

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

BEATRIZ SANTANA MENDONÇA

**Avaliação do efeito do ácido *p*-cumárico sobre timócitos submetidos à
senescência *in vitro* com D-galactose**

MACEIÓ, AL

2022

BEATRIZ SANTANA MENDONÇA

Avaliação do efeito do ácido *p*-cumárico sobre timócitos submetidos à senescência *in vitro* com D-galactose

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao corpo docente do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Alagoas, realizado sob orientação da Prof^a Dr^a Maria Danielma dos Santos Reis.

MACEIÓ, AL

2022

**Catálogo na fonte Universidade
Federal de Alagoas Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecária: Taciana Sousa dos Santos – CRB-4 – 2062

M539a Mendonça, Beatriz Santana.

Avaliação do efeito do ácido p-cumárico sobre timócitos submetidos à senescência *in vitro* com D-galactose / Beatriz Santana Mendonça. – 2022.
33 f. : il. color.

Orientadora: Maria Danielma dos Santos Reis.

Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas: Bacharelado) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2022.

Bibliografia: f. 29-33.

1. Senescência. 2. Ácido p-cumárico. 3. Timócitos. 4. D-galactose. I. Título.

CDU: 57.017.6

BEATRIZ SANTANA MENDONÇA

Avaliação do efeito do ácido *p*-cumárico sobre timócitos submetidos à senescência *in vitro* com D-galactose

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao corpo docente do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Alagoas, realizado sob orientação da Professora Dr^a Maria Danielma dos Santos Reis.



Documento assinado digitalmente
Maria Danielma dos Santos Reis
Data: 08/02/2022 12:52:30-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof^a Dr^a Maria Danielma dos Santos Reis (Orientadora)

Composição da banca examinadora:



Documento assinado digitalmente
Marvin Paulo Lins
Data: 09/02/2022 15:03:54-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof. Dr. Marvin Paulo Lins – UFAL/ICBS



Documento assinado digitalmente
Jamyllle Nunes de Souza Ferro
Data: 09/02/2022 16:57:59-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof^a Dr^a Jamyllle Nunes de Souza Ferro – UFAL/ICBS

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer em primeiro lugar à toda minha família, em especial a minha mãe Lílian Santana e a minha avó Regina Adeane, que convivem comigo todos os dias e que diariamente me deram o suporte e força necessários durante a minha graduação. Agradeço também às minhas tias Natália Pimentel e Eveline Pimentel e ao meu primo Túlio Montenegro, que sempre me incentivaram a seguir os meus objetivos e persistir o máximo possível. Sem dúvida o suporte da minha família durante esses anos foi essencial para a minha conclusão de curso.

Agradeço também aos meus amigos e amigas que passaram pelo curso comigo e que sempre me apoiaram e acreditaram em mim muito mais do que eu mesma. Agradeço a todos os professores do ICBS com quem tive o privilégio e a oportunidade de aprender durante a graduação, levarei os ensinamentos de vocês para a vida e para a minha carreira profissional.

Agradeço a todos os integrantes do Laboratório de Biologia Celular, onde tive a oportunidade de fazer iniciação científica e conhecer pesquisadores incríveis. Faço um agradecimento especial ao Rafael Calado e a Laura Morales, que foram meus parceiros durante dois ciclos do PIBIC e me auxiliaram em diversos experimentos. Agradeço também a todo o grupo de pesquisa do qual faço parte, ao doutorando Felipe Porto e ao Prof. Dr. Marvin Lins. Também deixo meu agradecimento às novas integrantes do nosso grupo, Aline Gabrielly e Adrielly Suely. Agradeço à técnica do laboratório Juliane Barreto por ter me auxiliado nos experimentos utilizando o citômetro. E por fim gostaria de agradecer a duas pessoas que são grandes inspirações para mim, à Prof^a Dr^a Salete Smaniotto que acreditou em mim, me abriu a primeira porta para o LBC e é uma professora que sempre lembrarei. E agradeço também à minha orientadora Prof^a Dr^a Maria Danielma, muito obrigada por sempre ter confiado em mim e me dado todo o suporte, ter tido a oportunidade de desenvolver projetos de iniciação científica com você foi muito importante para a minha construção como pesquisadora.

RESUMO

A senescência é um processo que afeta diretamente o sistema imunológico com o aumento da idade e acarreta o desenvolvimento de patologias em diferentes tecidos do corpo, principalmente em idosos. Neste sentido, produtos que apresentam atividade antioxidante como o ácido *p*-cumárico (ApC) podem ser úteis no combate ao envelhecimento. Assim, este trabalho objetivou avaliar o efeito do ApC sobre timócitos tratados com D-galactose (D-gal) *in vitro*, especificamente analisando a viabilidade celular, perfil das suas subpopulações e adesão às células epiteliais tímicas (TECs). Para isso, timócitos obtidos de camundongos C57BL/6 (CEUAs 47/2016; 19/2019) foram tratados *in vitro* com D-gal (0,1, 1, 10 e 20 mg/mL) ou ApC (0,1, 1, 5, 10 ou 100 μ M) para realização de teste de viabilidade celular pelo método de captação do iodeto de propídeo (PI). Após verificação da viabilidade, foi realizado o co-tratamento com D-gal (20 mg/mL) e ApC (5 μ M) por 24 horas ou pré-tratamento com ApC (5 μ M) por uma hora para verificação da viabilidade celular, da imunofenotipagem por citometria de fluxo e da adesão heterocelular utilizando TECs da linhagem 2BH4. Foi possível observar que a D-gal diminuiu a viabilidade dos timócitos, principalmente da subpopulação duplo-positiva para CD4 e CD8 e o pré-tratamento com ApC reverteu de maneira significativa essa diminuição. Em relação a adesão, o tratamento com D-gal por 24 horas diminuiu a capacidade de adesão dos timócitos comparado ao controle e o pré-tratamento com ApC reverteu essa diminuição de maneira significativa. Assim, pode-se concluir que uma alta concentração de D-gal afeta a sobrevivência dos timócitos e a subpopulação duplo-positiva e que o pré-tratamento com o ácido *p*-cumárico pode ter efeito protetor sobre os timócitos expostos a D-gal. Também foi observado que o tratamento com a D-galactose prejudica a adesão dos timócitos e que o ApC mostrou ter efeito benéfico sobre a adesão.

Palavras-chave: Senescência, Timócitos, Produtos naturais

ABSTRACT

Senescence is a process that directly affects the immune system during aging, contributing to the development of pathologies in different tissues of the body, especially in the elderly. In this sense, products with antioxidant activity such as the p-coumaric acid (pCA) can be useful in combating these alterations. Thus, this work aimed to evaluate the effect of pCA on thymocytes treated with D-galactose (D-gal) *in vitro*, specifically analyzing the cell viability, the thymocyte subpopulations and adhesion to thymic epithelial cells (TECs). For this, thymocytes obtained from C57BL/6 mice (CEUAs 47/2016; 19/2019) were treated *in vitro* with D-gal (0.1, 1, 10 and 20 mg/mL) or pCA (0.1, 1, 5, 10 or 100 μ M) to test cell viability by the method of capturing propidium iodide (PI). After verification of viability, co-treatment with D-gal (20 mg/mL) and pCA (5 μ M) for 24 hours or pre-treatment with pCA (5 μ M) for one hour was performed to analyze cell viability, immunophenotyping by flow cytometry and heterocellular adhesion using TECs of the 2BH4 cell line. It was possible to observe that D-gal decreased the viability of thymocytes, mainly in the double-positive subpopulation for CD4 and CD8, and pretreatment with pCA significantly reversed this effect. Regarding adhesion, treatment with D-gal for 24 hours diminished the adhesion capacity of thymocytes compared to control and pretreatment with pCA significantly prevented this decrease. Thus, it can be concluded that a high concentration of D-gal affects the survival of thymocytes and the double-positive subpopulation and that pretreatment with p-coumaric acid may have a protective effect on thymocytes exposed to D-gal. It was also observed that treatment with D-galactose impairs thymocyte adhesion and that pCA was shown to have a beneficial effect on adhesion.

Keywords: Senescence, Thymocytes, Natural products

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
1.1	Senescência Celular	8
1.2	Timo	10
1.3	D-galactose	13
1.4	Ácido <i>p</i> -cumárico	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo geral	17
2.2	Objetivos específicos	17
3	MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1	Obtenção de timócitos	18
3.2	Tratamentos <i>in vitro</i>	18
3.3	Ensaio de viabilidade celular	18
3.4	Imunofenotipagem por citometria de fluxo	18
3.5	Avaliação da adesão dos timócitos às TEC's	19
3.6	Análises estatísticas	19
4	RESULTADOS	20
4.1	Análise da viabilidade de timócitos após tratamento <i>in vitro</i> com D-galactose	20
4.2	Análise da viabilidade de timócitos após tratamento <i>in vitro</i> com ácido <i>p</i> -cumárico	20
4.3	Efeito do ácido <i>p</i> -cumárico na viabilidade de timócitos expostos à D-galactose <i>in vitro</i>	21
4.4	Efeito do ácido <i>p</i> -cumárico sobre as subpopulações de timócitos expostos à D-galactose <i>in vitro</i>	22
4.5	Efeito do ácido <i>p</i> -cumárico sobre a adesão dos timócitos expostos à D-galactose <i>in vitro</i>	24
5	DISCUSSÃO	26
6	CONCLUSÃO	29
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

1 INTRODUÇÃO

1.1 Senescência celular

A senescência ou envelhecimento celular é um processo que acontece naturalmente no organismo, caracterizado por um declínio da função celular e pelo acúmulo de defeitos moleculares que resultam na parada irreversível do ciclo celular. Além de acontecer de maneira natural, alguns fatores podem contribuir para que a senescência ocorra de forma acelerada, como por exemplo o estresse oxidativo e a exposição crônica a diferentes tipos de radiação, que causam danos diretos ao DNA e, por isso prejudicam o funcionamento normal das células (PALACIO *et al.*, 2019).

