

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção



**Efeito de senolíticos sobre parâmetros neuroquímicos em camundongos
fêmeas C57BL6 durante o envelhecimento**

Olívia Wyse Faria

Pelotas, 29 de novembro de 2022

Olivia Wyse Faria

**Efeito de senolíticos sobre parâmetros neuroquímicos em camundongos
fêmeas C57BL6 durante o envelhecimento**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Francieli Moro Stefanello
Coorientadora: Dr^a. Mayara Sandrielly Soares de Aguiar

Pelotas, 2022

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na publicação

F111e Faria, Olivia Wyse

Efeito de senolíticos sobre parâmetros neuroquímicos em camundongos fêmeas C57BL6 durante o envelhecimento / Olivia Wyse Faria ; Prof. Dra. Francieli Moro Stefanello, orientador ; Dra. Mayara Sandrielly Soares de Aguiar, Olivia Wyse faria, coorientadores. – Pelotas, 2022.

76 f.

Dissertação (Mestrado) – Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2022.

1. Senolíticos. 2. Cérebro. 3. Envelhecimento. 4. Neuroinflamação. 5. Estresse oxidativo. I. Stefanello, Prof. Dra. Francieli Moro, orient. II. Aguiar, Dra. Mayara Sandrielly Soares de, coorient. III. faria, Olivia Wyse, coorient. IV. Título.

CDD : 616.81

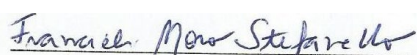
Olivia Wyse Faria

Efeito de senolíticos sobre parâmetros neuroquímicos em camundongos fêmeas C57BL6 durante o envelhecimento

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Bioprospecção do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 29 de novembro de 2022 às 14h.

Banca examinadora:



Profª Drª Francieli Moro Stefanello (Orientadora) - Doutora em Ciências Biológicas - Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.



Profª Drª Cristiani Folharini Bortolatto - Doutora em Bioquímica Toxicológica pela Universidade Federal de Santa Maria.



Drª Fernanda Cardoso Teixeira - Doutora em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção) pela Universidade Federal de Pelotas.

Dedico este trabalho a minha mãe Carmen Dora e ao meu pai José Potiguar por terem me concedido a oportunidade de chegar até aqui.

Agradecimentos

Agradeço a Deus e nossos amigos espirituais por permitir que meu sonho fosse realizado.

Agradeço ao meu filho Gustavo pelo amor que sempre me deu através de seus beijinhos, carinhos e palavras diárias como “Eu te amo” nos quais me deram e sempre me darão forças para eu seguir em frente e realizar até o que acho impossível.

Aos meus pais, José Potiguar e Carmen Dora, por serem pessoas simplesmente incríveis! Agradeço, principalmente, por todo o amor que me deram, que me dão e que ainda me darão, pois sem esse amor eu nada seria. Sou muito grata, também, por tudo que me ensinaram, por todo o apoio e pela torcida ao longo das minhas conquistas. Conheço todos os esforços que fizeram para que eu pudesse ter as melhores condições possíveis para vivenciar esse momento tão importante na minha vida. Palavras nunca serão o suficiente para demonstrar toda minha gratidão.

Agradeço ao meu irmão Vinícius que sempre me incentivou a realizar meu sonho e me escutou em todas as fases da minha vida.

A minha orientadora, Francieli Stefanello, pela amizade, incentivo, pela oportunidade e aprendizado proporcionado, além de toda a paciência e calma em diversos momentos em que tais qualidades me faltaram.

A minha coorientadora, Mayara de Aguiar, pelo aprendizado, pela paciência, amizade, incentivo e ajuda em todas as etapas do mestrado: no fluxo, na bancada, na análise dos dados e na escrita desta dissertação.

Agradeço ao meu padrinho Roberto pelo incentivo e apoio, assim como as primas Marcia e Rosangela.

Agradeço a todos meus amigos e amigas.

Às colegas de laboratório pela paciência e troca de experiências. Pelo incentivo da Kelen e do William na disciplina de seminários II.

Aos colegas de laboratório que se tornaram amigos para a vida, especialmente à Júlia por todas as risadas, pelas confidências e pelos conselhos.

Agradeço também a minha equipe de trabalho da UBS Cohab Fragata pelo incentivo e paciência nos meus momentos de estresse e que sempre tinham uma palavra de apoio a me oferecer.

Ao professor Augusto Schneider que colaborou para a realização deste trabalho.

Ao Biotério Central e a Anelize.

Ao PPGBBio pela oportunidade e a todo corpo docente por todo aprendizado.

Aos professores da banca por aceitarem o convite para avaliação deste trabalho.

A Universidade Federal de Pelotas por toda formação acadêmica.

Por fim, a todos que cruzaram o meu caminho, pois sem eles não chegaria aqui! Gratidão me define.

Resumo

FARIA, Olívia Wyse. **Efeito de senolíticos sobre parâmetros neuroquímicos em camundongos fêmeas C57BL6 durante o envelhecimento.** 76f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2022.

O envelhecimento é um processo fisiológico e multifatorial que leva à diminuição das capacidades funcionais do cérebro, ocasionando um declínio no desempenho cognitivo prejudicando a qualidade de vida. O envelhecimento celular se inicia com o aumento da senescência celular, momento em que as células perdem sua capacidade de divisão e proliferação, interrompendo o ciclo celular e ativando mecanismos de apoptose. Durante esse processo, as células senescentes secretam mediadores que induzem à inflamação e dano tecidual definido como fenótipo secretor associado à senescência. Recentemente, descobriu-se uma nova classe de compostos que promovem a remoção das células senescentes de tecido e órgãos chamada senolíticos, sendo os primeiros estudados o dasatinibe (D) e a quercetina (Q). Assim, este estudo teve como objetivo investigar o potencial neuroprotetor dos compostos senolíticos (D+Q) em camundongos durante o processo de envelhecimento. Os camundongos fêmeas C57BL6 foram divididos em dois grupos (n=16 por grupo), sendo: Grupo I - Controle (Veículo) e Grupo II - Tratado (D+Q). O tratamento ou veículo foi administrado por gavagem (dasatinibe: 5 mg/kg e quercetina: 50 mg/kg) por três dias consecutivos a cada duas semanas a partir dos 30 dias de idade, sendo metade dos animais eutanasiada aos 6 meses de idade e a outra metade aos 14 meses de idade. Ao final do tratamento, o cérebro total foi coletado para análises de parâmetros de estresse oxidativo, níveis de fator de necrose tumoral alfa, e atividade das enzimas acetilcolinesterase e Na^+ , K^+ -ATPase. Os resultados demonstraram um aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO), conteúdo de tióis totais e peroxidação lipídica seguido por uma redução nos níveis de nitrito e na atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione S-transferase no cérebro de animais controle durante o envelhecimento. O tratamento com D+Q protegeu contra o aumento de ERO e da redução da atividade da catalase. A atividade da acetilcolinesterase foi aumentada, e a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase foi reduzida nos animais de 14 meses de idade, enquanto o tratamento com D+Q foi capaz de evitar essa redução. Esses dados indicam um importante papel das drogas senolíticas na regulação do processo de envelhecimento cerebral e sustentam a necessidade de futuras investigações sobre o papel da senescência celular nas neuropatologias associadas à idade.

Palavras-chave: Senolíticos, cérebro, envelhecimento, neuroinflamação, estresse oxidativo.

Abstract

FARIA, Olívia Wyse. **Effect of senolytics on neurochemical parameters in mice females C57BL6 during aging.** 76f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2022.

Aging is a physiological and multifactorial process that leads to a decrease in the functional capacities of the brain, causing a decline in cognitive performance, impairing quality of life. Cellular aging begins with the increase in cell senescence, when cells lose their ability to divide and proliferate, interrupting the cell cycle and activating apoptosis mechanisms. During this process, senescent cells secrete mediators that induce inflammation and tissue damage defined as a senescence-associated secretory phenotype. Recently, a new class of compounds that promote the removal of senescent cells from tissue and organs called senolytics has been discovered, the first ones being studied being dasatinib (D) and quercetin (Q). Thus, this study aimed to investigate the neuroprotective potential of senolytic compounds (D+Q) in mice during the aging process. Female mice C57BL6 were divided into two groups (n=16 per group): Group I - Control (Vehicle) and Group II - Treated (D+Q). Treatment or vehicle was administered by gavage (dasatinib: 5 mg/kg and quercetin: 50 mg/kg) for three consecutive days every two weeks starting at 30 days of age, with half of the animals euthanized at 6 months of age and the other half at 14 months of age. At the end of treatment, the whole brain was collected for analysis of oxidative stress parameters, levels of tumor necrosis factor alpha, and activity of acetylcholinesterase and Na⁺, K⁺-ATPase. The results showed an increase in reactive oxygen species (ROS) levels, thiols total content and lipid peroxidation followed by a reduction in nitrite levels and in the activity of superoxide dismutase, catalase and glutathione S-transferase enzymes in the brain of control animals during aging. Treatment with D+Q protected against increased ROS and reduced catalase activity. Acetylcholinesterase activity was increased, the Na⁺, K⁺-ATPase activity was reduced in 14-month-old animals, while D+Q treatment was able to avoid this reduction. These data indicate the important role of senolytic drugs in regulating the process of brain aging and support the need for future investigations of the role of cellular senescence in age-associated neuropathologies.

Keywords: Senolytics, brain, aging, neuroinflammation, oxidative stress.

Lista de Figuras

Figura 1 Senescência e neuro inflamação.....	19
Figura 2 Formação da acetilcolina, a sua liberação e a sua receptividade pelos receptores biológicos	26
Figura 3 Estrutura química da quercetina	30
Figura 4 Estrutura química do dasatinibe	31

Lista de Abreviaturas

ACh - Acetilcolina
AChE - Acetilcolinesterase
ATP - Trifosfato de adenosina
ATPase - Adenosina trifosfatase
BuChE - Butirilcolinesterase
CAT - Catalase
D - Dasatinibe
DA - Doença de Alzheimer
DNA - Ácido desoxirribonucleico
ERO - Espécies reativas de oxigênio
GPx - Glutathione peroxidase
GST - Glutathione S-transferase
IL-6 - Interleucina 6
IL-10 - Interleucina 10
LCR - Líquido cefalorraquidiano
MDA - Malondialdeído
NO - Óxido nítrico
OH· - Radical hidroxila
O₂^{·-} - Radical ânion superóxido
H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
PCR - Proteína C reativa
Q - Quercetina
SASP - Fenótipo secretor associado à senescência
SNC - Sistema Nervoso Central
SOD - Superóxido dismutase
TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
SH - Grupo sulfidríla
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

Sumário

1 Introdução	12
2 Objetivos	15
Objetivo geral	15
Objetivos específicos	15
3 Revisão de literatura	16
Envelhecimento	16
Envelhecimento cerebral e senescência celular	17
Neuroinflamação e estresse oxidativo	21
Acetilcolinesterase e Na ⁺ , K ⁺ -ATPase	25
Compostos senolíticos.	28
4 Manuscrito	32
5 Discussão	55
6 Conclusão	61
7 Referências	62
Anexos	75

1. Introdução

A expectativa de vida humana durante o século XX aumentou cerca de 30 anos. Isso ocorreu devido à melhora da saúde pública, das alterações ambientais e nutricionais, incluindo a maior qualidade dos alimentos, da água, da higiene e das condições de vida, a redução do impacto das doenças infecciosas, e cuidados médicos melhorados em todas as idades (UNITED NATIONS, 2019).

O envelhecimento é um processo natural, complexo e multifatorial que leva à perda das capacidades funcionais, inclusive do cérebro, resultando em declínio no desempenho cognitivo e aptidão física, diminuindo a qualidade de vida e independência (KIRKWOOD, 2005). Atualmente, embora existam diversas teorias sobre as causas do envelhecimento, reconhece-se que a sua principal causa é o acúmulo gradual de danos moleculares e celulares como, danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA), irregularidades nos cromossomos e encurtamento dos telômeros, em adição de outras fisiológicas como, desequilíbrio hormonal, consumo excessivo de calorias, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e inflamação (GEMS e PARTRIDGE, 2013; WILEY et al., 2016).

Muitos estudos têm associado o envelhecimento do cérebro (MATTSON e ARUMUGAM, 2018) à senescência celular (LOPEZ-OTIN et al., 2013). As células senescentes param de se dividir e modificam sua ação para fortalecer a função secretora, o que leva à aquisição do chamado fenótipo secretor associado à senescência (SASP) (HAYFLICK e MOORHEAD, 1961), incluindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e proteínas da matriz extracelular, bem como lipídios bioativos entre outros (XU et al., 2018).

Diversos estudos relatam que a senescência celular também está relacionada à neuroinflamação e à redução da neurogênese (BAKER e PETERSEN, 2018; VAN DEURSEN, 2014). A inflamação é uma das principais causas do envelhecimento, que muitas vezes está associada a um processo de cicatrização prejudicado (SCHAFER e WERNER, 2008), sobretudo, acredita-se que mesmo de baixo grau contribua para o processo de envelhecimento resultando em vários declínios relacionados ao envelhecimento em muitas funções de órgãos (SIKORA et al., 2010; CALDER et al., 2017).

A enzima acetilcolinesterase (AChE), pertencente ao sistema colinérgico, desempenha diversas funções no SNC e seu aumento está associado ao processo inflamatório (POHANKA, 2014) e às doenças neurodegenerativas, levando a prejuízos na memória e ao déficit cognitivo no envelhecimento (SILMAN, SUSMAN, 2005; POHANKA, 2014). Também, nesse processo há um desequilíbrio na atividade da enzima Na^+ , K^+ -ATPase que resulta em despolarização neuronal, havendo alterações na liberação de neurotransmissores e transmissão sináptica, desequilíbrio osmótico e na plasticidade sináptica, prejudicando assim a memória e o processo de aprendizagem (ARNAIZ, ORDIERES., 2014; PETRUSHANKO et al., 2016). De acordo com Chakroborty e colaboradores (2015), conforme a evolução do envelhecimento, a atividade da enzima Na^+ , K^+ -ATPase é reduzida, em consequência ao aumento do dano oxidativo no envelhecimento cerebral (CHAKROBORTY et al., 2015).

Cabe destacar que o estresse oxidativo também está associado ao processo de envelhecimento. O dano oxidativo leva à alteração na estrutura e na função de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, destacando-se como um componente essencial na patogênese de várias doenças relacionadas à idade (LUO et al., 2021). Porém, é importante salientar que o envelhecimento, se for originado do estresse oxidativo, pode ser minimizado por estratégias farmacológicas, ambientais e nutricionais (ROMANO et al., 2010).

Uma nova classe de compostos, chamados senolíticos, que eliminam as células envelhecidas dos tecidos e atenuam o impacto negativo no corpo, tem um efeito protetor no aparecimento de doenças relacionadas à idade (BAKER et al., 2016), aumentando a expectativa de saúde e vida de camundongos (XU et al., 2018). No entanto, pesquisadores recentemente demonstraram que o tratamento de animais com uma combinação dos senolíticos, dasatinibe e quercetina, promove redução seletiva do número de células senescentes e de sintomas característicos do envelhecimento, reduzindo a carga celular senescente e consequentemente a secreção de citocinas pró-inflamatórias (KIRKLAND e TCHKONIA, 2017; HICKSON et al., 2019).

Assim, considerando o atual cenário de envelhecimento da população mundial, são importantes os estudos que investiguem o potencial dos compostos senolíticos no envelhecimento através da modulação da

senescência, visando uma melhor qualidade de vida aos idosos a fim de retardar esse processo.

2. Objetivos

Objetivo geral

O objetivo geral do estudo foi investigar o potencial neuroprotetor dos compostos senolíticos dasatinibe e quercetina em camundongos fêmeas C57BL6 durante o processo de envelhecimento cerebral.

Objetivos específicos:

- I. Avaliar os efeitos do tratamento com dasatinibe mais quercetina sobre os níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) em cérebro de camundongos fêmeas C57BL6 de 6 e 14 meses de vida;
- II. Analisar os efeitos do tratamento com dasatinibe mais quercetina sobre os parâmetros de estresse oxidativo em cérebro de camundongos fêmeas C57BL6 de 6 e 14 meses de vida;
- III. Investigar os efeitos dos senolíticos sobre a atividade da AChE em cérebro de camundongos fêmeas C57BL6 de 6 e 14 meses de vida;
- IV. Avaliar os efeitos dos senolíticos sobre a atividade da Na^+ , K^+ , ATPase no cérebro de camundongos fêmeas C57BL6 de 6 e 14 meses de vida.

3. Revisão de literatura

Envelhecimento

A expectativa de vida humana a nível mundial expandiu notavelmente. Projeções globais a respeito da população com 65 anos ou mais, apontam para um crescimento duas vezes maior que o atual até 2050 (PRINCE et al., 2014; UNITED NATIONS, 2019). Dados das Nações Unidas indicam que a população idosa com 65 anos ou mais será de 1,5 bilhão em 2050 (UNITED NATIONS, 2019). No Brasil, as estimativas indicam que em 2060 o percentual da população com 65 anos ou mais de idade será de 58,2 milhões (IBGE, 2018).

De acordo com Gilbert (2000), o envelhecimento é a alteração das funções fisiológicas necessárias para a sobrevivência e fertilidade. A progressão da idade é o principal fator de risco para diversos tipos de perda de função, assim como a prevalência de doenças crônicas e mortais, incluindo o câncer, doenças cardiovasculares e demência (FERRUCI e FABBRI, 2018).

O envelhecimento pode ser dividido a partir de perspectivas distintas: envelhecimento normal (médio ou típico), envelhecimento patológico (associado a doenças específicas) e o envelhecimento bem-sucedido (DEPP e JESTE, 2020). Os principais sinais celulares e moleculares do envelhecimento incluem reparo deficiente do DNA, encurtamento dos telômeros, irregularidade nos cromossomos, perda de proteostase e alterações epigenéticas, levando consequentemente a disfunção mitocondrial, detecção desregulada de nutrientes e senescência celular (LOPEZ-OTIN et al., 2013).

É importante mencionar que o envelhecimento celular está associado aos efeitos deletérios nas organelas celulares e biomoléculas, causados pelas ERO, provocando alterações acumulativas, podendo culminar na morte celular (BARJA, 2004; TEXEIRA e GUARIENTO, 2010). Com a evolução do processo de envelhecimento, há um enfraquecimento gradual do sistema imunitário, resultando numa inconformidade entre atividade pró-inflamatória e anti-inflamatória (FRANCESCHI et al., 2007). As células senescentes não são abstraídas pelo sistema imunológico e aglomeram-se nos tecidos, causando prejuízos ao secretar moléculas inflamatórias sendo assim importantes na etiologia de muitas doenças (PARTRIDGE, DEELEN, SLAGBOOM, 2018).

Em resumo, sabe-se que o envelhecimento é um processo complexo e multifatorial caracterizado por perda progressiva da integridade fisiológica e das funções celulares (LOPEZ-OTIN et al., 2013). Essa alteração, em diferentes níveis, afeta todas as células, em especial as dos sistemas nervoso, endócrino e imunitário e, conseqüentemente, a comunicação entre eles, levando ao acúmulo de células danificadas, uma homeostase prejudicada e aumento da morbidade e mortalidade (DE LA FUENTE, 2008).

Muitas das características do envelhecimento como estresse, epigenética, dano macromolecular, inflamação, proteostase e disfunção de células-tronco (LOPEZ-OTIN et al., 2013) resultam no processo de senescência celular que desempenha uma função crítica na condução do envelhecimento e de doenças relacionadas à idade.

