

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

MARIANA UCZAY

**AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS IRIDOIDES COM ATIVIDADE NO SISTEMA
NERVOSO CENTRAL: UM ENFOQUE EM GENIPOSÍDEO E
ASPERULOSÍDEO**

Porto Alegre
2023

Mariana Uczay

**AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS IRIDOIDES COM ATIVIDADE NO SISTEMA
NERVOSO CENTRAL: UM ENFOQUE EM GENIPOSÍDEO E
ASPERULOSÍDEO**

Tese de doutorado apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Farmacologia e
Terapêutica, como requisito parcial para
obtenção do Grau de Doutora em
Farmacologia e Terapêutica

Orientadora: Prof^a Dra^a Patrícia Pereira

Porto Alegre (RS), Brasil

Outubro de 2023

MARIANA UCZAY

**AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS IRIDOIDES COM ATIVIDADE NO SISTEMA
NERVOSO CENTRAL: UM ENFOQUE EM GENIPOSÍDEO E
ASPERULOSÍDEO**

Tese de doutorado apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Farmacologia e
Terapêutica, como requisito parcial para
obtenção do Grau de Doutora em
Farmacologia e Terapêutica

Orientadora: Prof^a Dra^a Patrícia Pereira

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a Dr^a. Mirna Bainy Leal

Prof^a Dr^a. Anapaula Sommer Vinagre

Prof^a Dr^a. Ivana Grivicich

AGRADECIMENTOS

Ao concluir esta tese, gostaria de agradecer:

À toda minha família, por entender minha ausência durante esses mais de quatro anos, principalmente ao meu namorado Rômulo, pela imensurável ajuda durante a execução deste trabalho.

À minha orientadora, Prof^a Patrícia Pereira, por me receber em seu laboratório, pela confiança depositada em mim, e principalmente pela excelente relação de amizade que construímos durante o período do meu doutorado.

Ao Prof^o José Angel Fontenla, por ter me recebido tão bem em seu laboratório na Universidade de Santiago de Compostela.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelas bolsas de doutorado e doutorado sanduíche recebidas.

A todos os professores do PPGFT que contribuíram para minha formação como farmacologista.

Muito obrigada!

RESUMO

As doenças neurológicas são frequentes, e apesar dos grandes avanços conquistados nas últimas décadas, ainda não existem tratamentos eficazes e capazes de reverter totalmente danos causados aos neurônios, ou de promover a neuroproteção. Muitos iridoides já foram estudados devido a atividades biológicas como a diminuição da inflamação e do estresse oxidativo, além disso, em pesquisas recentes, já demonstraram promover a neuroproteção. Geniposídeo (GP) e asperulosídeo (ASP) são iridoides encontrados na flora nativa do Brasil. Neste trabalho, buscamos avaliar as propriedades ADMETox de GP e ASP por meio de ensaios *in silico* e *in vivo*, além de avaliar o potencial anticonvulsivante em modelo de crise epiléptica induzida por pilocarpina em camundongos. GP foi extraído de frutos de *Genipa americana* e ASP a partir de partes aéreas (folhas e ramos) de *Escallonia megapotamica* e *Escallonia bifida*. O mecanismo de ação destes compostos foi avaliado por meio de análises de *docking* molecular, de ensaios de ligação a receptores e avaliação da atividade antioxidante em *Caenorhabditis elegans*. GP e ASP demonstraram possuir boas características farmacológicas de lipofilicidade, tamanho molecular e doadores e aceptores de hidrogênios, porém, parecem ter pouca permeabilidade pela barreira hematoencefálica (BHE), e por meio de ensaios *in silico*, sugerimos um mecanismo ativo de passagem pela BHE. GP demonstrou ter baixa toxicidade em doses terapêuticas, tanto em modelos *in silico*, quanto *in vivo*. ASP demonstrou atividade genotóxica no ensaio cometa, além de alterar o comprimento corporal de *C. elegans*, afetando seu desenvolvimento. Observamos resultados favoráveis quanto ao seu efeito anticonvulsivante, onde GP e ASP aumentaram a latência e diminuíram a ocorrência de crises induzidas por pilocarpina em camundongos. Além disso, em *C. elegans* observamos um potencial efeito antioxidante, GP foi capaz de reverter o dano causado por peróxido de hidrogênio na enzima superóxido dismutase (SOD) nas concentrações de 1 e 2 mM, e ASP foi capaz de reverter o dano causado por peróxido de hidrogênio na glutathione S transferase (GST) nas concentrações de 0,5, 1 e 2 mM. Avaliamos a afinidade de ligação de ambos os compostos em receptores canabinoides e de adenosina, porém nenhum dos compostos ligou-se de maneira adequada aos receptores. Nas análises de *docking* molecular, observamos que GP e ASP ligam-se as enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase com uma afinidade de ligação maior que a da galantamina, um inibidor colinesterásico clássico. Desta forma,

concluimos que GP e ASP demonstram potencial farmacológico, uma vez que conferiram proteção nos modelos experimentais empregados neste estudo.

Palavras-chave: epilepsia; neuroproteção; estresse oxidativo; geniposídeo, asperulosídeo, *C elegans*; *docking* molecular.

ABSTRACT

Neurological diseases are common, and despite major advances in recent decades, there are still no effective treatments that can fully reverse damage to neurons or promote neuroprotection. The biological activities of many iridoids, such as reducing inflammation and oxidative stress, have already been studied. In addition, recent research has shown that they promote neuroprotection. Geniposide (GP) and asperuloside (ASP) are iridoids found in the native flora of Brazil. In this study, we evaluated the ADMETox properties of GP and ASP through *in silico* and *in vivo* assays, in addition to evaluating the anticonvulsant potential in a model of epileptic seizures induced by pilocarpine in mice. GP was extracted from *Genipa americana* fruits and ASP from aerial parts (leaves and branches) of *Escallonia megapotamica* and *Escallonia bifida*. The mechanism of action of these compounds was evaluated via molecular *docking*, receptor binding tests and an evaluation of antioxidant activity in *Caenorhabditis elegans*. GP and ASP showed good pharmacological characteristics of lipophilicity, molecular size and hydrogen donors and acceptors, however, they seem to have little permeability through the blood-brain barrier (BBB), through *in silico* assays, we suggest an active mechanism of passage through the BBB. GP has been shown to have low toxicity at therapeutic doses, both in *in silico* and *in vivo* models. ASP demonstrated genotoxicological activity in the comet assay, in addition to altering the body length of the worms, affecting their development. We observed favorable results regarding its anticonvulsant effect, where GP and ASP increased latency and decreased the occurrence of seizures induced by pilocarpine in mice. Furthermore, in *C. elegans* we observed a potential antioxidant effect, GP was able to reverse the damage caused by hydrogen peroxide on the superoxide dismutase (SOD) enzyme at concentrations of 1 and 2 mM, and ASP was able to reverse the damage caused by hydrogen peroxide on the glutathione S transferase (GST) at concentrations of 0.5, 1 and 2 mM. We evaluated the binding affinity of both compounds at cannabinoid and adenosine receptors, but none of the compounds adequately bound to the receptors. In molecular docking analyses, we observed that GP and ASP bind to acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes with a higher binding affinity than galantamine, a classic cholinesterase inhibitor. Thus, we conclude that GP and ASP demonstrate pharmacological potential, since they provided protection in the experimental models used in this study.

