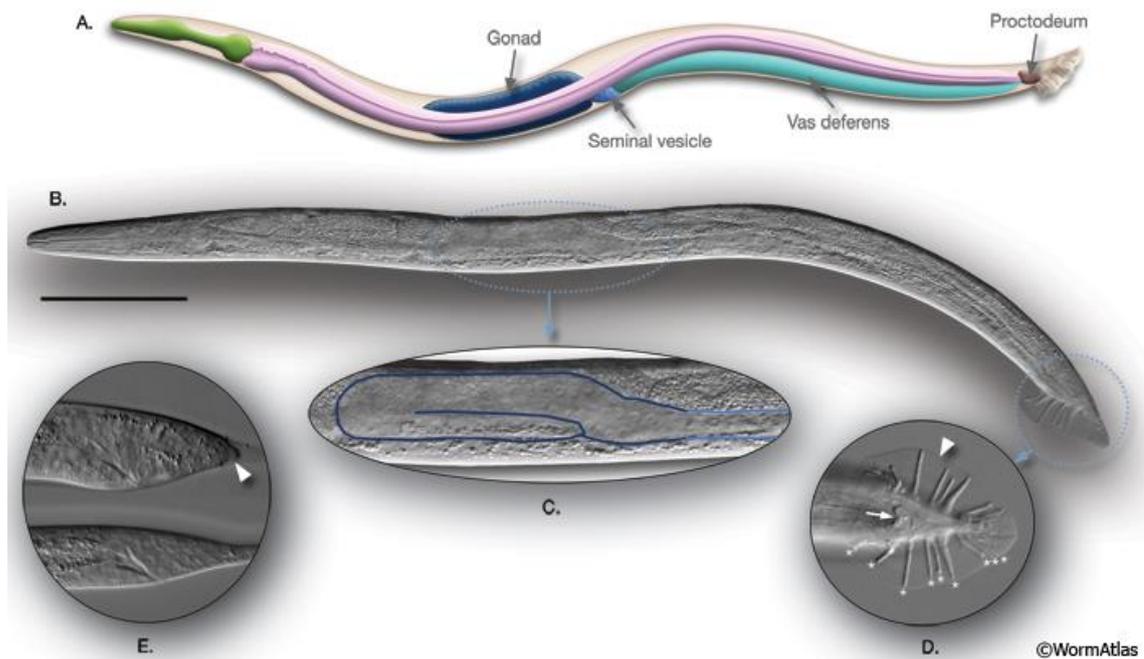


Figura 2. *C. elegans* macho (a) esquema da anatomia interna e (b) registro por microscopia evidenciando em (c) espermateca, (d) calda e cloaca e a seta ampliada em (e) mostrando o momento que começa a inchar a estrutura para liberação dos espermatozoides. Fonte: WormAtlas (<https://www.wormatlas.org/>)

Um hermafrodita típico pode produzir cerca de 300 a 350 descendentes por autofertilização, com uma média geralmente em torno de 300. Os vermes têm um número limitado de espermatozoides que são produzidos durante a fase jovem adulta, antes de começar a produzir oócitos. Já aqueles que passam pela cúpula com machos podem produzir até 1000 descendentes dependendo das condições de manutenção. A autofecundação dos hermafroditas (XX) permite que vermes homozigotos gerem progênies geneticamente idênticas. E o acasalamento dos machos (XO), facilita o isolamento e a manutenção de cepas geneticamente alteradas, bem como a movimentação de alterações genéticas induzidas entre cepas distintas. (Hodgkin & Doniach, 1997)

Geralmente o seu cultivo se dá em um meio sólido chamado Meio de Crescimento para Nematódeos (*Nematode Growth Medium* -NGM). A linhagem selvagem (N2 Bristol) possui um ciclo de vida curto (chegando a fase adulta em 3 dias), vivendo de 3-4 semanas quando mantida em condições padrões de manutenção entre 18-22 C°. O mapeamento do crescimento ao longo do desenvolvimento embrionário até a maturação adulta do nematódeo está totalmente descrito (figura 3) (Stiernagle, 2006).

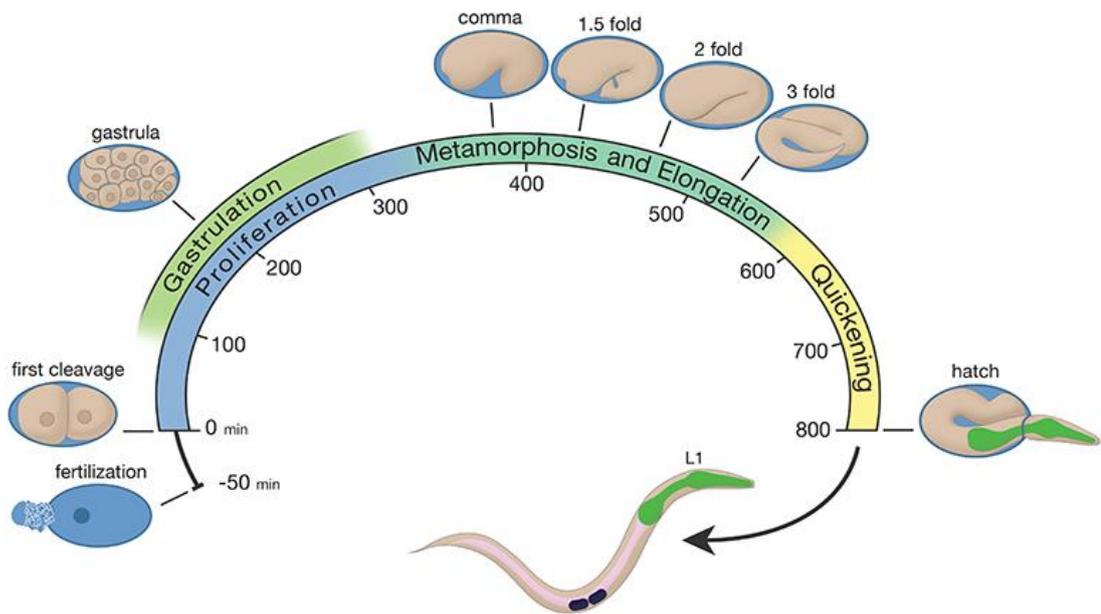


Figura 3. Esquema do desenvolvimento embrionário intra e extrauterino. Fonte: WormAtlas (<https://www.wormatlas.org/>)

O tempo entre a fecundação até a primeira divisão mitótica é de 50 minutos, passando por um período intrauterino de desenvolvimento de até 150 minutos, quando então o ovo é liberado do hermafrodita para o meio externo pela vulva (figura 4) (Porta-de-la-Riva et al., 2012).

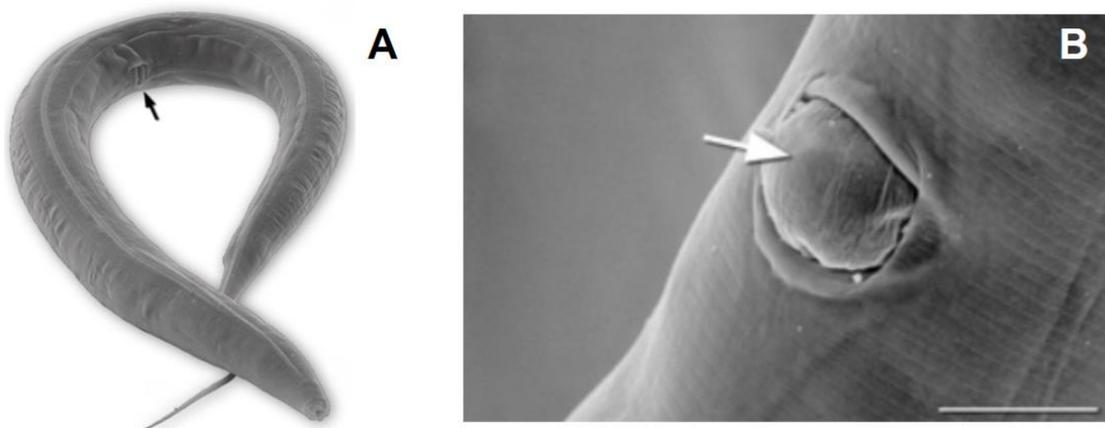


Figura 4. Imagem microscopia eletrônica do (a) hermafrodita com a seta apontando para a vulva e (b) a vulva externa com a expulsão de um ovo. Fonte: WormAtlas, (<https://www.wormatlas.org/>)

O desenvolvimento dentro do ovo após a expulsão pode ser de até 9 horas, com o verme demorando 2-3 horas para romper a membrana se exteriorizar. Nesse período o sistema digestório é diferenciado, como vermes liberando uma proteína juntamente com os ovos, que é utilizada pelos recém eclodidos como fonte alimentar primária (Zhou et al., 2011).