Envelhecimento cerebral e senescência celular

Durante o envelhecimento, assim como acontece com outros órgãos e sistemas, as capacidades funcionais do cérebro diminuem progressivamente, levando a um declínio do desempenho cognitivo, o qual se manifesta através do decréscimo na aprendizagem e na memória, velocidade de tomada de decisão, atenção e percepção sensorial (audição, olfato, paladar, tato e visão), bem como na coordenação motora (MATTSON e ARUMUGAM, 2018).

De acordo com Fjell et al. (2014), as regiões do cérebro mais afetadas pelo envelhecimento são o córtex cerebral e o hipocampo, responsáveis pela memória de curto e longo prazo, desempenho físico e cognitivo. Essas regiões sofrem mudanças na estrutura, peso e espessura. Ademais, com o envelhecimento, o volume e o peso do cérebro diminuem e a geração neuronal é rapidamente diminuída (ESPUNY-CAMACHO et al., 2017; BAKER e PETERSEN, 2018).

Algumas marcas do envelhecimento que são comuns aos neurônios e outras células foram descritas recentemente por Mattson e Arumugam (2018), sendo elas: ácidos nucleicos e lipídios danificados pela oxidação, disfunção mitocondrial, acúmulo intracelular de proteínas, metabolismo energético desequilibrado, mecanismos de eliminação de resíduos celulares prejudicados,

reparo de DNA comprometido, homeostase de Ca^{2+} , exaustão de células-tronco e inflamação.

Tal como acontece nos tecidos periféricos, o envelhecimento consequentemente evolui para uma inflamação crônica de baixo grau no cérebro (FRANK KANNON et al., 2009), que ocorre na ausência de patógeno contribuindo para a redução das densidades pré e pós-sinápticas, das sinapses e das espinhas dendríticas e sucessivamente prejuízos cognitivos e perda de memória em indivíduos idosos (YANKNER, LU, LOERCH, 2008). É interessante mencionar que alterações neuropatológicas, como a atrofia cerebral, placas neuríticas contendo beta-amiloide ($\text{A}\beta$) e os emaranhados neurofibrilares podem ser encontrados no cérebro de idosos que não apresentam comprometimento cognitivo, podendo os idosos viver até a idade avançada sem o acúmulo dessas placas (MUFSON et al., 2016).

Assim como a função cerebral depende da conectividade da rede neuronal, os efeitos do envelhecimento também se manifestam no nível da plasticidade sináptica, como o declínio associado à idade no número de sinapses e na transmissão sináptica anormal em várias regiões do cérebro. Além disso, um marco do cérebro envelhecido é o aumento do nível de neuroinflamação gerado pelas células gliais, o que pode levar a alterações na função neuronal/sináptica (LUPO et al., 2019).

A senescência celular foi descoberta inicialmente *in vitro* em fibroblastos humanos em 1961 (HAYFLICK e MOOREHEAD, 1961) e se caracteriza como uma parada da proliferação celular irreversível (HERRANZ e GIL, 2018; GORGOULIS et al., 2019). Essa relação foi descrita através da observação do acúmulo de células senescentes nos tecidos e órgãos de animais idosos e também em humanos, e de que o potencial de divisão e proliferação difere entre as células derivadas de indivíduos de diferentes idades, contribuindo para sua degeneração funcional (VAN DEURSEN, 2014; BAKER e PETERSEN, 2018).

Diversos estudos relatam que a senescência celular também está relacionada à neuroinflamação e redução da neurogênese (VAN DEURSEN, 2014; BAKER e PETERSEN, 2018). Assim, está associada ao processo de envelhecimento e às doenças relacionadas com a idade como a doença de Alzheimer e Parkinson (HE e SHARPLESS, 2017).

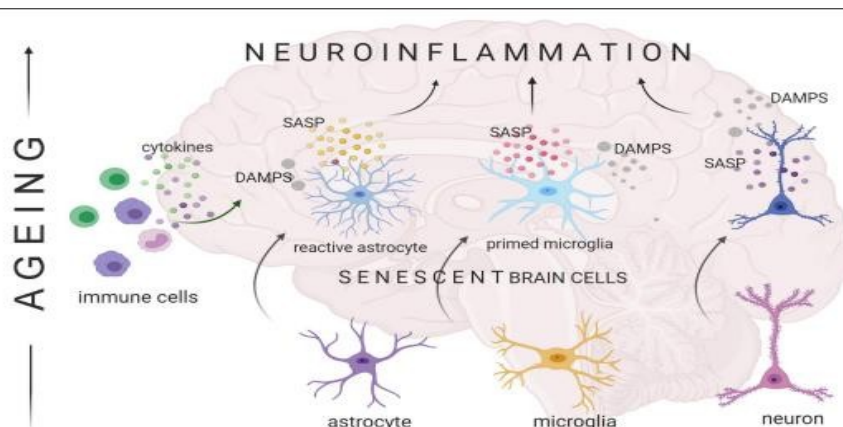


Figura 1 As células senescentes contribuem para a neuroinflamação relacionada ao envelhecimento (Sikora et al., 2021).

O papel e os mecanismos da senescência são complexos e dependem da idade. Em um organismo jovem, a senescência celular tem uma função benéfica, pois ela é primordial ao desenvolvimento embrionário (as células senescentes são eliminadas pelas células imunes como um elemento da formação do corpo), à regeneração de tecidos e como uma barreira contra o câncer (as células senescentes não são capazes de se proliferar) (CAPASSO et al., 2015). Em um organismo envelhecido é prejudicial, pois o número de células senescentes aumenta gerando uma inflamação crônica de baixo grau, produção excessiva de ERO e causando alterações microambientais, que sustentam a progressão tumoral (CAPASSO et al., 2015).

Diversos pesquisadores relataram que apesar da senescência celular contribuir de forma importante para o processo do envelhecimento cerebral, assim como às doenças relacionadas a este processo, as causas da senescência em condições patológicas ou fisiológicas permanecem incompreensíveis. Existem hipóteses como encurtamento dos telômeros, danos ao DNA, ativação de oncogenes, estresse e danos da cromatina (BAKER et al., 2016; XU et al., 2018; OGDRODNIK et al., 2021).

Uma das características mais importantes das células senescentes é o aparecimento do fenótipo secretor associado à senescência (SASP) que é um fenótipo muito heterogêneo (BASISTY et al., 2020) composto por fatores pró-inflamatórios, de crescimento e de remodelamento tecidual, implicado na

propagação da senescência e na sustentação da inflamação crônica. Dentre os mediadores secretados citam-se as citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucinas (IL-1 α , IL-1 β e IL-6), quimiocinas (IL-8 e proteína α regulada pelo crescimento) e proteínas da matriz extracelular, bem como lipídios bioativos (bradicininas, ceramidas, prostanoides), micro-RNA's (miRNAs), além de outros nucleotídeos não codificantes (HERNANDEZ-SEGURA et al., 2017; HERRANZ et al., 2018; XU et al., 2018; FAFIAN-LABORA e O'LOGHLEN, 2020) assim promovendo um ambiente nocivo para as células vizinhas não senescentes levando as mesmas ao processo inflamatório (BORODKINA et al., 2018)

As células senescentes param de se dividir e se acumulam com o envelhecimento e modificam sua ação para fortalecer a função secretora, o que leva à aquisição do SASP, que está ligado à inflamação e doença tecidual relacionada à idade (CUOLLO et al., 2020). Esses fatores conduzem à ativação de vias de supressão tumoral, estabelecendo e mantendo a interrupção do crescimento da senescência (CAMPISI, 2011).

Existem alguns marcadores que são usados para identificar células senescentes como a atividade aumentada de β -galactosidase, conhecida como SA- β -gal (DEBACQ-CHAINIAUX et al., 2009), cuja alteração decorre da superexpressão e acúmulo lisossomal endógeno da β -galactosidase especificamente em células senescentes (LEE et al., 2020). Também como biomarcadores destacam-se a expressão aumentada de inibidores de cinase p16, p21 e p53, redução da fosforilação da proteína do retinoblastoma e aumento de marcadores citológicos, como focos de heterocromatina associados à senescência e danos ao DNA associados à senescência (CAMPISI, D'ADDA, DI FAGAGNA, 2007; KHOSLA et al., 2020; HERNANDEZ-SEGURA, NEHME, DEMARIA, 2018).

Para um bom funcionamento do organismo, o cérebro requer múltiplas células incluindo neurônios, astrócitos, micróglia, oligodendrócitos e células endoteliais. O envelhecimento do cérebro está associado tanto à senescência celular quanto a distúrbios de autofagia (MATTSON e ARUMUGAM, 2018).

O processo de envelhecimento produz importantes alterações no sistema nervoso central (SNC) como as neuroanatômicas (diminuição da

contagem de neurônios, atrofia cerebral, aumento das placas neuríticas, aumento da melanina e da lipofusina), na neurotransmissão (diminuição da síntese dopaminérgica e de catecolaminas e diminuição na transmissão colinérgica), neurofisiológicas (diminuição do fluxo sanguíneo cerebral) e eletrofisiológicas (latências aumentadas nas respostas evocadas e diminuição do ritmo alfa) (INOUE, 2020).

Neuroinflamação e estresse oxidativo

Sabe-se que no processo de envelhecimento cerebral, há um desequilíbrio da homeostase metabólica (LOPES-OTIN et al 2013; SPINELLI et al., 2020) e imune (PATTABIRAMAN et al., 2017) gerando uma inflamação crônica de baixo grau (FRANCESCHI et al., 2000). Assim, alterando os marcadores imunológicos circulantes, como proteína C-reativa (PCR) (TANG et al., 2017), TNF- α (MARCOS-PEREZ, 2020), interleucina-6 (IL-6) (REA et al., 2018) bem como células apoptóticas, células imunes e detritos no local da lesão. Consequentemente, comprometendo a homeostase funcional (FULLERTON e GILROY, 2016) e aumentando a incidência de doenças degenerativas (KENNEDY et al., 2014; CHEN et al., 2016; GROSS e WALKER, 2019).

Com o envelhecimento, a micróglia, por apresentar a função de vigilância ativa do tecido cerebral, adota um estado pró-inflamatório devido à redução da sinalização de repouso por neurônios e astrócitos (NEUMANN, 2001; CARDONA et al., 2006). Assim, como resultado do estresse, infecção e trauma, o cérebro envelhecido é submetido mais facilmente a um estado de neuroinflamação crônica, tornando-se mais propenso à sinalização apoptótica (NIRAULA, SHERIDAN, GODBOUT., 2017; WANG et al., 2016; SOUSA et al., 2014) e evoluindo à perda de volume e comprometimento cognitivo (VON BERNHARDI et al., 2015).

O TNF- α desempenha um papel central na iniciação e manutenção da resposta inflamatória, e os efeitos desta citocina no SNC podem ser homeostáticos ou fisiopatológicos (PROBERT, 2015; STEELAND e VANDENBROUCKE, 2019). As funções do TNF- α são de controlar a plasticidade sináptica, ativação microglial, fortalecimento sináptico induzido por

astrócitos e transmissão glutamatérgica no SNC saudável (BELARBI et al., 2012; OLMOS e LLADÓ, 2014). Já em condições patológicas, as grandes quantidades de TNF- α liberadas pela microglia levam a uma inflamação crônica que evolui para um comprometimento cognitivo (OLMOS e LLADÓ, 2014). Em pacientes com doença de Alzheimer (DA), os níveis de TNF- α estão elevados no líquido cefalorraquidiano (LCR) e plasma e estão diretamente ligados com a gravidade da doença (STEELAND et al., 2018).

Além da neuroinflamação, o estresse oxidativo também está relacionado ao envelhecimento. Neste sentido, Harman em 1954 propôs a hipótese de que as reações oxidativas dos radicais livres podem estar envolvidas com o processo de envelhecimento e estão associadas à doença, ao ambiente e ao envelhecimento intrínseco (HARMAN, 1992). De fato, o acúmulo de danos oxidativos em macromoléculas (DNA, lipídios e proteínas) ocasionado por ERO leva a danos estruturais e funcionais associados à idade (BECKMAN e AMES, 1998).

Sabe-se que o aumento dos níveis de ERO leva à senescência celular, considerado um mecanismo fisiológico que interrompe a proliferação celular em resposta a danos que ocorrem durante a replicação. Como descrito anteriormente, as células senescentes adquirem um fenótipo secretor associado à senescência irreversível (SASP) envolvendo a secreção de fatores solúveis (quimiocinas, interleucinas e fatores de crescimento), enzimas degradativas (metaloproteases de matriz) e componentes de proteínas insolúveis/matriz extracelular (POLO, DIMRI, DIMRI, 2016).

A teoria oxidativa-inflamatória do envelhecimento destaca que o envelhecimento é uma perda da homeostase devido a um estresse oxidativo crônico que afeta especialmente o sistema nervoso, endócrino e imunológico e que a consequente ativação do sistema imunológico leva a um estado inflamatório que cria um círculo vicioso em que o estresse oxidativo crônico e a inflamação se alimentam e, consequentemente, aumentam a morbidade e mortalidade relacionadas à idade (DE LA FUENTE e MIQUEL, 2009).

O comprometimento cognitivo e a demência afetam diretamente a qualidade e a expectativa de vida nos idosos (CACCIATORE, 2005; ABETE, 2014). Em um estudo realizado por Chen e Liu (2017) demonstrou-se que o estresse oxidativo desempenha um papel fundamental na fisiopatologia da

demência. Um estudo recente mostrou que o aumento dos biomarcadores de estresse oxidativo como malondialdeído (MDA), glutathione redutase-GSH-Px se correlacionou com níveis elevados de citocinas inflamatórias e ambos foram associados ao baixo desempenho cognitivo em idosos institucionalizados (BAIERLE, 2015).

Complementando, pesquisadores mostraram que além da idade ser a principal causa do declínio cognitivo, o comprometimento cognitivo é mais lento em pacientes com baixos níveis de GSH cerebral, acelerando o declínio cognitivo em idosos (MANDAL et al., 2012, 2015). Com o passar dos anos foi confirmado que os radicais livres estão fortemente envolvidos no processo de envelhecimento, assim como doenças associadas à idade (BUTTERFIELD e HALLIWELL, 2019; GRIMM e ECKERT, 2017; GUILLAUMET-ADKINS et al., 2017).

A teoria do envelhecimento por radicais livres de Harman é relevante no SNC, pois este consome cerca de 20% do oxigênio do corpo sendo altamente vulnerável ao estresse oxidativo (BONDA et al., 2014). Ainda, o cérebro apresenta elevada demanda energética, abundância de ácidos graxos poli-insaturados facilmente peroxidáveis, alto nível de ferro catalisador de ERO e uma diminuição de enzimas antioxidantes (KIM et al., 2006). De acordo com Grimm e Eckert (2017) os neurônios são muito sensíveis, devido as células não serem divisíveis, pós-mitóticas e são insubstituíveis em caso de dano, levando à disfunção mitocondrial no final de sua vida.

O estresse oxidativo causa a peroxidação de lipídeos de membranas, como membranas plasmáticas onde atuam como uma barreira entre os espaços intracelular e extracelular (CHANDRASEKARAN, IDELCHIK, ELEMFEZ, 2017). Consequentemente devido à peroxidação lipídica, reduz a fluidez da membrana, levando a um aumento no vazamento da membrana facilitando a entrada dessas substâncias no sistema intracelular, que geralmente não conseguem atravessar a barreira, exceto por canais específicos (K^+ , Ca^{2+} , entre outros) danificando as enzimas, proteínas de membrana e receptores.

Sabe-se que o dano oxidativo é também acelerado devido às mitocôndrias nos terminais pré-sinápticos serem expostas a grandes níveis de insulto de cálcio dos canais de cálcio (GRIMM e ECKERT, 2017). Isso leva à

diminuição da produção de ATP, aumento da produção de ERO e aumento da oxidação de proteínas, DNA e lipídios (GRIMM e ECKERT, 2017; MECOCCHI et al., 2018).

O estresse oxidativo acontece quando a produção ERO, como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila ($OH^{\cdot}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), excede o sistema de defesa antioxidante celular como mostra na figura abaixo. Na célula, o principal sistema protetor é representado pelas enzimas antioxidantes, como catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), tioredoxinas e glutaredoxinas, além de fatores antioxidantes não enzimáticos, como as vitaminas A e C, ácido úrico e carotenoides (YUNG- ZHONG et al., 2002; SINGH et al., 2019).

A SOD converte o $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 . Já a CAT é uma peroxidase, ou seja, uma enzima que faz parte do grupo de oxirredutases com a função de oxidar substratos orgânicos, e possui a função de decomposição do H_2O_2 , que é uma molécula naturalmente formada em organismos vivos durante o metabolismo oxidativo (SINGH et al., 2019).

As enzimas glutathione-S-transferases (GST) desempenham um papel importante no sistema de detoxificação celular protegendo a célula dos metabólitos reativos de O_2 e são metabolizadoras de xenobióticos (HAYES et al., 2005; FROVA, 2006). Estas enzimas apresentam uma resposta adaptativa ao estresse celular, apresentando uma resposta antioxidante (HAYES., 2005; FROVA, 2006). Há sete classes de GSTs reconhecidas em mamíferos, que são: alfa (α), pi (π), mu (μ), sigma (σ), ômega (ω), theta (θ) e zeta (ξ) (HAYES and MCLELLAN, 1999; SHEEHAN et al., 2001). Ainda, destaca-se que as subunidades Yb e Y β da classe π GST são encontradas no cérebro de ratos, o que pode exercer uma função na detoxificação (HELM et al., 2011). Neste sentido, Struzynska et al. (2002) demonstraram um aumento da atividade e densidade de GSTs citosólicas no cerebelo e hipocampo de ratos expostos ao chumbo. Sabe-se que no meio ambiente há a presença de inúmeros produtos químicos e metais devido ao aumento da população e a industrialização, sendo que grande parte desses produtos químicos são extremamente tóxicos a todos ambientes como o ar, a água e as espécies migratórias (CHOI, WANIA, 2011).

O óxido nítrico (NO) atua na vasodilatação do endotélio (IGNARO et al., 1987). O NO originado do cérebro é produzido preferencialmente pela

forma neuronal da NOS (NOS1 ou nNOS) através da reação que converte L-arginina e oxigênio em citrulina e NO (BREDT, HWANG et al., 1991). Sabe-se que a capacidade do NO de afetar vários alvos celulares no SNC equilibra o papel dessa molécula em uma ampla gama de funções fisiológicas, como a homeostase energética e o controle hipotalâmico da reprodução (CHACHLAKI, GARTHWAITE, PRÉVOT, 2017).

Com base no que foi citado anteriormente, para garantir uma boa qualidade de vida no envelhecimento, é fundamental encontrar terapias eficazes capazes de diminuir o estresse oxidativo associado à idade.

Acetilcolinesterase (AChE) e Na⁺ K⁺-ATPase

O sistema colinérgico no cérebro é uma importante rede neuromoduladora. Quinn (1987) já denominava a AChE como uma enzima eficaz localizada em todo o corpo, atuando nas sinapses do SNC, nas junções neuromusculares do sistema nervoso periférico e ligada às membranas dos eritrócitos no sangue. Esta enzima atua na manutenção de níveis adequados do neurotransmissor acetilcolina (ACh) na fenda sináptica, por meio da sua hidrólise catalítica, formando acetato e colina, finalizando assim a neurotransmissão colinérgica (BAJGAR et al., 2009; GIACOBONI, 2004; SOREG e SEIDMAN, 2001; WANG et al., 2004).