Keywords: epilepsy; neuroprotection; oxidative stress; geniposide, asperuloside, *C. elegans*; molecular docking.

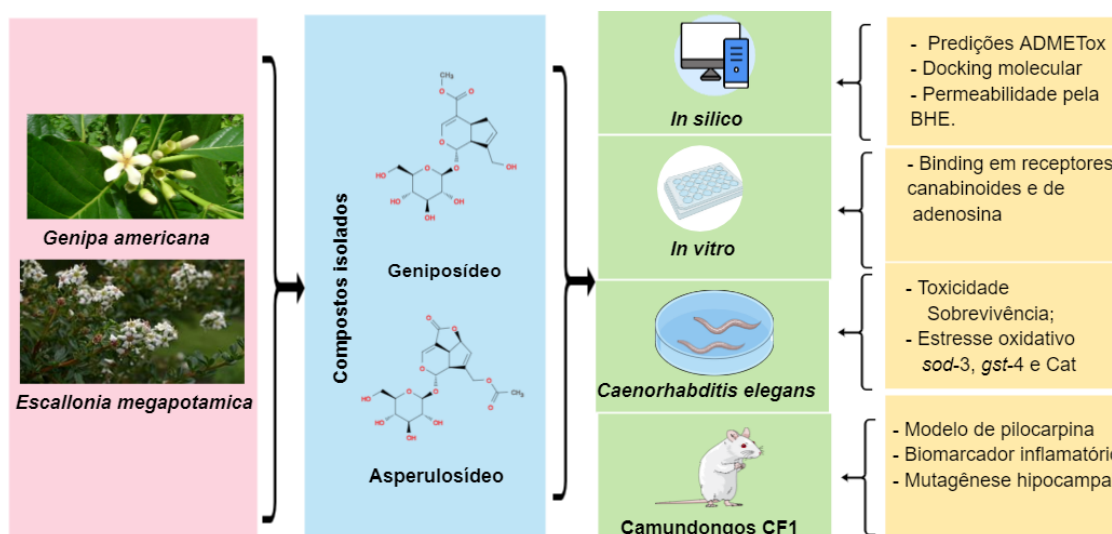
APRESENTAÇÃO

Esta tese consiste em uma introdução geral e um breve referencial teórico sobre seu tema. O primeiro capítulo teve como objetivo avaliar a atividade anticonvulsivante de GP e ASP em um modelo de crise epiléptica induzido por Pilocarpina em camundongos. Os experimentos foram desenvolvidos no Centro de Experimentação animal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CREAL-UFRGS), no Laboratório de Neurofarmacologia e Toxicologia Pré-Clínica e no Laboratório de Genética Toxicológica da Universidade Luterana do Brasil (Ulbra). A partir dos resultados deste trabalho, produzimos um artigo que foi publicado na revista *Naunyn Archives of pharmacology* em 2022.

O segundo capítulo tem como objetivo avaliar as propriedades farmacológicas de GP e ASP através de análises *in silico*, *in vitro* e *in vivo* em *Caenorhabditis elegans*, as análises foram realizadas no Laboratório de Farmacologia do Sistema Nervoso Central da Universidade de Santiago de Compostela e no Laboratório de Neurofarmacologia e Toxicologia Pré-Clínica na UFRGS. Este trabalho será submetido na revista *Computational biology and chemistry*.

Ao final há uma discussão geral sobre todos os resultados encontrados pelos experimentos realizados nesta tese, uma conclusão geral e perspectivas futuras.

RESUMO GRÁFICO



LISTA DE ABREVIACOES

ASP: Asperulosídeo

AChE: Acetilcolinesterase

BChE: Butirilcolinesterase

COX-2: Cicloxigenase-2

DA: Doença de Alzheimer

DP: Doença de Parkinson

DZP: Diazepan

GAD - Glutamato descarboxilase

GP: Geniposídeo

IL-6: Interleucina-6

iNOS: xido nítrico-sintase induzível

NF-κB - nuclear factor-kappa B

NO: Oxido nítrico

PILO: pilocarpina

SAL: Salina

SE: *status epilepticus*

SMB: Metil-bromido de escopolamina

SNC: Sistema nervoso central

TNF: Fator de necrose tumoral

VPA: cido valproico

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Visão geral da resposta do encéfalo às espécies reativas.....16
- Figura 2. Estrutura química do geniposídeo.....**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 3. Estrutura química do asperulosídeo.**Erro! Indicador não definido.**

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	14
1 INTRODUÇÃO GERAL	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1 Doenças do sistema nervoso central.....	15
2.3 Neuroinflamação	16
2.4 Estresse oxidativo.....	17
2.4 Iridoides.....	19
2.4.1 Geniposídeo.....	20
2.4.2 Asperulosídeo.....	21
3. OBJETIVOS.....	24
3.1 Objetivo geral.....	24
3.2 Objetivos Específicos.....	24
CAPÍTULO II.....	25
Geniposide and asperuloside alter the COX-2 and GluN2B receptor expression after pilocarpine-induced seizures in mice	25
CAPÍTULO III	38
<i>In-silico, in vitro</i> and <i>in vivo</i> pharmacological evaluation of two iridoids: geniposide and asperuloside	39
4 DISCUSSÃO GERAL.....	80
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
ANEXO 1 – Carta de Aprovação CEUA	90

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO GERAL

Patologias cerebrais como acidente vascular cerebral, epilepsia, doença de Alzheimer (DA), doença de Parkinson (DP) e traumatismo cranioencefálico são as principais causas de incapacidade na população mundial, cada vez mais envelhecida (DiLuca; Olesen, 2014). Apesar dos avanços na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos de distúrbios que afetam o sistema nervoso central (SNC) e das novas terapêuticas que surgem, cada vez mais têm-se observado um aumento em sua incidência (Neri *et al.*, 2022). Por outro lado, as doenças do SNC são mais difíceis de tratar do que outros tipos de doenças, uma vez que apenas compostos de baixo peso molecular poderem atingir o tecido cerebral para exercer efeitos curativos devido à existência da barreira hematoencefálica (BHE) (Sweeney; Sagare; Zlokovic, 2018).

As doenças neurológicas representam um impacto significativo na qualidade de vida dos pacientes e seus cuidadores, bem como na saúde e na economia do país. A prevalência mundial da DA é de aproximadamente 3% entre as pessoas com 65 a 74 anos, com um aumento drástico de 30% entre aquelas com 85 anos ou mais (Marasco, 2020). Quanto à DP a taxa de prevalência é de 2% na população com 65 anos ou mais (Pringsheim *et al.*, 2014). Já para casos de epilepsia, estima-se que a taxa de prevalência seja de 2,83 casos a cada 1000 habitantes por ano (Fiest *et al.*, 2017).

Tendo em vista a falta de fármacos que atuem de maneira efetiva nas doenças que afetam o SNC, compostos de origem natural são frequentemente analisados em função de sua atividade neuroprotetor (Bharate; Mignani; Vishwakarma, 2018). Iridoides formam um grupo de compostos naturais que possuem um anel de ciclopentano, estando amplamente presentes nas famílias Bignoniaceae, Rubiaceae, Scrophulariaceae, Verbenaceae e Oleaceae. Devido às suas características estruturais únicas e configurações complexas, estes compostos exibem numerosas atividades biológicas desejáveis, tais como atividades neuroprotetora, anti-inflamatória, antimicrobiana e antitumoral (Zhou *et al.*, 2019; Cao *et al.*, 2019).