As células senescentes apresentam uma série de modificações, como o encurtamento de telômeros, o aumento da área nuclear e o aumento na expressão de genes relacionados à parada do ciclo celular, como os genes para as proteínas p21 e p53 (JU *et al.*, 2007). Além disso, já foi observado que as células senescentes em cultura geralmente tornam-se maiores, achatadas, com a presença de vacúolos e podem ser multinucleadas (MUÑOZ-ESPÍN; SERRANO, 2014). Essas características fazem com que as células senescentes se diferenciem de outros tipos celulares que também não se dividem, como as células quiescentes, que não apresentam atividade da enzima β -galactosidase associada à senescência (SA- β -GAL), presente em células senescentes e que é um dos ensaios mais utilizados para visualização da senescência (MUÑOZ-ESPÍN; SERRANO, 2014; DMRI *et al.*, 1995). Além das características já apresentadas, as células em senescência passam a apresentar um fenótipo secretor associado a senescência (FSAS), marcado principalmente pela secreção de citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas IL-6 e IL-8, fatores de crescimento, quimiocinas e pelo fator de transcrição NF-kB, contribuindo para uma inflamação sistêmica (ACOSTA *et al.*, 2008; COPPE *et al.*, 2008).

Um dos fatores responsáveis por acelerar o envelhecimento celular é o estresse oxidativo, que causa disfunção e até a morte de células, acarretando no envelhecimento celular (HARMAN, 1956). Esse processo é um mecanismo de lesão celular mediado pelo acúmulo de radicais livres, dentre eles, as espécies reativas de oxigênio (EROs). A produção normal de EROs é de extrema importância, pois elas estão envolvidas na regulação de processos relacionados a manutenção da homeostase celular e diversas funções celulares. Porém, sua produção excessiva

induz mutações somáticas e causa danos irreversíveis, principalmente para o organismo envelhecido, fazendo com que haja um desequilíbrio entre moléculas antioxidantes e substâncias oxidantes (KUMAR; PANDEY, 2015; HUSSAIN *et al.*, 2016). Essas observações são a base da teoria do envelhecimento por radicais livres proposta em 1956 por Denham Harman.

A teoria dos radicais livres é corroborada por uma série de estudos experimentais. Foi observado que um nível elevado de EROs no organismo de indivíduos com idade avançada está relacionado a uma diminuição na produção de moléculas antioxidantes. Além disso, importantes enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), a catalase e a glutathione peroxidase (GPx) passam a ser produzidas em menor quantidade e favorecem o estresse oxidativo (KEDZIORA-KORNATOWSKA *et al.*, 2006; ASHOK; ALI, 1999).

Também já foi visto que o aumento do nível de EROs intracelular a partir do tratamento com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) leva à senescência prematura, assim como o aumento de EROs internamente pode danificar as células a partir da oxidação do DNA, de proteínas e lipídeos (BEN-PORATH; WEINBERG, 2005; BLANDER *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 1998). Os componentes FSAS podem estimular a formação de EROs, ocasionando a senescência em células vizinhas de forma parácrina (ACOSTA *et al.*, 2013). O estresse oxidativo também está presente em doenças relacionadas ao envelhecimento. Neste contexto, foi demonstrado que o estresse oxidativo induz dano celular no cérebro em casos de diabetes, aumentando o nível de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6 e moléculas inflamatórias como NF- κ B (REAGAN *et al.*, 1999; PRABHAKAR, 2013).

As células senescentes acumulam-se nos tecidos à medida que o organismo envelhece, ocasionando diversas alterações moleculares, morfológicas e fisiológicas complexas que contribuem para o aumento na incidência de doenças crônicas, cardiovasculares e neurodegenerativas (FRANCESCHI *et al.*, 2018). Essas doenças relacionadas à idade são caracterizadas por reações inflamatórias de baixo grau em vários tecidos e órgãos, podendo ser causadas tanto por fatores genéticos quanto ambientais (MINATO *et al.*, 2020). Acredita-se que esse acúmulo está diretamente relacionado a uma falha do sistema imunológico em remover as células envelhecidas e estimular a regeneração tecidual.

Porém, a senescência não pode ser vista apenas de maneira negativa, muitos estudos demonstram que ela pode ser benéfica no caso da progressão de algumas

doenças como o câncer, em que a senescência ocorre como forma de supressão tumoral, impedindo a expansão de células pré-cancerosas e reparando o tecido (COLLADO; SERRANO, 2010). Além do câncer, a senescência também pode ser benéfica em casos de fibrose hepática, cardíaca, renal e na fibrose oral, participando na restrição da resposta fibrótica inicial (WIEMANN *et al.*, 2002; ZHU *et al.*, 2013; WOLSTEIN *et al.*, 2010; JUN; LAU, 2010). Mesmo com esses e outros efeitos benéficos, em organismos envelhecidos essa resposta pode ser dificultada devido ao sistema imunológico já estar enfraquecido, levando ao acúmulo das células senescentes em tecidos.

O envelhecimento das células do sistema imune, conhecido como imunosenescência, é caracterizado por alterações significativas na função geral do sistema imunológico ao longo do tempo, ocorrendo uma diminuição na capacidade imunológica adquirida e crescimento nas características imunológicas pró-inflamatórias, o que torna os indivíduos idosos mais suscetíveis ao desenvolvimento de doenças (GORONZY; WEYWAND, 2012). Durante a imunosenescência, um dos principais tipos celulares afetados são as subpopulações de células T, em que o acúmulo dessas células ao entrarem em senescência contribui para o estado inflamatório que ocorre durante o envelhecimento (AKBAR *et al.*, 2016). Sendo o timo o principal responsável pelo desenvolvimento e maturação dessas células, ele acaba sendo diretamente afetado durante a imunosenescência.

1.2 Timo

O timo é um órgão que fica localizado no mediastino e anatomicamente é composto por dois lobos (direito e esquerdo), sendo o lobo direito ligeiramente maior que o esquerdo e é envolvido externamente por uma camada de tecido conjuntivo fibroso. Cada um desses lobos é dividido em lóbulos e possui um microambiente tímico especializado com duas regiões, uma mais externa denominada córtex e outra mais interna denominada medula, sendo essas duas áreas ligadas por uma junção córtico-medular (REZZANI *et al.*, 2014).

O timo é considerado um importante órgão linfoepitelial para desenvolvimento e maturação de células T, caracterizado por ser grande na infância, devido ao fato de precisar estabelecer o repertório inicial de células T, permanecendo homeostático por um tempo, seguido por um lento processo de involução, que continua por toda a fase

adulta (HALE *et al.*, 2021). As células do estroma tímico incluem as células da linhagem não T, como as células epiteliais tímicas (TECs), células endoteliais, células mesenquimais, fibroblastos, células dendríticas e células B. As TECs são subdivididas em corticais (cTECs) e medulares (mTECs), sendo as cTECs essenciais para os eventos iniciais de diferenciação de células T e as mTECs tendo como papel principal estabelecer a autotolerância por meio de seleção negativa e geração de células T regulatórias (Treg) (KLEIN *et al.*, 2014). As células do estroma tímico são responsáveis por fornecer os sinais para o desenvolvimento das células T em diferenciação (timócitos) e para a homeostase do estroma, regulando a timopoiese (HAN; ZÚÑIGA-PFLUCKER, 2021).

A partir do momento que os progenitores de células T entram no timo pela corrente sanguínea, eles migram para a zona subcapsular do córtex tímico e passam pelo estágio de diferenciação duplo-negativo (DN), onde eles não expressam nenhuma das moléculas co-receptoras CD4 e CD8 (OVERGAARD *et al.*, 2014). É neste momento que ocorre o rearranjo do receptor de célula T (TCR β) e formação posterior do pré-TCR, que faz com que o timócito se diferencie e passe a expressar as duas moléculas CD4 e CD8, sendo chamados de duplo-positivos (DP) (SWAT *et al.*, 2006). Nesse momento novamente a sinalização através do TCR é importante para a sobrevivência dessas células e para a determinação da seleção positiva (IOANNIDIS *et al.*, 2001). Já foi visto que além de estarem presentes nos órgãos-alvo, as células DP podem ter a sua frequência aumentada no sangue periférico em algumas situações patológicas, como por exemplo em doenças autoimunes, porém pouco se sabe sobre a frequência dessas células durante o envelhecimento (PAREL; CHIZZOLINI, 2004).