Pesquisas recentes demonstraram que a sinalização colinérgica do cérebro e o nervo vago são os principais reguladores fisiológicos da inflamação (PAVLOV et al., 2018; LEHNER et al., 2019). Assim essa sinalização cerebral acaba controlando as respostas de citocinas periféricas e a inflamação, ainda, esse reflexo inflamatório fornece um canal de comunicação cérebro-periferia nessa regulação (YOSHIYAMA et al., 2010; PAVLOV e TRACEY, 2015; BEHESHTI e AGHAIE, 2016; BURCUL et al., 2018).

Os inibidores da AChE alteram a função colinérgica central ao inibir as enzimas que degradam a ACh, aumentando a capacidade do neurotransmissor ligar aos receptores muscarínicos e nicotínicos cerebrais (SERENIKI et al., 2008). Estudos demonstram que o aumento da expressão da AChE e distúrbios metabólicos estão associados a formação de placas e emaranhados em

pacientes com Alzheimer (DE FERRARI et al., 2001; VIAYNA, SABATE, D. MUNOS-TORRERO, 2013). Ainda, com o aumento da atividade desta enzima, há um declínio no nível de neurotransmissores e alterações sinápticas (FRANCISCO, 2005), resultando em fluxo sanguíneo cerebral anormal, dificuldade de aprendizado, insônia, déficit de memória e disfunção cortical (BABIC, 1999). Assim sendo, a ACh é essencial ao processo de aprendizagem e memória. Abaixo, uma figura mostrando a neurotransmissão colinérgica.

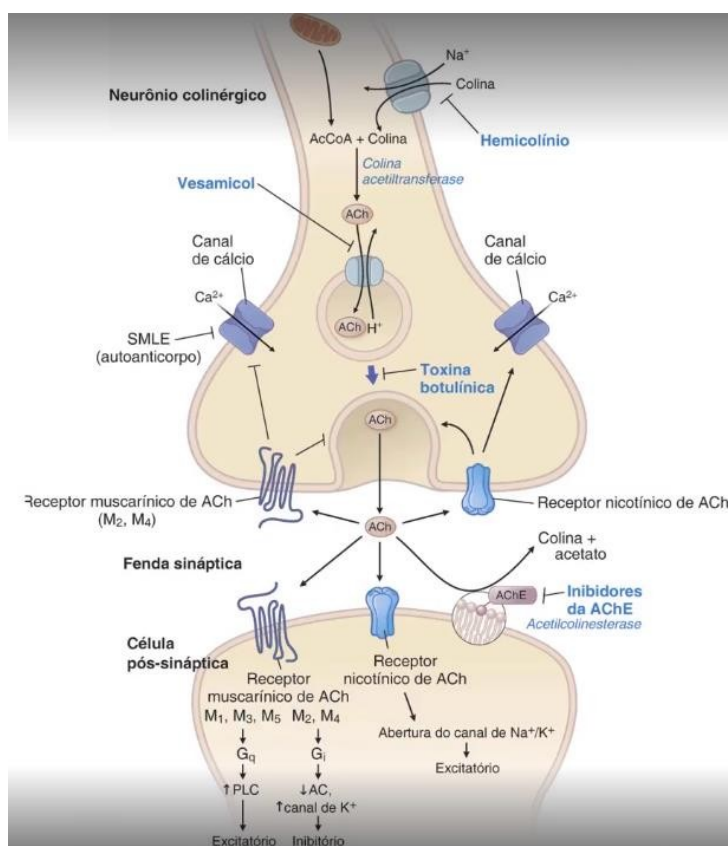


Figura 2 Formação da acetilcolina, a sua liberação e a sua receptividade pelos receptores biológicos (Tohmé, 2019).

A enzima Na^+ , K^+ -ATPase, também conhecida como bomba de sódio e potássio, é responsável pela manutenção do equilíbrio através das membranas das terminações nervosas (neurônios) e atua regulando a entrada de potássio (K^+) com a saída de sódio (Na^+) das células (SKOU, 1957; ARNAIZ e ORDIERES, 2014). O comprometimento desse equilíbrio leva à despolarização das terminações nervosas com entrada de Ca^{2+} na célula promovendo a

liberação de neurotransmissores o que é prejudicial à função celular (SCHEINER-BOBIS, 2002; ALBERS e SIEGEL, 2012; ARNAIZ e ORDIERES, 2014; ZHANG et al., 2013).

A Na^+ , K^+ -ATPase é uma enzima oligomérica que consiste em três subunidades; α , β e γ , todas necessárias para a função enzimática e sendo a subunidade α a catalítica, e a responsável pela troca de íons Na^+ e K^+ (TEIXEIRA et al., 2003). Também é na subunidade α aonde se encontra o sítio de ligação para o ATP (ARNAIZ e ORDIERES, 2014). Além disso, a subunidade α apresenta quatro diferentes isoformas: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ e $\alpha 4$. Dessas, três isoformas são expressas no cérebro: a $\alpha 1$ é encontrada em vários tipos celulares do SNC como nas células gliais; a $\alpha 2$ é predominantemente expressa em astrócitos (MOSELEY et al., 2003) mas também existe nas células gliais e neurônios; e a $\alpha 3$ é expressa apenas em neurônios (MOSELEY et al., 2007; SWEADNER, 1989; CHOLET et al., 2002). A subunidade β é a responsável por regular tanto a atividade quanto a estabilidade conformacional da subunidade α e a subunidade γ desempenha uma função reguladora de forma tecido-específica (EAKLE et al., 1994; CHOW e FORTE, 1995; ARNAIZ e ORDIERES, 2014). Também parece estar envolvida na modulação da afinidade da enzima por K^+ e Na^+ (SKOU, 1957; LUTSENKO e KAPLAN, 1993).

A Na^+ , K^+ -ATPase cerebral aumenta cerca de 10 vezes durante o desenvolvimento, e esse aumento é devido ao acúmulo da própria enzima. No entanto, durante o processo do envelhecimento, a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase no cérebro é reduzida (COHADON e DESBORDES, 1986; ARNAIZ e ORDIERES, 2014). No envelhecimento, o potencial de membrana de repouso sinaptossomal e a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase diminuem significativamente. Também pode haver redução do conteúdo de fosfatidilcolina durante o envelhecimento, que pelo menos em parte, pode ser responsável pela diminuição da atividade enzimática devido à alteração do microambiente lipídico (TANAKA, ANDO, 1992; ARNAIZ e ORDIERES, 2014). Estudos demonstram, em modelos experimentais de Alzheimer, uma diminuição de 30% na expressão da subunidade α da enzima Na^+ , K^+ -ATPase no hipocampo (DADA et al., 2003). Assim, a redução induzida pela idade na Na^+ , K^+ -ATPase

cerebral pode estar relacionada à diminuição da excitabilidade neuronal e ao comprometimento das funções cognitivas (KOCÁK, ONER, OZTAS, 2002).

Compostos senolíticos

Envelhecer de forma saudável é o interesse da coletividade. Felizmente, a ciência parece ter descoberto um provável caminho para proporcionar o envelhecimento saudável e ainda a prevenção de doenças relacionadas à idade. Uma nova classe de compostos, chamados senolíticos, que eliminam as células envelhecidas dos tecidos e atenuam o impacto negativo no corpo tem um efeito protetor no aparecimento de patologias relacionadas à idade (BAKER, PETERSEN, 2018), aumentando a expectativa de saúde e vida dos camundongos (XU et al., 2018). De acordo com Hickson *et al* (2019), os senolíticos também são capazes de reduzir o número de células senescentes em humanos e diminuir a secreção de fatores de sinalização pró-inflamatórios.

Em meados de 2004/2005, iniciou-se uma busca por drogas senolíticas capazes de eliminar seletivamente as células senescentes através de uma pesquisa do grupo Sharpless (KRISHNAMURTHY et al., 2004) que descobriram um acúmulo tardio de células p16^{Ink4a}-, SA-β-gal-positivas em camundongos que por restrição calórica ou uma mutação que diminui a sinalização do hormônio do crescimento há uma melhora na saúde desses camundongos.

No entanto a partir de 2005, Kirkland e Tchkonja (2020) realizaram uma tentativa de desenvolver proteínas de fusão com um local de reconhecimento da célula senescente e uma toxina para matar as células senescentes através de uma triagem de compostos de alto rendimento como candidatos que eliminam células senescentes, porém sem sucesso (ZHU et al., 2015; ZHU et al., 2017; KIRKLAND e TCHKONIA, 2017, 2020). Assim, os pesquisadores voltaram-se para um paradigma de descoberta baseado em hipóteses para encontrar as primeiras drogas senolíticas (ZHU et al., 2015; ZHU et al., 2017; KIRKLAND e TCHKONIA, 2017).

De acordo Zhu et al. (2015) os primeiros senolíticos descobertos com base em hipóteses foram o dasatinibe e quercetina em que foi investigado em como as células senescentes que expressam um SASP podem sobreviver,

apesar de seu próprio meio altamente pró-apoptótico e metabolicamente distinto e potencialmente prejudicial. Após, através da bioinformática onde foi realizada uma análise transcriptômica comparando pré-adipócitos humanos senescentes com proliferantes, descobriu-se que as células senescentes dependem das redes da via antiapoptótica de células senescentes (SCAPs) a fim de protegê-las de estímulos pró-apoptóticos (ZHU et al., 2015).

Alguns SCAPs foram identificados incluindo a tirosina cinases/efrinas, família BCL-2/BCL-X, p53/p21, PI3K/AKT e HIF-1 α (ZHU et al., 2015). Zhu et al. (2015) demonstraram uma potencial atividade apoptótica da combinação de dasatinibe e quercetina na eliminação de células senescentes. Esse efeito foi atribuído ao próprio SASP e ao estado metabólico dessas células (ZHU et al., 2015).

Juiz et al. (2019) realizaram o primeiro ensaio clínico com tratamento senolítico demonstrando que foi bem tolerado e observando uma melhora na função física em pacientes com fibrose pulmonar idiopática, uma doença grave, fornecendo assim as primeiras evidências encorajadoras para estudos clínicos. Da mesma forma, outro estudo aberto com os mesmos compostos foi realizado com pacientes com doença renal diabética, em que o tratamento de curto prazo diminuiu efetivamente o número de células senescentes no tecido adiposo e reduziu os níveis plasmáticos dos principais fatores SASP, incluindo IL-2 e IL-6 (HICKSON et al., 2019).

Sabe-se que como as células senescentes não se dividem e se acumulam lentamente durante um período de semanas a meses, os agentes senolíticos não precisam ser administrados ininterruptamente para serem eficazes (ZHU et al., 2014; MUSI et al., 2018). Os regimes de dosagem intervalada têm o benefício de reduzir o risco de efeitos de medicamentos associados, que podem incluir; retenção de líquidos, mielossupressão associada ao dasatinibe, hemorragia, disfunção miocárdica e dispneia (MASIELLO, GOROSPE, YANG, 2009; ZHU et al., 2015).

A quercetina é um flavonoide do tipo flavonol que foi isolado pela primeira vez em 1854 a partir de seu glicosídeo, a quercitrina (KIM e PARK, 2018). É encontrado na maioria dos vegetais, frutas e chá, exibindo atividade antioxidante, anti-inflamatória e neuroprotetora (PEI et al., 2016; MORAND et al., 1998). Estudos mostraram que esse composto reduz marcadores

bioquímicos de envelhecimento em humanos, assim como pode prolongar a vida útil em estudos envolvendo modelos animais, pois induz a apoptose nas células senescentes (KIRKLAND e TCHKONIA, 2017; ABHARZANJANI et al., 2017).

A quercetina tem como alvo as vias BCL-2, HIF-1 α , insulina/IGF-1, PI3K/AKT e outros SCAPs, eliminando preferencialmente as células endoteliais senescentes (ZHU et al., 2015). No entanto, esse composto apresenta baixa disponibilidade e solubilidade (RICH et al., 2017). Quimicamente, deriva do esqueleto de difenilpropano (C6-C3-C6) e contém um anel heterocíclico (C) com um átomo de oxigênio incorporado (pirano) de acordo com a figura abaixo.

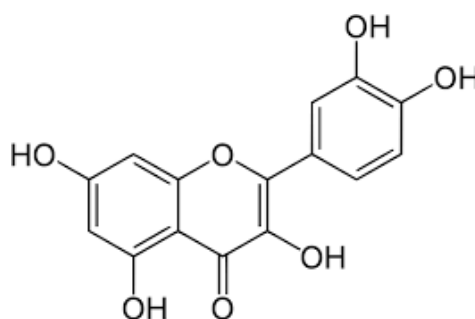


Figura 3 Estrutura química da quercetina.

Fórmula: C₁₅H₁₀O₇

O dasatinibe foi inicialmente identificado através de uma seleção para inibidores de proto-oncogene cinase e utilizado como um agente quimioterápico que através da inibição de múltiplas cinases (proteína tirosina cinase), altera as vias de sobrevivência celular antiapoptótica em células progenitoras de adipócitos senescentes (DAS et al., 2006; KIRKLAND e TCHKONIA, 2020). Esse fármaco foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para leucemia mieloide crônica e linfoblástica aguda (KANTARJIAN et al., 2006) e sabe-se que atravessa a barreira hematoencefálica e apresenta vários efeitos imunomoduladores antitumorais (FEI et al., 2009; HEKIN et al., 2017).

Quimicamente, o dasatinibe é uma 2-metilpirimidina substituída na posição 4 pelo grupo amino primário do ácido 2-amino-1,3-tiazol-5-carboxílico e na posição 6 por um 4-(2-hidroxietil) grupo piperazin-1-il, onde o grupo ácido carboxílico foi formalmente condensado com 2-cloro-6-metilanilina para

fornecer a amida correspondente. Em suma é um composto amino secundário, um composto amino terciário, um composto organoclorado, uma aminopirimidina, um membro de 1,3-tiazóis, uma amida de ácido monocarboxílico, uma N-arilpiperazina e uma N-(2-hidroxietil) piperazina de acordo com a figura abaixo.

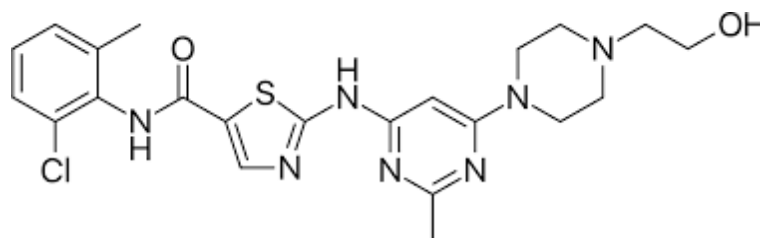


Figura 4 Estrutura química do dasatinibe.

Fórmula: $C_{22}H_{26}ClN_7O_2S$

A combinação de dasatinibe mais quercetina induz de forma mais eficaz a apoptose em todos os tipos de células senescentes, provavelmente por meio de mecanismos adicionais que promovem o direcionamento de múltiplos SCAPs (ZHU et al., 2015). Até o presente momento, a eficácia dos senolíticos de dasatinibe mais quercetina testados em dezenas de modelos *in vivo* de forma intermitente apresentou melhora em muitas doenças relacionadas à idade, como sintomas de disfunção física, resistência à insulina, osteoporose, esteatose hepática, neurodegeneração, disfunção do músculo esquelético, fibrose pulmonar e doença renal crônica (WISSLER et al., 2020).

Em síntese, a combinação de drogas senolíticas pode promover a remoção das células senescentes, visando complementar múltiplas vias associadas à senescência envolvidas na sobrevivência e resistência à apoptose (ZHU et al., 2015).

4. Manuscrito

Effect of treatment with senolytics on mice brain aging: involvement of redox status, Na⁺, K⁺-ATPase and acetylcholinesterase activity

Submetido ao periódico *Biogerontology*

Effect of treatment with senolytics on mice brain aging: involvement of redox status, Na⁺, K⁺-ATPase and acetylcholinesterase activity

Olivia Wyse Faria¹, Mayara Sandrielly Soares de Aguiar^{2*}, Julia Eishenhardt de Mello², Fernando Lopez Alvez², Karina Pereira Luduvico¹, Driele Neske Garcia³, Augusto Schneider³, Michal M. Masternak^{4,5}, Roselia Maria Spanevello², Francieli Moro Stefanello¹

¹Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Laboratório de Biomarcadores, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário S/N, Pelotas, RS, Brazil.

²Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Laboratório de Neuroquímica, Inflamação e Câncer, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário S/N, Pelotas, RS, Brazil.

³Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brazil

⁴Burnett School of Biomedical Sciences, College of Medicine, University of Central Florida, Orlando, FL 32816, USA

⁵Department of Head and Neck Surgery, Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland

*Address reprint requests to: Francieli Moro Stefanello, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, Pelotas, RS, Brazil, CEP: 96010-900.

Phone: 55 53 32757355, Fax: 55 53 32757354, E-mail: francieli.stefanello@ufpel.edu.br

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effects of treatment with senolytics (dasatinib + quercetin) on inflammatory and oxidative stress markers and study of acetylcholinesterase (AChE) and Na⁺, K⁺-ATPase activities in the brain of aged mice. Adult female mice C57BL6 were divided into two groups, as follows: Group I - Control (Vehicle) and Group II – dasatinib (D) + quercetin (Q) treated. Treatment or vehicle was administered via gavage (D: 5 mg/kg and Q: 50 mg/kg) for three consecutive days every two weeks starting at 30 days of age and half of the animals in each group were euthanized at 6 months of age and the other half at 14 months of age and the brain was collected for biochemical analysis. The results showed an increase in the levels of reactive oxygen species (ROS), thiol content and lipid peroxidation followed by a reduction in nitrite levels and the activity of the enzymes superoxide dismutase, catalase and glutathione S-transferase in the brain of control animals with aging. Treatment with D+Q protected against aging-associated increase in ROS and catalase activity reduction. AChE activity was increased, while Na⁺, K⁺-ATPase activity was reduced in the animals with 14 months, while treatment with D+Q was able to prevent this reduction. These data indicate the important role of senolytic drugs in regulating the process of brain aging and support the need for future investigations of the role of cellular senescence in age-associated neuropathologies.

Kew words: Senolytics, brain, aging, redox status, ATPase

1. Introduction

According to the United Nations (2019), the world population of elderly people over 65 years old will be approximately 1.5 billion in 2050. Aging is a natural, complex and multifactorial process that leads to the loss of functional capacities, including healthy function of brain. This results in a decline in cognitive performance, manifested through a decrease in learning and memory, speed of decision making, attention and sensory perception and motor coordination, decreasing the quality of life of the elderly (Mattson and Arumugam 2018; Kirkwood 2005).

Cellular senescence involves extensive changes in gene expression resulting in arrest of cell division and proliferation. This process can be induced by DNA damage, the oncogenic mutations, metabolic and mitochondrial dysfunction, as well as inflammation (Wiley et al. 2016). In the brain, aged neurons are less functional than their youthful counterparts, but, importantly, they have not transitioned into a novel senescent phenotype, likely because telomere wear is inherently linked to proliferation. However, *in vitro* chronically activated microglia exhibit characteristics of senescence, including senescence-associated β -galactosidase activity, formation of heterochromatic foci, and growth arrest and aged human brain tissue displays an increase in the number of astrocytes positive for p16INK4A and matrix metalloproteinase 3 (MMP3), the common senescent associated secretory phenotype (SASP)-associated protease (Baker and Petersen 2018). Additionally, evidence has suggested that the accumulation of senescent astrocytes may drive to cognitive decline found in neurodegenerative disorders (Csipo et al. 2020). Therefore, alternatives that modulate the cellular senescence process with consequent improvement in the aging process are of great importance in geroscience.