Portanto esta tese tem como objetivos avaliar o efeito neuroprotetor de geniposídeo (GP) e asperulosídeo (ASP), dois dos principais iridoides encontrados na flora brasileira, em diferentes modelos experimentais. Foram estudadas suas atividades no SNC, o perfil de toxicidade, atividade antioxidante, bem como seu potencial efeito anticonvulsivante.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Doenças do sistema nervoso central

O SNC é um dos sistemas mais importante dos vertebrados, sendo responsável por transmitir informações ao sistema nervoso periférico e controlar as diversas atividades inerentes aos organismos. As doenças que acometem o SNC constituem um grupo heterogêneo de distúrbios que podem apresentar características neurodegenerativas, ou não. Em 2019, havia cerca de 50 milhões de pessoas vivendo com doenças neurodegenerativas em todo o mundo, e estima-se que esse número suba para 152 milhões até 2060 (Jia *et al.*, 2019). As doenças neurodegenerativas são caracterizadas pela perda progressiva e seletiva de sistemas neuronais anatômica ou fisiologicamente relacionados. Exemplos clássicos incluem a DA e DP.

Como principal causa de demência, a DA é um problema de saúde global crescente que tem um enorme impacto em nível individual e social (Scheltens *et al.*, 2016). Esta doença é causada por placas β -amiloides e emaranhados neurofibrilares da proteína Tau que se acumulam no cérebro e resultam em declínio cognitivo gradual. Como uma doença neurodegenerativa de conformação proteica, a DA apresenta-se como perda de memória e disfunção neurocognitiva progressivas. Apesar de vários tratamentos terem sido desenvolvidos para aliviar sintomas leves, nenhum medicamento está atualmente em uso que melhore a cognição ou previna a progressão da DA (Joe; Ringman, 2019).

Já a DP é uma doença neurodegenerativa progressiva, caracterizada por graves deficiências locomotoras, incluindo bradicinesia, tremor e rigidez (Ahmad *et al.*, 2022). Esses sintomas são a manifestação da perda de neurônios dopaminérgicos da pars compacta da substância negra (Kalia; Lang, 2015). Outras anormalidades associadas à DP são defeitos cognitivos, anormalidades psiquiátricas e implicações

neurodegenerativas (Ahv; Krp, 2017). A facilitação dopaminérgica (L-dopa, agonistas da dopamina, inibidores da monoamina oxidase-B e da COMT) é usada para proporcionar alívio sintomático sem fornecer neuroproteção na DP (Schapira *et al.*, 2006).

A epilepsia é uma das doenças do SNC mais frequentes, caracterizada por crises epilépticas imprevisíveis e recorrentes (Ambrogini *et al.*, 2019). Apesar de não ser uma doença neurodegenerativa, apresenta diversas características semelhantes à essas doenças. Essa condição ocorre quando há sincronização anormal espontânea de descargas neuronais que levam a períodos transitórios de disfunção cerebral, que podem manifestar-se como perturbações da percepção, do controle motor, da consciência ou do controle autonômico, dependendo das áreas do cérebro envolvidas (Fisher *et al.*, 2014). Os fármacos disponíveis na terapêutica não satisfazem totalmente o tratamento dos pacientes com epilepsia, pois acabam por tratar apenas os sintomas e não os mecanismos fisiológicos envolvidos (Schulze-Bonhage, 2017) além disso, muitos pacientes são refratários ou sofrem com graves efeitos adversos.

2.3 Neuroinflamação

A inflamação é uma reação fisiológica do sistema imunológico a estímulos nocivos que protege o tecido de lesões, mantém sua homeostase e facilita a recuperação do tecido após danos. A neuroinflamação se refere a uma resposta inflamatória dentro do SNC que pode ser causada por insultos patológicos, incluindo infecção, trauma, isquemia e toxinas (Leng; Edison, 2020). O processo é marcado pela produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 β , IL-6, IL-18 e fator de necrose tumoral (TNF), quimiocinas e moléculas como prostaglandinas e óxido nítrico (DiSabato, Quan; Godbout, 2016). A epilepsia, a DA e a DP compartilham muitos processos fundamentais associados à disfunção neuronal, estresse oxidativo, morte celular e neuroinflamação (Dugger; Dickson, 2017; Upaganlawar *et al.*, 2021). Como resposta precoce a insultos ao cérebro, o processo de neuroinflamação é ativado para prevenir danos aos neurônios e atenuar a neurodegeneração (Soltani Khaboushan, Yazdanpanah; Rezaei, 2022).

Está bem estabelecido que a inflamação no SNC desempenha um papel fundamental na epileptogênese. Além disso, a disfunção da barreira hematoencefálica (BHE) após a inflamação contribui para a epileptogênese. A neuroinflamação pode induzir a apoptose neuronal ativando receptores, como o receptor-1 do TNF, que ativa a via da caspase 8 e impulsiona os neurônios para a apoptose. Já na DA, os mediadores pró-

inflamatórios aumentam a produção de proteína precursora de amiloide (APP) que se converte em moléculas β -amilóide ($A\beta$), a marca registrada da DA (Park *et al.*, 2023). Além disso, APP e $A\beta$ são moléculas pró-inflamatórias que intensificam a inflamação. Da mesma forma, na DP, a agregação de inclusões de α -sinucleína resulta na ativação do fator nuclear- κ B (NF- κ B) na microglia, podendo desencadear a apoptose (Dugger; Dickson, 2017).

Além disso, a neuroinflamação pode estar associada com a produção aumentada de espécies reativas de oxigênio (EROs). Em mitocôndrias danificadas, o extravasamento de elétrons aumenta a taxa de formação de superóxido dismutase e, conseqüentemente de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Outras conseqüências nesta cascata de eventos incluem alterações na homeostase do cálcio, peroxidação lipídica, alterações na permeabilidade da membrana, além de danos às proteínas e ao DNA. Todos esses aspectos acabam afetando expressão gênica predispondo a alterações do ciclo celular e, eventualmente, a senescência e/ou ativação de vias de apoptose (Patel, 2002).

2.4 Estresse oxidativo

O cérebro consome 20 a 50% do consumo total de oxigênio corporal, embora represente cerca de 2% do peso corporal, o que significa que a função cerebral é amplamente dependente do suprimento constitutivo de O_2 (Fujita *et al.*, 2012). Com esse consumo aumentado de oxigênio, observa-se, também um aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs desempenham um papel fisiopatológico crucial, porém, seu acúmulo aumenta a suscetibilidade do tecido cerebral a danos (Figura 3). Os mecanismos pelos quais as EROs causam danos ao tecido cerebral não são bem compreendidos, mas é relatado que desencadeiam uma variedade de cascatas moleculares que aumentam a permeabilidade da BHE e alteram a morfologia cerebral, causando neuroinflamação e morte neuronal (Salim, 2017).

