



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CAMPUS A. C. SIMÕES
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

VANESSA DE OLIVEIRA BATISTA

**ALTERAÇÕES MOLECULARES E CELULARES PROVOCADAS PELA INDUÇÃO
DA SENESCÊNCIA CELULAR COM D-GALACTOSE SOBRE CÉLULAS
EPITELIAIS TÍMICAS HUMANAS**

Maceió - AL
2025

VANESSA DE OLIVEIRA BATISTA

**ALTERAÇÕES MOLECULARES E CELULARES PROVOCADAS PELA INDUÇÃO
DA SENESCÊNCIA CELULAR COM D-GALACTOSE SOBRE CÉLULAS
EPITELIAIS TÍMICAS HUMANAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Farmácia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Danielma dos Santos Reis

Maceió - AL
2025

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária: Girlaine da Silva Santos – CRB-4 – 1127

B333a Batista, Vanessa de Oliveira de.

Alterações moleculares e celulares provocadas pela indução da senescência celular com d-galactose sobre células epiteliais tímicas humanas / Vanessa de Oliveira Batista. – 2025.

39 f. : il.

Orientadora: Maria Danielma dos Santos Reis.

Monografia (Trabalho de conclusão de Curso em Farmácia: Bacharelado) – Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2025.

Bibliografia: f. 35 - 39.

1. Envelhecimento celular. 2. Espectroscopia Raman. 3. Galactose. 4. Timo. 5. Apoptose. I. Título.

CDU: 615: 57.017.6

Folha de Aprovação

VANESSA DE OLIVEIRA BATISTA

Alterações moleculares e celulares provocadas pela indução da senescência celular com D-galactose sobre células epiteliais tímica humanas

Trabalho de Conclusão de Curso
submetido à banca examinadora do curso
de Bacharelado em Farmácia da
Universidade Federal de Alagoas e
aprovado em 27/01/2025.



Documento assinado digitalmente

MARIA DANIELMA DOS SANTOS REIS

Data: 31/01/2025 17:10:17-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Orientadora - Prof^ª Dr^a Maria Danielma dos Santos Reis
(Universidade Federal de Alagoas)

Banca examinadora:



Documento assinado digitalmente

JULIANE PEREIRA DA SILVA BARRETO

Data: 04/02/2025 10:34:08-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Examinadora 1 - Ma. Juliane Pereira da Silva Barreto
(Universidade Federal de Alagoas)



Documento assinado digitalmente

ANA LUCIA MENDES DA SILVA

Data: 04/02/2025 16:03:45-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Examinadora 2 - Prof^ª Ma. Ana Lúcia Mendes da Silva
(Universidade Federal de Alagoas)

Dedico este trabalho aos meus pais, Vicente e Ângela, pelo amor incondicional, pelo apoio constante e por sempre acreditarem no meu potencial, mesmo nos momentos mais desafiadores. Vocês me ensinaram que sonhos são possíveis, e sem vocês, esta conquista não seria realidade.

AGRADECIMENTOS

Concluir esta jornada é muito mais do que atingir um objetivo acadêmico; é a realização de um sonho construído com esforço, dedicação e o apoio de muitas pessoas especiais. Durante esse percurso, enfrentei desafios que testaram meus limites, mas também vivi momentos de aprendizado e crescimento que jamais esquecerei. Esta conquista não seria possível sem aqueles que estiveram ao meu lado, direta ou indiretamente, oferecendo suporte, inspiração e amor. Por isso, dedico este espaço para expressar minha gratidão a todos que, de alguma forma, contribuíram para que este momento se tornasse realidade.

A Deus, antes de tudo, por ser minha fortaleza em todos os momentos e por guiar cada passo dessa jornada de aprendizado e superação. Sem Sua presença, graça e amor infinitos, nada disso seria possível. Obrigada por renovar minhas forças nos momentos de cansaço e me mostrar que, com fé, tudo é possível.

Aos meus pais, pela dedicação incansável e por sempre fazerem o possível para que eu chegasse onde estou hoje. Obrigada pelo amor incondicional, pelos conselhos sábios e pelo exemplo de vida que me inspira diariamente. Vocês são a base de tudo o que sou e conquistarei.

Aos meus irmãos Ítalo e Vitor, que mesmo com toda a implicância, sempre estiveram ao meu lado, tornando minha caminhada mais leve e repleta de momentos inesquecíveis. Obrigada pelos sorrisos, brincadeiras e pela certeza de que sempre posso contar com vocês.