Após a eclosão o verme está no estágio larval de número 1 (L1), nessa fase inicia o desenvolvimento primário do sistema reprodutivo e ocorre totalmente o desenvolvimento do sistema de celomócitos (imunidade inata do animal). No final do estágio L1 o sistema nervoso começa a se dividir. O animal permanece até 12 horas nesse estágio. Durante o estágio L1, em algumas condições, como aglomerações, estresse térmico, ausência de alimento ou exposição agentes patógenos pode induzir uma forma de resistência, prolongamento da vida e defesas do animal, esse estágio larval é chamado de *dauer*. *C. elegans* é capaz de permanecer nesse estágio por meses. É um estado onde não há envelhecimento, porque sua duração não afeta a expectativa de vida pós-*dauer*. Durante este estado, a alimentação é interrompida indefinidamente e a locomoção é marcadamente reduzida. O estado *dauer* termina quando o animal experimenta condições mais favoráveis ao seu desenvolvimento. No estágio seguinte (L2) ocorrem poucas mudanças celulares, apenas um aumento de tamanho. Algumas alterações no sistema reprodutivo e nervoso, como a diferenciação gonadal distal e o surgimento de dois neurônios ganglionares ventrais acontecem no estágio L2. Em condições normais os animais permanecem no estágio L2 por 8 horas (figura 5) (Hu, 2007; Altun & Hall, 2009).

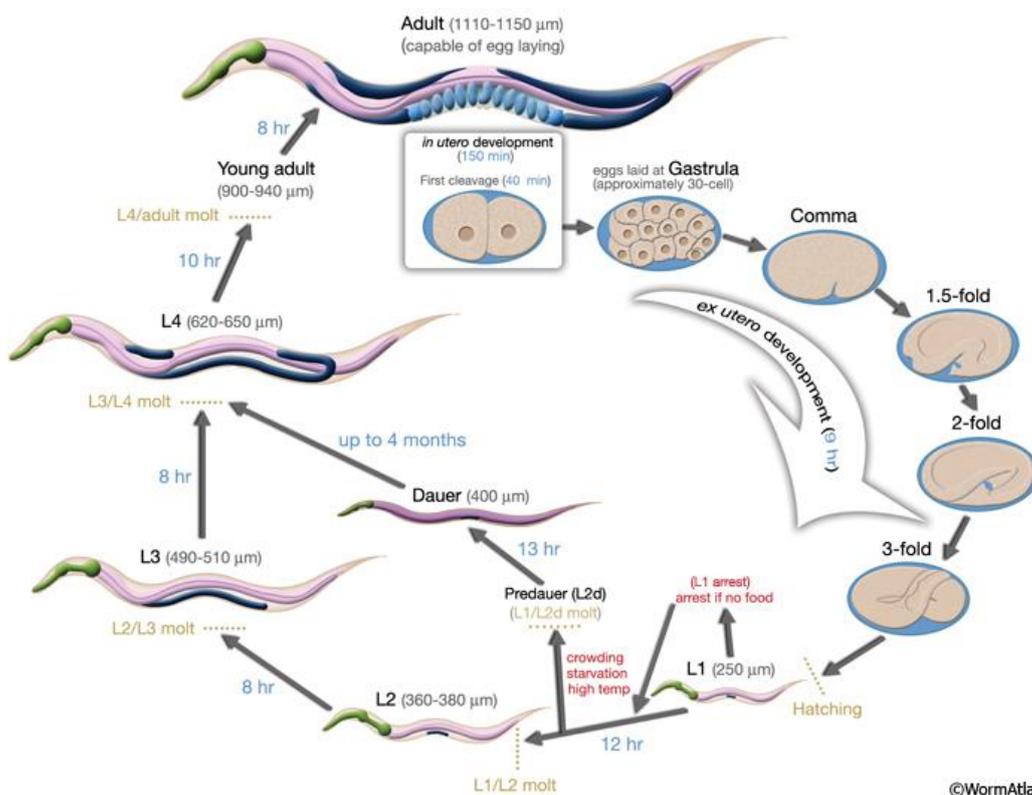


Figura 5. Ciclo de vida do *C. elegans*, quando mantido em 22°C. Fonte: WormAtlas (<https://www.wormatlas.org/>)

No início do estágio seguinte (L3) o sistema nervoso já está completo, ocorrendo modificações sinápticas apenas para adaptação ou exposições do animal ao ambiente. É também no estágio L3 que as gônadas terminam a sua diferenciação, surge o útero e as espermatecas. Ao final desse estágio, que dura cerca de 8 horas, a diferenciação vulvar inicia (Mango, 2007). No estágio L4 o animal está praticamente formado, porém ainda incapaz de se reproduzir pois uma diferenciação entre os músculos ventrais e neurônios associados ao aparelho da postura de ovos são finalizados apenas ao final das 10 horas que este estágio dura. Por fim, ao final do estágio L4 e as 8 horas que sucedem, o animal é considerado um adulto jovem capaz de se reproduzir e se preparar para iniciar o primeiro dia de postura. Essa fase da vida adulta é marcada pelo começo das diferenciações dos oócitos e ao final desse estágio as fecundações começam (Altun & Hall, 2009).

#### 2.4.2 Sistema Nervoso do *C. elegans*

*C. elegans* possui 302 neurônios em hermafroditas e 383 em machos. Os neurônios estão organizados em um sistema nervoso simples, que inclui um anel nervoso na região da cabeça e cordões nervosos longitudinais.

Os vermes possuem neurônios sensoriais que são responsáveis pela detecção de estímulos ambientais como químicos, mecânicos e térmicos (figura 6). Os neurônios motores que controlam a contração dos músculos e, portanto, a locomoção do animal. E os interneurônios que vão processar informações sensoriais e coordenar as respostas motoras (de Bono & Maricq, 2005).

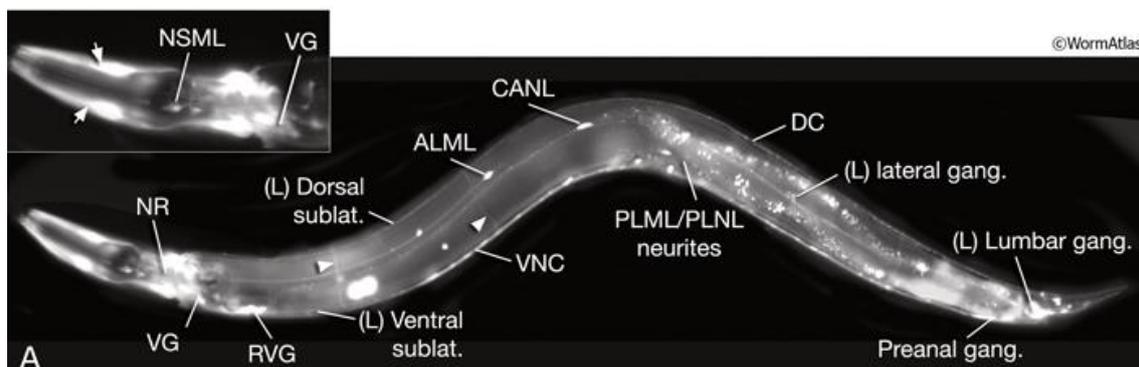


Figura 6. Imagem epifluorescente de um animal transgênico expressando um repórter pan-neural, vista lateral esquerda. A maior coleção de neurônios está ao redor do anel nervoso (NR)

dentro de vários gânglios da cabeça, incluindo o gânglio retrovesicular (RVG) e o gânglio ventral (VG; também, inserção). Ampliação, 400x. Marcador de cepa: unc119::GFP. Obtido do WormAtlas. (<https://www.wormatlas.org/>)

*C. elegans* possui aproximadamente 7.000 sinapses químicas, 600 junções em sinapses elétricas e 2.000 junções neuromusculares. A rede neural é bem documentada e mapeada, o que permite estudos detalhados sobre circuitos neurais e de inúmeros comportamentos, como locomoção, bombeamento faríngeo, digestão, respostas a estímulos mecânicos e térmicos, memória e aprendizagem no modelo (Harris et al., 2020). Essa rede de neurônios e células de ação se comunicam entre si por neurotransmissores altamente conservados entre as espécies, como acetilcolina, GABA, glutamato, dopamina, serotonina e neuropeptídeos (Bargmann & Marder, 2013).

#### 2.4.3 Envelhecimento e *C. elegans*

Os estudos do envelhecimento em *C. elegans* oferecem valiosas informações sobre os processos biológicos fundamentais que regulam a longevidade e a saúde, com implicações potenciais para a compreensão do envelhecimento em humanos (Labbé et al., 2019).

Com o envelhecimento, *C. elegans* mostra sinais físicos como atrofia muscular (figura 7), diminuição da mobilidade e aumento da opacidade do corpo. Alterações metabólicas incluem mudanças nos níveis de ATP, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e acúmulo de produtos de glicação avançada (AGEs). Além disso, a fertilidade diminui e se extingue com a idade, com a maioria dos ovos sendo produzidos nos primeiros dias da fase adulta (Herndon et al., 2002).

Genes como *daf-2*, *age-1*, e *clk-1* estão envolvidos na regulação da longevidade. Mutações nesses genes podem aumentar a vida útil. A via de sinalização da insulina/IGF-1 é crucial na regulação do envelhecimento, como o gene *daf-2*, que codifica o receptor de insulina/IGF-1, quando mutado, pode dobrar a vida útil dos nematoides. O DAF-16/FOXO é um fator de transcrição regulado pela via da insulina/IGF-1. Quando a sinalização de insulina é baixa, DAF-16 entra no núcleo e ativa genes que promovem a longevidade, resistência ao estresse e manutenção de proteínas (Kenyon, 2010).