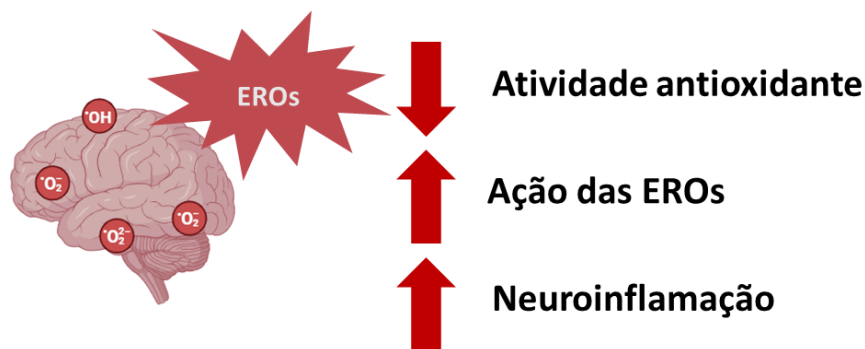


Figura 1. Visão geral da resposta do encéfalo às espécies reativas. Fonte: elaborado pela autora

A regulação da quantidade de espécies reativas no cérebro é crucial para manter a atividade cerebral normal. Algumas evidências sugerem que o dano oxidativo tem um papel importante no declínio cognitivo que acompanha o envelhecimento. O perfil transcricional de amostras de córtex frontal pós-morte de indivíduos com idade entre 26 e 106 anos revelou que após os 40 anos houve uma diminuição na expressão de genes envolvidos na plasticidade sináptica, transporte vesicular e função mitocondrial, seguido por aumento da expressão de resposta ao estresse, genes antioxidantes e reparadores de DNA (Lu *et al.*, 2004).

Existem dois tipos de mecanismos de proteção no cérebro para lidar com a ameaça representada pelas EROs, o sistema enzimático antioxidante e os antioxidantes de baixo peso molecular. O sistema enzimático antioxidante inclui superóxido dismutase (SOD), glutatona-S-transferases (GST), e catalase (CAT) (Yang *et al.*, 2022). As enzimas SOD, incluindo Cu-Zn SOD e Mn-SOD, facilitam a dismutação espontânea de radicais superóxido para gerar H_2O_2 , que é posteriormente removido pela enzima CAT (Saso; Firuzi, 2014). A GST é uma enzima, que catalisa a ligação da glutatona com intermediários hidrofóbicos, tornando-os menos tóxicos e facilitando o seu transporte para fora da célula (Mazari *et al.*, 2023). Os antioxidantes de baixo peso molecular incluem a glutatona, ácido úrico, ácido ascórbico e melatonina, que oferecem funções de neutralização causando a quelatação de metais de transição. A glutatona, que ocorre na forma reduzida (GSH) e na forma oxidada (dissulfeto de glutatona), é o antioxidante endógeno não enzimático mais importante e pode ser regenerada pela glutatona redutase com o consumo de NADPH (Yang *et al.*, 2022). A proporção endógena de GSH para dissulfeto de glutatona é considerada um indicador da homeostase redox dentro de uma

célula. Níveis mais altos de GSH também servem como cofator para outras enzimas, incluindo glioxalase e peroxidase. Até o momento, a regulação de enzimas antioxidantes é reconhecida como um dos caminhos para a descoberta de estratégias neuroprotetoras (Fujita *et al.*, 2012).

2.4 Iridoides

Iridoides são uma classe de compostos monoterpênicos amplamente distribuídos nas plantas com flores das famílias Scrophulariaceae, Rubiaceae, Labiatae, Loganiaceae, Bignoniaceae, Gentianaceae, Verbenaceae e Oleaceae. Esses metabólitos vegetais são classificados de acordo com o número de átomos de carbono presentes no esqueleto de sua parte aglicona, sendo C-8, C-9 e C-10 (Dinda *et al.*, 2019). Grande parte dos iridoides contém uma molécula de glicose e, portanto, são chamados de iridoides glicosídeos.

Os iridoides são encontrados em plantas, principalmente nas dicotiledôneas das angiospermas e, em alguns casos, nas monocotiledôneas, onde estão presentes em algumas folhas, frutos, raízes e brotos (Dinda *et al.*, 2019). Esses compostos desempenham um papel protetor contra predadores em plantas e animais. Isso se deve em parte ao seu sabor amargo, que parece desencorajar os predadores (Pankoke, Bowers; Dobler, 2012). Até o momento, os iridoides foram identificados como compostos-chave na medicina natural chinesa usados no tratamento e controle de muitas doenças, incluindo condições inflamatórias.

Algumas revisões recentes focam nas atividades farmacológicas de diversos iridoides (Dinda *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2020; Manzione *et al.*, 2020), focando em seu potencial neuroprotetor, anti-inflamatório, hepatoprotetor, hipoglicemiante e anti-tumoral. Verificou-se que iridoides como catalpol, geniposídeo, harpagosídeo e loganina e seco-iridoides como a oleuropeína e sua aglicona e oleocanthal exibem efeito neuroprotetor significativo e a propriedade de desacelerar o processo de neurogênese na DA e na DP. Esses metabólitos vegetais demonstraram melhorar a DA aumentando a expressão da enzima degradadora de insulina, neprilisina, PPAR- γ e α -secretase, e diminuindo a expressão de β -secretase (BACE-1) para reduzir os níveis de oligômeros A β em neurônios cerebrais (Dinda *et al.*, 2019).

2.4.1 Geniposídeo

Geniposídeo (figura 1) é um dos principais glicosídeos iridoídeos, já foi isolado de quase 40 espécies de plantas e a maioria delas são utilizadas como fitoterápicos tradicionais. As atividades farmacológicas do geniposídeo são múltiplas, incluindo funções analgésicas, antidepressivas, anti-inflamatórias, antioxidantes, imunoregulatórias, antitrombótica, além de apresentar efeitos neuroprotetivos, hepatoprotetivos e antitumorais (Zhou *et al.*, 2019).

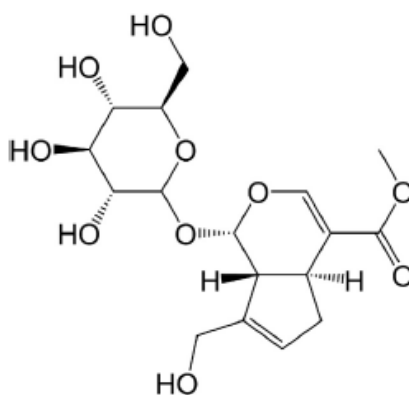


Figura 2 - Estrutura química do geniposídeo. Fonte: elaborada pela autora.

Os mecanismos ativos de GP estão relacionados ao aumento da atividade de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase e catalase e inibição de espécies reativas de oxigênio, e óxido nítrico, além de seu efeito regulatório de vias de sinalização como AMPK e PI3K/Akt (Ma *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2016; Wei *et al.*, 2018). Estudos *in vitro* indicam que GP pode atravessar a barreira hematoencefálica com alguma permeabilidade (Chen *et al.*, 2013; Qu *et al.*, 2014).

Outro estudo mostrou que a administração em camundongos APP/PS1 de geniposídeo a 50 mg/kg/d pode melhorar as habilidades de exploração e memória dos camundongos e melhorar efetivamente o comprometimento cognitivo. O geniposídeo exerce um efeito neuroprotetor aumentando o nível de expressão de p-4E-BP1 e reduzindo a expressão de p-mTOR e p-Akt, melhorando assim o comprometimento cognitivo, este efeito foi mediado pela regulação das vias proteicas relacionadas com mTOR (Zhang *et al.*, 2020). Além disso, alguns estudos demonstraram que o tratamento com geniposídeo por 4 semanas reduziu significativamente o nível de fosforilação da

proteína tau no cérebro de camundongos transgênicos APP/PS1 e acelerou a fosforilação do glicogênio sintase quinase-3 (GSK3).

O estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial aparecem no estágio inicial da DA e aceleram o desenvolvimento da doença. Estudos apontaram que a gavagem de camundongos APP/PS1 com geniposídeo poderia inibir o dano oxidativo mitocondrial, aumentar o potencial de membrana mitocondrial (MMP) e a atividade do citocromo c oxidase (CcO) e prevenir o desenvolvimento de DA por melhorar significativamente o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial em camundongos (Lv *et al.*, 2014). Alguns estudos observaram que GP pode aumentar a secreção de insulina ativando a expressão do receptor do peptídeo 1 semelhante ao glucagon (GLP-1R) (Guo *et al.*, 2012; TU *et al.*, 2021).

2.4.2 Asperulosídeo

Outro iridoide que possui efeitos biológicos é o ASP (figura 2), o primeiro iridoide isolado da raiz de *Rubia tinctorum L.* (Rubiaceae) (atta-ur-rahman, 2005). Sabe-se que esse composto possui efeitos farmacológicos como atividade anti-obesidade, antiinflamatória e antioxidante (Hirata *et al.*, 2011). Entretanto, poucos estudos foram realizados analisando a atividade desse composto, e até agora, nenhum estudo experimental foi realizando associando o ASP a seu efeito neuroprotetor.

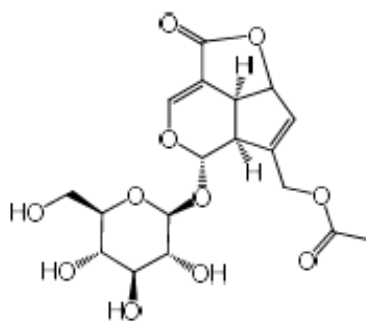


Figura 3 - Estrutura química do asperulosídeo. Fonte: elaborada pela autora.

Um dos vários estudos que demonstraram o efeito anti-inflamatório do ASP foi conduzido por He *et al.*, em 2018. Foram investigados os mecanismos subjacentes da atividade anti-inflamatória mostrada pelo H. difusa, usando asperulosídeo isolado da planta em células RAW 264.7 com dano induzido por LPS. Nas células tratadas o nível

de mediadores inflamatórios, NO e prostaglandina E2, bem como a citocina inflamatória IL-6 foram notavelmente reduzidos. Como a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e a ciclooxigenase-2 (COX-2) são as principais enzimas que catalisam as produções de NO e PGE 2, respectivamente, acredita-se que elas sejam os mediadores que desempenham papéis fundamentais para uma variedade de respostas inflamatórias. Portanto, a expressão de proteína e mRNA de iNOS e COX-2 foram então medidos para investigar o mecanismo subjacente dos achados observados. Os resultados demonstraram que o ASP inibiu significativamente os níveis de transcrição de mRNA de iNOS e COX-2. Como resultado da estimulação do iNOS, as prostaglandinas são liberadas e os NOs são posteriormente ativados, o que inicia a transcrição de genes inflamatórios a jusante, ou seja, as citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF (Chan *et al.*, 2020).

Outro estudo semelhante foi conduzido por Qiu et al., em 2015, com o objetivo de investigar os efeitos anti-inflamatórios da ASP isolado de um fitoterápico tradicional chinês, Herba Paederiae. O estudo avaliou as respostas inflamatórias em células RAW 264.7 com dano induzido por LPS em um modelo experimental de rato, em que os níveis de citocinas pró-inflamatórias foram medidos usando ensaio imunoenzimático (ELISA) e Western blotting. Os pesquisadores descobriram que o ASP reduz as expressões de TNF- α , IL-6 e interleucina 1-beta (IL-1). Na análise de Western blot, observou-se que o ASP tem um efeito significativo na regulação de IB-, Erk1/2, JNK e p38 quinases em células estimuladas por LPS. Estes achados demonstram que o ASP tem um efeito anti-inflamatório substancial, em que a sua dose foi diretamente correlacionada com a supressão de vias pró-inflamatórias (Chan *et al.*, 2020).

2.5 *Caenorhabditis elegans*

O nematódeo *Caenorhabditis elegans* é um importante organismo modelo com muitas características úteis, incluindo rápido desenvolvimento e envelhecimento, fácil cultivo e tratabilidade genética. Ensaio de sobrevivência utilizando *C. elegans* são métodos poderosos para estudar processos fisiológicos, e toxicidade de diversas substâncias (Park et al., 2017). Estudos elaborados para classificar a toxicidade em *C. elegans* mostraram consistentemente uma boa correlação com a classificação LD₅₀ oral de roedores (Hunt, 2017). Além disso, estudos de toxicidade usando modelos de mamíferos são caros e demorados (Tralau et al., 2012), e meta-análises indicam que

modelos de roedores preveem efeitos tóxicos específicos em humanos apenas cerca de 50% das vezes (Hartung, 2009; Knight et al., 2009).

Uma vantagem da utilização de *C. elegans* em ensaios de toxicidade é que as populações isogênicas sincronizadas são simples de preparar, já que o verme geralmente existe como um hermafrodita autofecundante que produz centenas de descendentes isogênicos. A maioria dos ensaios de sobrevivência de *C. elegans* leva um tempo relativamente curto, por exemplo, os ensaios de resistência ao estresse e expectativa de vida de *C. elegans* geralmente levam alguns dias e semanas, respectivamente (Park; Jung; Lee, 2017).

Outra característica que faz desse verme um bom modelo de pesquisa, é sua homologia com seres humanos, já que dois terços das proteínas humanas têm homólogos de *C. elegans*, e quase 80% dos genes para erros inatos do metabolismo humano têm homólogos em *C. elegans* (Sonnhammer e Durbin, 1997; Kuwabara e O'Neil, 2001). O ortólogo de *C. elegans* de TRPML1, o gene da mucopolidose tipo IV, é cup-5 (coelomócitos com defeito) (Campbell e Fares, 2010). Em humanos, mutações em TRPML1 resultam em retardo psicomotor e anormalidades oftalmológicas, enquanto *C. elegans* homozigotos para mutações em cup-5 são estéreis, mas em ambas as espécies a ausência de atividade de TRPML1/ cup-5 em nível celular resulta em acúmulo inadequado de lisossomos. Além disso, o gene TRPML1 humano normal resgata anormalidades reprodutivas e lisossomais de *C. elegans* cup-5 (Hersh et al., 2002). De maneira semelhante, os parâmetros de toxicidade em *C. elegans*, como capacidade reprodutiva reduzida, padrões de motilidade alterados ou defeitos de desenvolvimento, podem detectar toxinas que provocam parâmetros de organismo muito diferentes em humanos, mas análises subsequentes de efeitos mais sutis em nível molecular têm o potencial indicam vias compartilhadas de toxicidade.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar as propriedades farmacológicas de geniposídeo e asperulosídeo e seu potencial como agentes protetores do SNC.

3.2 Objetivos Específicos

In silico

- Avaliar as atividades farmacológicas de GP e ASP;
- Predizer a toxicidade de GP e ASP;
- Predizer a capacidade dos iridoídeos de atravessar a barreira hematoencefálica;
- Analisar, através de *docking* molecular o potencial de GP e ASP como fármacos antiparkinsonianos, anticonvulsivantes e anti Alzheimer.