Ao meu namorado Vitor, pelo apoio constante, pelas palavras de incentivo e por tornar os dias mais leves. Você foi meu porto seguro em meio aos desafios dessa jornada, me incentivando, cuidando e torcendo por cada conquista.

Às minhas amigas da graduação para a vida: Kathylen, Yasmin e Bia. Nosso "quarteto fantástico" foi mais do que um apoio; foi um verdadeiro presente nessa jornada. Vocês foram a minha família na UFAL, compartilhando risadas, conquistas e até as lágrimas. Um agradecimento especial à Beatriz, minha parceira de perrengues durante os experimentos e horas extras na universidade. Cada momento vivido com vocês foi uma parte essencial dessa trajetória.

Aos amigos e pessoas queridas que fiz no Laboratório de Biologia Celular (LBC), especialmente às queridas Everlaine e Jordana, por estarem sempre prontas a ajudar, escutar e oferecer suporte nos momentos mais desafiadores, principalmente neste último ano. A vocês, minha gratidão por transformarem o laboratório em um lugar de aprendizado e amizade.

Também à Juliane, técnica do laboratório, que com seu acolhimento caloroso, paciência e compreensão fez toda a diferença nos meus dias no laboratório.

Ao meu grupo de pesquisa, pela colaboração, pelo aprendizado constante e por contribuírem para o meu crescimento acadêmico e pessoal. Vocês foram parte fundamental na construção dessa etapa tão importante da minha formação. Obrigada por tornarem essa caminhada científica mais rica e significativa.

Por fim, à minha orientadora, Danielma, minha eterna gratidão. Obrigada por acreditar no meu potencial, por me proporcionar a oportunidade de fazer ciência e por toda a paciência, apoio e incentivo. Sua orientação foi além de um trabalho acadêmico; foi um verdadeiro ato de confiança e dedicação que impactou profundamente minha trajetória. Sua compreensão e apoio foram essenciais para que eu pudesse concluir com êxito essa etapa tão significativa da minha vida.

Com este trabalho, encerro uma etapa importante da minha formação, mas sei que o aprendizado não termina aqui. O compromisso com a ciência, com o aprimoramento contínuo e com a busca por contribuir para a sociedade permanecem como pilares que guiarão minha trajetória profissional e acadêmica nos próximos anos.

RESUMO

A senescência celular é um processo biológico caracterizado pela interrupção permanente do ciclo celular, frequentemente associado ao envelhecimento e a disfunções teciduais. Esse fenômeno pode ser desencadeado por diversos fatores, como danos ao DNA, estresse oxidativo e alterações metabólicas, desempenhando um papel fundamental tanto em processos fisiológicos, como o reparo tecidual e a supressão tumoral, quanto em condições patológicas, incluindo o envelhecimento e o desenvolvimento de doenças crônicas. No sistema imunológico, a senescência celular pode afetar o timo, órgão linfóide primário responsável pela maturação de linfócitos T. Com o avanço da idade, esse órgão sofre involução progressiva, caracterizada pela redução das células epiteliais tímicas (TECs), aumento da fibrose e infiltração de tecido adiposo, resultando na perda da competência imunológica. Dessa forma, compreender os mecanismos envolvidos na senescência celular das TECs é essencial para elucidar os fatores que impulsionam a involução tímica e suas consequências para a imunossenescência. Por isso, o objetivo principal deste estudo foi investigar as alterações moleculares e celulares na senescência celular induzida pela D-galactose (D-gal) em TECs, utilizando técnicas tradicionais de biologia celular e espectroscopia Raman. Foram avaliadas a viabilidade, a proliferação, a morfologia celular e as alterações bioquímicas em células tratadas com D-gal. Os resultados demonstraram que a exposição à D-gal reduziu significativamente a viabilidade e a proliferação celular, além de provocar desorganização da rede celular, perda da adesão entre as células, alteração no tamanho celular, achatamento da morfologia e presença de vacúolos. Além disso, essas alterações foram acompanhadas por um aumento na presença de células apoptóticas—um achado inesperado, dada a resistência típica das células senescentes à apoptose. A análise espectroscópica revelou danos bioquímicos em componentes celulares como DNA, proteínas e lipídios, evidenciando a sensibilidade da espectroscopia Raman na detecção de alterações associadas à senescência. Este estudo reforça a relevância do modelo experimental com D-gal para a investigação do envelhecimento celular e destaca a necessidade de pesquisas adicionais para aprofundar os mecanismos moleculares envolvidos e a relação entre senescência celular e apoptose no timo humano. Além disso, ressalta a espectroscopia Raman como uma abordagem versátil e promissora para o estudo da senescência celular, oferecendo vantagens em relação às técnicas tradicionais.