O estresse oxidativo é outro fator determinante no envelhecimento de *C. elegans* (curiosamente processo similar em organismos superiores). As mitocôndrias desempenham um papel crucial no envelhecimento, com disfunções mitocondriais e a produção de ROS correlacionadas ao envelhecimento (Anderson et al., 2017).

Uma das alterações relacionadas ao envelhecimento mais facilmente observadas é a acúmulo de compostos fluorescentes no intestino, conhecidos como grânulos intestinais. Supõe-se que esses grânulos consistam em lipofuscina, também conhecida como AGEs (Klass, 1977; Garigan et al., 2002; Herndon et al., 2002; Gerstbrein et al. 2005). Outros estudos indicam a presença de ácido antranílico nos grânulos intestinais (Coburn e Gems, 2013). Estudos de Pincus et al. (2016) indicam que a autofluorescência observada em *C. elegans* é o produto de uma mistura complexa de materiais que refletem aspectos distintos da fisiologia do organismo e do envelhecimento. Seus resultados sugerem que a autofluorescência nos comprimentos de onda vermelhos se correlaciona melhor com os processos relacionados ao envelhecimento e à expectativa de vida de animais individuais.

Intervenções como a restrição calórica ou dietas que limitam certos nutrientes sem causar desnutrição podem prolongar a vida útil de *C. elegans*. Substâncias como resveratrol, rapamicina e quercetina foram estudadas por seus efeitos na extensão da vida útil e na promoção da saúde. Estressores leves, como a exposição a baixos níveis de agentes oxidantes, podem ativar vias de resposta ao estresse, levando a um estado de *hormesis* - onde uma baixa dose de um agente estressante, cuja as doses mais altas seria prejudiciais, provoca uma resposta de longevidade.

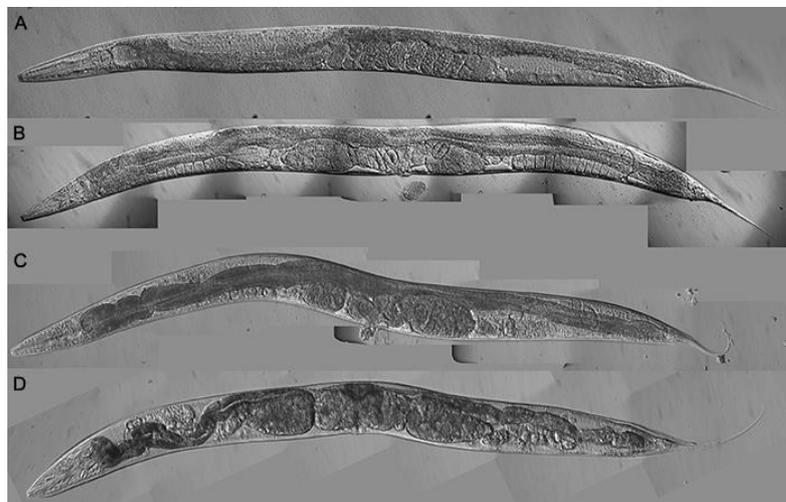


Figura 7. Microcopia dos *C. elegans* com (A) 1 dia, (B) 4 dias, (C) 7 dias e (D) 15 dias de idade adulta. Fonte da imagem: (<https://www.wormatlas.org/>)

#### 2.4.4 *Healthspan* e *Gerospan*

Tendo em vista os distintos estágios larvais e o processo de envelhecimento, *C. elegans* se torna um importante ferramentas na pesquisa para determinantes de padrões de saúde e envelhecimento. Os principais padrões de saúde nesse modelo são os bombeamentos faríngeos,

mobilidade e capacidade de resposta ao estresse. Sendo que o declínio na mobilidade/locomotor é um dos principais indicadores do envelhecimento. Para obter uma avaliação precisa da saúde dos animais, a vida útil de um animal deve ser dividida em duas partes separadas: *healthspan* e *gerospan*. *Healthspan* é definido como o período em que o animal tem mais de 50% da capacidade funcional máxima do tipo selvagem. *Gerospan* é definido como o período em que o animal tem menos de 50% da capacidade funcional máxima do tipo selvagem. (Bansal et al., 2015)



Figura 8. Esquema representativo do ciclo de vida dos *C. elegans* relacionado ao padrão de mobilidade durante os períodos de Healthspan e Gerospan mantidos a 20 C°. Elaborado pelo autor baseado em Bansal et al.,2015.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil de toxicidade do extrato aquoso de *Achyrocline satureioides* (ASAE) e o potencial efeito dos seus compostos isolados sobre o sistema nervoso.

#### 3.2 Objetivos Específicos

##### *In silico*

- Avaliar as atividades farmacológicas e Absorção, Distribuição, Metabolização e Excreção (ADME) dos compostos presentes no ASAE (3-o-metilquercetina - 3OMQ, achyrobichalcona – ACB, quercetina - Q e luteolina - L);
- Predizer a toxicidade de 3OMQ, ACB, Q e L;
- Predizer a capacidade da 3OMQ, ACB, Q e L de atravessar a barreira hematoencefálica;
- Analisar, através de *docking* molecular o potencial de 3OMQ, ACB, Q e L como fármacos antiparkinsonianos e anti Alzheimer.

##### *In vivo*

- Avaliar a toxicidade, segurança e o impacto no sistema antioxidante do ASAE em *C. elegans*.
- Avaliar a capacidade do ASAE contra danos dopaminérgicos e colinérgicos induzido por reserpina e manganês como modelo de Parkinson em *C. elegans*;
- Avaliar o potencial sobre padrões de saúde e a capacidade do ASAE e seu bioativos (3OMQ, Q e L) contra o envelhecimento e o declínio cognitivo em *C. elegans*

## CAPÍTULO II

### **Toxicological assessment of the *Achyrocline satureioides* aqueous extract in the *Caenorhabditis elegans* alternative model**

Publicado na revista científica: Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues (United Kingdom)

Fator de Impacto: 3.06

Doi: <https://doi.org/10.1080/15287394.2024.2368618>



## Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues



ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: [www.tandfonline.com/journals/uteh20](http://www.tandfonline.com/journals/uteh20)

# Toxicological assessment of the *Achyrocline satureioides* aqueous extract in the *Caenorhabditis elegans* alternative model

Péterson Alves Santos, Mariana Uczay, Pricila Pflüger, Larissa Aline Carneiro Lobo, Marilise Brittes Rott, Jose Angel Fontenla, Ionara Rodrigues Siqueira & Patrícia Pereira

To cite this article: Péterson Alves Santos, Mariana Uczay, Pricila Pflüger, Larissa Aline Carneiro Lobo, Marilise Brittes Rott, Jose Angel Fontenla, Ionara Rodrigues Siqueira & Patrícia Pereira (2024) Toxicological assessment of the *Achyrocline satureioides* aqueous extract in the *Caenorhabditis elegans* alternative model, Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 87:18, 730-751, DOI: [10.1080/15287394.2024.2368618](https://doi.org/10.1080/15287394.2024.2368618)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/15287394.2024.2368618>



Published online: 21 Jun 2024.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 92



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at  
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=uteh20>

## CAPÍTULO III

Artigo: *Achyrocline satureioides: in silico and in vivo evaluation of the potential neuroprotective effect of the aqueous extract in Caenorhabditis elegans*

Está submetido na revista científica: *Phytotherapy Research* (United Kingdom)

Fator de Impacto: 7.32



**Achyrocline satureioides: in silico and in vivo evaluation of the potential neuroprotective effect of the aqueous extract in Caenorhabditis elegans**

Journal:	<i>Phytotherapy Research</i>
Manuscript ID	PTR-24-2377
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	27-Jul-2024
Complete List of Authors:	Santos, Péterson; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Institute of Basic Health Sciences; University of Santiago de Compostela, Pharmacology, Pharmacy and Pharmaceutical Technology Pflüger, Prícila; University of Santiago de Compostela, Pharmacology, Pharmacy and Pharmaceutical Technology; University of Santiago de Compostela, Center for Research in Molecular Medicine and Chronic Diseases (CIMUS) Uczay, Mariana; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Institute of Basic Health Sciences; University of Santiago de Compostela, Pharmacology, Pharmacy and Pharmaceutical Technology Rott, Marilise; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Institute of Basic Health Sciences (ICBS) Gómez-Couso, Hipólito; University of Santiago de Compostela, Department of Microbiology and Parasitology Siqueira, Ionara; Universidade Federal do Rio Grande do Sul Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Farmacologia Pereira, Patricia; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Pharmacology; University of Santiago de Compostela, Pharmacology, Pharmacy and Pharmaceutical Technology Fontenla, Jose; University of Santiago de Compostela, Pharmacology, Pharmacy and Pharmaceutical Technology
Keyword:	neurodegenerative diseases, <i>Achyrocline satureioides</i> , neuroprotection, in silico, <i>Caenorhabditis elegans</i>

## CAPÍTULO IV

Artigo: *Achyrocline satureioides* and bioactives increase lifespan and improve healthspan through the *daf-16/snk-1* pathways and neuroprotective potential in *Caenorhabditis elegans*

Artigo em elaboração e será submetido à revista científica: Journal of Ethnopharmacology (Ireland)

Fator de Impacto: 5.98

*Achyrocline satureioides* and bioactives increase lifespan and improve healthspan through the *daf-16/snk-1* pathways and neuroprotective potential in *Caenorhabditis elegans*

Santos, P.A.<sup>1,2,4</sup>, Pflüger, P.<sup>2,3</sup>, Bielavski, J.B.<sup>1,4</sup>, Varriente, G.O.<sup>1,4</sup>, Rott, M.B.<sup>4</sup>, Siqueira, I.R.<sup>4</sup>, Fontenla, J.A.<sup>2</sup>, Pereira, P.\*<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Neuropharmacology and Preclinical Toxicology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 90050-170, Brazil.