Senolytic compounds represent new or repurposed combination of drugs having ability to eliminate senescent cells and have a protective effect on the onset of age-related pathologies (Baker et al. 2016; Xu et al. 2018). According to Hickson et al. (2019), senolytics are also able to reduce the number of senescent cells and decrease the secretion of pro-inflammatory signaling factors in humans. These compounds were discovered by Zhu et al. (2015), who used the combination of dasatinib and quercetin (D+Q) demonstrating a potential apoptotic activity in senescent cells. Studies using these compounds concomitantly have shown to be neuroprotective against brain aging in rodents by removing A β plaques, reducing neuroinflammation and improving memory (Zhang et al. 2019; Sikora et al. 2021; Gonzales et al. 2022).

The process of cellular senescence is directly linked to oxidative stress. When the production of free radicals exceeds the capacity of action of antioxidants, there is the oxidation of biomolecules resulting in cellular damage (Halliwell and Whiteman

2004; Huang et al. 2005). Also, according to Mattson and Arumugam (2018), as a result of the SASP, glial cells present greater release of pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α). The main physiological effect of TNF- α is to allow the immune and inflammatory response and studies suggest that TNF- α is the major inflammatory factor that promotes the SASP. Also, it has been demonstrated that TNF- α induces neuronal senescence and enhances the SASP of neurons (Silman and Sussman 2005; Bae et al. 2022).

Acetylcholine (ACh) is a neurotransmitter of the cholinergic system that acts as a neuromodulator involved in learning, cognition, attention and memory processes (Picciotto et al. 2012; Beckmann and Lips 2013). The enzyme able to interrupt cholinergic signaling is acetylcholinesterase (AChE), which is an interesting therapeutic target. In fact, an increase in AChE activity is widely found in patients with Alzheimer's disease (AD), and is also the target of many drugs used in AD (Picciotto et al. 2012; Beckmann and Lips 2013).

The Na⁺, K⁺-ATPase, known as the sodium-potassium pump, is bound to the plasma membrane and its main function is to maintain ionic balance by adjusting the entry of potassium with the exit of sodium from the cells (Arnaiz and Ordieres 2014). The imbalance in the activity of this enzyme leads to neuronal depolarization with the entry of calcium (Ca²⁺), promoting the release of neurotransmitters, osmotic nonconformity and functional impairment (Zhang et al. 2013; Arnaiz and Ordieres 2014). Modulation of Na⁺, K⁺-ATPase activity also directly influences synaptic transmission and plasticity, learning and memory processes (Moseley et al. 2007; Zhang et al. 2013; Petrushanko et al. 2016).

Thus, considering the role of senescence in neurodegenerative disorders, the aim of this study was to evaluate the effects of senolytics (D+Q) treatment on oxidative stress and inflammatory parameters and on the AChE and Na⁺, K⁺-ATPase activities in the brain of aging mice.

2. Materials and Methods

Chemicals

Dasatinib was obtained from LC laboratories (Woburn, MA). The quercetin and TNF- α immunoassay kit were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). All other reagents used in the experiments were of analytical grade and of the highest purity.

Animals and ethical aspects

Female C57BL/6 mice 30 days-old were used for this study, maintained under a standard 12-h dark-light cycle (lights on between 7:00 a.m. and 7:00 p.m.) in a room

with controlled temperature and air humidity 40%-60%. All animal procedures were approved by the ethics committee from the Federal University of Pelotas, Brazil, under protocol number 58357-2018. The use of animals was in accordance with the Brazilian Guidelines for the Care and Use of Animals in Scientific Research Activities (DCBA) and the National Council of Control of Animal Experimentation (CONCEA).

Experimental protocol

Mice received water and a standard diet ad libitum throughout the duration of the experiment and treatments started 1 week after weaning and continued until 6 or 14 months of age. Mice were divided into two groups (n=16 per group), as follows: Group I - Control (Vehicle) and Group II - Treated (D+Q). Treatment or vehicle was administered via gavage (dasatinib: 5 mg/kg and quercetin: 50 mg/kg) for three consecutive days every two weeks starting at 30 days of age and half of the animals in each group were euthanized at 6 months of age and the other half at 14 months of age. The control group received a placebo solution (diluent in 60% phosal, 30% PEG400 and 10% ethyl alcohol) (Xu et al., 2018).

At six and 14 months of age eight mice from each group were anesthetized, euthanized, dissected and the brain was collected and stored at -80°C for biochemical analyses.

2.4. Oxidative stress parameters

The brain tissue was homogenized using the sodium phosphate buffer (pH 7.4) containing KCl or Tris-HCl 10 mM, pH 7.4 buffer, centrifuged at 2500 x g for 10 min at 4 °C, and the supernatant was collected for the biochemical analyses.

Reactive oxygen species (ROS) assay

ROS levels were determined using the 2, 7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) assay, whereby DCFH-DA reacts with ROS and consequently emits fluorescence. Intact brain tissue was incubated with DCFH-DA for 30 min at 37 °C and fluorescence was determined in at 485/520 nm. The result is expressed as $\mu\text{molDCF/mg}$ of protein (Ali et al. 1992).

Nitrite levels

The production of nitrite was determined as described by Stuehr and Nathan (1989). Brain supernatants were reacted with Griess reagent (1% sulfanilamide, 1% naphthylethylenediamine chloride, and 25% H_3PO_4) for 10 min at room temperature. The absorbance was measured at 540 nm and the results were expressed as μM

nitrite/mg of protein.

Total sulfhydryl (SH) content

The total SH content was determined using the 5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) reagent as described by Aksenov and Markesbery (2001). The reaction was based on the reduction of DTNB by thiols resulting in a yellow derivative (TNB) whose absorption is read at 412 nm. The results were expressed as nmol TNB/mg of protein.

Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS)

TBARS levels were measured using the method described by Esterbauer and Cheeseman (1990). Briefly, 10% TCA was added to the homogenates, the samples were centrifuged, and the supernatant was collected. Then, 0.67% TBA was added to the supernatant, which was placed in a water bath at 100°C for 30 min. After, the absorbance was analyzed using a spectrophotometer at 535 nm and the results were expressed as nmol TBARS/mg of protein.

Superoxide Dismutase (SOD) assay

The SOD activity was measured according to Misra and Fridovich (1972). This method is based on the inhibition of superoxide-dependent adrenaline auto-oxidation. The specific activity of SOD was reported as units/mg of protein.

Catalase (CAT) assay

The CAT activity based on the decomposition of H₂O₂ monitored at 240 nm at ambient temperature was performed according to Aebi (1984). The CAT activity was reported as units/mg of protein.

Glutathione S-transferase (GST) assay

GST activity was measured using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as a substrate according to Habig et al. (1974). The assay medium consisted of 1 mM CDNB (in ethanol), 10 mM glutathione (GSH), 20 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5), and brain homogenates. The activity was expressed as μ mol GS-DNB/min/mg of protein.

Acetylcholinesterase (AChE) and Na⁺, K⁺-ATPase activity

The AChE activity was determined as described Ellman et al. (1961). First, the reaction system was composed of 10 mM DTNB, 100 mM phosphate buffer (pH 7.5),

and brain homogenate, and was incubated for 2 min at 27 °C. After that, 8 mM acetylthiocholine was added and the absorbance was determined for 2 min with 30-s intervals at 27 °C. All readings were performed in triplicate and the AChE activity was expressed as $\mu\text{mol AcSCH/h/mg}$ of protein.

The Na^+ , K^+ -ATPase assay was based on phosphate (Pi) release and performed using the malachite green method (Chan et al. 1986) with ATP as a substrate. For this, brain were homogenized (1:10 w/v) in Tris-HCl 10 mM, pH 7.4. The samples were centrifuged and the supernatants were collected. The incubation system contained Tris, NaCl, KCl, MgCl_2 , EDTA, water and pH adjusted to 7.4. Pre-incubation included incubation system addition, ouabain and samples. For the incubation at 37°C for 10 minutes, ATP was added. In the next step, incubation at 37°C for 30 minutes was made with TCA addition. In the last step, malachite green reagent was added. The detection was made at 630 nm, and Specific enzyme activity was expressed as nmol of $\text{Pi}/\text{min}/\text{mg}$ of protein as suggested by Wyse et al. (2007).

TNF α levels

Quantification of was performed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). The test was performed according to the manufacturer's instructions. Results were expressed as pg/mg of protein.

Protein determination

For AChE and Na^+ , K^+ -ATPase activity, the protein was determined according Bradford (1976), while the protein concentration for oxidative stress parameters and TNF levels was measured by Lowry et al. (1951).

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5 and two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni test for multiple comparisons. All data were expressed as mean $\pm$ standard error and the differences between mean values were considered significant at $P < 0.05$.

3. Results

As shown in Figure 1, treatment with D+Q ($P < 0.01$) protect against increase of ROS in aged brains when comparing with age matched vehicle treated control mice [interaction: $F_{(1, 27)} = 5.62$, $P < 0.05$] (Figure 1A). Furthermore, nitrite levels were

significantly reduced in the brains of 14 compared to 6-month-old mice ($P<0.001$), and D+Q treatment ($P>0.05$) was not able to protect against this change [interaction: $F_{(1, 29)} = 1.04$, $P>0.05$] (Figure 1B). Regarding the total thiol content, there was an increase in the brain of 14-months-old when compared to 6-month-old mice ($P<0.001$), which was increased ($P<0.001$) even more by D+Q treatment [interaction: $F_{(1, 25)} = 25.17$, $P<0.001$] (Figure 1C). Finally, there was an increase in lipid peroxidation in the brain of 14-month-old ($P<0.001$) compared to 6-month-old mice, and treatment with D+Q ($P>0.05$) did not protect against this change [interaction: $F_{(1, 26)} = 0.044$, $P>0.05$] (Figure 1D).

Regarding antioxidant enzyme activity, we observed a reduction ($P<0.001$ and $P<0.05$, respectively) in the activity of SOD [interaction: $F_{(1, 23)} = 0.004$, $P>0.05$] and GST [interaction: $F_{(1, 20)} = 0.50$, $P>0.05$] in the brain of 14-months-old when compared to 6-month-old mice. Treatment with D+Q was not able to protect against this decrease ($P>0.05$) (Figures 2A and 2C). Furthermore, D+Q treatment ($P<0.01$) prevented the reduction in CAT activity observed in the brain of 14-months-old compared to 6-month-old mice [interaction: $F_{(1, 27)} = 7.17$, $P<0.05$] (Figure 2B).

AChE activity was significantly higher in the brain of 14-months-old when compared to 6-month-old mice ($P<0.01$), and treatment with D+Q ($P>0.05$) was not able to protect against this change [interaction: $F_{(1, 31)} = 0.054$, $P>0.05$] (Figure 3A). Na^+ , K^+ -ATPase activity was reduced in 14-months-old when compared to 6-month-old mice ($P<0.01$), and treatment with D+Q ($P<0.05$) was able to prevent this decrease [interaction: $F_{(1, 12)} = 11.68$, $P<0.01$] (Figure 3B).

No changes were observed in brain TNF- α levels with age or treatment [interaction: $F_{(1, 17)} = 1.22$, $P>0.05$] (Figure 4).

4. Discussion

Senescent cells entail essentially irreversible replicative arrest, sustained viability with resistance to apoptosis, and frequently, increased metabolic activity. Cells with features of senescence have been detected in the context of brain aging and neurodegenerative disease (Baker and Petersen 2018; Zhang et al. 2019; Kirkland and Tchkonja 2020). In this sense, the search for compounds capable of modulating the process of cellular senescence would be of great relevance for the protection of the various chronic neurological disorders such as Alzheimer's and Parkinson's disease (Baker and Petersen 2018; Zhang et al. 2019; Kirkland and Tchkonja 2020). The association of D+Q compounds demonstrated promising therapeutic results with partial reduction in neurofibrillary tangles in subjects with early-stage dementia due to Alzheimer's disease (Zhu et al. 2015; Xu et al. 2018; Krzystyniak 2022).

Quercetin, as a senolytic, acts in part by inhibiting members of the BCL-2 family, such as BCL-xL, as well as HIF-1 α and other components of the senescent cell anti-apoptotic pathway network. Furthermore, the combination of D+Q was shown to be able to cause apoptosis of both senescent human primary adipocyte progenitor cells and senescent HUVECs. It should be noted that the target of true senolytics are senescent cells, and not a single receptor, enzyme or biochemical pathway (Breccia et al. 2011; Chan et al. 2012; Zhu et al. 2015; Yosef et al. 2016).

Bioenergetic deficits and chronic oxidative stress are major contributors to cognitive decline associated with brain aging. It is well known that a significant portion of ATP is used to fuel Na⁺, K⁺-ATPase activity to maintain sodium and potassium gradients. The imbalance in the activity of this enzyme can result in neuronal depolarization, providing neurotransmitter release, osmotic imbalance, alteration in synaptic transmission and plasticity, thus impairing the memory and learning process (Moseley et al. 2007; Zhang et al. 2013; Arnaiz and Ordieres 2014; Petrushanko et al. 2016). We observed a reduction in Na⁺, K⁺-ATPase activity with age, as found by Chakraborty et al. (2003). According to the same authors, the age-related decline of Na⁺, K⁺-ATPase activity in the rat brain is probably the consequence of increased oxidative damage in brain aging (Chakraborty et al. 2003). In addition, Philbert et al. (2022) detected contrasting levels of Na⁺ and K⁺ in hippocampal tissue suggesting dysfunction of Na⁺, K⁺-ATPase exchange, possibly resulting from a deficient generation of metabolic energy (Philbert et al. 2022). Therefore, the modulation of Na⁺, K⁺-ATPase activity can be studied as a target for the treatment of neurodegenerative diseases and aging, as well as for the reason of it having sulfhydryl groups susceptible to oxidation. In this sense, the treatment with D+Q was able due to protect against the reduction of the activity of Na⁺, K⁺-ATPase, which can be due decreased ROS in mice treated with D+Q.

AChE plays an important role in the process of memory and learning, as well as postsynaptic differentiation, glial activation, activation of dopaminergic neurons and cell adhesion (Silman and Sussman 2005). An increase in AChE activity has been observed in several pathologies such as Alzheimer's and is related to changes in inflammatory parameters (D'Amelio et al. 2010; Pohanka 2014). We observed that aging increases the activity of AChE, which impairs memory and cognitive activities. Corroborating these data, cellular senescence induces a pro-inflammatory state, associated with changes in the cholinergic system (D'Amelio et al. 2010; Pohanka 2014). However, treatment with senolytics was not able to protect the brain against increased AChE activity, despite previous studies have already demonstrated an anticholinesterase effect of quercetin (Batiha et al. 2020).

In the present study, a classic picture of oxidative stress was observed in older mice, with increased levels of ROS and TBARS, in addition to reduced activity of the antioxidant enzymes SOD, CAT and GST. It is known that ROS production and accumulation levels increase gradually throughout life, particularly in the CNS (Ansari and Scheff 2010; Stefanatos and Sanz 2018; Simas et al. 2019). In addition, there is a reduction in oxidant enzymes in the brain with age, resulting in oxidative stress (Kumar et al. 2018). Evidence suggests that oxidative stress may be one of the main mechanisms that cause cognitive aging and neurodegenerative diseases (Xu et al. 2014; Lushchak 2014; Tan et al. 2018; Ionescu-Tucker and Cotman 2021). In this way, researchers demonstrate higher levels of ROS and oxidative stress markers when comparing the brain of younger and older animals (Liu et al. 2003; Serrano and Klann 2004), corroborating the data observed in the present study. The increase in ROS in aged animal models resulted in the appearance of behavioral or cognitive deficits in memory (spatial and temporal) and in learning (Carney et al. 1991; Fukui et al. 2001).

On the other hand, the increase in total thiol content observed in the untreated older animals could be happening as a compensation mechanism of the brain itself to try to reverse the oxidative damage. Regulation of thiol redox balance is important for multiple metabolic, signaling and transcriptional processes in mammalian cells. Thiol groups of proteins or small molecules are highly reactive and susceptible to oxidation that may cause significant loss of biological activity. In this way, alterations in protein redox status have been related in the pathogeny of various neurological diseases and aging process (Halliwell and Whiteman 2004; Huang et al. 2005).

There are several hypotheses for the increase in ROS in older mice, such as the increase in the activity of the enzyme nitric oxide synthase. Furthermore, this increase in ROS may be a consequence of the reduction in SOD and CAT activity, as observed in our study. It is known that increased production of ROS can cause damage to membrane proteins and lipids, as corroborated by increased levels of TBARS. Lipid peroxidation can alter cell permeability and selectivity, thus impairing cell function. On the other hand, treatment with D+Q was able to reduce the production of ROS, which could interrupt or reduce the cascade of deterioration of cellular biological molecules. The mechanisms by which treatment with senolytics can reduce ROS levels may be related in part to the presence of phenolic hydroxyl groups that are accessible to oxidizing agents (Haq and Allamro 2019; Ganeshpurkar 2017) in addition to their ability to increase the activity of CAT responsible for the detoxification of hydrogen peroxide in non-reactive molecules.

Also, it should be noted that D+Q can act in other ways that can lead to a reduction in ROS levels and oxidative stress in the brain, such as: improving the

intestinal microbiota and insulin resistance, modulating monocyte and macrophages activity, increasing neuronal markers, indicating improved neurogenesis, reduction of neuroinflammation and of Tau and beta-amyloid protein accumulation in Alzheimer's disease (Zhang et al. 2019; Kirkland and Tchkonja 2020; Saccon et al. 2021; Krzystyniak et al. 2022). Previous studies showed that D+Q improved the learning and memory in aged mice (Zhang et al. 2019; Krzystyniak et al. 2022).

A reduction in the levels of nitrites was observed in the brain of older mice, and the treatment with D+Q was not able to protect against this decrease. Nitrites are a nitric oxide degradation metabolite which under physiological conditions acts as a vasodilator, so its reduction would impair blood transport in the body through arteries and arterioles, impairing cerebral oxygenation and causing memory impairment and learning (Iadecola 1993; Böhme et al. 1993). Recently, a study suggested that the elevation of nitric oxide synthase activity could be a compensatory mechanism to restore the synaptic changes that occur in presymptomatic AD, as shown in the transgenic mouse model (Chakroborty et al. 2015). In these mice, NO blockade triggered a synaptic depression, suggesting that this increase is necessary to maintain synaptic plasticity, which is essential for memory formation.

It is known that reduced GST expression is associated with brain aging, neurodegeneration and memory impairment (Bjork et al. 2006; Dasari et al. 2018). These data agree with the results found in the present work. GST has important functions in the cellular detoxification system by protecting the cell from reactive oxygen metabolites and contributing to the biotransformation of carcinogens and xenobiotics (Hayes et al. 2005; da Fonseca et al. 2010). Although treatment with D+Q appears to attenuate the reduction in GST activity, it was not effective in significantly protecting against this change.