Palavras-chave: Envelhecimento celular; Involução tímica; Alterações bioquímicas; Timo; Apoptose; Espectroscopia Raman.

ABSTRACT

Cell senescence is a biological process characterized by the permanent arrest of the cell cycle, often associated with aging and tissue dysfunction. This phenomenon can be triggered by various factors, such as DNA damage, oxidative stress, and metabolic alterations, playing a fundamental role in both physiological processes, such as tissue repair and tumor suppression, and pathological conditions, including aging and the development of chronic diseases. In the immune system, cell senescence can affect the thymus, a primary lymphoid organ responsible for the maturation of T lymphocytes. With aging, the thymus undergoes progressive involution, marked by the reduction of thymic epithelial cells (TECs), increased fibrosis, and infiltration of adipose tissue, ultimately leading to a decline in immune competence. Therefore, understanding the mechanisms involved in TEC senescence is essential to elucidate the factors driving thymic involution and its consequences for immunosenescence. Thus, this study aimed to investigate the molecular and cellular alterations in the cell senescence induced by D-galactose (D-gal) in TECs using traditional cell biology techniques and Raman spectroscopy. Cell viability, proliferation, morphology, and biochemical changes were evaluated in D-gal-treated cells. The results showed that exposure to D-gal significantly reduced cell viability and proliferation, while also causing disorganization of the cellular network, loss of cell adhesion, changes in cell size, morphological flattening, and the presence of vacuoles. Additionally, these alterations were accompanied by an increased presence of apoptotic cells—an unexpected finding, given the typical resistance of senescent cells to apoptosis. Spectroscopic analysis revealed biochemical damage in cellular components such as DNA, proteins, and lipids, highlighting the sensitivity of Raman spectroscopy in detecting senescence-associated changes. This study reinforces the relevance of the D-gal experimental model for investigating cell aging and underscores the need for further research to deepen the understanding of the molecular mechanisms involved and the relationship between cell senescence and apoptosis in the human thymus. Additionally, it highlights Raman spectroscopy as a versatile and promising approach for studying cellular senescence, offering advantages over traditional techniques.

Keywords: Cellular aging; Thymic involution; Biochemical alterations; Thymus; Apoptosis; Raman spectroscopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação gráfica da anatomia de timo neonatal.....	12
Figura 2 - Marcas do envelhecimento	15
Figura 3 - Estrutura molecular da D-Galactose.....	17
Figura 4 - Efeito da D-Galactose na viabilidade das células epiteliais tímicas humanas.....	24
Figura 5 - Morfologia das células THPN após exposição a D-galactose por 24 horas através de coloração com cristal violeta	25
Figura 6 - Morfologia das células THPN após exposição a D-galactose através de microscopia eletrônica de varredura	26
Figura 7 - Proliferação das células THPN após exposição a D-galactose.....	27
Figura 8 - Ensaio para avaliar taxa de morte celular com Laranja de acridina e Iodeto de Propídio após exposição a D-galactose	28
Figura 9 - Espectro Raman de células THPN após exposição a D-galactose	29
Figura 10 - Análise de componente principal (PCA)	29

SUMÁRIO

1. Introdução	11
2. Referencial Teórico.....	12
2.1 Timo.....	12
2.2 Senescência celular.....	14
2.3 Estresse oxidativo induzido por D-galactose.....	16
2.4 A espectroscopia RAMAN	18
3. Objetivos.....	20
3.1 Objetivo Geral:	20
3.2 Objetivos Específicos:	20
4. Material e Métodos	21
4.1 Cultivo Celular	21
4.2 Indução da senescência celular com D-galactose.....	21
4.3 Ensaio de viabilidade celular	21
4.4 Ensaio de Morte celular	22
4.5 Proliferação celular.....	22
4.6 Morfologia celular	22
4.7 Análise de espectroscopia RAMAN	23
4.8 Análises estatísticas	23
5. Resultados.....	24
5.1 Viabilidade das células THPN após exposição a D-galactose	24
5.2 Análise da morfologia das células THPN após exposição a D-galactose	24
5.3 Proliferação das células THPN após exposição a D-galactose.....	26
5.4 Ensaio de morte celular com Laranja de acridina e Iodeto de Propídio após exposição a D-galactose	27
5.5 Análise do perfil bioquímico através de espectroscopia Raman	28
6. Discussão.....	30
7. Conclusão	33
8. Perspectivas.....	34
9. Referências Bibliográficas	35

1. Introdução

A senescência celular é um processo caracterizado pela interrupção permanente do ciclo celular, associado ao envelhecimento e a disfunções teciduais (Van Deursen, 2014). No timo, órgão essencial para a maturação dos linfócitos T e a regulação da resposta imunológica, a senescência das TECs pode comprometer a homeostase imunológica e contribuir para a imunossenescência, aumentando a vulnerabilidade do organismo a infecções e doenças relacionadas à idade (Leal et al., 2022).