<sup>2</sup> GI-1684 Laboratory of Central Nervous System Pharmacology (Faculty of Pharmacy), Department of Pharmacology, Pharmacy and Pharmaceutical Technology, University of Santiago de Compostela, 15782 - Santiago de Compostela, Spain.

<sup>3</sup> Center for Research in Molecular Medicine and Chronic Diseases (CIMUS). University of Santiago de Compostela, 15782 - Santiago de Compostela, Spain.

<sup>4</sup> Institute of Basic Health Sciences (ICBS), Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 90050-170, Brazil.

---

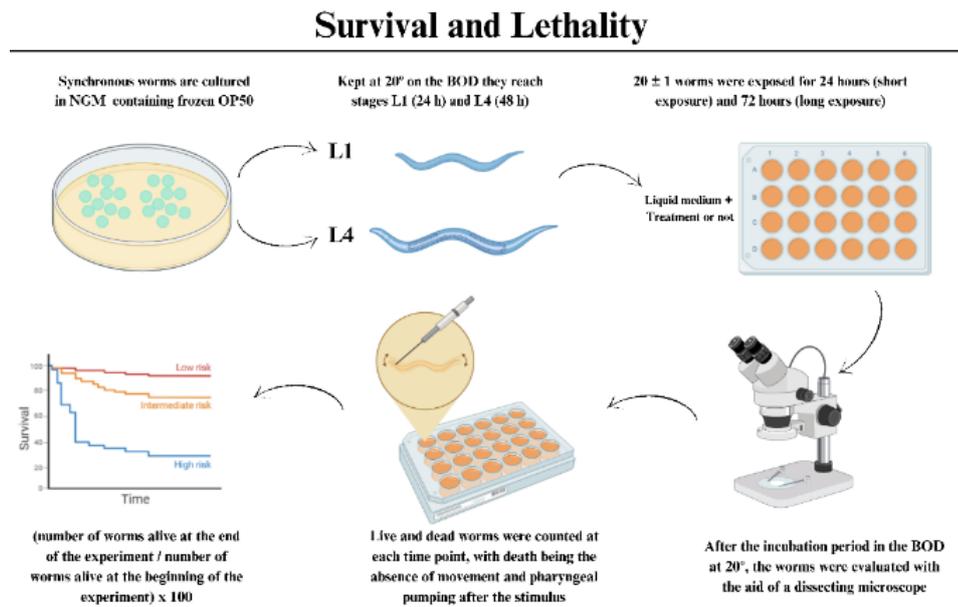
\*Author for correspondence: Patrícia Pereira, Email address: [patriciapereira@ufrgs.br](mailto:patriciapereira@ufrgs.br). Federal University of Rio Grande do Sul, Ramiro Barcelos, 2600. Porto Alegre, 90050-170, Brazil. Cell phone number: +55 51 997980204.

## CAPÍTULO V

Seção experimental *IN VIVO*: Evaluation toxicological and neurotoxicological parameters in *Caenorhabditis elegans*: protocols

Os protocolos dos métodos, desenhos e esquemas experimentais estão descritos e podem ser acessados em:

[https://osf.io/k9jde/?view\\_only=12e471c51998464eaccb04305e612d60](https://osf.io/k9jde/?view_only=12e471c51998464eaccb04305e612d60)



Esquema experimental ensaio de sobrevivência ou letalidade. Elaborado pelo autor nos aplicativos Biorender (<https://www.biorender.com/>) e Canva (<https://www.canva.com/>).

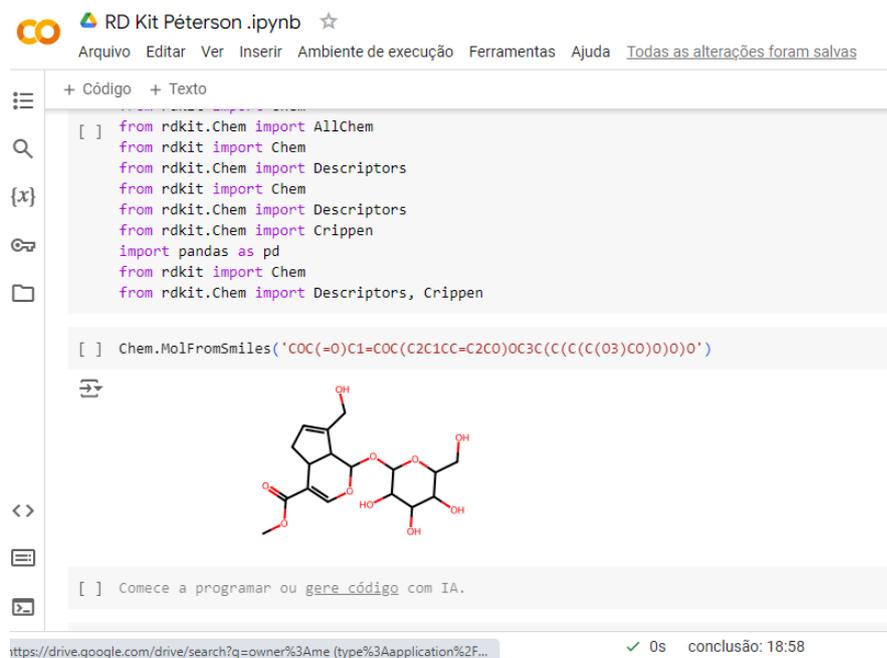
Santos, P. A., & Pereira, P. (2024). Evaluation toxicological and neurotoxicological parameters in *Caenorhabditis elegans*: protocols. OSF. <https://doi.org/10.17605/OSF.IO/K9JDE>

\* Protegidos pela *License: CC-By Attribution 4.0 International*

Seção experimental *IN SILICO*: Open source based on RDkit in Python language for massive screening of compounds and bioactives

O código aberto baseado em RDkit da linguagem Python para triagem massiva de compostos e bioativos pode ser encontrado em:

[https://osf.io/gvdu3/?view\\_only=cdf1f969bcfb4cb9894b14c0a21730b2](https://osf.io/gvdu3/?view_only=cdf1f969bcfb4cb9894b14c0a21730b2)



The screenshot displays a Jupyter Notebook titled "RD Kit Péterson .ipynb". The code cell contains the following Python code:

```
[ ] from rdkit.Chem import AllChem
from rdkit.Chem import Chem
from rdkit.Chem import Descriptors
from rdkit.Chem import Chem
from rdkit.Chem import Descriptors
from rdkit.Chem import Crippen
import pandas as pd
from rdkit.Chem import Chem
from rdkit.Chem import Descriptors, Crippen
```

The next cell shows the execution of the following code:

```
[ ] Chem.MolFromSmiles('COC(=O)C1=COC(C2C1CC=C2CO)OC3C(C(C(C(O3)CO)O)O)O')
```

Below the code, a chemical structure is rendered, showing a complex molecule with multiple hydroxyl groups and a lactone ring system.

At the bottom of the notebook, there is a prompt: "[ ] Comece a programar ou gere código com IA." and a status bar indicating "0s conclusão: 18:58".

Santos, P. A., Pereira, P., & Fontenla, J. A. (2024). Open source based on RDkit in Python language for massive screening of compounds and bioactives. OSF. <https://doi.org/10.17605/OSF.IO/GVDU3>

\*Protegidos pela *License: CC-BY Attribution 4.0 International*.

#### 4 DISCUSSÃO GERAL

Na busca pela identificação de substâncias que possam contribuir para estender a expectativa de vida e prevenir disfunções associadas à idade, vários estudos destacaram os potenciais benefícios dos fitoquímicos e extratos vegetais para a saúde. Babich et al. (2022) destacaram o papel de certos extratos e formulações vegetais na melhoria dos padrões de saúde e no aumento da expectativa de vida saudável. Luo, Si, Jia e Liu (2021) ressaltam a crescente relevância dos nutracêuticos e compostos vegetais isolados no tratamento de doenças relacionadas ao envelhecimento, especialmente aquelas que afetam o sistema nervoso.