The microglia of aged mice exhibit an increase in the production of pro-inflammatory cytokines such as IL-6, IL-1 β and TNF- α , all of which are upregulated factors in senescent cells (Baker and Petersen 2018; Zhang et al. 2019; Kirkland and Tchkonja 2020). TNF- α overexpression has been related to neuronal excitotoxicity, propagation of the inflammatory state and loss of synapses (Jung et al. 2019). In the present study, no changes were observed in TNF- α level in the brain with aging or by treatment with D+Q. This can be due to the fact that the mice were healthy and relatively young. Perhaps, the analysis of the isolated production of TNF by microglia could show different results. Another point that must be addressed is that low-grade neuroinflammation cannot yet be detected by the techniques used in this study.

5. Conclusion

Treatment with D+Q has an important role in modulating brain Na⁺, K⁺-ATPase activity, in addition to reducing ROS levels and increasing CAT activity, which could contribute to attenuating the negative effects caused by aging on the brain. These data are of great relevance for future investigations of the role of senolytic D+Q as adjuvants in the treatment of age-associated neuropathologies, such as dementia.

Funding: This work was supported by Fundação de Amparo à pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Finance code 001) and National Institute on Aging of the National Institutes of Health under Award Number R56AG074499 to M.M.M.

Disclosure Statement: The authors declare that they have no conflict of interest.

Data Availability Statement: The datasets generated during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

References

- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121-126.
- Aksenov MY, Markesbery WR (2001) Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 302:141-145.
- Ali SF, LeBel CP, Bondy SC (1992) Reactive oxygen species formation as a biomarker of methyl mercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicol* 13:637-648.
- Ansari MA, Scheff SW (2010) Oxidative stress in the progression of Alzheimer disease in the frontal cortex. *J Neuropathol Exp Neurol*, 69:155-167.
- Arnaiz GRL, Ordieres MG (2014) Brain Na(+), K(+)-ATPase Activity In Aging and Disease. *Int J Biomed Sci* 10:85-102.
- Bae EJ, Choi M, Kim JT et al (2022) TNF- α promotes α -synuclein propagation through stimulation of senescence-associated lysosomal exocytosis. *Exp Mol Med* 54:788-800. doi: 10.1038/s12276-022-00789-x.
- Baker DJ, Childs BG, Durik M et al (2016) Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* 530:184-189. doi: 10.1038/nature16932.
- Baker DJ, Petersen RC (2018) Cellular senescence in brain aging and neurodegenerative diseases: evidence and perspectives. *J Clin Invest* 128:1208-1216. doi: 10.1172/JCI95145.
-

Batiha GES, Beshbishy AM, Ikram M et al (2020) The Pharmacological Activity, Biochemical Properties, and Pharmacokinetics of the Major Natural Polyphenolic Flavonoid: Quercetin. *Foods* 9:374. doi: 10.3390/foods9030374.

Beckmann J, Lips KS (2013) The non-neuronal cholinergic system in health and disease. *Pharmacology* 92:286-302. doi: 10.1159/000355835.

Böhme GA, Bon C, Lemaire M et al (1993) Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:9191-9194.

Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

Carney JM, Starke-Reed PE, Oliver CN et al (1991) Reversal of age-related increase in brain protein oxidation, decrease in enzyme activity, and loss in temporal and spatial memory by chronic administration of the spin-trapping compound N-tert-butyl-alpha-phenylnitron. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:3633-3636. doi: 10.1073/pnas.88.9.3633.

Chakraborty H, Sen P, Sur A, Chatterjee U, Chakrabarti S (2003) Age-related oxidative inactivation of Na⁺, K⁺-ATPase in rat brain crude synaptosomes. *Exp Gerontol* 38:705-710. doi: 10.1016/s0531-5565(03)00066-4.

Chakraborty S, Kim J, Schneider C, West AR, Stutzmann GE (2015) Nitric oxide signaling is recruited as a compensatory mechanism for sustaining synaptic plasticity in Alzheimer's disease mice. *J Neurosci* 35:6893-6902. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4002-14.2015.

Chan CM, Jing X, Pike LA et al (2012) Targeted inhibition of Src kinase with dasatinib blocks thyroid cancer growth and metastasis. *Clin Cancer Res* 18:3580-91. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3359.

Chan K, Delfert D, Junger KD (1986) A direct colorimetric assay for Ca²⁺-ATPase activity. *Anal Biochem* 157:1375-1378. doi: 10.1016/0003-2697(86)90640-8.

Csipo T, Lipcz A, Ashpole NM, Balasubramanian P, Tarantini S (2020) Astrocyte senescence contributes to cognitive decline. *GeroScience* 42:51-55.

D'Amelio M, Cavallucci V, Cecconi F (2010) Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. *Cell Death Differ* 17:1104-1114. doi: 10.1038/cdd.2009.180.

da Fonseca RR, Johnson WE, O'Brien SJ, Vasconcelos V, Antunes A (2010) Molecular evolution and the role of oxidative stress in the expansion and functional diversification of cytosolic glutathione transferases. *BMC Evol Biol* 10:281. doi: 10.1186/1471-2148-10-281.

Dasari S, Ganjari MS, Oruganti L, Balaji H, Meriga B (2017) Glutathione S- transferases Detoxify Endogenous and Exogenous Toxic Agents - Mini review. *J Dairy Vet Anim Res* 5:1-3. doi: 10.15406/jdvar.2017.05.00154

Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 17:88-95. doi: 10.1016/0006-2952(61)90145-9.

Esterbauer H, Cheeseman KH (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 186:407-421. doi: 10.1016/0076-6879(90)86134-H.

Fukui K, Onodera K, Shinkai T, Suzuki S, Urano S (2001) Impairment of Learning and Memory in Rats Caused by Oxidative Stress and Aging, and Changes in Antioxidative Defense Systems. *Ann NY Acad Sci* 928:168-175. doi: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb05646.

Ganeshpurkar A (2017) The Pharmacological Potential of Rutin. *Pharm J* 25:149-164. doi: 10.1016/j.j.sps.2016.04.025.

Gonzales MM, Garbarino VR, Marques ZE et al (2022) Senolytic Therapy to Modulate the Progression of Alzheimer's Disease (SToMP-AD): A Pilot Clinical Trial. *J Prev Alzheimers Dis* 9:22-29. doi: 10.14283/jpad.2021.62.

Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249:7130-9.

Halliwell B, Whiteman M (2004) Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 142:231-255. doi:10.1038/sj.bjp.0705776.

Haq SH, AlAmro AA (2019) Neuroprotective effect of quercetin in murine cortical brain tissue cultures. *Clin Nutr Exp* v. 23:89-96. doi: 10.1016/j.yclnex.2018.10.002.

Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR (2005) Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45:51-88. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857.

Hickson LTJ, Langhi Prata LGP, Bobart SA et al (2019) Senolytics decrease senescent cells in humans: Preliminary report from a clinical trial of Dasatinib plus Quercetin in individuals with diabetic kidney disease. *EBioMedicine* 47:446-456. doi: 10.1016/j.ebiom.2019.08.069.

Huang D, Ou B, Prior RL (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* 53:1841-56. doi: 10.1021/jf030723c.

Iadecola C (1993) Regulation of the cerebral microcirculation during neural activity: Is nitric oxide the missing link? *Trends Neurosci* 16: 206-214.

Jung YJ, Tweedie D, Scerba M, Greig NH (2019) Neuroinflammation as a Factor of Neurodegenerative Disease: Thalidomide Analogs as Treatments. *Front Cell Dev Biol*, 7:313. doi: 10.3389/fcell.2019.00313.

Kirkland JL, Tchkonja T (2020) Senolytic drugs: from discovery to translation. *J Intern Med* 288:518-536. doi: 10.1111/joim.13141.

Kirkwood TB (2005) Understanding the odd science of aging. *Cell* 120:437-447. doi: 10.1016/j.cell.2005.01.027.

Krzystyniak A, Wesierska M, Petrazzo G et al (2022) Combination of dasatinib and quercetin improves cognitive abilities in aged male Wistar rats, alleviates inflammation and changes hippocampal synaptic plasticity and histone H3 methylation profile. *Aging (Albany NY)* 14:572-595. doi: 10.18632/aging.203835.

Kumar A, Yegla B, Foster TC (2018) Redox Signaling in Neurotransmission and Cognition During Aging. *Antioxid Redox Signal* 28:1724-1745. doi:10.1089/ars.2017.7111.

Liu R, Liu IY, Bi X et al (2003) Reversal of age-related learning deficits and brain oxidative stress in mice with superoxide dismutase/catalase mimetics. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:8526-8531. doi: 10.1073/pnas.1332809100.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.

Lushchak VI (2014) Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact* 224:164-175. doi: 10.1016/j.cbi.2014.10.016

Mattson M, Arumugam TV (2018) Hallmarks of Brain Aging: Adaptive and Pathological Modification by Metabolic States. *Cell Metab* 27:1176-1199. doi: 10.1016/j.cmet.2018.05.011.

Misra HP, Fridovich I (1972) The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247:3170- 3175.

Moseley AE, Williams MT, Schaefer TL et al (2007) Deficiency in Na, K-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. *J Neurosci* 27:616-626. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4464-06.2007.

Petrushanko IY, Mitkevich VA, Anashkina AA et al (2016) Direct interaction of beta-amyloid with Na,K-ATPase as a putative regulator of the enzyme function. *Sci Rep* 6:27738. doi: 10.1038/srep27738.

Philbert SA, Xu J, Scholefield M, Stephanie I, Unwin RD, Cooper GJS (2022) Contrasting sodium and potassium perturbations in the hippocampus indicate potential Na⁺/K⁺-ATPase dysfunction in vascular dementia. *Front Aging Neurosci* 14:822787. doi: 10.3389/fnagi.2022.822787.

Picciotto MR, Higley MJ, Mineur YS (2012) Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron* 76:116-29. doi: 10.1016/j.neuron.2012.08.036.

Pohanka M (2014) Inhibitors of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase meet immunity. *Int J Mol Sci* 15:9809-25. doi: 10.3390/ijms15069809.

Saccon TD, Nagpal R, Yadav H et al (2021) Senolytic Combination of Dasatinib and Quercetin Alleviates Intestinal Senescence and Inflammation and Modulates the Gut Microbiome in Aged Mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 76:1895-1905. doi: 10.1093/gerona/glab002.

Serrano F, Klann E (2004) Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus. *Ageing Res Rev* 3:431-443. doi: 10.1016/j.arr.2004.05.002.

Sikora E, Bielak-Zmijewska A, Dudkowska M et al (2021) Cellular Senescence in Brain Aging. *Front Aging Neurosci*. 25; 13:646924. doi: 10.3389/fnagi.2021.646924.

Silman I, Sussman JL (2005) Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* 5:293-302. doi: 10.1016/j.coph.2005.01.014.

Simas LAW, Granzoti RO, Porsch L (2019) Estresse oxidativo e o seu impacto no envelhecimento: uma revisão bibliográfica. *Braz J Nat Sci* 2:2019. doi: 10.31415/bjns.v2i2.53.

Stefanatos R, Sanz A (2018) The role of mitochondrial ROS in the aging brain. *FEBS Lett*, 592:743-758. doi: 10.1002/1873-3468.12902.

Stuehr DJ, Nathan CF (1989) Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med* 169:1543-1555. doi: 10.1084/jem.169.5.1543.

Tan BL, Norhaizan ME, Liew WP, Sulaiman Rahman H (2018) Antioxidant and Oxidative Stress: A Mutual Interplay in Age-Related Diseases. *Front Pharmacol* 9:1162. doi: 10.3389/fphar.2018.01162.

Ionescu-Tucker A, Cotman CW (2021) Emerging roles of oxidative stress in brain aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 107:86-95. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2021.07.014.

United Nations. World Population Ageing 2019. United Nations: New York, NY, USA, 2019.

Wiley CD, Velarde MC, Lecot P et al (2016) Mitochondrial dysfunction induces senescence with a distinct secretory phenotype. *Cell Metab* 23:303-314. doi: 10.1016/j.cmet.2015.11.011.

Wyse AT, Streck EL, Barros SV et al (2007) Methylmalonate administration decreases Na⁺, K⁺-ATPase activity in cerebral cortex of rats. *NeuroReport* 11:2331-2334. <https://doi.org/10.1097/00001756-200007140-00052>.

Xu J, Wang H, Ding K (2014) Luteolin provides neuroprotection in models of traumatic brain injury via the Nrf2-ARE pathway. *Free Radic Biol Med* 71:186- 195. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.009.

Xu M, Pirtskhalava T, Farr JN et al (2018) Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nat Med* 24:1246-1256. doi: 10.1038/s41591-018-0092-9.

Yosef R, Pilpel N, Tokarsky-Amiel R et al (2016) Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nat Commun* 7:11190. doi: 10.1038/ncomms11190.

Zhang LN, Sun YJ, Pan S et al (2013) Na⁺-K⁺-ATPase, a potent neuroprotective modulator against Alzheimer disease. *Fundam Clin Pharmacol* 27:96-103. doi: 10.1111/fcp.12000.

Zhang P, Kishimoto Y, Grammatikakis I et al (2019) Senolytic therapy alleviates A β -associated oligodendrocyte progenitor cell senescence and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model. *Nat Neurosci* 22:719-728. doi: 10.1038/s41593-019-0372-9.

Zhu Y, Tchkonina T, Pirtskhalava T et al (2015) The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell* 14:644-658. doi: 10.1111/ace.12344.

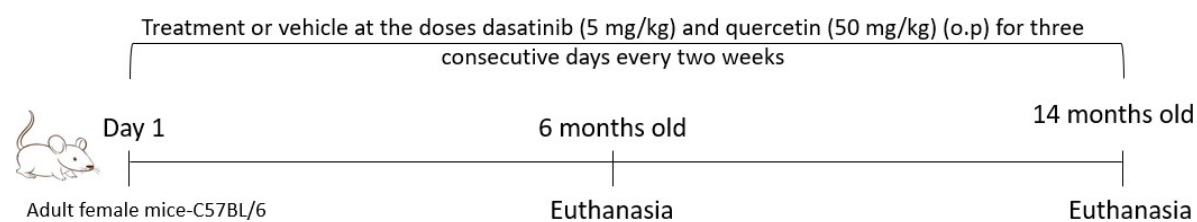


Figure 1. Experimental design of the treatment with dasatinib + quercetin.

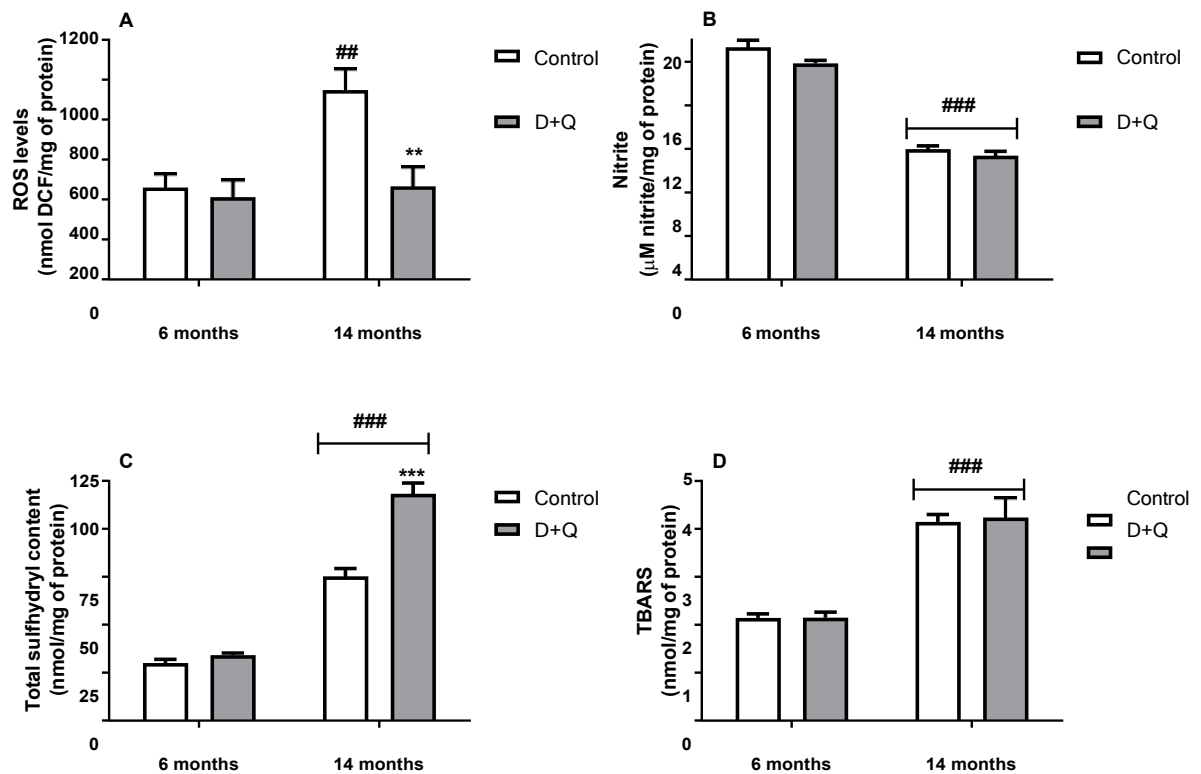


Figure 2. Effect of treatment with senolytics dasatinib (5 mg/kg) plus quercetin (50 mg/kg) (D+Q) on levels of reactive oxygen species - ROS (A), nitrites (B), total thiol - SH (C) and thiobarbituric acid reactive species -TBARS (D) content in brain of 6 and 14-month-old mice. Data are reported as mean $\pm$ S.E.M. ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$ compared with control/6 months. ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$ compared with control/14 months (n= 7-8 per group).

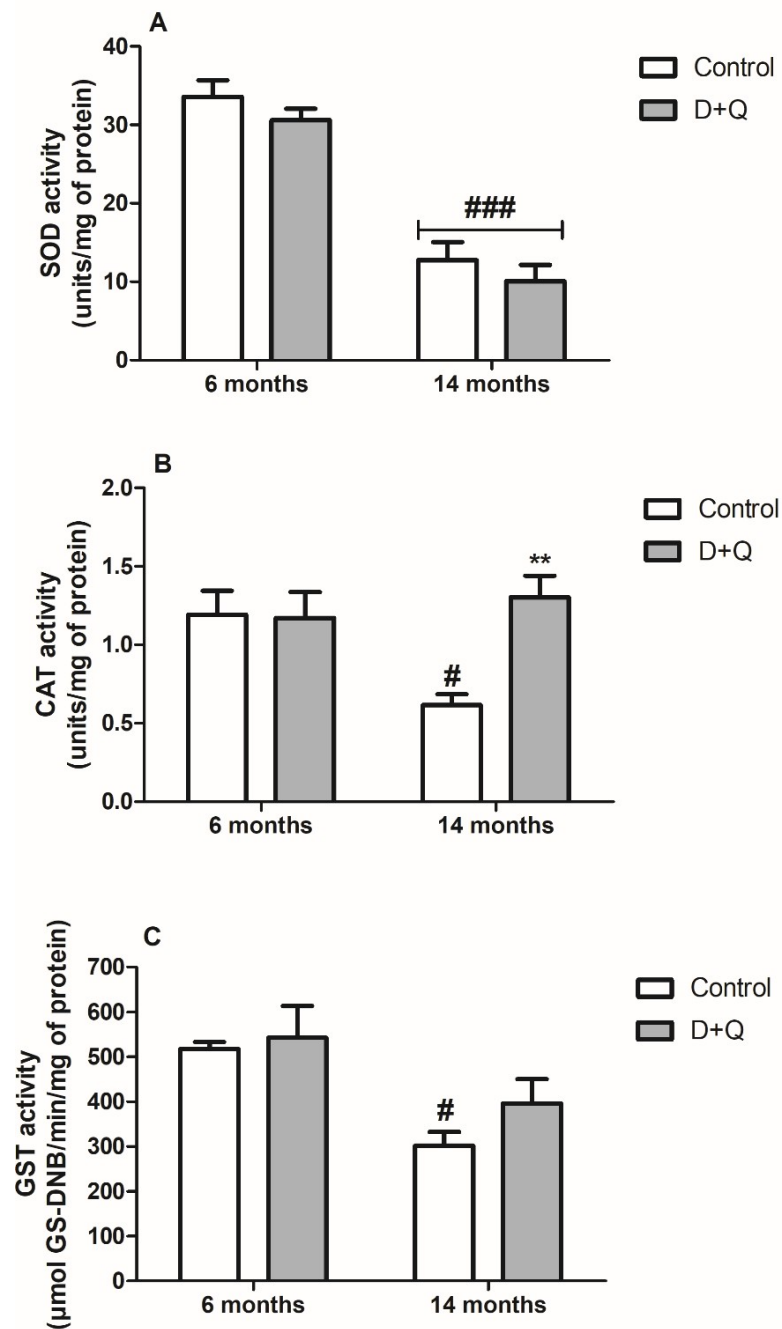


Figure 3. Effect of treatment with senolytics dasatinib (5 mg/kg) plus quercetin (50 mg/kg) (D+Q) on activities of superoxide dismutase - SOD (A), catalase - CAT (B) e glutathione S-transferase - GST (C) in brain of 6 and 14-month-old mice. Data are reported as mean $\pm$ S.E.M. # P <0.05, ### P <0.001 compared to control/6 months.