A parte final da diferenciação das células T ocorre com a interação das moléculas de superfície CD8 e CD4 com as moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I ou II, respectivamente, tornando-se simples-positiva para CD8 ou CD4. Essa ligação depende do TCR, fazendo então uma seleção positiva das duas linhagens. Essa escolha entre CD4 e CD8 também é importante para definir a função efetiva das células em citotóxicas (CD8⁺) e auxiliares (CD4⁺) (WANG; BOSSELUT, 2009). Os timócitos que passarem por esse processo de seleção positiva e se diferenciarem em CD4 ou CD8 migram para a região medular do timo, onde com o auxílio das mTECs irá ocorrer o processo de seleção negativa com a indução da auto-tolerância e eliminação das células T autorreativas, após esse

processo os timócitos selecionados estão aptos para deixar o timo e migrar para a periferia (GRAY *et al.*, 2005).

Quando as funções do sistema imunológico começam a se deteriorar com a idade (imunosenescência), o timo é logo afetado, exibindo alterações relacionadas à involução precoce quando comparada a outros órgãos (BARBOUTI *et al.*, 2020). A involução tímica relacionada à idade é caracterizada pela perda dos timócitos em fase de desenvolvimento e também pela diminuição no número de TEC's, com a substituição do parênquima do timo por tecido adiposo, além da diminuição na geração de novas células e pela redução do tamanho e peso do órgão. Com isso, há um declínio na frequência e na função das células T virgens e um aumento na frequência das células T de memória, causando uma restrição no repertório de células T na periferia que prejudica a resposta imune a novos patógenos e à vacinação (HALE *et al.*, 2021; BARBOUTI *et al.*, 2020; CHIN *et al.*, 2012). Algumas destas mudanças estão resumidas na figura 1.

Figura 1: Resumo das principais mudanças histopatológicas e manifestações clínicas durante a involução tímica

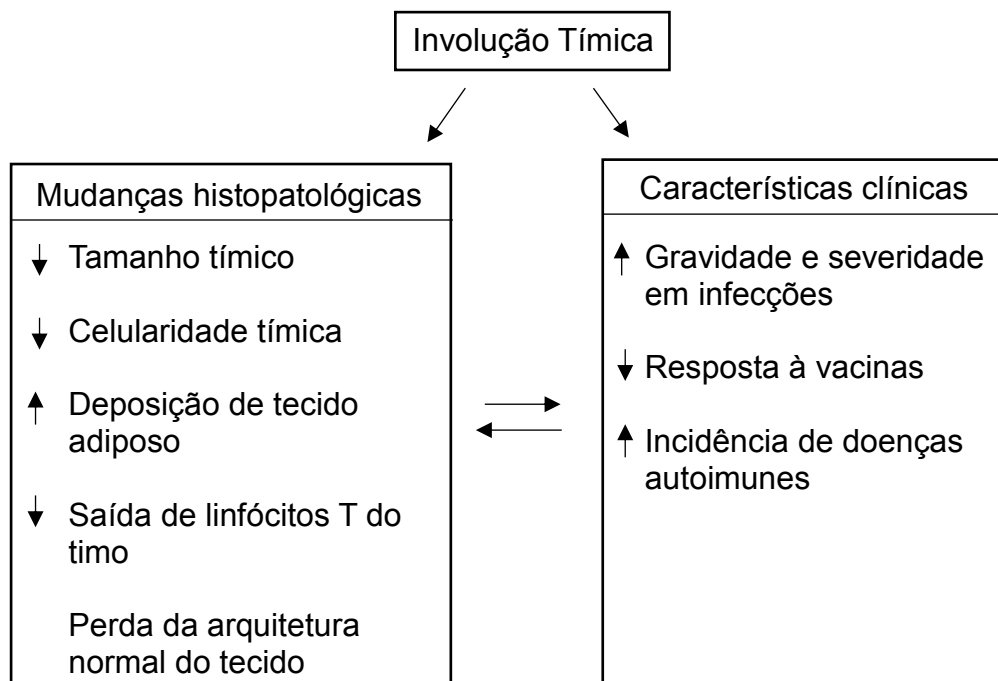


Figura 1. A figura mostra como as mudanças histopatológicas estão relacionadas às características clínicas decorrentes da involução tímica. Adaptado de BARBOUTI, 2020.

Além disso, ocorrem mudanças no microambiente tímico, com alterações na junção córtico-medular, que passa a ficar indefinida e como esse é um local-chave

para seleção positiva/negativa de progenitores de células T, pode contribuir para geração de células T autorreativas (FARINI *et al.*, 2021). Estudos demonstram que durante o envelhecimento há um considerável aumento na inflamação crônica nos indivíduos idosos devido ao aumento do dano crônico induzido pelas células T autorreativas e pelo FSAS. Além disso, ocorre um aumento na geração de células Treg policlonais no timo atrofiado e acúmulo de Treg nos órgãos linfoides secundários periféricos (WANG *et al.*, 2021).

Mesmo que a produção geral do timo diminua com a idade, o órgão é importante para a produção de células T com novas especificidades que podem proteger contra doenças, como por exemplo o câncer e doenças infecciosas (PALMER *et al.*, 2018). Assim, entender os mecanismos envolvidos na senescência do timo é essencial para tentar amenizar esse processo. Para que isso se torne possível de maneira acelerada, pode-se utilizar substâncias que mimetizem o envelhecimento natural do organismo, como é o caso da D-galactose.

1.3 D-galactose

A D-galactose (D-gal) é um açúcar monossacarídeo presente em algumas frutas, vegetais e em produtos lácteos, que tem sido amplamente utilizado como um modelo indutor do envelhecimento por estimular o estresse oxidativo, mimetizando o envelhecimento natural e causando o aparecimento de células senescentes. (ACOSTA; GROSS, 1995; KAVIANI *et al.*, 2017). Em animais, a D-gal é normalmente metabolizada em glicose pela D-galactoquinase e galactose-1-fosfato uridil transferase, mas quando administrada em altas concentrações, a aldose redutase catalisa a D-gal em galactitol, que não é metabolizado pelo organismo e se acumula nas células, levando ao aparecimento de EROs, e consequente estresse oxidativo (BAETA-CORRAL *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 1999; WU *et al.*, 2008).

Figura 2: Molécula de D-galactose

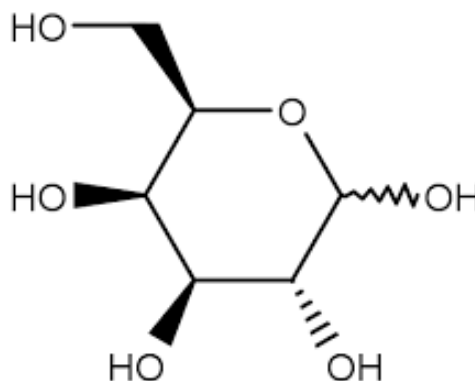


Figura 2. A figura mostra a molécula de D-galactose, que possui fórmula molecular $C_6H_{12}O_6$. Fonte da imagem: extrasynthese.com

Além disso, a D-galactose acaba gerando produtos finais de glicação avançada (AGE's) os quais provocam o aumento de EROs nos tecidos e pode acelerar as mudanças relacionadas ao envelhecimento no organismo, sendo relacionado com a patogênese da doença de Alzheimer, por exemplo (KAWATA *et al.*, 2021; BYUN *et al.*, 2017). Esse acúmulo de AGE's e EROs pode levar ao aumento nos níveis de malondialdeído (MDA) e a diminuição na atividade de algumas enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD) e a glutathione peroxidase (GPx) (SADIGH-ETEGHAD *et al.*, 2017). O acúmulo de AGE's também pode ser relacionado a alterações neurológicas e comportamentais semelhantes àsquelas encontradas em pessoas idosas. Estudos demonstraram que camundongos tratados com a D-galactose apresentam mudanças comportamentais, passando a apresentar déficits cognitivos e motores relacionados ao envelhecimento (LEI *et al.*, 2008; SONG *et al.*, 1999; BANJI *et al.*, 2013).

A D-galactose pode induzir efeitos de envelhecimento em diversos órgãos, aumentando também os níveis de apoptose e inflamação (REHMAN *et al.*, 2017). O sistema imunológico pode ser diretamente afetado pela administração de D-galactose, tendo o timo como um importante órgão-alvo. Já foi demonstrado em um trabalho recente que o tratamento com a D-galactose afeta o tamanho e o peso do timo e causa uma desorganização em seu microambiente, deixando a junção córtico-medular indefinida e prejudicando a diferenciação das células T (GUO *et al.*, 2020). Além disso, nesse mesmo artigo foi observado que a D-galactose alterou o subconjunto de células

T e afetou de maneira negativa a proliferação dos timócitos, além de aumentar a sua apoptose.

A maioria dos estudos utilizando a D-galactose são realizados *in vivo* principalmente para conseguir analisar as mudanças comportamentais nos animais, porém outros estudos já demonstraram que a D-gal também tem o potencial de induzir o envelhecimento celular *in vitro* (XU *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2015).

Dessa forma, se torna importante não só entender os mecanismos envolvidos na senescência celular, mas também buscar uma forma de inibir esse processo, diversos trabalhos têm utilizado produtos naturais com efeito antioxidante como inibidores do envelhecimento, como o trabalho de GUO e colaboradores (2020) que utilizou o ácido gálico (GA) como forma de tratamento. Assim, substâncias com potencial efeito citoprotetor descrito na literatura precisam ser mais estudadas em trabalhos envolvendo a senescência, como é o caso do ácido *p*-cumárico.