Recentemente, inúmeros estudos têm buscado avaliar o efeito na longevidade mediada por extratos de plantas amplamente aplicadas e difundidas popularmente, como *Jujubae fructus* (Zhang et al., 2024), *Sanghuangporus sanghuang* (Dong et al., 2023), *Camellia sinensis* (Duangjan et al., 2022) e *Panax ginseng* (Wang et al., 2021), mostrando efeitos tanto pró-longevidade em condições padrões de desenvolvimento dos *C. elegans* como modulações nas respostas ao estresse. Há uma busca intensa para compreender os mecanismos subjacentes e os responsáveis por esses efeitos. Joseph et al. (2007) discutem os efeitos dos polifenóis das frutas na sinalização neuronal e no comportamento na senescência, apontando que dietas ricas em antioxidantes e compostos anti-inflamatórios encontrados em frutas e vegetais podem reduzir o risco de doenças neurodegenerativas relacionadas à idade, como Alzheimer e Parkinson. Soda (2022) explora o papel das poliaminas como nutrientes para promover uma vida longa e saudável e seu efeito na metilação do DNA, destacando a intrincada relação entre patologias associadas ao envelhecimento, expectativa de vida e regulação da expressão gênica. Wang et al. (2013) também investigam a interação do cranberry com macronutrientes dietéticos para promover o envelhecimento saudável em *Drosophila*, mostrando as diversas bioatividades de plantas que podem dar suporte a processos de envelhecimento saudável.

O cenário de pesquisa em torno de plantas e substâncias bioativas que influenciam a expectativa de vida saudável é rico e diverso. Estudos destacaram o potencial de fitoquímicos, polifenóis de frutas e extratos vegetais na modulação de vias de sinalização, redução de riscos de doenças e promoção do envelhecimento saudável (Wang et al., 2021; Duangjan et al., 2022; Dong et al., 2023; Zhang et al., 2024).

As descobertas deste estudo demonstram que o extrato aquoso de *Achyrocline satureioides* (ASAE) e seus compostos bioativos podem aumentar significativamente a longevidade de *Caenorhabditis elegans* e tem potencial neuroprotetor no modelo.

Os fitoquímicos polifenólicos constituintes desses extratos, incluindo os flavonoides, por suas propriedades antioxidantes são indicados como os principais responsáveis por esses efeitos

na longevidade. A quercetina, por exemplo, já apresentou efeito na longevidade em *C. elegans* e outros modelos (Chen et al., 2024). De maneira inesperada, a exposição de quercetina na concentração de 150  $\mu\text{M}/\text{ml}$  por 48 horas em animais adultos não foi encontrada em uma extensão significativa da vida máxima. Relatórios anteriores determinaram que nas exposições de 72 horas imediatamente após a sincronização (em ovos ainda) em concentrações a partir de 100  $\mu\text{M}/\text{ml}$ , a quercetina prolongou a vida do animal nessa concentração (Kampkötter et al., 2008). Na sequência a uma série de trabalhos sobre a quercetina, não se tem dados homogêneos. Por exemplo, Pietsch e colaboradores (2009) verificaram que de fato, a quercetina em concentrações de 100 ou 200  $\mu\text{M}/\text{ml}$  não expandiu significativamente a vida útil da 1ª geração (P0) de nematoides expostos em tratamentos a partir do estágio L4. Somente quando os nematoides foram expostos durante toda a sua vida (ou seja, incluindo o desenvolvimento embrionário) uma extensão significativa da vida útil pôde ser observada. Comprovadamente, a exposição a compostos e substâncias no desenvolvimento embrionário e nos estágios L1-L2 pode, quando em concentrações não tóxicas, induzir as vias de resposta ao estresse, de forma total ou parcial pelo bloqueio de daf-2, além da formação de dauer sob essas condições, que poderia levar a um fenótipo de longevidade. Adicionalmente a isso, Saul e colaboradores (2008) verificaram que a quercetina atuava na longevidade independentemente de DAF-16, em um desenho experimental em que anteriormente verificaram ativação dessa via (Kampkötter et al., 2008). Em um estudo mais recente, a exposição após o estágio L4 de desenvolvimento do animal com 200  $\mu\text{M}/\text{ml}$  de quercetina não afetou a longevidade desses animais e não conseguiram reproduzir essa descoberta quando testaram o efeito. Em contraste, quando usaram a geração F1 de pais que tinham sido expostos, mesmo quando começaram a exposição do verme ao flavonol mais tarde na vida, observou-se um aumento na expectativa de vida (Surco et al., 2012; Pallauf et al., 2016).

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Entender os mecanismos pelos quais esses compostos naturais exercem seus efeitos em vários aspectos da saúde e do envelhecimento é crucial para o desenvolvimento de intervenções que podem aumentar a expectativa de vida saudável e mitigar disfunções relacionadas à idade, como disfunções no sistema nervoso.

Aqui, ASAE apresentou baixa toxicidade em *C. elegans* e mostrou ter um efeito dual no sistema redox/antioxidante, em concentrações seguras (abaixo da  $LC_{50}$ ) foi capaz de modular o sistema não enzimático e enzimático sem alterar padrões fisiológicos, aparentemente por ativação transcricional nuclear *daf-16* e parcialmente *snk-1* em 24 horas de exposição. Além de atuar como um potente neuroprotetor e modulador do sistema dopaminérgico, foram apresentadas que as concentrações menores não forneceram proteção suficiente contra os danos neurodegenerativos induzidos pela reserpina, embora modularam comportamentos dopaminérgicos previamente danificados. Adicionalmente, o ASAE aumentou a expectativa de vida dos animais após a exposição crônica de 48 horas e foi capaz de melhorar padrões de saúde no animal.

Os compostos isolados majoritários tiveram uma prospecção *in silico* potencialmente esclarecedora. ACB mostrou-se pouco similar a fármacos, porém com grande potencial de ser metabolizada e seus metabolitos de entrarem no SNC, além do transporte ativo ser viável conforme mostra os ensaios de Docking Molecular. E a 3OMQ mostrou-se muito similar a fármacos já aplicados na clínica, e um efeito como as possíveis respostas esperadas de interação com os receptores de doenças neurodegenerativas de interesse, como Parkinson e Alzheimer. O investimento em um composto sintético da ACB deveria ser explorado a seguir, bem como seus metabolitos principais que ainda não tem registro na PubChem (M1 e M3).

*In vivo*, avaliamos os compostos disponíveis (Q, L e 3OMQ) e o mais promissor foi a 3-O-Metilquercetina que demonstrou propriedades neuroprotetoras e potencial para intervenções terapêuticas para condições neurológicas. Além do potencial antienvelhecimento.

Porém mais estudos devem ser realizados para avançar na aplicação desses compostos isolados ou em conjunto com outras estratégias farmacológicas em doenças associadas ao envelhecimento.

## 6 COLABORAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Durante o desenvolvimento desta tese, outras produções e colaborações foram desenvolvidas.

Colaborações:

- 1) Coautor, do artigo da doutoranda Larissa Alina Carneiro Lobo (PPGFT-UFRGS), integrante do grupo de pesquisa. Foi a primeira publicação com o modelo *C. elegans* do grupo. DOI: [10.1080/15287394.2023.2237069](https://doi.org/10.1080/15287394.2023.2237069)
- 2) Um dos autores do artigo da mestranda Glaucia Campos (PPGFT-UFRGS), integrante do grupo de pesquisa, submetido ao Journal of Applied Toxicology (FI=3.84). Foi a primeira dissertação com o modelo *C. elegans* do grupo.



Gamma-decanolactone increases stress resistance and improves toxicity parameters on the <i>Caenorhabditis elegans</i> alternative model	
Journal:	Journal of Applied Toxicology
Manuscript ID:	JAT-24-0389
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	09-Jul-2024
Complete List of Authors:	Campos, Glaucia; Universidade Federal do Rio Grande do Sul Instituto de Ciencias Basicas da Saude Santos, Peterson Alves; Universidade Federal do Rio Grande do Sul Instituto de Ciencias Basicas da Saude; Universidade de Santiago de Compostela Departamento de Farmacologia Farmacia e Tecnologia Farmaceutica Uczay, Mariana; Universidade Federal do Rio Grande do Sul Instituto de Ciencias Basicas da Saude; Universidade de Santiago de Compostela Departamento de Farmacologia Farmacia e Tecnologia Farmaceutica Pflüger, Priscila; Universidade de Santiago de Compostela Departamento de Farmacologia Farmacia e Tecnologia Farmaceutica Mendes, Thais Lemos; Universidade Federal do Rio Grande do Sul Instituto de Ciencias Basicas da Saude Fontenla, Jose Angel; Universidade de Santiago de Compostela Departamento de Farmacologia Farmacia e Tecnologia Farmaceutica Pereira, Patricia; Universidade Federal do Rio Grande do Sul Instituto de Ciencias Basicas da Saude; Universidade de Santiago de Compostela Departamento de Farmacologia Farmacia e Tecnologia Farmaceutica
Keywords:	gamma-decanolactone, toxicity, antioxidant, <i>in silico</i>, <i>in vivo</i>, <i>Caenorhabditis elegans</i>

- 3) Autor da secção “*Toxicological and safety profile in the alternative C. elegans model*” do manuscrito do aluno de doutoramento Vinicius Del Monte (Departamento de Tecnologia Farmacêutica da Universidade de Santiago de Compostela, Espanha) que avalia a utilização de duas nanoformulações carregadas com ciclopirox.
- 4) Coautor dos manuscritos das alunas de mestrado da Universidade Federal de Rondônia orientadas do professor Sandro Schons.