** P <0.01, *** P <0.001 compared to control/14 months (n= 5-8 per group).

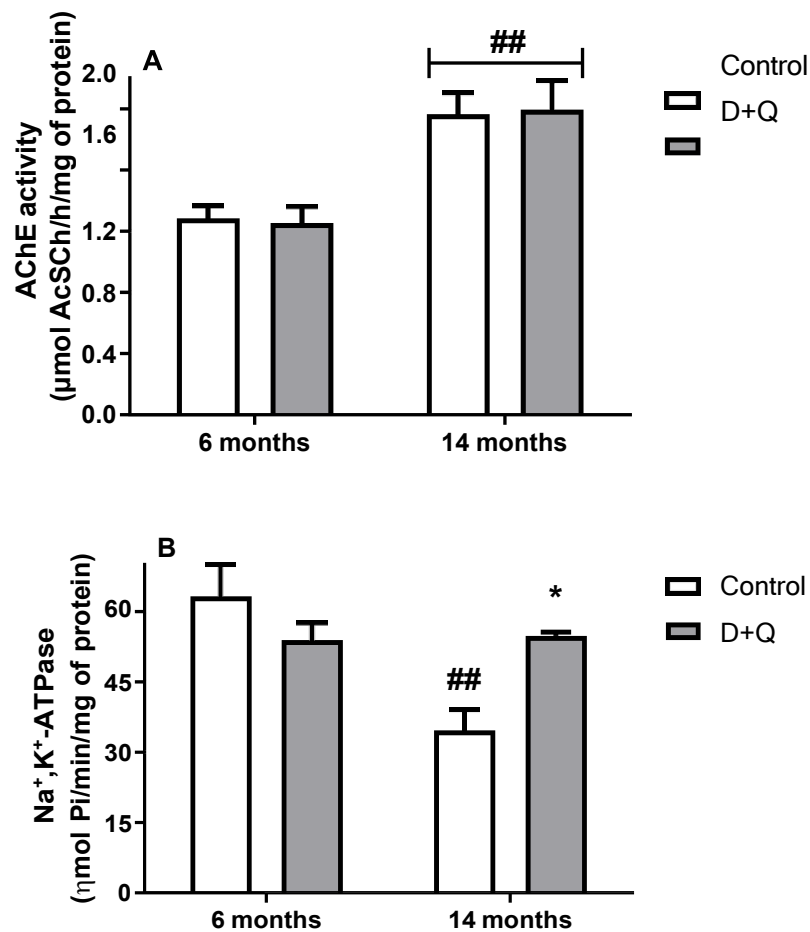


Figure 4. Effect of treatment with senolytics dasatinib (5 mg/kg) plus quercetin (50 mg/kg) (D+Q) on activities of acetylcholinesterase - AChE (A) and Na^+, K^+ -ATPase (B) in brain of 6 and 14-month-old mice. Data are reported as mean $\pm$ S.E.M. ## $P < 0.01$ compared to control/6 months. * $P < 0.05$ compared to control/14 months ($n = 4-8$ per group).

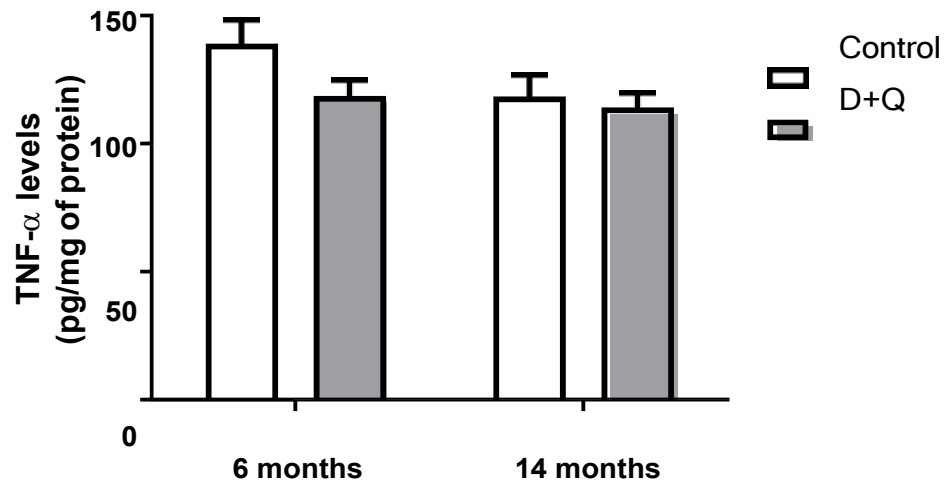


Figure 5: Effect of treatment with senolytics dasatinib (5 mg/kg) plus quercetin (50 mg/kg) (D+Q) on levels of TNF- α in brain of 6 and 14-month-old mice. Data are reported as mean $\pm$ S.E.M (n= 5-7 per group).

5. Discussão

Descobertas realizadas por Zhu e colaboradores (2015) sobre terapias senolíticas no processo de envelhecimento têm sido utilizadas como preventivas em modelos animais incluindo humanos idosos (PAEZ-RIBES et al., 2019). Sabe-se que os senolíticos são drogas que eliminam seletivamente as células senescentes, sendo assim aplicados como um complemento para eliminar as células senescentes objetivando melhorar ou manter a saúde de todos os tecidos e órgãos (KIRKLAND e TCHKONIA, 2017; Zhu et al., 2015). Sua ação ocorre inibindo as vias anti-apoptóticas superiores em células senescentes (SHORT et al., 2019), melhorando a função física e aumentando a expectativa de vida em ratos (YOUSEFZADEH et al., 2018), camundongos (XU et al., 2018) e humanos (WISLER et al., 2020; HICKSON et al., 2019; JUIZ et al., 2019).

Através dos estudos realizados com dasatinibe mais quercetina em modelos animais, percebe-se a importância desses compostos no processo de envelhecimento cerebral, em que há a presença de um menor número de células senescentes resultando em melhora da função imunológica e aumentando a expectativa de um envelhecimento mais saudável (ZHU et al., 2015; SCHAFER et al., 2017; FARR et al., 2017; OGRODNIK et al., 2017; XU et al., 2018; TAN et al., 2018; HICKSON et al., 2019; JUIZ et al., 2019; GONZALES et al., 2022).

Cabe destacar que as regiões cerebrais mais danificadas no processo de envelhecimento são o córtex pré-frontal, hipocampo e lobo temporal (WALHOVD et al., 2011; FAROKHIAN et al., 2017; PAREEK, RALLABANDI, ROY, 2018; KONFLANZ, COSTA, MENDES, 2016; CARMONA, 2018), as quais estão diretamente ligadas a alterações no desempenho de aprendizagem, memória e da função executiva (ALEXANDER et al., 2012; LEVIN et al., 2014). Também, além das alterações citadas, há modificações nos neurotransmissores e nos seus receptores e alterações bioquímicas, pois a integridade da conexão neuronal no cérebro apresenta mudanças conforme o avançar da idade (PORGES et al., 2016).

O sistema colinérgico abrange todo o processo de síntese, armazenamento, transporte e degradação da ACh no SNC onde a mesma atua

como neuromodulador nos processos comportamentais de aprendizado, cognição, atenção e memória, sendo modulada pela ação das colinesterases (SILMAN e SUSSMAN, 2005; DAS, 2007; POHANKA, 2014). Pesquisadores demonstraram um aumento na atividade da AChE em pacientes com DA (D'AMELIO, CAVALLUCCI, CECCONI, 2007; POHANKA, 2014), o que corrobora com nossos achados uma vez que foi observado um aumento na atividade dessa enzima nos animais de 14 meses em comparação com os de 6 meses. No entanto, estudo realizado em ratos idosos (24 meses) em comparação com animais mais jovens (3 meses) de várias linhagens revelou uma redução da colinesterase total no hipocampo, córtex cerebral e estriado (MENEGUZ, BISSO, MICHALEK, 1992). Outro estudo realizado por Janeczke et al. (2018) mostrou que cérebros de idosos cognitivamente normais apresentaram uma redução dos neurônios piramidais corticais positivos para AChE em comparação com os de adultos jovens (JANECZEK et al., 2018).

Alterações na atividade da Na^+ , K^+ -ATPase estão relacionadas aos distúrbios neurodegenerativos (ZHANG et al., 2013). Em estudo com pacientes com DA e em modelos animais percebe-se uma redução na expressão dessa enzima no tecido cerebral (CHAUHAN et al., 1997; FU et al., 2009). De fato, a redução da atividade da Na^+ , K^+ -ATPase prejudica a transmissão e a plasticidade sináptica, além do processo de memória e aprendizado (MOSELEY et al., 2007; ZHANG et al., 2013; PETRUSHANKO et al., 2016, WAUGH et al., 2019). Em nosso estudo, a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase foi diminuída com o envelhecimento e o tratamento com senolíticos foi capaz de restaurar a atividade enzimática. No envelhecimento, a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase reduz significativamente, assim como a diminuição do conteúdo de fosfatidilcolina, que em parte, pode ser responsável pela redução da atividade enzimática devido à alteração do microambiente lipídico (TANAKA, ANDO, 1992; ARNAIZ e ORDIERES, 2014).

Com relação à inflamação, sabe-se que o $\text{TNF-}\alpha$ desempenha um papel central na iniciação e manutenção da resposta inflamatória, podendo apresentar efeitos homeostáticos ou fisiopatológicos (PROBERT, 2015; STEELAND e VANDENBROUCKE, 2019). Em condições patológicas, o excesso de $\text{TNF-}\alpha$ liberado pela micróglia leva a uma inflamação crônica que consequentemente evoluiu para um déficit cognitivo e disfunção física (OLMOS

e LLADÓ, 2014; JUNG et al., 2019). Neste contexto, em pacientes com DA, os níveis de TNF- α encontram-se elevados no líquido cefalorraquidiano e no plasma (STEELAND et al., 2018). Entretanto, em nosso estudo não foi observada alteração nos níveis dessa citocina com o envelhecimento, o que pode ter ocorrido pois os camundongos utilizados eram saudáveis e relativamente jovens. Ainda, pode-se especular que a neuroinflamação de baixo grau que ocorre no processo de envelhecimento não pode ser detectado pelos testes avaliados no presente estudo.

As ERO são metabólitos essenciais que aumentam progressivamente ao longo da vida, no entanto, seu acúmulo pode ser tóxico para o SNC (TUCKER e COTMAN, 2021), danificando as células desse sistema (ANSARI e SCHEFF, 2010; STEFANATOS e SANZ, 2018; SIMAS, GRANZOTI, PORSCH, 2019). De acordo com estudos, o aumento das ERO é um dos mecanismos que causa o envelhecimento cerebral (cognitivo e doenças neurodegenerativas) (XU, WANG, DING, 2014; LUSHCHAK, 2014; TAN et al., 2018; TUCKER e COTMAN, 2021). Neste sentido, pesquisadores observaram a presença de níveis mais elevados de ERO em animais idosos (SOHAL et al., 1994; LIU et al., 2003; SERRANO e KLANN, 2004), corroborando com os achados do presente estudo onde um aumento foi demonstrado em animais de 14 meses em relação aos de 6 meses. Ainda, o tratamento com dasatinibe mais quercetina foi capaz de proteger contra o aumento das ERO demonstrado no cérebro de animais idosos em relação aos camundongos adultos.

O aumento de ERO em animais idosos pode ser devido a disfunção mitocondrial, irregularidade dos cromossomos, reparo deficiente do DNA, encurtamento dos telômeros, perda de proteostase e alterações epigenéticas, senescência celular (LOPEZ-OTIN et al., 2013). Além disso, o aumento da enzima NOS que sintetiza NO ocorre em inúmeras condições patológicas, como isquemia, inflamação e nas doenças neurodegenerativas (LIU, LIANG, SOONG, 2019; TEWARI et al., 2021). No entanto, em nosso estudo houve redução dos níveis de nitritos, metabólitos de degradação do NO, nos animais mais velhos não tratados em comparação com os animais de 6 meses de idade.

O NO em condições fisiológicas atua como um vasodilatador, portanto sua redução prejudicaria o transporte de sangue no corpo através das artérias

e arteríolas, prejudicando a oxigenação cerebral e causando comprometimento da memória e aprendizado (IADECOLA, 1993; BOHME et al., 1993). Recentemente, um estudo sugeriu que a elevação da atividade da NOS poderia ser um mecanismo compensatório para restaurar as alterações sinápticas que ocorrem na DA pré-sintomática, como mostrado no modelo de camundongo transgênico (CHAKROBOTTY et al., 2015). Nessescamundongos, o bloqueio do NO desencadeou uma depressão sináptica, sugerindo que o aumento é necessário para manter a plasticidade sináptica, essencial para a formação da memória.

O dano relacionado à idade desencadeia vias de resposta ao estresse que dependem da sinalização redox produzindo H_2O_2 direta ou indiretamente através do oxigênio, levando a um acúmulo dessa espécie reativa e à peroxidação lipídica (HEKIMI, LAPOINTE, WEN, 2011; VANE e DANSEN, 2020). Assim, resultando em necrose e morte celular por apoptose das células neuronais (SINGH et al., 2019; BECKMAN e AMES, 1998; MARIANI et al., 2005). No presente estudo observou-se um aumento da peroxidação lipídica no cérebro de animais de 14 meses e o tratamento com dasatinibe mais quercetina não foi capaz de proteger contra essa alteração. Um estudo com ratos idosos e ratos deficientes de vitamina E mostrou que os animais deficientes desta vitamina apresentaram níveis mais elevados de TBARS, hidroperóxidos lipídicos e carbonilas proteicas nas membranas sinápticas (FUKUI et al., 2001).

Em relação ao conteúdo total de tiol, houve um aumento no cérebro dos animais de 14 meses em relação aos de 6 meses, o que pode estar ocorrendo como um mecanismo de compensação do próprio cérebro para tentar reverter o dano oxidativo. Ainda, o tratamento com dasatinibe mais quercetina foi capaz de aumentar os níveis do conteúdo tiólico nos animais de 14 meses. A regulação do equilíbrio redox é importante para múltiplos processos metabólicos, de sinalização e de transcrição em células de mamíferos. Grupos tiois de proteínas ou pequenas moléculas são altamente reativos e suscetíveis à oxidação o que pode causar perda significativa de atividade biológica. Desta forma, alterações no estado redox das proteínas têm sido relacionadas na patogênese de várias doenças neurológicas e no processo de envelhecimento (HALLIWELL et al., 2004; HUANG e PRIOR, 2005).

Sabe-se que em condições fisiológicas, os níveis de ERO são regulados na célula pelas enzimas antioxidantes endógenas, como CAT, SOD e GPx, bem como por antioxidantes exógenos, como polifenóis, vitaminas e minerais (RAHAL et al., 2014; MA e HE, 2012) compensando o estresse oxidativo, assim realizando uma remoção nas células senescentes (DINKOVA-KOSTOVA e TALALAY, 2010). Nos animais mais idosos estas enzimas estão reduzidas devido à produção excessiva de ERO (DRINGEN, PAWLOWSKI, HIRRLINGER, 2005; ROUGEMONT, DO KQ, CASTAGNE, 2002; SULTANA et al., 2008), o que corrobora com nosso estudo pois observamos uma diminuição na atividade da SOD e CAT no cérebro de animais de 14 meses. O tratamento com senolíticos foi capaz de restaurar apenas a atividade da CAT. Sabe-se que os polifenóis aumentam a expressão de enzimas antioxidantes como a CAT (GOMES, SILVA, OLIVEIRA, 2012), o que em parte poderia explicar o efeito mediado pelo tratamento com dasatinibe mais quercetina nos animais mais velhos.

A GST é uma enzima que apresenta funções importantes no sistema de detoxicação celular, protegendo a célula dos metabólitos reativos do oxigênio e contribuindo para a biotransformação de carcinógenos e xenobióticos (HAYES et al., 2005; da FONSECA et al., 2010). Em nosso estudo foi observada uma redução na atividade dessa enzima com o envelhecimento, o que está de acordo com estudos prévios demonstrando que a expressão reduzida da GST está associada ao envelhecimento cerebral, neurodegeneração e comprometimento da memória (BJORK et al., 2006; DASARI et al., 2018).

Dados da literatura demonstram que a quercetina apresenta muitos efeitos benéficos no cérebro idoso devido a sua capacidade antioxidante e anti-inflamatória (CHEIN, 2006; BOTAS, HAENEN, BAST, 2008; LIAO et al., 2018; XU et al., 2019). Isso se deve a vários fatores como à presença de grupos hidroxila fenólicos que são acessíveis a agentes oxidantes (HAQ e ALIAMRO, 2019; GANESH PURKAR, 2017) e a ativação do elemento responsivo antioxidante do fator 2 relacionado ao Nrf2-ARE que oferece um efeito neuroprotetor contra morte celular e lesão oxidativa (ZHU et al., 2014; KIRKLAND e TCHKONIA, 2020). O dasatinibe apresenta a capacidade de inibir a tirosina cinase, atravessar a barreira hematoencefálica e executar efeitos

neuroprotetores em modelos de DA (WANG, 1995; JURK et al., 2014; FARR et al., 2016).

De acordo com nosso estudo a redução das enzimas antioxidantes, o aumento da peroxidação lipídica e o aumento dos níveis de ERO são fatores que culminam no aumento do estresse oxidativo. No entanto o uso dos compostos senolíticos dasatinibe + quercetina nos animais mais velhos, na maioria dos casos, conseguiu reverter estas alterações, assim podendo trazer benefícios em modelos de animais de doenças relacionadas ao envelhecimento.