1.4 Ácido *p*-cumárico

O ácido *p*-cumárico (ApC) é um polifenol encontrado em diversos alimentos como uvas, vinho, tomate, cenoura, entre outros (ALAMED *et al.*, 2009). O ApC possui inúmeras atividades farmacológicas e biológicas, incluindo efeito quimioprotetor, cardioprotetor e antioxidante, com a eliminação de radicais livres, tendo efeito protetor para as células e podendo atuar como um agente imunomodulador no organismo envelhecido (GODARZI *et al.*, 2020). Além dessas atividades, já foi mostrado que o ácido *p*-cumárico possui efeito antimicrobiano e antiviral, atividade antimutagênica e antidiabética (PEI *et al.*, 2016; BAHADORAN *et al.*, 2013).

Figura 3: Molécula do Ácido *p*-cumárico

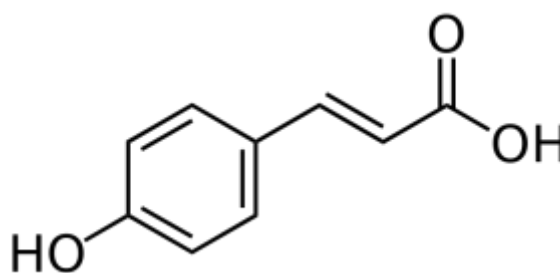


Figura 3. A figura mostra a molécula do ácido *p*-cumárico, que possui fórmula molecular $C_9H_8O_3$.
Fonte da imagem: fciencias.com

O ácido *p*-cumárico faz parte da família dos ácidos hidroxicinâmicos e é sintetizado pela via do chiquimato, tendo fenilalanina e tirosina como precursores. Após sintetizado, o ApC pode ser transformado em ácidos fenólicos e metabólitos secundários, podendo ser encontrado na forma livre ou ligada (EL-SEEDI *et al.*, 2012). Na dieta ele geralmente é encontrado em baixa concentração, porém apresenta um teor alto em algumas espécies de cogumelos em que pode ser encontrado (PEI *et al.*, 2016).

A atividade antioxidante do ácido *p*-cumárico é possível devido a presença do grupo fenil hidroxila, possuindo atividade antioxidante semelhante aos ácidos cafeico e ferúlico, porém a sua capacidade de eliminação de radicais livres em células ainda não foi bem explorada com relação a outros antioxidantes análogos (PEI *et al.*, 2016; MATHEW *et al.*, 2015). Quando comparado ao ácido ferúlico, já foi observado que o ApC pode eliminar uma maior quantidade de espécies reativas de oxigênio em células do pulmão humano e adenocarcinoma de cólon (BOUZAIENE *et al.*, 2015). Porém, são poucos os trabalhos que mostram a atividade do ácido *p*-cumárico sobre o timo envelhecido.

Com base nesses fatores e sabendo que o envelhecimento é um problema de saúde pública, percebe-se a importância de entender como ocorre a senescência celular, analisando os mecanismos por trás desse processo. Assim, a busca por substâncias como o ácido *p*-cumárico que possam minimizar os efeitos da senescência no sistema imunológico e principalmente no timo é um fator fundamental que pode contribuir para encontrar um modelo de combate ao envelhecimento.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do ácido *p*-cumárico sobre os timócitos tratados com D-galactose *in vitro* em modelo de senescência celular.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Avaliar a viabilidade de timócitos após tratamento *in vitro* com D-galactose e ácido *p*-cumárico;
- 2) Avaliar o efeito do tratamento com ácido *p*-cumárico sobre o perfil das subpopulações de timócitos expostos à D-galactose *in vitro*;
- 3) Avaliar o efeito do tratamento com ácido *p*-cumárico sobre a adesão dos timócitos expostos à D-galactose *in vitro*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção de timócitos

Os timos foram obtidos de camundongos C57BL/6 (CEUAs 47/2016; 19/2019) e macerados com o auxílio do êmbolo de uma seringa em poço de placa de 12 poços com 1 mL de tampão fosfato salina (PBS) contendo 2% de soro bovino fetal (SBF) para a liberação dos timócitos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi recolhido e as células contadas em câmara de Neubauer sob o método de exclusão por azul de Trypan 0,02% ao microscópio de luz. Após a contagem, o volume de células foi ajustado para a realização dos testes experimentais.

3.2 Tratamentos *in vitro*

Os timócitos (1×10^6 células) foram tratados em experimentos independentes com D-galactose (D-gal) nas concentrações de 0,1, 1, 10 e 20 mg/mL diluídos em meio RPMI contendo 10% de SBF ou ácido *p*-cumárico (ApC) nas concentrações de 0,1, 1, 5, 10 ou 100 μ M solubilizado em DMSO e plaqueados em meio RPMI contendo 10% de SBF. Os timócitos foram colocados em placas de 96 poços e deixados por 24 horas em estufa contendo 5% de CO₂ para verificação da viabilidade celular e determinação das concentrações que serão usadas nos experimentos posteriores. Em outros experimentos, os timócitos foram expostos ao ApC por 1 h e tratados por 24 horas com D-gal ou co-tratados com D-gal e ApC por 24 horas. Após realização dos esquemas de tratamento, os timócitos foram coletados para realização dos experimentos.

3.3 Ensaio de viabilidade celular

Após as 24 horas de tratamento, as células em suspensão foram centrifugadas, incubadas com iodeto de propídio (PI), que é um marcador de célula não viável, e encaminhadas para leitura em citômetro de fluxo FACS Canto II (BD biosciences). Os dados obtidos foram analisados através do software Flowing versão 2.5.1.

3.4 Imunofenotipagem por citometria de fluxo

Foram realizadas análises por citometria de fluxo para determinar o fenótipo das células quanto à expressão das moléculas de superfície celular CD4/CD8. As células em suspensão foram distribuídas em eppendorfs e incubadas com anticorpos monoclonais específicos anti-CD4 e anti-CD8 conjugados a fluorocromos por 20

minutos. Após marcação, as células foram centrifugadas, lavadas com PBS e fixadas para leitura no citômetro de fluxo. Os dados obtidos foram analisados através do software Flowing versão 2.5.1.

3.5 Avaliação da adesão dos timócitos às TEC's

Para realizar este ensaio, 1×10^5 de TEC's da linhagem murina 2BH4 foram plaqueadas em meio DMEM contendo 10% de SBF em placas de Petri um dia antes da realização do ensaio de adesão. O tratamento dos timócitos foi realizado com um grupo controle, um grupo tratado apenas com a D-gal (20 mg/mL), um grupo tratado simultaneamente com a D-gal e o ApC (5 μ M) e um grupo pré-tratado com o ácido *p*-cumárico por 1 hora e depois adicionada a D-gal em placa de 96 poços. 24 horas após o tratamento, os timócitos sobreviventes de cada grupo de tratamento foram contados e a quantidade foi normalizada para o grupo onde foram contados menos timócitos (7×10^5 de timócitos para cada grupo de tratamento). Então, essa quantidade foi retirada da placa de 96 poços, centrifugada e levada para o ensaio de adesão com as TEC's previamente plaqueadas durante 1 hora, sendo a proporção de TEC's para timócitos de 1/7. Também foi realizado o ensaio de adesão com os timócitos frescos. Para isso, após a obtenção dos timócitos, 1×10^6 de células foram adicionadas em placas de Petri com as TEC's da linhagem 2BH4 já plaqueadas no dia anterior e foram realizados os tratamentos com a D-galactose (20 mg/mL) e o ácido *p*-cumárico (5 μ M) utilizando os mesmos grupos de tratamento. As células foram mantidas aderindo com as TEC's durante 1 hora, sendo a proporção de TEC's para timócitos de 1/10.

Passado esse tempo, o meio foi retirado e as células lavadas delicadamente com PBS em temperatura ambiente para lavagem dos timócitos não aderidos. Após esse processo, as células foram soltas com PBS gelado para soltar os timócitos aderidos, esses foram recolhidos em eppendorfs e levados para contagem em câmara de Neubauer.

3.6 Análises estatísticas

Para as análises estatísticas dos dados obtidos e confecção dos gráficos foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 5.00 (GraphPad Prism Software, Inc.). Os resultados foram representados como média e erro-padrão da média (EPM), e avaliados estatisticamente através do teste ANOVA, seguido do pós-teste de Turkey, com um nível de significância selecionado para $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Análise da viabilidade de timócitos após tratamento *in vitro* com D-galactose

Ao analisar o percentual de células viáveis tratadas com D-galactose utilizando a captação de PI por citometria de fluxo, foi possível observar uma diminuição estatisticamente significativa no percentual de timócitos viáveis no grupo tratado com a concentração mais alta de D-gal (20 mg/mL) quando comparado ao grupo controle (Figura 4). Assim, pode-se sugerir que o açúcar, na concentração de 20 mg/mL, pode dificultar diretamente a sobrevivência/proliferação dos timócitos, sendo esta escolhida para ser utilizada nos experimentos posteriores.