In vitro

- Avaliar a atividade inibitória de GP e ASP em receptores de adenosina.
- Avaliar a atividade inibitória de GP e ASP em receptores canabinoides.

In vivo

- Avaliar a toxicidade de GP e ASP em *C. elegans*.
- Avaliar a capacidade de GP e ASP de alterar enzimas de estresse oxidativo em *C. elegans*.
- Avaliar o efeito de GP e ASP em modelo de crise epiléptica induzida por pilocarpina em camundongo.

Ex vivo

- Avaliar expressão de COX-2, GAD1, GluN2B e pGLUT em hipocampo de camundongos submetidos a modelo de indução de crise epiléptica por pilocarpina.
- Avaliar a genotoxicidade em sangue de camundongos submetidos a modelo de indução de crise epiléptica por pilocarpina.

CAPÍTULO II

Geniposide and asperuloside alter the COX-2 and GluN2B receptor expression after pilocarpine-induced seizures in mice

Publicado na revista científica: Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology

Fator de Impacto: 3.6

Doi: <https://doi.org/10.1007/s00210-022-02367-4>

CAPÍTULO III

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

4 DISCUSSÃO GERAL

Geniposídeo possui um amplo espectro de efeitos farmacológicos, incluindo efeitos neuroprotetores, antidiabéticos, hepatoprotetores, anti-inflamatórios, analgésicos, antidepressivos, cardioprotetores, antioxidantes, imuno-reguladores, antitrombóticos e antitumorais (Zhou *et al.*, 2019). GP inibe vias clássicas relacionadas à inflamação, como vias de sinalização NFκB, MAPK e TLR4, e pode aumentar a atividade de algumas enzimas e vias antioxidantes importantes, incluindo peroxidação lipídica hepática, glutationa-S-transferase, glutationa, glutationa peroxidase e superóxido dismutase, protegendo contra lesões por estresse oxidativo (Gao; Feng, 2022). Em alguns estudos o asperulosídeo demonstrou propriedades no tratamento da obesidade, câncer e infecções bacterianas (Chan *et al.*, 2020). ASP tem estado amplamente envolvido na pesquisa de algumas doenças inflamatórias, incluindo lesão pulmonar aguda, nefropatia e artrite reumatoide (Chan *et al.* 2020).

Já se sabe que a absorção, distribuição, metabolismo e excreção dos medicamentos após a administração afetam significativamente os seus efeitos biológicos. Neste trabalho avaliamos as propriedades farmacológicas de GP e ASP através de predições ADMETox no software Molispiration. Para avaliar o potencial uso desses compostos como fármacos usamos como base a regra dos 5 de Lipinski (Lipinski, 2004), que leva em consideração uma série de características de fármacos já utilizados na terapêutica e sua semelhança molecular aos compostos testados. As regras são: massa molecular < 500 Da; coeficiente de partição octanol/água calculado (CLogP) < 5; número de doadores de ligações de hidrogênio < 5; e número de aceptores de ligações de hidrogênio <10 (Walters, 2012). GP cumpre todos os requisitos da regra dos 5 de Lipinski. Já o ASP viola uma das regras possuindo 11 aceptores de pontes de hidrogênio.

Devido à existência da barreira hematoencefálica, muitos fármacos têm efeitos terapêuticos limitados nas doenças do SNC. Através do programa CBligand, avaliamos a capacidade de GP e ASP de passar através da BHE, ambos possuem baixa permeabilidade, sendo pouco provável que passem através de difusão passiva pela barreira. Entretanto, GP e ASP possuem uma molécula de glicose em sua estrutura química, através de análises de docking molecular sugerimos que esses compostos podem atravessar a BHE de maneira ativa, utilizando o transportador de glicose GLUT1.

A falta de toxicidade do composto selecionado é considerada um fator importante para selecionar um componente como potencial terapêutico (Segall; Barber, 2014).

Avaliamos a toxicidade de GP e ASP, tanto em modelo *in silico*, quanto *in vivo* em *C. elegans*. Ambos os compostos demonstraram baixa toxicidade, ASP demonstrou ser ligeiramente mais tóxico que GP.

Nas últimas duas décadas, as abordagens de descoberta de medicamentos auxiliada por computador ganharam força significativa no desenvolvimento e testes farmacológicos (Elkadeed et al., 2023). O *docking* molecular é um método *in silico* eficaz para estudar as interações moleculares entre proteínas e moléculas candidatas a medicamentos. O acoplamento molecular e os cálculos *in silico* são abordagens baseadas em simulação que podem ser usadas para prever moléculas apropriadamente ligadas aos sítios ativos de enzimas (Sadeghi et al., 2021). Através de análises de *docking* molecular, observamos que tanto GP quanto o ASP possuem uma afinidade de ligação com as enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase, sendo comparada com a galantamina, um inibidor colinesterásico clássico.

A atividade antioxidante de GP e ASP foi avaliada através de ensaios realizados com linhagens de *C. elegans* geneticamente modificadas. Ambos os compostos demonstraram atividade antioxidante, GP parece atuar restaurando os níveis da enzima SOD-3 e ASP na enzima GST-4, após danos induzidos por peróxido de hidrogênio.

Até o momento nenhum dos dois compostos foi avaliado em modelo de crise epiléptica induzida por pilocarpina. Em nosso estudo, observamos que ambos compostos foram capazes de aumentar a latência para a primeira crise neste modelo, e diminuir a ocorrência de crises. ASP em conjunto com a pilocarpina demonstrou aumentar a frequência de danos ao DNA, avaliada pelo ensaio cometa. Os mecanismos pelos quais GP e ASP podem atenuar as crises epilépticas não estão bem definidos. No entanto já se demonstrou que GP (10 e 20 mg/kg) foi capaz de atenuar crises epilépticas induzidas por eletrochoque em camundongos, provavelmente através da regulação negativa de vias inflamatórias (Wei et al., 2018). Além disso, outros estudos focaram na atividade anti-inflamatória de GP, demonstrando sua efetividade na regulação de vias inflamatórias (Ran et al., 2021; Zhou et al., 2019). De modo semelhante, ASP (20, 40 e 80 mg/kg) demonstrou apresentar atividade anti-inflamatória em modelo de inflamação induzida por LPS em camundongos, reduzindo a expressão de TNF- α e IL-1 β e IL-6 (Qiu et al., 2018). Devido a importância dos mecanismos neuroinflamatórios no início e prolongamento das crises epilépticas, sugere-se que as propriedades anti-inflamatórias de GP e ASP podem atenuar as crises epilépticas induzidas por PILO em camundongos.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesta tese o potencial de GP e ASP como fármacos atuantes no SNC foi avaliado, e observamos que ambos os compostos possuem boas características farmacológicas, porém, baixa permeabilidade pela barreira hematoencefálica. Através de análises de *docking* molecular sugerimos um mecanismo de passagem ativa de GP e ASP até o SNC.