6. Conclusão

Com o envelhecimento, o cérebro se torna mais suscetível às degenerações principalmente porque a produção de antioxidantes vai sendo reduzida gradualmente e assim observando um aumento na produção de radicais livres e do estresse oxidativo. De acordo com nosso estudo conclui-se que o tratamento com os senolíticos dasatinibe mais quercetina é de extrema importância a fim de retardar o envelhecimento, assim como as doenças associadas a esse processo. Os senolíticos dasatinibe mais quercetina modularam o *status* redox e a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase, o que poderia contribuir para reduzir os efeitos negativos causados pelo envelhecimento no cérebro.

Nesse cenário, estudos acerca da investigação dos processos fisiológicos envolvidos no envelhecimento, bem como a busca por alternativas terapêuticas que visem uma melhor qualidade de vida aos idosos são de grande relevância. Embora existam estudos pré-clínicos mostrando o efeito positivo dessas substâncias na redução de alterações encontradas no processo de envelhecimento, as pesquisas sobre os benefícios ao SNC ainda são escassas.

REFERÊNCIAS

- ABHARZANJANI, F., AFSHAR, M., HEMMATI, M., MOOSSAVI, M. Short-term high dose of quercetin and resveratrol alters aging markers in human kidney cells. *International Journal of Preventive Medicine*, v. 8, p. 64, 2017.
- ACOSTA, J.C., O'LOGHLEN, A., BANITO, A., GUIJARRO, M.V., AUGERT, A., RAGUZ, S., FUMAGALLI, M., DA COSTA, M., BROWN, C., POPOV, N. Chemokine Signaling via the CXCR2 Receptor Reinforces Senescence. *Cell*, v. 133, p.1006-1018, 2008.
- ADKINS, A.G., ESTEBAN, G.R., MEREU, E., LAGO, M.M., JAITIN, D.A., VILLANUEVA, A., VIDAL, A., MARTI, A.M., FELIP, E., VIVANCOS, A., SHAUL, H.K., HEATH, S., GUT, M., AMIT, I., GUT, I., HEYN, H. Single-cell transcriptome conservation in cryopreserved cells and tissues. *Genome Biology*, v. 18, n.1, p. 45, 2017.
- ALBERS, R.W., SIEGEL, G.J. Membrane transport. *Basic neurochemistry*, p.40-62, 2012.
- ARNAIZ, G. R. L.; ORDIERES, M. G. L. Brain Na⁺, K⁺-ATPase activity in aging and disease. *International Journal of Biomedical Science*, v. 10, n. 2, p. 85-102, 2014.
- AYALA, A., MUÑOZ, M.F., ARGÜELLES, S. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 201, p. 31, 2014.
- BARJA, G. Free radicals and aging. *Trends in Neurosciences*, v. 27, n. 10, p. 595-600, 2004.
- BASSTY, N., ABHIJIT, C., JEON, O.H., KUEHNEMANN, C., PAYNE, T., RAO, C, HOLTZ, A., SHAH, S., SHARMA, V., FERRUCCI, L., CAMPISI, J., SCHILLING, B. A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development. *ECollection*, v. 18, n. 1, 2020.
- BABIC, T. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal Neurol, Neurosurg Psychiatry*, v. 67, n. 4, p. 558, 1999.
- BAKER, D.J; PETERSEN, R.C. Cellular senescence in brain aging and neurodegenerative diseases: evidence and perspectives *Journal of Clinical Investigation*, v. 128, p. 1208-1216, 2018.
- BAKER, D.J., WIJSHAKE, T., TCHKONIA, T., LEBRASSEUR, N.K, CHILDS, B.G, VAN DE SLUIS, B., KIRKLAND, J.L, VAN DEURSEN, J.M. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*, v. 479, p. 232-236, 2011.
- BAKER, D.J., CHILDS, B.G., DURIK, M., WIJERS, M.E, SIEBEN, C.J., ZHONG, J., SALTNESS, R.A., JEGANATHAN, K.B., VERZOSA, G.C.,

PEZESHKI, A. Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature*, v. 530, p. 184-189, 2016.

BAIERLE, M., NASCIMENTO, S.N., MORO, A.M., BRUCKER, N., FREITAS, F., GAUER, B., DURGANTE, J., BORDIGNON, S., ZIBETTI, M., TRENTINI, C.M., DUARTE, M.M.M.F., GRUNE, T. Relationship between Inflammation and Oxidative Stress and Cognitive Decline in the Institutionalized Elderly. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015.

BELARBI, K., JOPSON, T., TWEEDIE, D., ARELLANO, C., LUO, W., GREIG, N.H., ROSI, S. TNF- α protein synthesis inhibitor restores neuronal function and reverses cognitive deficits induced by chronic neuroinflammation. *Journal of Neuroinflammation*, v. 9, n. 23, 2012.

BEHESHTI, S., AGHAIE, R. Therapeutic effect of frankincense in a mouse model of Alzheimer's disease. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, v. 6, n. 4, p. 468 – 475, 2016.

BONDA, D.J., STONE, J.G., TORRES, S.L., SIEDLAK, S., PERRY, J., SMITH, M.A., KRISCIO, R., JICHA, G., CASADESUS, G., ZHU, X., LEE, H.G. Dysregulation of leptin signaling in Alzheimer disease: evidence for neuronal leptin resistance. *Journal of Neurochemistry*, v. 128, n. 1, p.162-72, 2014.

BORODKINA, A.V., DERYABIN, P.I., GIUKOVA, A.A., NIKOLSKY, N.N. Social Life” of Senescent Cells: What Is SASP and Why Study It?. *Acta Naturae*, v. 10, n. 1, p. 4-14, 2018.

BREDT, D.S., HWANG, P.M., GLATT, C.E., LOEENSTEIN, C., REED, R.R., & SNYDER, S.H. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*, v.351, p. 714-718, 1991.

BUTTERFIELD, DA., HALLIWELL, B. Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. *Nature Review Neuroscience*, v. 20, n. 3, p.148-160, 2019. doi: 10.1038/s41583-019-0132-6.

BURCUL, F., GENERALIC MEKINIC, M., RADAN, P., ROLLIN, I., BLAZEVIC. Isothiocyanates: cholinesterase inhibitory, antioxidant and anti-inflammatory activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, v.33, n.1, p. 577 – 582, 2018.

CAMPISI, J., d'ADDA DI FAGAGNA, F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 8, p. 729-740, 2007.

CAMPISI, J. Cellular senescence: putting the paradoxes in perspective. *Current Opinion Genetics Development*, v. 21 n. 1, p. 107-112, 2011.

CARDONA, A.E., PIORO, E.P., SASSE, M.E, KOSTENKO, V., CARDONA, S.M., DIJKSTRA, I.M., HUANG, D., KIDD, G., DOMBROWSKI, S., DUTTA, R.J., LEE, J.C., COOK, D.N., JUNG, S., LIRA, S.A., LITTMAN, D.R.,

RANSOHOFF, R.M. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nature Neuroscience*, v. 9, p. 917-924, 2006.

CHACHLAKI, K., GARTHWAITE, J., & PREVOT, V. The gentle art of saying NO: How nitric oxide gets things done in the hypothalamus. *Nature Reviews. Endocrinology*, v.13, p. 521-535, 2017.

CHAKROBORTY, S., KIM, J., SCHNEIDER, C., WEST, A.R., STUTZMANN, G.E. Nitric oxide signaling is recruited as a compensatory mechanism for sustaining synaptic plasticity in Alzheimer's disease mice. *Journal of Neuroscience*, v. 35, n. 17, p. 6893-6902, 2015.

CHANDRASEKARAN, A., IDELCHIK, M.P.S., MELENDEZ, J.A. Redox control of senescence and age-related disease. *Redox Biology*, v.11, p. 91-102, 2017.

CHAUHAN, N.B., LEE, J.M., SIEGEL, G.J. Na,K-ATPase mRNA levels and plaque load in Alzheimer's disease. *Journal of Molecular Neuroscience*, v. 9, n. 3, p. 151-66, 1997.

CHOI, SD., WANIA, F. On the reversibility of environmental contamination with persistent organic pollutants. *American chemical society publications*, v. 45, n. 20, p. 8834-41, 2011.

CHOLET, N., PELLERIN, L., MAGISTRETTI, P.J., HAMEL, E. Similar perisynaptic glial localization for the alpha 2 subunit Na⁺, K⁺-ATPase and the glutamate transporters GLAST and GLT-1 in the rat somatosensory cortex. *Brain Cortex*, v.12, p. 515-525, 2002.

CHOW, D.C, FORTE, J.G. Functional significance of the beta subunit for heterodimeric P-type ATPases. *Journal of Experimental Biology*, v. 198, p. 1-17, 1995.

CHEN, P-Y., LIU, Y-M., CHEN, M-L. The Effect of Hypnosis on Anxiety in Patients With Cancer: A Meta-Analys. *Worldview on evidence based nursing*, v. 14, n. 3, p. 223-236, 2017.

CHEN, W.W., ZHANG, X., HUANG, W.J. Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Molecular Medicine*, v. 13, p. 3391-3396, 2016.

CHIURCHIU, V., MACARRONE, M. Chronic inflammatory disorders and their redox control: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*, v. 15, n. 9, p. 2605-41, 2011.

COHADON, F., DESBORDES, P. Brain water and aging. *Gerontology*, v. 32, p. 46-49, 1986.

COPPE, J.P., DESPREZ, P.Y., KRTOLICA, A., CAMPISI, J. The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annual review Pathology*, v. 5, p. 99-118, 2010.

CUOLLO, L., ANTONANGELI, F., SANTONI, A., SORIANI, A. The Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP) in the Challenging Future of Cancer Therapy and Age-Related Diseases. *Biology*, v. 9, n. 485, 2020.

DA FONSECA, R.R., JOHNSON, W.E., O'BRIEN, S.J., VASCONCELOS, V., ANTUNES, A. Molecular evolution and the role of oxidative stress in the expansion and functional diversification of cytosolic glutathione transferases. *BMC Evolutionary Biology*, v. 10, n. 1, p. 281, 2010.

DAS, J., CHEN, P., NORRIS, D., PADMANABHA, R., LIN, J., MOQUIN, R.V., SHEN, Z., COOK, L.S., DOWEYKO, A.M., PITT, S., PANG, S., SHEN, D.R., FANG, Q.F., FEX, H.F., MCINTYRE, K.W., SHUSTER, D.J., GILLOOLY, K.M., BEHNIA, K., SCHIEVEN, G.L., WITYAK, J., BARRISH, J.C. 2-Aminothiazole as a Novel Kinase Inhibitor Template. Structure-Activity Relationship Studies toward the Discovery of *N*-(2-Chloro-6-methylphenyl)-2-[[6-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]]-2-methyl-4-pyrimidinyl]amino]-1,3-thiazole-5-carboxamide (Dasatinib, BMS-354825) as a Potent *pan*-Src Kinase Inhibitor. *Journal of Medicine Chemistry*, v. 49, n.23, p. 6819-32, 2006.

DADA L.A., CHANDEL, N.S., RIDGE, K.M., PEDEMONTE, C., BERTORELLO, A.M., SZNAJDER, J.I. Hypoxia induced endocytosis of Na^+ , K^+ -ATPASE in alveolar epithelial cells is mediated by mitochondrial reactive oxygen species and PKC-zeta. *Journal of Clinical Investigation*, v. 7, n. 111, p. 1057-1060, 2003.

DE FERRARI, G.V., CANALES, M.A., SHIN, I., WEINER, L.M, SILMAN, I., INESTROSA, N.C. Structural motif of acetylcholinesterase that promotes the formation of amyloid beta-peptide fibrils. *Biochemistry*, v. 40, p. 10447-10457, 2001.

DE LA FUENTE, M. Role of the immune system in aging. *Immunology*, v. 27, n. 4, p. 176-191, 2008.

DEPP, C.A.; JESTE, D.V. Definitions and Predictors of Successful Aging: A Comprehensive Review of Larger Quantitative Studies. *The American Journal of Geriatric Psychiatry*, v. 14, n. 1, p. 6-20, 2006.

EAKLE, K.A., KABALIN, M.A., WANG, S.G., FARLEY, R.A. The influence of beta subunit structure on the stability of Na^+/K^+ -ATPase complexes and interaction with K^+ . *Journal of Biology Chemistry*, v. 269, p. 6550-6557, 1994.

FAFIAN-LABORA, J.A., O'LOGHLEN, A. Classical and Nonclassical Intercellular Communication in Senescence and Ageing. *Trends in Cell Biology*, v. 30, p. 628-639, 2020.

FEI, F., YU, Y., SCHMITT, A., ROJEWSKI, M.T., CHEN, B., GOTZ, M., DOHNER, H., BUNJES, D., SCHMITT, M. Dasatinib inhibits the proliferation and function of $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ regulatory T cells. *Journal of Haematology*, v. 144, p. 195-205, 2009.

FRANCESCHI, C., CAPRI, M., MONTI, D., GIUNTA, S., OLIVEIRA, F., SEVINI, F., PANOURGIA, M.P., INDIA, L., CELANI, L., SCURTI, M., CEVENINI, E., CASTELLANI, G.C., SALVIOLO, S. Inflammaging and anti-inflammaging: A systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 128, n. 92, p.105, 2007.

FRANK-CANNON, T., CRANK-CANNON, T.C., ALTO, L.T., MCALPINE, F.E., TANSEY, M.G. Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases?. *Molecular Neurodegeneration*, v. 4, n. 47, 2009.

FRANCISCO, P.T. The interplay of neurotransmitters in Alzheimer's disease. *International journal of neuropsychiatric medicine*, v. 10, p. 6-9, 2005.

FRANCESCHI, C., BONAFA, M., VALENSIN, S., OLIVIERI, F., DE LUCA, M., OTTAVIANI, E., DE BENEDICTIS, G. Inflamm-aging: An evolutionary perspective on immunosenescence. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 908, p. 244-254, 2000.

FULLERTON, J.N., GILROY, D.W. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 15, p. 551-567, 2016.

GEMMA, C., VILA, F., BACHSTETTER, A., BICKFORD, P.C. Oxidative Stress and the Aging Brain: From Theory to Prevention. n: Riddle DR, editor. *Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms*, n. 15, 2007.

GEMS, D., PARTRIDGE, L. Genetics of longevity in model organisms: debates and paradigm shifts. *Annual Review of Physiology*, v. 75, p. 621-644, 2013.

GIACOBINI, E. (2004). Cholinesterase inhibitors: New roles and therapeutic alternatives. *Pharmacological Research*, v. 50, p. 433- 440, 2004.

GROSS, A.L., WALKER, K.A., MOGHEKAR, A.R., PETTIGREW, C., SOLDAN, A., ALBERT, M.S., WALSTON, J.D. Plasma Markers of Inflammation Linked to Clinical Progression and Decline During Preclinical AD. *Frontiers Aging Neuroscience*, v. 11, n. 229, 2019.

GRIMM, A., ECKERT, A. Brain aging and neurodegeneration: from a mitochondrial point of view. *Journal of Neurochemistry*, v.143, n. 4, p. 418-431, 2017.

HAYES, J.D., FLANAGAN, J.U., JOWSEY, I.R. Glutathione transferases. *Annual Review Pharmacology and Toxicology*, v. 45, p. 51-88, 2005.

HAYES, J.D., MCLELLAN, L.I. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radical Research*, v. 31, n. 4, p. 273-300, 1999.

HARMAN, D. Role of free radicals in aging and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 673, n. 174, p. 126-141, 1992.

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

HEKIM, C., LLANDER, M., YAN, J., MICHAUD, E., SMYKLA, R., VAHA-KOSKELA, M., SAVOLA, P., TAHTINEN, S., SAIKKO, L., HEMMINKI, A., KOVANEN, P.E., PORKKA, K., LEE, F.Y., MUSTJOKI, S. Dasatinib Changes Immune Cell Profiles Concomitant with Reduced Tumor Growth in Several Murine Solid Tumor Models. *Cancer Immunol Research*, v. 5, p. 157-169, 2017.

HERNANDEZ-SEGURA, A., de JONG, T.V., MELOV, S., GURYEY, V., CAMPISI, J., DEMARIA, M. Unmasking Transcriptional Heterogeneity in Senescent Cells. *Current Biology*, v. 27, p. 2652-2660, 2017.

HERRANZ, N., GIL, J. Mechanisms and functions of cellular senescence. *Journal Clinical Investigation*, v.128, p. 1238-1246, 2018.

HELM, E.V.D., YAO, J., DUTT, SHUBIR, RAO, V., SALESTIN, J.M., WALKER, M.P. REM sleep depotentiates amygdala activity to previous emotional experiences. *Current Biology*, v. 21, n. 23, p. 2029-32, 2011.

HERNANDEZ-SEGURA, A., NEHME, J., DEMARIA, M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol*, v. 28, p. 436-453, 2018.

HICKSON, L.J., PRATA, L.G.P.L., BOBART, S.A., EVANS, T.K., GIORGADZE, N., HASHMI, S.K., HERRMANN, S.M., JENSEN, M.D., JIA, Q., JORDAN, K.L., KELLOGG, T.A., KHOSLA, S., KOERBER, D.M., LAGNADO, A.B., LAWSON, D.K., LEBRASSEUR, N.K., LERMAN, L.O., MCDONALD, K.M., MCKENZIE, T.J., PASSOS, J.F., PIGNOLO, R.J., PIRTSKHALAVA, T., SAADIG, I.M., SCHAEFER, K.K., TEXTOR, S.C., VICTORELLI, S.G., VOLKMAN, T.L., XUE, A., WENTWORTH, M.A., GERDES, E.O.W., ZHU, Y., TCHKONIA, T., KIRKLAND, J.L . Senolytics decrease senescent cells in humans: Preliminary report from a clinical trial of Dasatinib plus Quercetin in individuals with diabetic kidney disease. *EBioMedicine*, v. 47, p. 446-456, 2019.

IBGE. Projeção da População 2018: número de habitantes do país deve parar de crescer em 2047. Agência IBGE notícias. 2018.
<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/21837-projecao-da-populacao-2018-numero-de-habitantes-do-pais-deve-parar-de-crescer-em-2047>. Acesso em 19 de outubro de 2022.

IGNARRO, L.J., BYRNS, R.E., BUGA, G.M., & WOOD, K.S. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circulation Research*, v.61, p. 866-879, 1987.

JANECZEK, M., GEFEN, T., SAMIMI, M., KIM, G., WEINTRAUB, S., BIGIO, E., ROGALSKI, E., MESULAM, M.M., GEULA, C. Variations in acetylcholinesterase Activity within Human Cortical Pyramidal Neurons Across Age and Cognitive Trajectories. *Brain cortex*, v. 28, n. 4, p.1329-1337, 2018.

JUNG, Y.J., TWEEDIE, D., SCERBA, M.T., GREIG, N.H. Neuroinflammation as a Factor of Neurodegenerative Disease: Thalidomide Analogs as Treatments. *Front Cell Developmental Biology*, v. 7, n. 313, 2019.

JUIZ, J.N., NAMBIAR, A.M., TCHKONIA, T., LeBRASSEUR, N.K., PASCUAL, R., HASHMI, S.K. Senolytics in idiopathic pulmonary fibrosis: Results from a first-in-human, open-label, pilot study. *EBioMedicine*, v. 40, p. 554-63, 2019.

KANTAJIAN, H., JABBOUR, E., GRIMLEY, J, KIRKPATRICK, P. Dasatinib. *Nature Review Drug Discovery*, v. 5, n. 9, p. 717-8, 2006.

KENNEDY, B.K., BERGER, S.L., BRUNET, A., CAMPISI, J., CUERVO, A.M., EPEL, E.S., FRANCESCHI, C., LITHGOW, G.J., MORIMOTO, R.I., PESSIN, J.E. Geroscience: Linking Aging to Chronic Disease. *Cell*, v. 159, p. 709-713, 2014.