Figura 4: Percentual de timócitos viáveis após tratamento *in vitro* com D-galactose

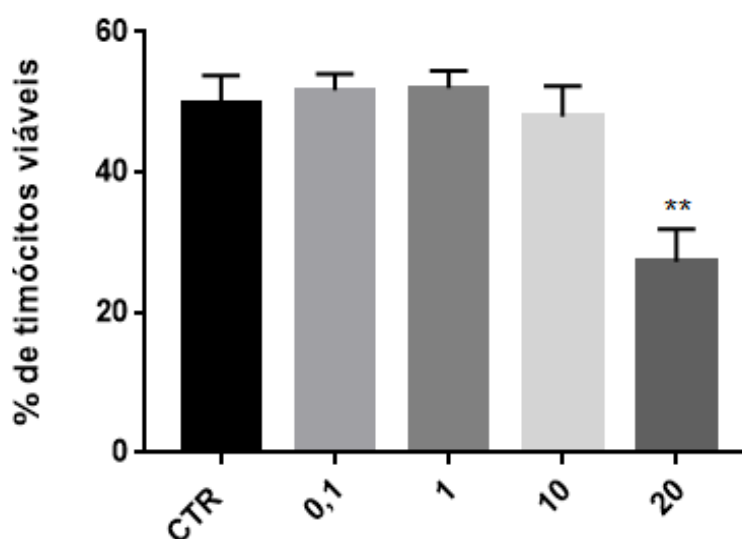


Figura 4. 24 horas após o tratamento *in vitro* com D-galactose nas concentrações de 0,1, 1, 10 e 20 mg/mL, os timócitos em suspensão foram incubados com iodeto de propídio (PI) e analisados por citometria de fluxo. O gráfico mostra a média $\pm$ erro-padrão do percentual médio de timócitos viáveis, PI negativos. (*) = $p < 0,05$ em relação ao grupo CTR. Foram realizados 3 experimentos independentes.

4.2 Análise da viabilidade de timócitos após tratamento *in vitro* com ácido *p*-cumárico

Também foi realizado o teste de viabilidade celular por citometria de fluxo para verificar a ação do ApC sobre os timócitos em cultura por 24 horas. Não foi observada diferença significativa entre as concentrações testadas, sendo a concentração de 5

μM escolhida para ser utilizada nos experimentos posteriores, já que a partir da concentração de $10 \mu\text{M}$ é possível observar uma pequena diminuição na viabilidade das células (Figura 5).

Figura 5: Percentual de timócitos viáveis após tratamento *in vitro* com ácido *p*-cumárico

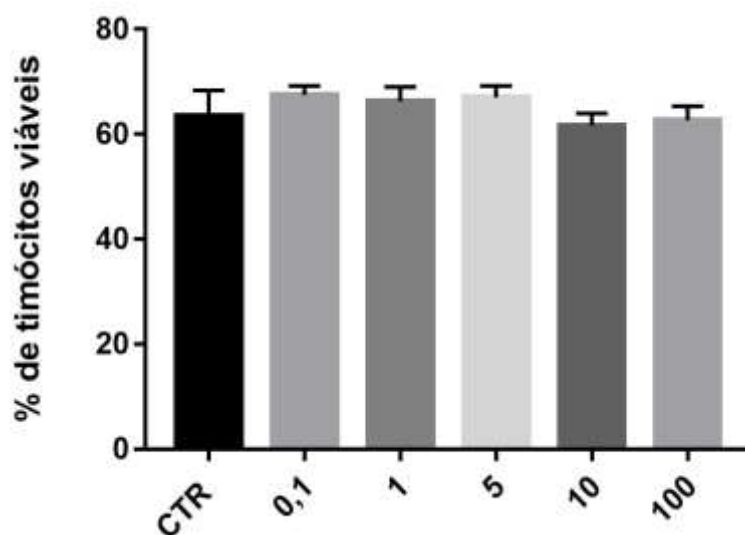


Figura 5. 24 horas após o tratamento *in vitro* com o ácido *p*-cumárico nas concentrações de 0,1, 1, 5, 10 e $100 \mu\text{M}$, os timócitos em suspensão foram incubados com iodeto de propídio (PI) e analisados por citometria de fluxo. O gráfico mostra a média $\pm$ erro-padrão do percentual médio de timócitos viáveis, PI negativos. Foram realizados 2 experimentos independentes.

4.3 Efeito do ácido *p*-cumárico na viabilidade de timócitos expostos à D-galactose *in vitro*

Após a escolha das concentrações a serem utilizadas, a viabilidade das células foi verificada seguindo duas formas de tratamento: em uma foi realizado o co-tratamento do ApC ($5 \mu\text{M}$) com a D-gal (20 mg/mL) (grupo ApC + D-gal); na segunda forma foi realizado um pré-tratamento com o ácido por 1 hora e após esse tempo foi adicionada a D-gal (grupo ApC + D-gal (Pré)), além de ter o grupo tratado apenas com a D-galactose na concentração de 20 mg/mL (D-gal) e o grupo controle (CTR), que não recebeu nenhum tipo de tratamento. Após o plaqueamento, todos os grupos foram mantidos em cultura por 24 horas em estufa contendo 5% de CO_2 para realização dos próximos experimentos além do ensaio de viabilidade.

Como mostrado na figura 6, o tratamento com a D-gal diminuiu significativamente a viabilidade dos timócitos quando comparado ao grupo controle, no grupo tratado com as duas substâncias simultaneamente não é possível observar

nenhuma diferença em relação ao grupo D-gal, porém no grupo pré-tratado com o ácido *p*-cumárico ocorreu um aumento significativo na porcentagem de timócitos viáveis quando comparado ao grupo tratado apenas com a D-galactose.

Figura 6: Efeito do tratamento com ácido *p*-cumárico no percentual de timócitos viáveis após exposição a D-galactose

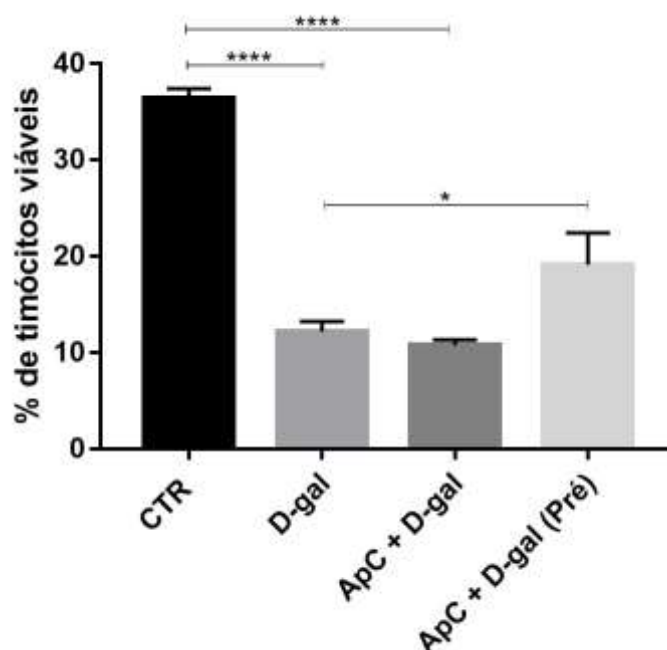


Figura 6. 24 horas após o tratamento *in vitro* com D-galactose e ácido *p*-cumárico nas concentrações de 20 mg/mL e 5 μ M, respectivamente, os timócitos em suspensão foram incubados com iodeto de propídio (PI) e analisados por citometria de fluxo. O gráfico mostra a média $\pm$ erro-padrão do percentual médio de timócitos viáveis, PI negativos. (*) = $p < 0,05$. Foram realizados 3 experimentos independentes.

4.4 Efeito do ácido *p*-cumárico sobre as subpopulações de timócitos expostos à D-galactose *in vitro*

Conforme mostrado na figura 7, o tratamento com D-gal não alterou significativamente o percentual de timócitos duplo-negativos (DN) em comparação ao grupo controle, enquanto o tratamento conjunto com ApC aumentou a porcentagem dessas células de forma significativa em relação às células tratadas apenas com o açúcar. Observou-se também uma diminuição significativa no percentual de timócitos duplo-positivos (DP) para CD4 e CD8 após o tratamento com a D-gal quando comparado ao grupo controle e no grupo pré-tratado com o ApC é possível observar um aumento nessa porcentagem de células DP quando comparado ao grupo tratado apenas com D-galactose.

Não foi vista alteração significativa no percentual de células simples-positivas para CD4 (CD4SP) e para CD8 (CD8SP) no grupo tratado com D-gal em relação ao controle (Figura 7). Porém, o pré-tratamento com ApC diminuiu significativamente o percentual de timócitos CD4SP e CD8SP quando comparado ao grupo D-gal.