Ambos os compostos avaliados demonstraram potencial como fármacos anticonvulsivantes em camundongos, bem como baixa toxicidade nas análises *in silico* e *in vivo*. ASP demonstrou ser mais tóxico que GP, devido à semelhança de ambos os compostos nos resultados obtidos, futuros estudos devem focar na atividade de GP. Com análises de *docking* molecular observamos que GP e ASP possuem alta afinidade de ligação com acetilcolinesterase e butirilcolinesterase, que pode ser um dos mecanismos de ação, que levam a diminuição das crises epiléticas no modelo de pilocarpina. GP e ASP também demonstraram atividade antioxidantes no modelo *de C. elegans*, e devido a importância do estresse oxidativo na fisiopatologia da epilepsia, esta pode ser outra forma de redução de crises epiléticas induzidas em camundongos.

Antes da avaliação clínica de GP e ASP, mais análises são necessárias, visando principalmente esclarecer os seus mecanismos de ação e possíveis efeitos farmacológicos adicionais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, J. et al. Novel therapeutic interventions for combating Parkinson's disease and prospects of Nose-to-Brain drug delivery. **Biochemical pharmacology**, v. 195, 1 jan. 2022.

AHV, S.; KR, C.; P, J. Non-motor features of Parkinson disease. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 18, n. 8, p. 509, 1 ago. 2017.

AMBROGINI, P. et al. Excitotoxicity, neuroinflammation and oxidant stress as molecular bases of epileptogenesis and epilepsy-derived neurodegeneration: The role of vitamin E. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, v. 1865, n. 6, p. 1098–1112, 2019.

BHARATE, S. S.; MIGNANI, S.; VISHWAKARMA, R. A. Why Are the Majority of Active Compounds in the CNS Domain Natural Products? A Critical Analysis. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 61, n. 23, p. 10345–10374, 13 dez. 2018.

CAMPBELL, Erin M.; FARES, Hanna. Roles of CUP-5, the *Caenorhabditis elegans* orthologue of human TRPML1, in lysosome and gut granule biogenesis. **BMC cell biology**, [s. l.], v. 11, 2010. Disponível em:

CAO, J. et al. Occurrence and Biological Activities of Phenylpropionyl Iridoids. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 4, p. 292–309, 31 jan. 2019.

CHAN, Y. et al. Emerging therapeutic potential of the iridoid molecule, asperuloside: A snapshot of its underlying molecular mechanisms. **Chemico-Biological Interactions**, v. 315, p. 108911, 5 jan. 2020.

CHEN, Z. Z. et al. Influence of borneol and muscone on geniposide transport through MDCK and MDCK-MDR1 cells as blood-brain barrier in vitro model. **International journal of pharmaceutics**, v. 456, n. 1, p. 73–79, 1 nov. 2013.

DILUCA, M.; OLESEN, J. The cost of brain diseases: A burden or a challenge? **Neuron**, v. 82, n. 6, p. 1205–1208, 18 jun. 2014.

DINDA, B. et al. Therapeutic potentials of plant iridoids in Alzheimer's and Parkinson's diseases: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 169, p. 185–199, 1 maio 2019.

DISABATO, D. J.; QUAN, N.; GODBOUT, J. P. Neuroinflammation: The Devil is in the Details. **Journal of neurochemistry**, v. 139, n. Suppl 2, p. 136, 1 out. 2016.
DUGGER, B. N.; DICKSON, D. W. Pathology of Neurodegenerative Diseases. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 9, n. 7, 2017.

ELKAEED, E. B. et al. Computer-assisted drug discovery of potential natural inhibitors of the SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase through a multi-phase in silico approach. **Antiviral therapy**, v. 28, n. 5, 5 set. 2023.

FIEST, K. M. et al. Prevalence and incidence of epilepsy: A systematic review and meta-analysis of international studies. **Neurology**, v. 88, n. 3, p. 296, 1 jan. 2017.

FISHER, R. S. et al. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, n. 4, p. 475–482, 1 abr. 2014.

FUJITA, K. et al. Therapeutic Approach to Neurodegenerative Diseases by Medical Gases: Focusing on Redox Signaling and Related Antioxidant Enzymes. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, 2012.

GAO, S.; FENG, Q. The Beneficial Effects of Geniposide on Glucose and Lipid Metabolism: A Review. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 16, p. 3365, 2022.

GUO, L. X. et al. Glucagon-like peptide 1 receptor plays a critical role in geniposide-regulated insulin secretion in INS-1 cells. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 33, n. 2, p. 237–241, fev. 2012.

HIRATA, T. et al. Anti-obesity compounds in green leaves of *Eucommia ulmoides*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 6, p. 1786–1791, 15 mar. 2011.

HARTUNG, Thomas *et al.* Integrated testing strategies for safety assessments. **ALTEX**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 3–18, 2013.

HE, Jingyu et al. Asperuloside and Asperulosidic Acid Exert an Anti-Inflammatory Effect via Suppression of the NF- κ B and MAPK Signaling Pathways in LPS-Induced RAW 264.7 Macrophages. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 19, n. 7, 2018.

HERSH, Bradley M.; HARTWIEG, Erika; HORVITZ, H. Robert. The *Caenorhabditis elegans* mucolipin-like gene *cup-5* is essential for viability and regulates lysosomes in multiple cell types. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 99, n. 7, p. 4355–4360, 2002.

HUNT, Piper Reid. The *C. elegans* model in toxicity testing. **Journal of Applied Toxicology**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 50, 2017.

JIA, R. X. et al. Effects of physical activity and exercise on the cognitive function of patients with Alzheimer disease: a meta-analysis. **BMC Geriatrics**, v. 19, n. 1, 2 jul. 2019.

JIANG, Y. Q. et al. Geniposide Prevents Hypoxia/Reoxygenation-Induced Apoptosis in H9c2 Cells: Improvement of Mitochondrial Dysfunction and Activation of GLP-1R and the PI3K/AKT Signaling Pathway. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 1, p. 407–421, 1 jul. 2016.

JOE, E.; RINGMAN, J. M. Cognitive symptoms of Alzheimer's disease: clinical management and prevention. **BMJ**, v. 367, 6 dez. 2019.

KALIA, L. V.; LANG, A. E. Parkinson's disease. **Lancet** (London, England), v. 386, n. 9996, p. 896–912, 29 ago. 2015.

KNIGHT, Andrew W. *et al.* Evaluation of high-throughput genotoxicity assays used in profiling the US EPA ToxCast chemicals. **Regulatory toxicology and pharmacology : RTP**, [s. l.], v. 55, n. 2, p. 188–199, 2009.

KUWABARA, P. E.; O'NEIL, N. The use of functional genomics in *C. elegans* for studying human development and disease. **Journal of inherited metabolic disease**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 127–138, 2001.

LENG, F.; EDISON, P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? **Nature Reviews Neurology** 2020, 17:3, v. 17, n. 3, p. 157–172, 14 dez. 2020.

LI, H. M. et al. Baicalin and Geniposide Inhibit Polarization and Inflammatory Injury of OGD/R-Treated Microglia by Suppressing the 5-LOX/LTB4 Pathway. **Neurochemical Research**, v. 46, n. 7, p. 1844, 1 jul. 2021.

LIPINSKI, C. A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. **Drug discovery today**. Technologies, v. 1, n. 4, p. 337–341, dez. 2004.

LU, T. et al. Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. **Nature**, 429:6994, v. 429, n. 6994, p. 883–891, 9 jun. 2004.

LV, C. et al. Geniposide attenuates mitochondrial dysfunction and memory deficits in APP/PS1 transgenic mice. **Current Alzheimer research**, v. 11, n. 6, p. 580–587, 14 jul. 2014.