**Assessment of the safety and biological effects of methanolic extracts of  
*Sapindus saponaria L.* in *Caenorhabditis elegans*: modulates lifespan  
and resistance to stress**

Ana Carolina Anchieta Adriano, Peterson Alves Santos, Patricia Pereira & Sandro

***Himatanthus sucuuba* used traditionally for the treatment of infectious diseases in the Amazon region: studies of antimicrobial activities, toxicity profile and safety in the *C. elegans* model**

Regiane Rossi Oliveira Lima, Peterson Alves Santos, Ana Carolina Anchieta Adriano, Patricia Pereira & Sandro de Vargas Schons.

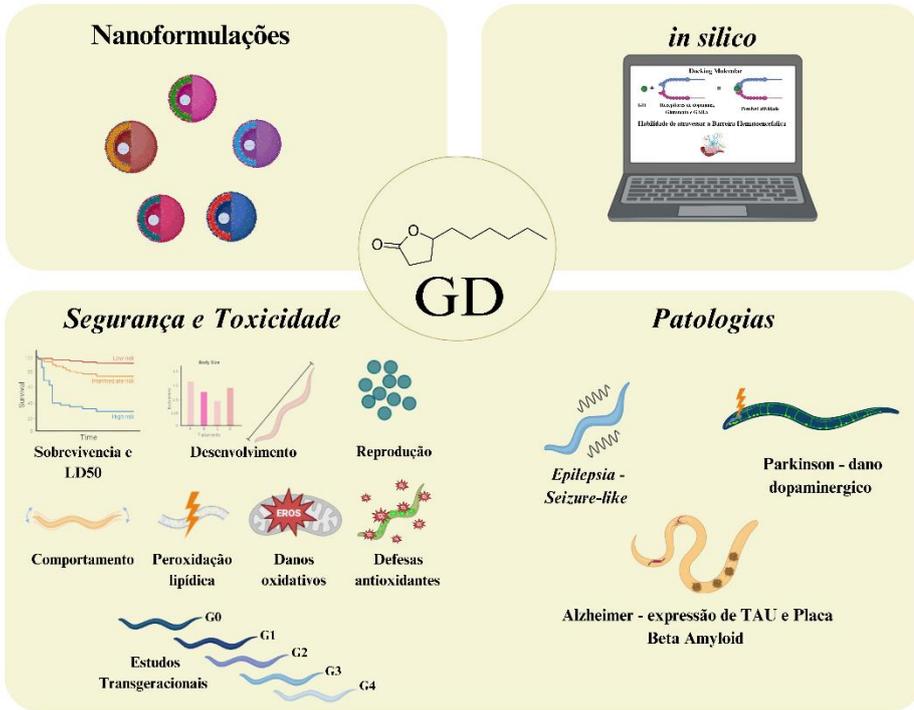
- 5) Coautor do manuscrito da tese da Dra. Mariana Uczay, integrante do laboratório.

***In silico, in vitro* and *in vivo* pharmacological evaluation of two iridoids: geniposide and asperuloside**

Uczay, M.<sup>1,2</sup>; Santos, P.<sup>1,2</sup>; von Poser, G.<sup>3</sup>; Pereira, P.<sup>1,2</sup>; Brea, J.M.<sup>4</sup>; Loza, M.I.<sup>4</sup>,

Fontenla, J.A.\*<sup>2</sup>

- 6) Projeto em cooperação com a Profa. Dra. Marilise Brites: Reposicionamento de fármacos - determinação dos efeitos da combinação de fármacos aplicados na clínica com potencial contra infecções amebianas em *C. elegans*.
- 7) Projeto em cooperação com CiMUS da USC: Impacto do uso de antipsicóticos nas demências e no envelhecimento em modelos de neurodegeneração em *C. elegans*: com foco na memória e aprendizagem.
- 8) Elaboração e produção de 5 nanoformulações inéditas carregadas com Gamma-decanolactona (GD) que serão estudadas na sequência em um estágio Pós-doutoral. Já está em andamento a prospecção dos lipossomas no modelo de *C. elegans* e aplicação das mesmas no projeto guarda-chuva já aprovado, **45475 - NanoTarget - plataforma para determinação do perfil de segurança/toxicidade e efeito neuroprotetor de nanoformulações de Gama-decanolactona no modelo experimental de *Caenorhabditis elegans***, como parte dos projetos de outros alunos de mestrado do laboratório.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adachi, S., Kondo, S., Sato, Y., Yoshizawa, F., & Yagasaki, K. (2019). Anti-hyperuricemic effect of isorhamnetin in cultured hepatocytes and model mice: structure–activity relationships of methylquercetins as inhibitors of uric acid production. *Cytotechnology*, 71(1), 181-192. <https://doi.org/10.1007/s10616-018-0275-8>

Adjei-Fremah, S., Jackai, L., Schimmel, K., & Worku, M. (2016). Microarray analysis of the effect of cowpea (*Vigna unguiculata*) phenolic extract in bovine peripheral blood. *Journal of Applied Animal Research*, 46(1), 100-106. <https://doi.org/10.1080/09712119.2016.1264305>

Alam, M. (2023). The burden of diabetes and hypertension on healthy life expectancy in Bangladesh. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2451585/v1>

Alshawaf, E., Hammad, M., Marafie, S., Ali, H., Al-Mulla, F., Abubaker, J., ... & Mohammad, A. (2022). Discovery of natural products to block SARS-CoV-2 S-protein interaction with neuropilin-1 receptor: a molecular dynamics simulation approach. *Microbial Pathogenesis*, 170, 105701. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105701>

Altun, Z. F., & Hall, D. H. (2009). *C. elegans Atlas*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/pdb.top85>

Anderson, R., Rodriguez, M., & Morrow, J. (2017). Mitochondrial dysfunction in *C. elegans* aging: Evidence from studies on oxidative stress and mitochondrial function. *Ageing Research Reviews*, 36, 25-37. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.11.004>

Ando, R., Ueda, S., Yamagishi, S., Miyazaki, H., Kaida, Y., Kaifu, K., ... & Okuda, S. (2013). Involvement of advanced glycation end product-induced asymmetric dimethylarginine generation in endothelial dysfunction. *Diabetes and Vascular Disease Research*, 10(5), 436-441. <https://doi.org/10.1177/1479164113486662>

Arredondo, M., Blasina, F., Echeverry, C., Morquio, A., Ferreira, M., Abin-Carriquiry, J., & Dajas, F. (2004). Cytoprotection by *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. and some of its main flavonoids against oxidative stress. *Journal of Ethnopharmacology*, 91(1), 13-20. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2003.11.012>

Bansal, A., Zhu, L. J., Yen, K., & Tissenbaum, H. A. (2015). Uncoupling lifespan and healthspan in *Caenorhabditis elegans* longevity mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(3), E277-286. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412192112>

Bargmann, C. I., & Marder, E. (2013). From *C. elegans* to *Drosophila* and back: A case study in neuroethology. *Current Opinion in Neurobiology*, 23(1), 7-13. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2012.08.004>

Bianchi, S. E., et al. (2020). Achyrocline satureioides compounds, achyrobichalcone and 3-O-methylquercetin, induce mitochondrial dysfunction and apoptosis in human breast cancer cell lines. *IUBMB Life*, 72(10), 2133-2145. <http://dx.doi.org/10.1002/iub.2348>

Boulch, M., Ahmed, E., Rogowska-Wrzesińska, A., Baraibar, M., & Friguet, B. (2018). Proteome oxidative carbonylation during oxidative stress-induced premature senescence of WI-38 human fibroblasts. *Mechanisms of Ageing and Development*, 170, 59-71. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2017.07.005>

Cavalcante, A., Rübensam, G., Picada, J., Silva, E., Moreira, J., & Henriques, J. (2003). Mutagenicity, antioxidant potential, and antimutagenic activity against hydrogen peroxide of cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice and cajuina. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 41(5), 360-369. <https://doi.org/10.1002/em.10158>

Chaudhuri, K. R., Azulay, J., Odin, P., Lindvall, S., Domingos, J., Alobaidi, A., ... & Martinez-Martin, P. (2024). Economic burden of Parkinson's disease: a multinational, real-world, cost-of-illness study. *Drugs - Real World Outcomes*, 11(1), 1-11. <https://doi.org/10.1007/s40801-023-00410-1>

Cosentino, M., Bombelli, R., Carcano, E., Luini, A., Marino, F., Crema, F., ... & Lecchini, S. (2008). Immunomodulatory properties of *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. infusion: a study on human leukocytes. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(3), 501-507. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.12.014>

d'Avila, J., Ramos, A., Dourado, D., Siqueira, R., Carlos, A., & Moreno, A. (2020). Mecanismos moleculares do envelhecimento: revisão da literatura. *Revista Brasileira De Ciências Do Envelhecimento Humano*, 17(1). <https://doi.org/10.5335/rbceh.v17i1.10543>

de Bono, M., & Maricq, A. V. (2005). Neuronal substrates of complex behaviors in *C. elegans*. *Annual Review of Neuroscience*, 28, 451-501. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.27.070203.144259>