Nesse contexto, a D-gal tem sido amplamente utilizada como modelo experimental para indução do envelhecimento celular, uma vez que seu excesso favorece o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), a formação de produtos de glicação avançada (AGEs) e alterações bioquímicas que mimetizam o envelhecimento normal (Azman e Zakaria, 2019). Quando aplicada às TECs, essa substância pode comprometer sua morfologia e funcionalidade, impactando diretamente a maturação e seleção de linfócitos T no timo (Guo et al., 2020).

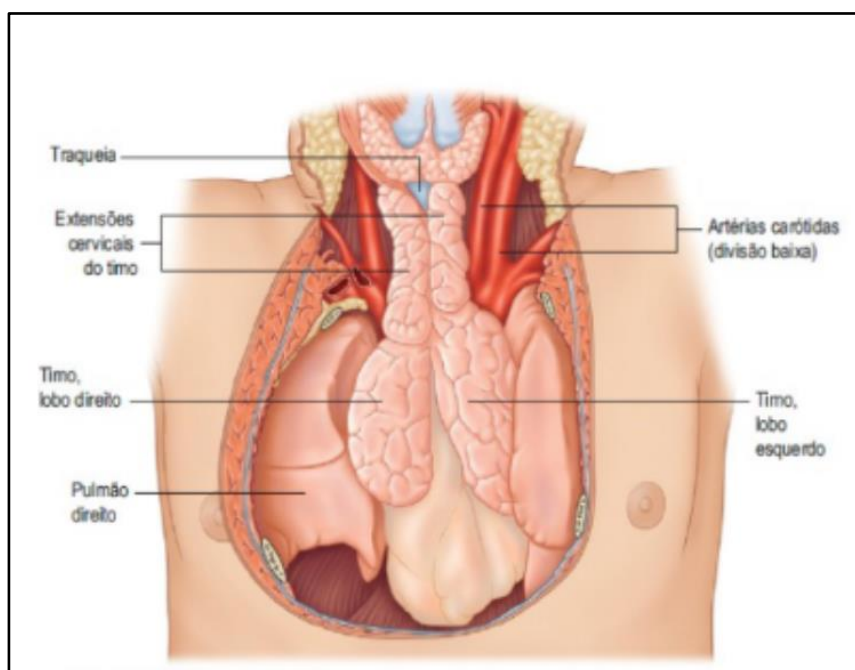
Diante disso, este estudo investiga os efeitos da senescência celular induzida pela D-gal sobre as TECs humanas, analisando sua viabilidade, proliferação e perfil bioquímico. A hipótese central é que esse tratamento induz senescência celular, promovendo mudanças estruturais e funcionais nessas células. Além disso, busca-se avaliar a espectroscopia Raman como ferramenta para a detecção dessas alterações, comparando-a com métodos tradicionais de biologia celular.

2. Referencial Teórico

2.1 Timo

O timo é um órgão linfóide primário localizado na região torácica, atrás da extremidade superior do esterno, próximo ao coração e aos grandes vasos da base (Lima e Carneiro-Sampaio, 2007; James et al., 2024). Ele desempenha um papel crucial no sistema imunológico, sendo responsável pela maturação e desenvolvimento dos linfócitos T, células essenciais para a resposta imune adaptativa (Thapa e Farber, 2019; Gulla, et al., 2023). É composto por dois lobos revestidos por uma cápsula delgada, que se projeta no órgão através de septos de tecido conjuntivo, dividindo o timo em lóbulos menores. Cada lóbulo possui um estroma formado por uma rede de TECs, macrófagos e células dendríticas, que criam um microambiente essencial para a migração, interação e maturação dos timócitos, células precursoras dos linfócitos T maduros (Rezzani et al., 2014). Além disso, o timo é fundamental para a seleção de células T, garantindo que apenas aquelas que reconhecem antígenos estranhos e que não reagem contra os próprios tecidos do corpo sejam liberadas para a circulação (Cowan et al., 2020).