Figura 7: Efeito do ácido *p*-cumárico no percentual das subpopulações de timócitos expostos à D-galactose *in vitro*

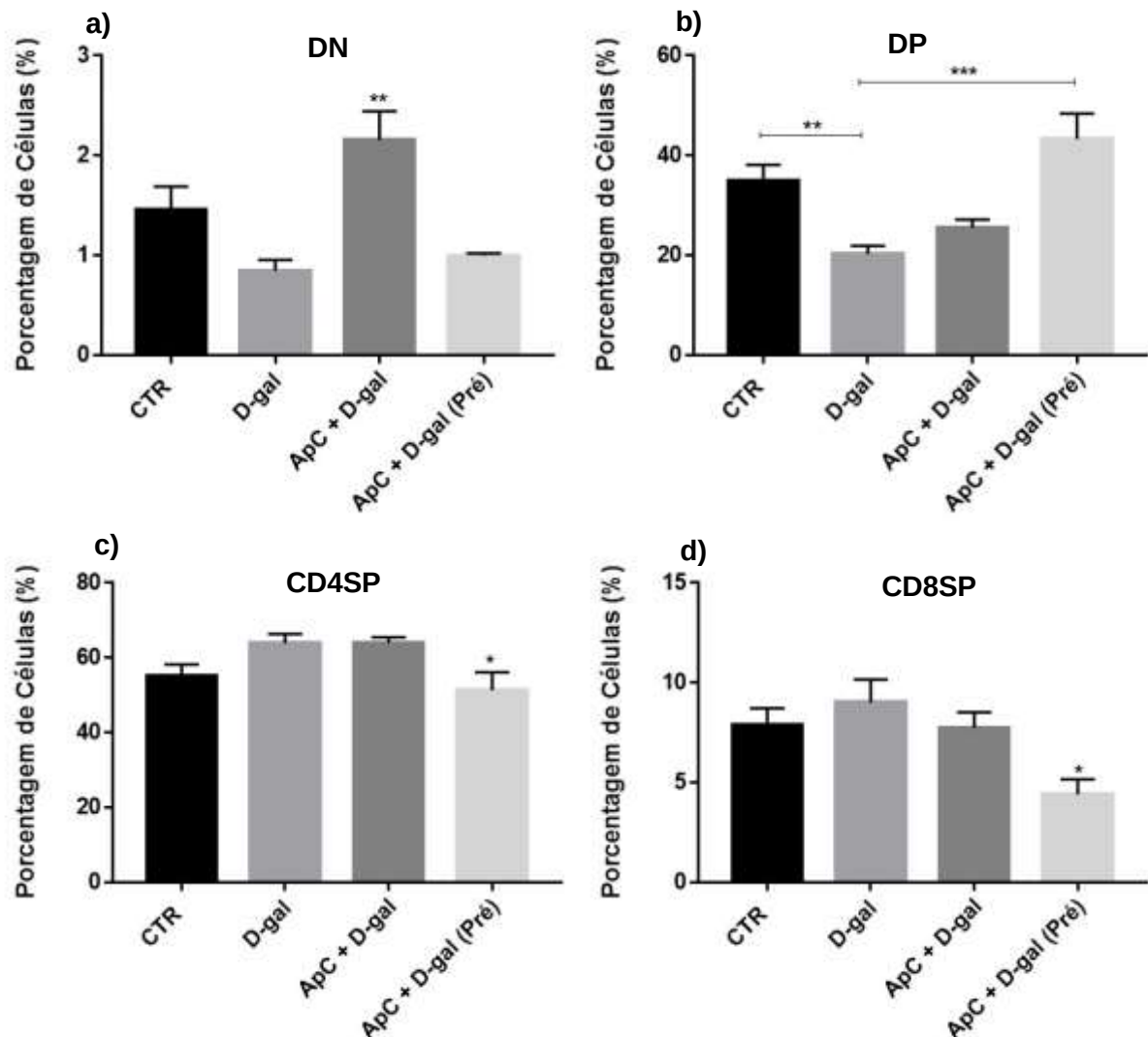


Figura 7. 24 horas após o tratamento *in vitro* com D-galactose e ácido *p*-cumárico nas concentrações de 20 mg/mL e 5 μ M, respectivamente, os timócitos em suspensão foram incubados com anticorpos monoclonais específicos anti-CD4 e anti-CD8 e analisados por citometria de fluxo. O gráfico mostra a média $\pm$ erro-padrão do percentual médio de células para cada subpopulação. Sendo (a) DN = duplo-negativo, (b) DP = duplo-positivo, (c) CD4SP= CD4 simples-positivo, (d) CD8SP= CD8 simples-positivo (*) = $p < 0,05$. Foram realizados 2 experimentos independentes.

4.5 Efeito do ácido *p*-cumárico sobre a adesão dos timócitos expostos à D-galactose *in vitro*

Na figura 8 é possível observar que o tratamento com D-galactose durante 24 horas diminuiu significativamente a quantidade de timócitos aderidos quando comparado ao grupo controle, demonstrando que o açúcar pode interferir na adesão dos timócitos. O pré-tratamento com o ácido *p*-cumárico possibilitou uma maior adesão dos timócitos às TEC's em relação ao grupo tratado apenas com D-gal.

Figura 8: Efeito do ácido *p*-cumárico sobre a capacidade de adesão dos timócitos após exposição a D-galactose por 24 horas

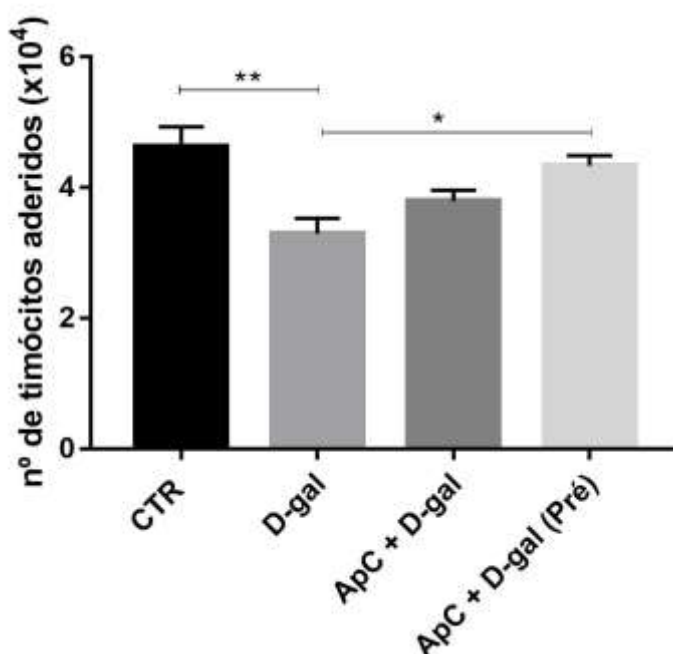


Figura 8. 24 horas após o tratamento *in vitro* com D-galactose e ácido *p*-cumárico nas concentrações de 20 mg/mL e 5 µM, respectivamente, os timócitos em suspensão foram colocados em placas de Petri contendo TEC's durante 1 hora para análise da adesão. Foi realizada contagem dos timócitos aderidos com o auxílio de câmara de Neubauer ao microscópio de luz. O gráfico mostra a média ± erro-padrão da quantidade média de timócitos aderidos. (*) = $p < 0,05$. Foram realizados 2 experimentos independentes.

Também foi realizado um experimento com timócitos frescos tratados com D-gal e ApC durante o tempo de adesão com as TEC's. Considerando essas células, não foi observada nenhuma diferença significativa na quantidade de timócitos aderidos entre os grupos de tratamento (Figura 9).

Figura 9: Efeito do ácido *p*-cumárico sobre a capacidade de adesão dos timócitos após exposição a D-galactose por 1 hora

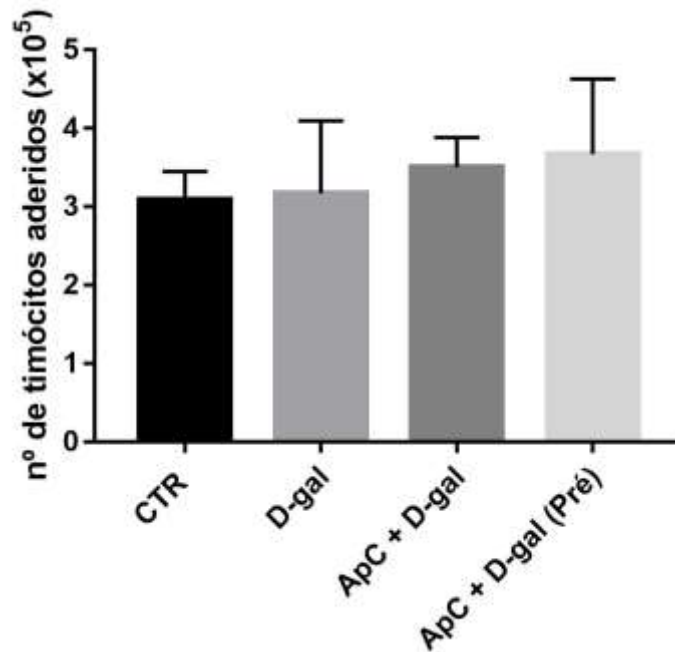


Figura 9. Após 1 hora de adesão, os timócitos frescos tratados com D-galactose e ácido *p*-cumárico nas concentrações de 20 mg/mL e 5 µM, respectivamente, foram coletados e foi realizada contagem dos timócitos aderidos com o auxílio de câmara de Neubauer ao microscópio de luz. O gráfico mostra a média ± erro-padrão da quantidade média de timócitos aderidos.

5 DISCUSSÃO

Como mostrado nos resultados, a D-galactose diminuiu a viabilidade dos timócitos de maneira significativa, isso corrobora com o trabalho de GUO e colaboradores (2020), onde foi demonstrado que o tratamento *in vivo* com D-galactose diminuiu significativamente a proliferação dos timócitos e aumentou a apoptose nessas células comparado ao grupo utilizado como controle. Com isso, pode-se sugerir que a D-gal dificulta a sobrevivência dos timócitos. Além disso, o pré-tratamento com o ApC preveniu a redução da viabilidade das células quando comparado ao grupo tratado apenas com a D-gal, sendo possível sugerir que o ácido *p*-cumárico pode exercer um efeito citoprotetor sobre a viabilidade dos timócitos, reduzindo essa perda.