MA, S. et al. Geniposide protects PC12 cells from lipopolysaccharide-evoked inflammatory injury via up-regulation of miR. **Artificial Cells Nanomed Biotechnology**, 145-5p. v. 47, n. 1, p. 2875–2881, 4 dez. 2019.

MA, T. et al. Hepatoprotective effects of geniposide in a rat model of nonalcoholic steatohepatitis. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, n. 4, p. 587–593, abr. 2011.

MANZIONE, M. G. et al. Phytochemical and pharmacological properties of asperuloside, a systematic review. **European journal of pharmacology**, v. 883, 15 set. 2020.

MARASCO, R. A. Economic burden of Alzheimer disease and managed care considerations. **The American journal of managed care**, v. 26, n. 8 Suppl, p. S171–S183, 1 ago. 2020.

MAZARI, A. M. A. et al. The Multifaceted Role of Glutathione S-Transferases in Health and Disease. **Biomolecules**, v. 13, n. 4, 1 abr. 2023.

NERI, S. et al. Epilepsy in neurodegenerative diseases. *Epileptic disorders* : international epilepsy journal with videotape, v. 24, n. 2, p. 249–273, 1 abr. 2022.

PANKOKE, H.; BOWERS, M. D.; DOBLER, S. The interplay between toxin-releasing β -glucosidase and plant iridoid glycosides impairs larval development in a generalist caterpillar, *Grammia incorrupta* (Arctiidae). **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 42, n. 6, p. 426–434, jun. 2012.

PARK, J. S. et al. A Triterpenoid Lupeol as an Antioxidant and Anti-Neuroinflammatory Agent: Impacts on Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. **Nutrients**, v. 15, n. 13, p. 3059, 7 jul. 2023.

PATEL, M. N. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and epilepsy. **Free Radical Research**, nov. 2002.

PARK, Hae Eun H.; JUNG, Yoonji; LEE, Seung Jae V. Survival assays using *Caenorhabditis elegans*. **Molecules and Cells**, [s. l.], v. 40, n. 2, p. 90, 2017.

PRINGSHEIM, T. et al. The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. **Movement Disorders**, v. 29, n. 13, p. 1583–1590, 1 nov. 2014.

QU, K. et al. An LC-MS method for simultaneous determination of five iridoids from Zhi-zi-chi Decoction in rat brain microdialysates and tissue homogenates: Towards an in depth study for its antidepressive activity. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 965, p. 206–215, 15 ago. 2014.

SADEGHI, M. et al. In silico study of garlic (*Allium sativum* L.)-derived compounds molecular interactions with α -glucosidase. **In silico pharmacology**, v. 9, n. 1, 7 jan. 2021.

SALIM, S. Oxidative Stress and the Central Nervous System. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 360, n. 1, p. 201, 1 jan. 2017.

SASO, L.; FIRUZI, O. Pharmacological applications of antioxidants: lights and shadows. **Current drug targets**, v. 15, n. 13, p. 1177–1199, 9 dez. 2014.

SCHAPIRA, A. H. V. et al. Novel pharmacological targets for the treatment of Parkinson's disease. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 10, p. 845–854, out. 2006.

SCHELTENS, P. et al. Alzheimer's disease. **The Lancet**, v. 388, n. 10043, p. 505–517, 30 jul. 2016.

SCHULZE-BONHAGE, A. A 2017 review of pharmacotherapy for treating focal epilepsy: where are we now and how will treatment develop? **Expert Opinion on Pharmacotherapy**. Taylor and Francis Ltd, 22 nov. 2017.

SEGALL, M. D.; BARBER, C. Addressing toxicity risk when designing and selecting compounds in early drug discovery. **Drug discovery today**, v. 19, n. 5, p. 688–693, 2014.

SOLTANI KHABOUSHAN, A.; YAZDANPANA, N.; REZAEI, N. Neuroinflammation and Proinflammatory Cytokines in Epileptogenesis. **Molecular Neurobiology**, v. 59, n. 3, p. 1724–1743, 1 mar. 2022.

SONNHAMMER, Erik L.L.; DURBIN, Richard. Analysis of protein domain families in *Caenorhabditis elegans*. **Genomics**, [s. l.], v. 46, n. 2, p. 200–216, 1997.

SWEENEY, M. D.; SAGARE, A. P.; ZLOKOVIC, B. V. Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nature reviews. Neurology*, v. 14, n. 3, p. 133–150, 1 mar. 2018.

TRALAU, Tewes *et al.* Wind of change challenges toxicological regulators. **Environmental health perspectives**, [s. l.], v. 120, n. 11, p. 1489–1494, 2012.

TU, Y. *et al.* Geniposide Attenuates Hyperglycemia-Induced Oxidative Stress and Inflammation by Activating the Nrf2 Signaling Pathway in Experimental Diabetic Retinopathy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, 2021.

UPAGANLAWAR, A. B. *et al.* Interweaving epilepsy and neurodegeneration: Vitamin E as a treatment approach. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 143, p. 112146, 1 nov. 2021.

WALTERS, W. P. Going further than Lipinski's rule in drug design. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 7, n. 2, p. 99–107, fev. 2012.

WANG, C. *et al.* Iridoids: Research Advances in Their Phytochemistry, Biological Activities, and Pharmacokinetics. **Molecules**, v. 25, n. 2, 2020.

WEI, H. *et al.* Geniposide attenuates epilepsy symptoms in a mouse model through the PI3K/Akt/GSK-3 β signaling pathway. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1136–1142, 2018.

YANG, M. *et al.* The Status of Oxidative Stress in Patients with Alcohol Dependence: A Meta-Analysis. **Antioxidants**, v. 11, n. 10, 1 out. 2022.

ZHANG, Z. et al. Geniposide effectively reverses cognitive impairment and inhibits pathological cerebral damage by regulating the mTOR Signal pathway in APP/PS1 mice. **Neuroscience Letters**, v. 720, p. 134749, 16 fev. 2020.

ZHOU, Y. X. et al. Diverse Pharmacological Activities and Potential Medicinal Benefits of Geniposide. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, 2019.

ANEXO 1 – Carta de Aprovação CEUA



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRO-REITORIA DE PESQUISA
Comissão De Ética No Uso De Animais

**CARTA DE APROVAÇÃO**

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 37769

Título: PROSPECÇÃO DE FÁRMACOS ANTICONVULSIVANTES A PARTIR DE COMPOSTOS NATURAIS IRIDÓIDES: GENIPOSÍDEO E ASPERULOSÍDEO

Vigência: 01/11/2019 à 31/12/2023

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

PATRÍCIA PEREIRA - coordenador desde 01/11/2019
GILSANE LINO VON POSER - pesquisador desde 01/11/2019
Wesley Roberto de Aguiar - Aluno de Mestrado desde 01/11/2019
Fernanda Marcela dos Santos - Aluno de Mestrado desde 01/11/2019
Mariana Uccy - Aluno de Doutorado desde 01/11/2019

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 16/09/2019 - Plenarinho - Saguão Térreo do Prédio da Reitoria/ Campus Centro/ UFRGS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 472 camundongos (Mus musculus) CF-1 machos, adultos com até dois meses de idade, peso médio de 25g, fornecidos pelo Centro de Reprodução e Pesquisa (CREAL); de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Sexta-Feira, 27 de Setembro de 2019

ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA
Coordenador da comissão de ética