Dimunová, L., Soósová, M. S., Kardosová, K., Červený, M., & Belovicova, M. (2021). Quality of life in post-stroke patients. *Kontakt*, 23(3), 157-161. <https://doi.org/10.32725/kont.2020.036>

Docampo-Palacios, M., Alvarez-Hernandez, A., Adiji, O., Turro, D., Valerino-Díaz, A., Viegas, L., ... & Dixon, R. (2020). Glucuronidation of methylated quercetin derivatives: chemical and biochemical approaches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(50), 14790-14807. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c04500>

Dong, Y., Guha, S., Sun, X., Cao, M., Wang, X., & Zou, S. (2012). Nutraceutical interventions for promoting healthy aging in invertebrate models. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2012/718491>

Espinoza, M. (2023). The socioeconomic distribution of life expectancy and healthy life expectancy in Chile. *International Journal for Equity in Health*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12939-023-01972-w>

Essmann, et al. (2020). Mechanical properties measured by atomic force microscopy define health biomarkers in ageing *C. elegans*. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14785-0>

Gao, B., Li, K., Yy, W., Zhang, J., Li, J., Zhang, L., ... & Yq, W. (2014). Zinc finger protein 637 protects cells against oxidative stress-induced premature senescence by MTERT-mediated telomerase activity and telomere maintenance. *Cell Death and Disease*, 5(7), e1334. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.298>

Gao, H., & Hong, J. (2008). Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression. *Trends in Immunology*, 29(8), 357-365. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.05.002>

Guo, Y., Ayers, J., Carter, K., Wang, T., Maden, S., Edmond, D., ... & Grady, W. (2019). Senescence-associated tissue microenvironment promotes colon cancer formation through the secretory factor GDF15. *Aging Cell*, 18(6). <https://doi.org/10.1111/ace1.13013>

Harris, J., Levin, M., & Ruvkun, G. (2020). The neural circuits of *C. elegans*. *Current Biology*, 30(1), R48-R56. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.11.010>

Herndon, J. G., Schmeissner, P., Dudaronek, J. M., Dauer, W. T., & Hench, J. (2002). Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing *C. elegans*. *Nature*, 419(6909), 808-814. <https://doi.org/10.1038/nature01136>

Hodgkin, J., & Doniach, T. (1997). Natural variation and copulatory plug formation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 146(1), 149-164. <https://doi.org/10.1093/genetics/146.1.149>

Hong, H., Kim, B., & Im, H. (2016). Pathophysiological role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases and psychiatric disorders. *International Neurology Journal*, 20(Suppl 1), S2-7. <https://doi.org/10.5213/inj.1632604.302>

Hu, P. J. (2007). Dauer. In *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology*. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.144.1>

Hunt, P. R. (2016). The *C. elegans* model in toxicity testing. *Journal of Applied Toxicology*, 37(1), 50-59. <http://dx.doi.org/10.1002/jat.3357>

Jiang, J., Shih, C., Wang, S., Chen, T., Lin, C., & Ko, W. (2006). Mechanisms of suppression of nitric oxide production by 3-O-methylquercetin in RAW 264.7 cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 103(2), 281-287. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.08.005>

Joseph, J., Shukitt-Hale, B., & Lau, F. (2007). Fruit polyphenols and their effects on neuronal signaling and behavior in senescence. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1100(1), 470-485. <https://doi.org/10.1196/annals.1395.052>

Kenyon, C. J. (2010). The genetics of ageing. *Nature*, 464(7288), 504-512. <https://doi.org/10.1038/nature08980>

Khan, M., Ullah, R., Rehman, S., Shah, S., Saeed, K., Tahir, M., ... & Kim, M. (2019). 17 $\beta$ -Estradiol modulates SIRT1 and halts oxidative stress-mediated cognitive impairment in a male aging mouse model. *Cells*, 8(8), 928. <https://doi.org/10.3390/cells8080928>

Khangholi, S., Majid, F., Berwary, N., Ahmad, F., & Aziz, R. (2015). The mechanisms of inhibition of advanced glycation end products formation through polyphenols in hyperglycemic condition. *Planta Medica*, 82(01/02), 32-45. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1558086>

Kitonde, C., Dossaji, S., Lukhoba, C., Wagacha, J., Klittich, C., Hahn, D., ... & Xiong, Q. (2019). In vitro studies of 3-O-methylquercetin against phytopathogenic fungi of major cereals. *Journal of Agricultural Science and Practice*, 4(4), 102-112. <https://doi.org/10.31248/jasp2019.145>

Ko, W., Chen, M., Wang, S., Lai, Y., Chen, J., & Lin, C. (2003). 3-O-methylquercetin more selectively inhibits phosphodiesterase subtype 3. *Planta Medica*, 69(4), 310-315. <https://doi.org/10.1055/s-2003-38874>

Ko, W., Shih, C., Chen, M., Lai, Y., Chen, J., Chen, C., & Lin, C. (2004). Suppressive effects of 3-O-methylquercetin on ovalbumin-induced airway hyperresponsiveness. *Planta Medica*, 70(12), 1123-1127. <https://doi.org/10.1055/s-2004-835838>

Ko, W., Wang, H., Lei, C., Shih, C., Chung, M., & Lin, C. (2002). Mechanisms of relaxant action of 3-O-methylquercetin in isolated guinea pig trachea. *Planta Medica*, 68(1), 30-35. <https://doi.org/10.1055/s-2002-20059>

Kumar, A., Bevara, G., Kaja, L., Badana, A., & Malla, R. (2016). Protective effect of 3-O-methyl quercetin and kaempferol from *Semecarpus anacardium* against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced

cytotoxicity in lung and liver cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1354-z>

Kumar, R., et al. (2015). Comparative analysis of stress-induced gene expression in *Caenorhabditis elegans* following exposure to environmental and lab reconstituted complex metal mixture. *PLoS One*, 10(1), e0132896. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132896>

Kuzan, A., Królewicz, E., Nowakowska, K., Stach, K., Kaliszewski, K., Domoślawski, P., ... & Kustrzeba-Wójcicka, I. (2021). Contribution of glycation and oxidative stress to thyroid gland pathology—a pilot study. *Biomolecules*, 11(4), 557. <https://doi.org/10.3390/biom11040557>

Labbé, D. P., Vigneault, F., & Pletcher, S. D. (2019). Insights into aging from *C. elegans*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(23), 4567-4582. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03299-0>

Lapierre, L. R., & Hansen, M. (2011). Autophagy and aging. *Cell Cycle*, 10(11), 1528-1532. <https://doi.org/10.4161/cc.10.11.15638>

Leal, L., & Tellis, C. (2015). Farmacovigilância de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil: uma breve revisão. *Revista Fitos*, 9(4), 261-264. <http://dx.doi.org/10.5935/2446-4775.20150020>

Lee, J., Chung, C., & Park, Y. (2012). Cell-penetrating superoxide dismutase attenuates oxidative stress-induced senescence by regulating the p53-p21Cip1 pathway and restores osteoblastic differentiation in human dental pulp stem cells. *International Journal of Nanomedicine*. <https://doi.org/10.2147/ijn.s31723>

Lee, Y., Lee, J., Moon, H., Jung, J., Sharma, M., Park, B., ... & Jhee, E. (2008). Differential effect of oxidative stress on the apoptosis of early and late passage human diploid fibroblasts: implication of heat shock protein 60. *Cell Biochemistry and Function*, 26(4), 502-508. <https://doi.org/10.1002/cbf.1473>

Leiser, S. F., & colleagues. (2016). Age-associated vulval integrity is an important marker of nematode healthspan. *Age*. <https://doi.org/10.1007/s11357-016-9936-8>

Leung, M. K. C., Williams, P. L., Benedetto, A., et al. (2008). *Caenorhabditis elegans*: An emerging model in biomedical and environmental toxicology. *Toxicological Sciences*, 106(1), 5-28. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn121>

Li, Y. (2023). Challenges to China's healthcare system reform in the context of aging and future reform direction. *Journal of Education, Humanities and Social Sciences*, 23, 469-475. <https://doi.org/10.54097/ehss.v23i.12937>

Ma, Y. (2024). The relationship between aging, economic development and healthcare expenditure in Japan: an empirical analysis. *SHS Web of Conferences*, 181, 04012. <https://doi.org/10.1051/shsconf/202418104012>

Mango, S. E. (2007). The *C. elegans* pharynx: a model for organogenesis. In *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology*. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.129.1>

Mishra, A., & Howlett, J. (2021). Preclinical models of frailty: Focus on interventions and their translational impact: A review. *Nutrition and Healthy Aging*. <https://doi.org/10.3233/nha-200103>

Nam, G., Kawk, H., Kim, S., & Kim, Y. (2020). Solvent fractions of fermented *Trapa japonica* fruit extract stimulate collagen synthesis through TGF- $\beta$ 1/GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenin pathway in human dermal fibroblasts. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 19(1), 226-233. <https://doi.org/10.1111/jocd.13253>