KHOSLA, S., FARR, J.N., TCHKONIA, T., KIRKLAND, J.L. The role of cellular senescence in ageing and endocrine disease. *Nature Review Endocrinology*, v.16, p. 263-275, 2020.

KIRKLAND, J.L; TCHKONIA, T. Cellular senescence: A translational perspective. *EBioMedicine*, v. 21, p. 21-28, 2017.

KIRKWOOD, T.B. Understanding the odd science of aging. *Cell*, v. 120, p. 437-447, 2005.

KIM, J.K., PARK, S.U. Quercetin and its role in biological functions: na updated review. *Experimental and Clinical Sciences Journal*, v. 17, n. 856, 2018.

KIRKLAND, J.L., TCHKONIA, T. Senolytic drugs: from discovery to translation. *Journal of Internal Medicine*, v. 288, n. 5, p. 518-36, 2020.

KOCAK, H., ONER, P., OZTAS, B. Comparison of Na(+), K(+)-ATPase activities in rat brains at different ages. *Gerontology*, v. 48, p. 279-281, 2002.

KRISHNAMURTHY, J., TORRICE, C., RAMSEY, M.R., KOVALEV, G.I., REGAIEY, K.A., SU, L., SHARPLESS, N.E . Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *Journal Clinical Investigation*, v. 114, p. 1299-307, 2004.

LAWRENCE, M., PERRY, S.G., HARRIS, P.L.R., LIU, Y., KATHRYN, A., SCHUBERT MARK, A. S. In situ oxidative catalysis by neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer's disease: a central role for bound transition metals. *Journal of neurochemistry*, v. 74, n. 1, p. 270-9, 2000.

LEHNER, K.R., SILVERMAN, H.A., ADDORISIO, M.E., ROY, A., AL-NAIZI, M.A., LEVINE, Y., OLOFSSON, P.S., CHAVAN, S.S., GROS, R., NATHANSON, N.M., AL-ABED, Y., METZ, C.N , PRADO, V.F., PRADO, M.A.M , TRACEY, K.J., PAVLOV, V.A. Forebrain cholinergic signaling regulates innate imune responses and inflammation. *Frontiers in Immunology*, v. 10, n. 585, 2019.

- LIU, L. et al. Characterization and biodistribution in vivo of quercetin-loaded cationic nanostructured lipid carriers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 115, p. 125- 131, 2014.
- LOPEZ-OTIN, C., BLASCO, M.A., PARTRIDGE, L., SERRANO, M., KROEMER, G. The Hallmarks of Aging. *Cell*, v. 153, p. 1194-1217, 2013.
- LUPO, G., GAETASANI, S., CACCI, E., BIAGIONI, S., NEGRI, R. Molecular signatures of the aging brain: finding the links between genes and phenotypes. *Neurotherapeutics*, v. 16, p. 543-553, 2019.
- LUTSENKO, S., KAPLAN, J.H. Um papel essencial para o domínio extracelular da subunidade beta Na,K-ATPase na oclusão de cátions. *Bioquímica*, v. 32, p. 6737-6743, 1993.
- LUSHCHAK, V. Classification of oxidative stress based on its intensity. *Experimental and Clinical Sciences Journal*, v. 13, p. 922-937, 2014.
- MANDAL, P.K., TRIPATHI, M., SUGUNAN, S. Brain oxidative stress: detection and mapping of anti-oxidant marker „glutathione“ in different brain regions of healthy male/female, MCI and Alzheimer patients using non-invasive magnetic resonance spectroscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 417, n. 1, p. 43-48, 2012.
- MANDAL, P.K., SAHARAN, S., TRIPATHI, M., MURARI, G. Brain glutathione levels- A novel biomarker for mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Biology Psychiatry*, v. 78, n. 10, p.702-710, 2015.
- MASIELLO, D., GOROSPE, G., YANG, A.S. The occurrence and management of fluid retention associated with TKI therapy in CML, with a focus on dasatinib. *Journal Hematology Oncology*, v. 2, p. 46, 2009.
- MATTSON, M; ARUMUGAM, T.V. Features of brain aging: adaptive and pathological modification by metabolic states. *Cell Metabolism*, v. 27, p. 1176-1199, 2018.
- MARCOS-PEREZ, D., SANCHEZ-FLORES, M., PROIETTI, S., BONASSI, S., COSTA, S., TEIXEIRA, J.P., FERNANDEZ-TAJES, J., PASARO, E., LAFFON, B., VALDIGLESIAS, V. Association of inflammatory mediators with frailty status in older adults: Results from a systematic review and meta-analysis. *GeroScience*, v. 42, p. 1451-1473, 2020.
- MECOCCI, P., BOCCARDI, V., CECCHETTI, R., BASTIANI, P., SCAMOSCI, M., RUGGIERO, C., BARONI, M. A Long Journey into Aging, Brain Aging, and Alzheimer's Disease Following the Oxidative Stress Tracks. *Journal Alzheimers Disease*, v. 62, n. 3, p. 1319-1335, 2018.

MENEGUZ, A., BISSO, G., MICHALEK, H. Age-related changes in acetylcholinesterase and its molecular forms in various brain areas of rats. *Neurochemical Research*, v. 17, p. 785-790, 1992.

MOSELEY, A. E., WILLIAMS, M.T., SCAEFER, T.L., BOHANAN, C.S., NEUMANN, J.C., BEHBEHANI, M.M., VORHEES, C.V., LINGREL, J.B. Deficiency in Na,K-ATPase α isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. *Journal of Neuroscience*, v. 27, n. 3, p.616-626, 2007.

MOSELEY, A.E., LIESKE, S.P., WETZEL, R.K., JAMES, P.F., HE, S. The Na,K-ATPase alpha 2 isoform is expressed in neurons and its absence disrupts neuronal activity in newborn mice. *Journal Biology chemistry*, v. 278, p. 5317-5324, 2003.

MORAND, C., CRESPO, V., MANACH, C., BESSON, C., DEMIGNE, REMESI, C. Plasma metabolites of quercetin and their antioxidant properties. *American Journal of Phisiology- Regulatory integrative and Comparative Physiology*, v. 275, p. 212-219, 1998.

MUSI, N., VALENTINE, J.M., SICKORA, K.R, BAEUERLE, E., THOMPSON, C.S., SHEN, Q., ORR, M.E. Tau protein aggregation is associated with cellular senescence in the brain. *Aging cell*, v. 17, n. 6, 2018.

NEUMANN, H. Control of glial immune function by neurons. *Glia*, v. 36, p.191-199, 2001.

NEVES, J., DEMARIA, M., CAMPISI, J., JASPER, H. Of flies, mice, and men: evolutionarily conserved tissue damage responses and aging. *Developmental cell*, v. 32, p. 9-18, 2015.

NIRAULA, A., SHERIDAN, J.F., GODBOUT, J.P. Microglia priming with aging and stress. *Neuropsychopharmacology*, v. 42, p. 318-333, 2017.

OGRODNIK, M., EVANS, S.A, FIELDER, E., VICTORELLI, S., KRUGER, P., SALMONOWICZ, H., WEIGAND, B.M, PATEL, A.D, PIRTSKHALAVA, T., INMAN, C.L. Whole-body senescent cell clearance alleviates age-related brain inflammation and cognitive impairment in mice. *Aging cell*, v. 20, n. 2, 2021.

OHARA, S.P., RUSSO, N.F.L., MILLER, J.D., ROOS, C.M., VERZOSA, G.C., BRASSEUR, N.K.L., WREN, J.D., FARR, J.N., KHOSLA, S., STOUT, M.B., MCGOWAN., STROISSNIG, H.F., GURKAR, A.U., ZHAO, J., COLANGELO, D., DORRONSORO, A., LING, Y.Y., BARGHOUTY, A.S., NAVARRO, D.C., SANO, T., ROBBINS, P.D., NIEDERNHOFER, L.J., KIRKLAND, J.L. The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drug. *Aging cell*, v.14, p. 644-658, 2015.

OLMOS, G., LLADO, J. Tumor necrosis factor alpha: A link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators Inflammation*, v. 2014, n. 861231, 2014.

PATTABIRAMAN, G., PALASIEWICZ, K., GALVIN, J.P., UCKER, D.S. Aging-associated dysregulation of homeostatic immune response termination (and not initiation). *Aging Cell*, v.16, p. 585-593, 2017.

PARTRIDGE L.; DEELEN J.; SLAGBOOM P.E. Facing up to the global challenges of ageing. *Nature*, v. 561, n. 7721, p. 45-56, 2018.

PRINCE, M., martin, K., MAELENN, G., PAUL, M., MATEUS, P., COMAS-HERRERA, A., WIITENBERG, R., BAYO, A., HU, B., DEREK, R., AMRITPAL, R., DHANYA, S. Dementia UK: Update. London: Alzheimer's Society, p. 61. 2^o ed, 2014.

PAVLOV, V.A., CHAVAN, S.S., TRACEY, K.J. Molecular and Functional Neuroscience in Immunity. *Annual Review Immunology*, v. 36, p. 783 - 812, 2018

PAVLOV, V.A., TRACEY, K.J. Neural circuitry and immunity. *Immunology Research* v. 63, p. 38 - 57, 2015.

PETRUSHANKO, I. Y., MITKEVICH, V.A., ANASHKINA, A.A., ADZHUBEI, A.A., BURNYSHEVA, K.M., LAKUNINA, V.A., KAMANINA, Y.V., DERGOUSOVA, E.A., LOPINA, O.D., OGUNSHOLA, O.O., BOGDANOVA, A.Y., MAKAROV, A.A. Direct interaction of beta-amyloid with Na,K-ATPase as a putative regulator of the enzyme function. *Science Reports*, v. 6, article 27738, p. 1-10, 2016.

PEI, M., YANG, M., QI, X., SHEN, X., CHEN, X., ZHANG, F. Quercetin ameliorates ischemia/reperfusion-induced cognitive deficits by inhibiting ASK1/JNK3/caspase-3 by enhancing the Akt signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Reports*, v. 478, p. 199-205, 2016.

POHANKA M. Inhibitors of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase meet immunity. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 15, p. 9809-25, 2014.

PROBERT, L. TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects. *Neuroscience*, v.302, p. 2-22, 2015.

QUINN, D.M. *Chemical Reviews*, v. 87, p. 955-979, 1987.

REA, I.M., GIBSON, D.S., MCGILLIGAN, V., MCNERLAN, S.E., ALEXANDER, H.D., ROSS, O.A. Age and Age-Related Diseases: Role of Inflammation Triggers and Cytokines. *Frontiers Immunology*, v. 9, n. 586, 2018.

ROBBINS, P.D., TCHKONIA, T., KIRKLAND, J.L. New agents that target senescent cells: the flavone, fisetin, and the BCL-XL inhibitors, A1331852 and A1155463. *Aging*, v. 9, p. 955-963, 2017.

SERENIKI, A., VITAL, M. A. B. F. Alzheimer's disease: pathophysiological and pharmacological features. *Revista psiquiatria do Rio Grande do Sul*, v. 30, n. 1, 2008.

SHEEHAN, D., MEADE, G., FOLEY, V.M., DOWD, C.A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Journal Biochemistry*, v. 360, n. 1, p. 1-16, 2001.

SILMAN, I., SUSSMAN, J.L. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. *Current Opinion in Pharmacology*, v. 5, p. 293-302, 2005.

SINGH, A., KUKRETI, R., SASO, L., KUKRETI, S. Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. *Molecules*, v. 24, n.8, p.1583, 2019.

SIKORA, E., ZMIJEWSKA, A.B., DUDKOWSKA, M., KRZYSTYNIAK, A., MOSIENIAK, G., WESIERSKA, M., WLODARCZYK, J. Cellular senescence in brain aging. *Frontiers Aging Neuroscience*, v. 13, n. 646924, 2021.

SKOU, J. The influence of some cations on a peripheral nerve adenosine triphosphatase. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, v. 23, p. 394-401, 1957.

SOREG, H., SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase-new roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 2, p. 294- 302, 2001.

SOUSA, V.C., VITAL, J., COSTENLA, A.R, BATALHA, V.L., SEBASTIÃO, A.M., RIBEIRO, J.A., LOPES, L.V. Maternal separation impairs long term-potential in CA1-CA3 synapses and hippocampal-dependent memory in old rats. *Neurobiology Aging*, v. 35, p.1680-1685, 2014.

SPINELLI, R., PARRILO, L., LONGO, M., FLORESE, P., DESIDERIO, A., ZATTERALE, F., MIELE, C., RACITI, G.A., BEGUINOT, F. Molecular basis of ageing in chronic metabolic diseases. *Journal of Endocrinological Investigation*, v. 43, p.1373-1389, 2020.

STEELAND, S., VANDENBROUCKE, R.E.J. Choroid plexus tumor necrosis factor receptor 1: A new neuroinflammatory piece of the complex Alzheimer's disease puzzle. *Neural Regeneration Research*, v. 14, p. 1144-1147, 2019.

STEELAND, S., GORLE, N., VANDENDRIESSCHE, C., BALUSU, S., BRKIC, M., VAN CAUWENBERGHE, C., VAN IMSCHOOT, G., VAN WONTERGHEM, E., De RYCKE, R., KREMER, A. Counteracting the effects of TNF receptor-1 has therapeutic potential in Alzheimer's disease. *Embo Molecular Medicine*, v. 10, n. 8300, 2018.

STRUZYNSKA, L., SULKOWSKI, G., LENKIEWICZ, A, RAFALOWSKA, U. Lead Stimulates the Glutathione System in Selective Regions of the Mouse Brain. *Neuropathology*, v. 40, n. 4, p. 203-209, 2002.

SWEADNER, K.J. Na⁺, K⁺-ATPase isozymes. *Biochimistry Biophys Acta*, v. 988, p. 185-220, 1989.

ANAKA, Y., ANDO, S. Age-related changes in [3H]ouabain binding to synaptic plasma membranes isolated from mouse brains. *Journal Biochemistry*, v. 112, p.117-121, 1992.

TANG, Y., FUNG, E., XU, A., LAN, H. C-reactive protein and ageing. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, v.44, p. 9-14, 2017.

TEIXEIRA, V.L., KATZ, A.L., PEDEMONTE, C.H., BERTORELLO, A.M. Isoform-specific regulation of endocytosis of Na⁺, K⁺-ATPase and recruitment to the plasma membrane. *New York Academy of Sciences*, v. 986, p. 587-594, 2003.

UNITED NATIONS. World Population Ageing 2019. United Nations: New York, NY, USA, 2019.

VAN DEURSEN, J.M. VAN DEURSEN, J.M. The role of senescent cells in aging. *Nature*, v. 509, p. 439-446, 2014.

VIAYNA, E., SABATE, R., Muñoz-Torrero, D. Dual β -amyloid aggregation and acetylcholinesterase inhibitors as multi-targeted anti-Alzheimer's drug candidates current Top. *Medicine Chemistry*, v. 13, n. 15, p. 1820 - 1842, 2013.

VON BERNHARDI, R., EUGENIN-VON, L., EUGENIN, J. Microglial cell dysregulation in brain aging and neurodegeneration. *Frontiers Aging Neuroscience*, v. 7, n.124, 2015.

WANG, J., YUAN, J., PANG, J, MA, J., HAN, B., GENG, Y., SHEN, L., WANG, H., MA, Q., WANG, Y., WANG, M. Effects of chronic stress on cognition in male SAMP8 mice. *Cellular Physiological Biochemistry*, v. 39, p. 1078-1086, 2016.

WILEY, C.D., VELARDE, M.C., LECOT, P., LIU, S., SARNOSKI, E.A., FREUND, A., SHIRAKAWA, K., LIM, H.W., DAVIS, S.S., RAMANATHAN, A., GERENCSE, A.A., VERDIN, E., CAMPISI, J. Mitochondrial dysfunction induces senescence with a distinct secretory phenotype. *Cellular Metabolism*, v. 23, p.303-314, 2016.

XU, M., PIRTSKHALAVA, T., FARR, J.N., WEIGAND, B.M., PALMER, A.K., WEIVODA, M.M., INMAN, C.L, OGRODNIK, M.B., HACHFELD, C.M., FRASER, D.G. ONKEN, J.L., JOHNSON, K.O., VERZOSA, G.C., LANGHI, L.G.P., WEIGL, M., GIOGADZE, N., BRASSEUR, N.K.L., MILLER, J.D., JURK, D., SINGH, R.J., ALLISON, D.B., EJIMA, K., HUBBARD, G.B., IKENO, Y., CUBRO, H., GAROVIC, V.D., HOU, X., WEROHA, S.J., ROBBINS, P.D., NIEDERNHOFER, L.J., KHOSLA, S., TCHKONIA, T., KIRKLAND. Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nature Medicine*, v. 24, p. 1246-1256, 2018.

YANKNER, B.A., LU, T., LOERCH, P. The aging brain. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, v.3, p. 41-66, 2008.

YOSHIYAMA, Y., KOJIMA, A., ISHIKAWA, C., ARAI, K. The anti-inflammatory action of donepezil improves tau pathology, synaptic loss and

neurodegeneration in a mouse model of tauopathy. *Journal Disease Alzheimers*, v. 22, n. 1, p. 295 – 306, 2010.

ZHANG, L-I.N., SUN, Y.J., PAN, S., L-I, J.X., QU, Y-E., LI, Y., WANG, Y.L., GAO, Z.B. $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, a potent neuroprotective modulator Against Alzheimer disease. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, v. 27, n. 1, p. 96-103, 2013.

ZHU, Y., TCHKONIA, T., PIRTSKHALAVA, T., GOWER, A., DING, H., GIOGADZE, N., PALMER, A.K., LKENO, Y., BORDEN, G., LENBURG, M. (2015) The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell*, v. 14, n. 4, p. 644-58, 2015.

ZHU, Y., DOORNEBAL, E.J., PIRTSKHALAVA, T., GIOGADZE, N., WENTTWORTH, M., FUHRMANN-STROISSNIGG, H., NIEDERNHOFER, L.J., ZHU, Y., ARMSTRONG, J.L., TCHKONIA, T., KIRKLAND, J.L. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype in age-related chronic diseases. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, v. 17, n. 4, p.324-8, 2014.

ANEXO A

Carta de aprovação na Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

18/12/2018

SEI/UFPel - 0392326 - Parecer



PARECER Nº
PROCESSO Nº

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
137/2018/CEEA/REITORIA
23110.058357/2018-72

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “**Uso de senolíticos para prevenção do envelhecimento ovariano e aumento da fertilidade em camundongos**” processo número 23110.058357/2018-72, de responsabilidade de Augusto Schneider - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua complementação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 10/12/2018.

Finalidade	(X) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	01/02/2019 a 30/12/2020
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> /C57BL/6
Nº de animais	88
Idade	21 dias
Sexo	40 Machos e 48 Fêmeas
Origem	Biotério Central-UFPel

Código para cadastro CEEA 58357-2018

ANEXO B

Carta de submissão do manuscrito

 [My account](#) 

Your submissions

Track your submissions

Effect of treatment with senolytics on mice brain aging: involvement of redox status, Na⁺, K⁺ -ATPase and acetylcholinesterase activity

Corresponding Author: Francieli Moro Stefanello
Biogerontology
c07817cc-3bb6-4ddc-860d-8aa8e5c667f8 | v.1.0

[View submission details](#)

Technical check in progress *2 minutes ago*