Em relação as subpopulações de células T, sabe-se que as células DP aparecem em maior quantidade durante a fase de desenvolvimento e maturação das células T e passado esse período, as células se diferenciam e começam a expressar somente CD4 ou CD8 de maneira independente (KOCH; RADTKE, 2011). Como durante o envelhecimento o timo tem uma perda de timócitos em fase de desenvolvimento, isso pode afetar diretamente a quantidade de células DP na senescência. O pré-tratamento com o ApC por 1 hora foi capaz de reverter significativamente a redução de timócitos DP quando comparado ao grupo D-gal, indicando que o ácido pode favorecer a sobrevivência/proliferação desse tipo celular.

De acordo com Goronzy; Weywand (2012), há uma diferença na resposta das células CD4 e CD8 virgens ao envelhecimento, as células CD4⁺ diminuem mais rapidamente apenas após os 75 anos de idade, enquanto as células CD8⁺ já sofrem uma diminuição por volta dos 65 anos, porém que essa redução não é refletida em números absolutos, já que tem um aumento nas células CD8 efetoras. Já foi visto também que o subconjunto de células T CD8⁺ é mais suscetível a alterações funcionais e fenotípicas durante o envelhecimento do que as células CD4⁺ e por isso se acumulam em maior proporção (CZESNIKIEWICZ-GUZYK *et al.*, 2008). Porém, nesse trabalho não foi possível observar diferença significativa no grupo tratado apenas com a D-galactose nas subpopulações simples-positivas para CD4 e CD8. Já no grupo pré-tratado com o ácido *p*-cumárico foi possível observar uma diminuição na porcentagem de células positivas para as subpopulações CD4SP e CD8SP.

Com relação a adesão, já foi visto que ocorre uma diminuição na produção de moléculas de adesão durante o envelhecimento cerebral, podendo chegar a um nível considerado crítico (ERBABA *et al.*, 2020). Assim, é possível que a diminuição da adesão observada neste estudo esteja relacionada com uma baixa produção de moléculas de adesão nos timócitos expostos a D-gal, o que é impedido pelo tratamento prévio com o ApC. Na adesão realizada com o grupo de timócitos frescos que tiveram o tratamento com a D-gal e o ApC apenas durante o tempo de 1 hora de adesão, não foi possível observar diferença significativa entre os grupos, este resultado pode estar relacionado ao tempo de exposição das células às substâncias estudadas. Dessa forma, podemos propor que a exposição prolongada a D-gal interfere com a adesão dos timócitos às TEC's, e que o ApC pode proteger os timócitos dos efeitos deletérios desse açúcar.

Este trabalho mostrou que a utilização do ácido *p*-cumárico reverteu o efeito da D-galactose sobre a viabilidade e a adesão dos timócitos, assim como também foi benéfica para as subpopulações observadas. Esses achados podem estar relacionados com os efeitos citoprotetores desse produto natural. Concordando com essa hipótese, o ApC mostrou ter efeito antioxidante sobre ratos com reperfusão isquêmica renal, aumentando a produção das enzimas antioxidantes SOD, GPx e catalase (GODARZI *et al.*, 2020). Além disso, o ApC também apresentou efeito anti-inflamatório em ratos com artrite reumatoide, diminuindo a expressão do fator de necrose tumoral- α (TNF- α), um mediador inflamatório (PRAGASAM *et al.*, 2013). Estes resultados condizem com o efeito do ácido sobre o envelhecimento que foi observado neste trabalho, mostrando que essa substância pode ser considerada um importante imunomodulador.

Porém ainda são poucos os trabalhos que utilizam o ácido *p*-cumárico para estudos relacionados à senescência celular. Outras substâncias com efeito antioxidante semelhante ao ApC já foram estudadas em modelos de envelhecimento do sistema imune, como é o caso do resveratrol (RSV), que foi capaz de diminuir a quantidade de células senescentes no timo, além de restaurar a anatomia tímica e a alteração nas subpopulações de células T (WEI *et al.*, 2020). Essa capacidade de restaurar as alterações nas subpopulações de timócitos foi semelhante a observada nesse estudo. Um outro produto natural utilizado como antioxidante em estudos envolvendo envelhecimento é o salidroside (SDS), que mostrou possuir efeito benéfico sobre as subpopulações e na proliferação de esplenócitos obtidos de ratos

idosos (LU *et al.*, 2013). MAO e colaboradores (2010) também demonstraram que SDS foi capaz de bloquear o aumento de AGE's em camundongos envelhecidos tratados com D-galactose, inibindo o estresse oxidativo.

Com base nos resultados encontrados nesse estudo e nos dados da literatura, é possível sugerir que o ApC possui efeito citoprotetor e antioxidante semelhante ao RSV e o SDS, sendo de extrema importância mais estudos que demonstrem os benefícios da utilização deste polifenol sobre o organismo envelhecido, especialmente sobre células e órgãos do sistema imunológico.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que uma alta concentração de D-galactose diminui a sobrevivência dos timócitos, diminui o percentual de células duplo-positivas (DP) e também prejudica a adesão dos timócitos. Em relação ao ácido *p*-cumárico foi possível observar que essa substância demonstrou possuir efeito citoprotetor sobre os timócitos expostos a D-gal principalmente nos estágios iniciais de desenvolvimento.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA, J. C. *et al.* Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. **Cell**. 2008, vol. 133, n. 6, p. 1006-1018.
- ACOSTA, J. C. *et al.* A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. **Nature Cell biology**. 2013, vol. 15, n. 8, p. 978-990.
- ACOSTA, P. B. & GROSS K. C. Hidden sources of galactose in the enviroment. **European Journal of Pedriatics**. 1995, vol. 154, n. 7/2, p. 87-92.
- AKBAR, A. N. *et al.* Senescence of T lymphocytes: Implications for enhancing human immunity. **Trends in Immunology**. 2016, vol. 37, n. 12, p. 866-876.
- ALAMED, J. *et al.* Relationships between free radical scavenging and antioxidante activity in foods. **Journal of agricultural and Food Chemistry**. 2009, vol. 57, n. 7, p. 2969-2976.
- ASHOK, B. T. & ALI R. The aging paradox: Free radical theory of aging. **Experimental Gerontology**. 1999, vol. 34, n. 3, p. 293-303.
- BAETA-CORRAL, R. *et al.* Sexual dimorphism in the behavioral responses and the immunoendocrine status in D-galactose-induced aging. **The Journals of Gerontology, Series A, Biological Sciences and Medical Sciences**. 2018, vol. 73, n. 9, p. 1147-1157.
- BAHADORAN, Z. *et al.* Dietary poliphenols as potencial nutraceuticals in management of diabetes: a review. **Journal of Diabetes and Metabolic Disorders**. 2013, vol. 12, n. 1, p. 43.
- BANJI, D. *et al.* Curcumin and piperin abrogate lipid and protein oxidation induced by D-galactose in rat brain. **Brain Research**. 2013, vol. 1515, p. 1-11.
- BARBOUTI, A. *et al.* Implications of oxidative stress and cellular senescence in age-related thymus involution. **Oxidative Medicince and Cellular Longevity**. 2020, 7986071.
- BEN-PORATH, I. & WEINBERG, R. A. The signals and pathways activating cellular senescence. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, 2005, vol. 37, n. 5, p. 961–976.
- BLANDER, G. *et al.* Superoxide dismutase 1 knock-down induces senescence in human fibroblastos. **The Journal of Biological Chemistry**. 2003, vol. 278, n. 40, p. 38966-38969.
- BOUZAIENE, N. N. *et al.* The effects of caffeic, coumaric and ferulic acids on proliferation, superoxide production, adhesion and migration of human tumor cells in vitro. **European Journal of pharmacology**. 2015, vol. 766, p. 99-105.
- BYUN, K. *et al.* Advanced glycation end-products produced systematically and by macrophages: A common contributor to inflammation and dengenerative diseases. **Pharmacology & Therapeutics**. 2017, vol. 177, p. 44-55.

CHEN, Q. M. *et al.* Molecular analysis of H₂O₂-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication. **The Biochemical Journal**. 1998, vol. 332, p. 43-50.

CHIN, I. K. *et al.* Changes in primary lymphoid organs with aging. **Seminars in Immunology**. 2012, vol. 24, n. 5, p. 309-320.

COLLADO, M. & SERRANO, M. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. **Nature Reviews, Cancer**. 2010, vol. 10, n. 1, p. 51-57.

COPPE, J. P. *et al.* Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. **PLoS Biology**. 2008, vol. 6, n. 12, p. 2853-2868.

CZESNIKIEWICZ-GUZYK, M. *et al.* T cell subset-specific susceptibility to aging. **Clinical Immunology**. 2008, vol. 127, n. 1, p. 107-118.

DMRI, G. P. *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and skin aging *in vivo*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**. 1995, vol. 92, n. 20, p. 9363-9637.

EL-SEEDI, H. R. *et al.* Biosynthesis, natural sources, dietary intake, pharmacokinetic properties, and biological activities of hydroxycinnamic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 2012, vol. 60, n. 44, p. 10877-10895.