Nascimento, M., & Diógenes, V. (2020). Transição demográfica no Brasil: um estudo sobre o impacto do envelhecimento populacional na previdência social. *Revista Evidenciação Contábil & Finanças*, 8(1), 40-61. <https://doi.org/10.22478/ufpb.2318-1001.2020v8n1.45463>

Oliveira, S., Moura, F., Demarco, F., Nascente, P., Pino, F., & Lund, R. (2012). An ethnomedicinal survey on phytotherapy with professionals and patients from basic care units in

the Brazilian Unified Health System. *Journal of Ethnopharmacology*, 140(2), 428-437.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.01.054>

Onken, B., et al. (2020). Gluconeogenesis and PEPCK are critical components of healthy aging and dietary restriction life extension. *PLoS Genetics*.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008982>

Palliyaguru, D., et al. (2019). Frailty index as a biomarker of lifespan and healthspan: Focus on pharmacological interventions. *Mechanisms of Ageing and Development*.  
<https://doi.org/10.1016/j.mad.2019.03.005>

Park, C., & Kim, J. (2012). Effect of advanced glycation end products on oxidative stress and senescence of trabecular meshwork cells. *Korean Journal of Ophthalmology*, 26(2), 123.  
<https://doi.org/10.3341/kjo.2012.26.2.123>

Pérez-Cano, F., Massot-Cladera, M., Rodríguez-Lagunas, M., & Castell, M. (2014). Flavonoids affect host-microbiota crosstalk through TLR modulation. *Antioxidants*, 3(4), 649-670.  
<https://doi.org/10.3390/antiox3040649>

Porta-de-la-Riva, M., Fontrodona, L., Villanueva, A., & Cerón, J. (2012). Basic *Caenorhabditis elegans* methods: synchronization and observation. *Journal of Visualized Experiments*, (64), e4019. <https://doi.org/10.3791/4019>

Queen, N., et al. (2020). Improvements to healthspan through environmental enrichment and lifestyle interventions: Where are we now? *Frontiers in Neuroscience*.  
<https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00605>

Ramkissoon, J., Mahomoodally, M., Ahmed, N., & Subratty, H. (2012). Natural inhibitors of advanced glycation end-products. *Nutrition & Food Science*, 42(6), 397-404.  
<https://doi.org/10.1108/00346651211277645>

Ritsuno, Y., Kawado, M., Morita, M., Yamada, H., Kanaji, A., Nakamura, M., ... & Fujita, N. (2021). Impact of musculoskeletal disorders on healthy life expectancy in Japan.  
<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-153067/v1>

Rodríguez, M., Basten, S. N., de Bono, M., & Kammenga, J. E. (2013). Worms under stress: *C. elegans* stress response and its relevance to complex human disease and aging. *Trends in Genetics*, 29(7), 367-374. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.02.008>

Sabini, M. C., et al. (2012). Evaluation of antiviral activity of aqueous extracts from *Achyrocline satureioides* against Western equine encephalitis virus. *Natural Product Research*, 26(4), 405-415. <https://doi.org/10.1080/14786419.2011.589257>

Salgueiro, A. C. F., et al. (2016). In vitro and in silico antioxidant and toxicological activities of *Achyrocline satureioides*. *Journal of Ethnopharmacology*, 194, 6-14. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.08.048>

Santin, J., Lemos, M., Klein-Júnior, L., Niero, R., & Andrade, S. (2010). Antiulcer effects of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (Asteraceae) (Marcela), a folk medicine plant, in different experimental models. *Journal of Ethnopharmacology*, 130(2), 334-339. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.05.014>

Sarkar, A. (2024). Evidences of in vivo cytotoxic and apoptotic potential of anthelmintic phytochemical kaempferol derivative isolated from *Lysimachia ramosa* (Wall. ex Duby) in Wistar rats. *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 85(1). <https://doi.org/10.1186/s41936-024-00369-7>

Schwingel, L., Bianchi, S., Zorzi, G., Gonçalves, P., Teixeira, H., & Bassani, V. (2018). Quercetin and 3-O-methylquercetin in vitro skin layers permeation/retention from hydrogels: why only a methoxy group difference determines different behaviors?. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 71(5), 733-745. <https://doi.org/10.1111/jphp.13050>

Seals, D. R., et al. (2015). Physiological geroscience: targeting function to increase healthspan and achieve optimal longevity. *The Journal of Physiology*, 593(14), 3017-3027. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.282665>

Shi, J., Wang, C., Sang, C., Nsanzamahoro, S., Chai, T., Wang, J., ... & Yang, J. (2022). Tabersonine inhibits the lipopolysaccharide-induced neuroinflammatory response in BV2

microglia cells via the NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Molecules*, 27(21), 7521. <https://doi.org/10.3390/molecules27217521>

Silva, M. (2023). Structural and anticancer studies of methoxyflavone derivative from *Strychnos pseudoquina* A. St.-Hil. (Loganiaceae) from Brazilian Cerrado. *ACS Omega*, 8(43), 40764-40774. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c05841>

Silva, T. (2024). Comportamento de idosos para a promoção da saúde: análise segundo a teoria de Nola Pender. *Revista Eletrônica de Enfermagem*, 25, 74998. <https://doi.org/10.5216/ree.v25.74998>

Silva, T., Martins, H., Almeida, P., & Gomes, A. (2019). Correlações entre os componentes da aptidão física de idosos participantes de grupos de convivência. *Fisioterapia Brasil*, 20(3), 329-339. <https://doi.org/10.33233/fb.v20i3.2681>

Soda, K. (2022). Overview of polyamines as nutrients for human healthy long life and effect of increased polyamine intake on DNA methylation. *Cells*, 11(1), 164. <https://doi.org/10.3390/cells11010164>

Souza, P. O. de, et al. (2018). Anticancer activity of flavonoids isolated from *Achyrocline satureioides* in gliomas cell lines. *Toxicology In Vitro*, 51, 23-33. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.04.013>

Stiernagle, T. (2006). Maintenance of *C. elegans*. In *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.101.1>

Talib, W., Zarga, M., & Mahasneh, A. (2012). Antiproliferative, antimicrobial and apoptosis-inducing effects of compounds isolated from *Inula viscosa*. *Molecules*, 17(3), 3291-3303. <https://doi.org/10.3390/molecules17033291>

Terrabuio, E., Zenaro, E., & Constantin, G. (2023). The role of the CD8<sup>+</sup> T cell compartment in ageing and neurodegenerative disorders. *Frontiers in Immunology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1233870>

Vargas, V., Guidobono, R., & Henriques, J. (1991). Genotoxicity of plant extracts. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 86(suppl 2), 67-70. <https://doi.org/10.1590/s0074-02761991000600017>

Wang, C., Yolitz, J., Alberico, T., Laslo, M., Sun, Y., Wheeler, C., ... & Zou, S. (2013). Cranberry interacts with dietary macronutrients to promote healthy aging in *Drosophila*. *The Journals of Gerontology Series A*, 69(8), 945-954. <https://doi.org/10.1093/gerona/glt161>

Wegener, T., Deitelhoff, B., & Silber-Mankowsky, A. (2015). Drug safety aspects of herbal medicinal products. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 165(11-12), 243-250. <https://doi.org/10.1007/s10354-015-0370-9>

Wood, W. B. (1988). The Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Learning & Memory*, 17, 667.  
WormAtlas. (2009). Introduction to *C. elegans* anatomy. Banco de dados de comportamento e anatomia de *C. elegans*. Nova Iorque: Albert Einstein College of Medicine. Available at: <https://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/mainframe.htm>

Ycaza, A., Søndergaard, E., Morgan-Bathke, M., Leon, B., Lytle, K., Ramos, P., ... & Jensen, M. (2021). Senescent cells in human adipose tissue: a cross-sectional study. *Obesity*, 29(8), 1320-1327. <https://doi.org/10.1002/oby.23202>

Yu, A., Fuchshofer, R., Kook, D., Bloemendal, H., & Welge-Lüssen, U. (2009). Subtoxic oxidative stress induces senescence in retinal pigment epithelial cells via TGF- $\beta$  release. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 50(2), 926. <https://doi.org/10.1167/iovs.07-1003>

Zhao, R., Liu, X., Zhang, L., Yang, H., & Zhang, Q. (2019). Current progress of research on neurodegenerative diseases of salvianolic acid B. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2019/3281260>

Zhao, Y. J., Tan, L. C., Li, S. C., Au, W. L., Seah, S., Lau, P., ... & Wee, H. L. (2010). Economic burden of Parkinson's disease in Singapore. *European Journal of Neurology*, 18(3), 519-526. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2010.03210.x>

Zhou, Y., Wang, Y., Zou, J., Chen, Y., Liu, H., & Li, G. (2011). *Caenorhabditis elegans* as a model to study the interaction between innate immunity and gut microbial infection. *Journal of Genetics and Genomics*, 38(10), 455-461. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2011.09.003>

Zhou, Z., Fang, Z., Hui, J., Chen, Y., & He, L. (2010). Selective monomethylation of quercetin. *Synthesis*, 2010(23), 3980-3986. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1258310>

Zhuang, J., Zhang, L., Dai, S., Cui, L., Guo, C., Sloofman, L., ... & Yang, J. (2019). Comparison of multi-tissue aging between human and mouse. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42485-3>