ERBABA, B. *et al.* Zebrafish brain RNA sequencing reveals that cell adhesion molecules are critical in brain aging. **Neurobiology of Aging**. 2020, vol. 94, p. 164-175.

FARINI, A. *et al.* Defective dystrophic thymus determines degenerative changes in skeletal muscle. **Nature Communications**. 2021, vol. 12, n. 1, p. 2099.

FRANCESCHI, C. *et al.* The continuum of aging and age-related diseases: common mechanisms but different rates. **Frontiers in Medicine (Lausanne)**. 2018, vol. 5, p. 61.

GRAY, D. H. D. *et al.* Controlling the thymic microenvironment. **Current Opinion in Immunology**. 2005, vol. 17, n. 2, p. 137–143.

GODARZI, S. M. *et al.*, Antioxidant effect of p-coumaric acid on interleukin 1- β and tumor necrosis factor- α in rats with renal ischemic reperfusion. **Nefrologia (Engl Ed)**. 2020, vol. 40, n. 3, p. 311-319.

GORONZY, J. J. & WEYWAND, C. M. Immune aging and autoimmunity. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 2012, vol. 69, n. 10, p. 1615-1623.

GUO, L. *et al.* Gallic acid attenuates thymic involution in the d-galactose induced accelerated aging mice. **Immunobiology**. 2020, vol. 225, n. 1, 151817.

HALE, L. P. *et al.* T-cell depleted cultured pediatric thymus tissue as a model for some aspects of human age-related thymus involution. **Geroscience**. 2021, vol. 43, n. 3, p. 1369-1382.

HAN, J. & ZÚÑIGA-PFLUCKER, J. C. A 2020 view of thymus stromal cells in T cell development. **Journal of Immunology**. 2021, vol. 206, n. 2, p. 249-256.

HARMAN, D. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. **Journal of Gerontology**. 1956, vol. 11, n. 3, p. 298-300.

HUSSAIN, T. *et al.* Oxidative stress and inflammation: What polyphenols can do for us? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. 2016, doi: 10.1155/2016/7432797.

IOANNIDIS, V. *et al.* The β catenin-TCF-1 pathway ensures CD4(+) CD8(+) thymocyte survival. **Nature Immunology**. 2001, vol. 2, n. 8, p. 691-697.

JU, Z. *et al.* A Dual Role of p21 in Stem Cell Aging. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 2007, vol. 1100, n. 1, p. 333–344.

JUN, J. I. & LAU, L. F. Cellular senescence controls fibrosis in wound healing. **Aging (Albany NY)**. 2010, vol. 2, n. 9, p. 627-631.

KAVIANI, E. *et al.* Protective effect of atorvastatin on d-galactose-induced aging model in mice. **Behavioural Brain Research**. 2017, vol. 334, p. 55-60.

KAWATA, K. *et al.* Features of T- cell subset composition in a D-galactose-induced senescence mouse model. **Experimental Animals**. 2021, vol. 70, n. 3, p. 284-292.

KEDZIORA-KORNATOWSKA, K. *et al.* Effect of melatonin on the oxidative stress in erythrocytes of healthy young and elderly subjects. **Journal of Pineal Research**. 2007, vol. 42, n. 2, p. 153-158.

KLEIN, L. *et al.* Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). **Nature Reviews Immunology**. 2014, vol. 14, n. 6, p. 377-391.

KOCH, U & RADTKE, F. Mechanisms of T cell development and transformation. **Annual Review of Cell and Development Biology**. 2011, vol. 27, p. 539-562.

KUMAR, S. & PANDEY, A. K. Free radicals: Healthy implications and their mitigation by herbals. **British Journal of Medicine and Medical Research**. 2015, vol. 7, n. 6, p. 438-457.

LEI, M. *et al.* Impairments of astrocytes are involved in the d-galactose-induced brain aging. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 2008, vol. 369, n. 4, p. 1082-1087.

LU, L. *et al.* Rejuvenating activity of salidroside (SDS): dietary intake of SDS enhances the immune response of aged rats. **Age (Dordrecht, Netherlands)**. 2013, vol. 35, n. 3, p. 637-646.

MAO, G-X. *et al.* Protective role of salidroside against aging in a mouse model induced by D-galactose. **Biomedical and Environment Science: BES**. 2012, vol. 23, n. 2, p. 161-166.

MATHEW, S. *et al.* Reactivity of phenolic compounds towards free radicals under in vitro conditions. **Journal of Food Science and Technology**. 2012, vol. 52, n. 9, p. 5790-5798.

MINATO, N. *et al.* Physiology and pathology of T-cell aging. **International Immunology**. 2020, vol. 32, n. 4, p. 223-231.

MUÑOZ-ESPÍN, D. & SERRANO, M. Cellular senescence: From physiology to pathology. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. 2014, vol. 15, n. 7, p. 482–496.

- OVERGAARD, N. H. *et al.* CD4+/CD8+ double-positive T cells: more than just a development stage? **Journal of Leukocyte Biology**. 2015, vol. 97, n. 1, p. 31-38.
- PALACIO, L. *et al.* Restored immune cell function upon clearance of senescence in the irradiated splenic environment. **Aging cell**, 2019, vol. 18, n. 4: e12971.
- PALMER, S. *et al.* Thymic involution and rising disease incidence with age. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**. 2018, vol. 115, n. 8, p. 1883-1888.
- PAREL, Y. & CHIZZOLINI, C. CD4+ CD8+ double positive (DP) T cells in health and disease. **Autoimmunity Reviews**. 2004, vol. 3, n. 3, p. 215-220.
- PEI, K. *et al.* P-coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 2016, vol. 96, n. 9, p. 2952-2962.
- PRABHAKAR, O. Cerebroprotective effect of resveratrol through antioxidant and anti-inflammatory effects in diabetic rats. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**. 2013, vol. 386, n. 8, p. 705-710.
- PRAGASAM, S. J. *et al.* Immunomodulatory and anti-inflammatory effect of p-coumaric acid, a common dietary polyphenol on experimental inflammation in rats. **Inflammation**. 2013, vol. 36, n. 1, p. 169-176.
- REAGAN, L. P. *et al.* Neurological changes induced by stress in streptozotocin diabetic rats. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 1999, vol. 893, p. 126-137.
- REHMAN, S. U. *et al.* Anthocyanins reversed D-galactose-induced oxidative stress and neuroinflammation mediated cognitive impairment in adult rats. **Molecular Neurobiology**. 2017, vol. 54, n. 1, p. 255-271.
- REZZANI, R. *et al.* Thymus and aging: Morphological, radiological and functional view. **Age (Dordr)**. 2014, vol. 36, n. 1, p. 313-351.
- SADIGH-ETEGHAD, S. *et al.* D-galactose-induced brain ageing model: A systematic review and meta-analysis on cognitive outcomes and oxidative stress indices. **PLoS One**. 2017, vol. 12, n. 8, e0184122.
- SONG, X. *et al.* Advanced glycation in D-galactose induced mouse aging model. **Mechanisms of Ageing and Development**. 1999, vol. 108, n. 3, p. 239-251.
- SWAT, W., *et al.* Essential role of PI3K δ and PI3K γ in thymocyte survival. **Blood**. 2006, vol. 107, n. 6, p. 2415-2422.
- WANG, M. & BOSSELUT, R. CD4-CD8 lineage differentiation: Thpok-ing into the nucleus. **Journal of Immunology**. 2009, vol. 183, n. 5, p. 2903-2910.
- WANG, W. *et al.* Thymic aging may be associated with COVID-19 pathophysiology in the elderly. **Cells**. 2021, vol. 10, n. 3, p. 128.
- WANG, Z. *et al.* Physiologic and biochemical changes of mimetic aging induced by D-galactose in rats. **Lab Anim Sci Admin**. 1999, vol. 16, p. 23-25.
- WEI, T-T. *et al.* Resveratrol ameliorates thymus senescence changes in D-galactose induced mice. **Microbiology and Immunology**. 2020, vol. 64, n. 9, p. 620-629.

WIEMANN, S. U. *et al.* Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. **FASEB Journal**. 2002, vol. 16, n. 9, p. 935-942.

WOLSTEIN, J. M. *et al.* INK4a knockout mice exhibit increased fibrosis under normal conditions and in response to unilateral ureteral obstruction. **American Journal of Physiology, Renal Physiology**. 2010, vol. 299, n. 6, F1486-95.

WU, D. M. *et al.* Purple sweet potato color repairs D-galactose-induced spatial learning and memory impairment by regulating the expression of synaptic proteins. **Neurobiology of Learning and Memory**. 2008, vol. 90, n.1, p. 19-27.

XU, Y. *et al.* D-galactose induces premature senescence of lens epithelial cells by disturbing autophagy flux and mitochondrial functions. **Toxicology Letters**. 2018, vol. 289, p. 99-106.

ZHANG, D. *et al.* Coenzyme Q10 inhibits the aging of mesenchymal stem cell induced by D-galactose through Akt/mTOR signaling. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. 2015, vol. 2015, doi: 10.1155/2015/867293.

ZHU, F. *et al.* Senescent cardiac fibroblast is critical for cardiac fibrosis after myocardial infarction. **PLoS One**. 2013, vol. 8, n. 9, e74535.