Figura 1 - Representação gráfica da anatomia de timo neonatal



Fonte: <https://www.studocu.com/>

No processo de seleção e maturação dos linfócitos T, as TECs são indispensáveis e desempenham papéis essenciais no microambiente do timo. Essas células se dividem em duas

subpopulações principais, localizadas em regiões específicas e com funções complementares na maturação dos linfócitos T (Kadouri et al., 2019). No córtex tímico, as TECs corticais (cTECs) são cruciais para a seleção positiva, permitindo a sobrevivência dos timócitos que reconhecem corretamente os complexos de peptídeo-MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade), etapa essencial para a funcionalidade imunológica (Veneziani, 2020). Após essa fase inicial, os timócitos migram para a medula tímica, onde as TECs medulares (mTECs) são responsáveis pela seleção negativa. Expressando uma ampla variedade de autoantígenos, promovem a eliminação de linfócitos T autorreativos ou seu redirecionamento para funções reguladoras, garantindo a autotolerância e a homeostase imunológica. Dessa forma, a ação coordenada das cTECs e mTECs assegura que apenas linfócitos T maduros, funcionais e não autorreativos sejam liberados para a circulação, contribuindo para a eficiência do sistema imunológico adaptativo (Ohigashi et al., 2016).

No entanto, o timo não mantém sua funcionalidade inalterada ao longo da vida. Segundo Hale et al. (2021), ele sofre mudanças morfológicas e funcionais significativas com o envelhecimento. Durante a infância, apresenta alta atividade, mas, progressivamente, passa por um processo de involução, caracterizado pela substituição do tecido funcional por tecido adiposo e pela redução na produção de novos linfócitos T (Liang et al., 2022; Tong et al., 2020). Esse declínio, que se acentua após a puberdade, compromete a eficiência do sistema imunológico adaptativo, uma vez que reduz a população de TECs e, consequentemente, a geração de linfócitos T virgens e autotolerantes (Macena, Hermano e Costa, 2018; Cowan et al., 2020). Como resultado, a involução tímica está associada a uma maior suscetibilidade a infecções, menor eficácia vacinal e aumento da incidência de doenças relacionadas à idade, como o câncer.

Diante desse cenário, diversas pesquisas vêm explorando estratégias para rejuvenescer o timo e restaurar a produção de linfócitos T, visando aprimorar a imunidade em indivíduos idosos (Fujimori e Ohigashi, 2024). Nesse contexto, evidências científicas indicam que a atrofia tímica resulta da interação de múltiplos mecanismos, incluindo estresse oxidativo, alterações hormonais, modificações bioquímicas e infecções, sendo o estresse oxidativo e o acúmulo de danos moleculares nas TECs fatores centrais nesse processo (Barbouti, 2020). Esses achados reforçam a importância de investigar os mecanismos envolvidos na regressão tímica e possíveis intervenções terapêuticas para mitigar seus efeitos (Teixeira e Guariento, 2010).

2.2 Senescência celular

A senescência celular é um processo biológico que envolve a interrupção permanente do ciclo celular, resultando na perda da capacidade de divisão e proliferação celular. Esse estado pode ser induzido por diversos estressores, como danos ao DNA, disfunção mitocondrial, encurtamento dos telômeros e ativação de oncogenes. Apesar de atuar como um mecanismo de defesa contra a proliferação de células cancerígenas, contribuindo para a supressão tumoral, a cicatrização de feridas e a proteção contra fibrose, a senescência também está associada ao acúmulo de células senescentes nos tecidos ao longo do envelhecimento (Regulski, 2017; Martini e Passos, 2022; Inocêncio, de Oliveira e de Souza, 2024).

Esse acúmulo de células senescentes desempenha um papel importante no envelhecimento do organismo, promovendo disfunções teciduais e condições relacionadas à idade, como a remodelação do tecido e o declínio orgânico (Guo et al., 2022). Células senescentes, embora metabolicamente ativas, acumulam danos moleculares e alterações estruturais que comprometem a homeostase tecidual, contribuindo para a deterioração funcional dos tecidos em que se encontram (Campisi, 2021).

O envelhecimento, por sua vez, é um processo dinâmico, universal e progressivo, caracterizado por alterações morfológicas, funcionais, bioquímicas e psicológicas, que reduzem a capacidade adaptativa e favorecem o surgimento de doenças crônicas, impactando significativamente a saúde e a qualidade de vida (Silva e Ferrari, 2011). Entre os mecanismos envolvidos nesse processo, destaca-se o aumento de danos causados por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio provenientes do metabolismo mitocondrial, que levam à oxidação de macromoléculas como proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA, conforme a teoria dos radicais livres (Molina e Solórzano, 2021). Contudo, nem sempre indivíduos idosos apresentam maior estresse oxidativo em comparação aos jovens (Silva e Ferrari, 2011).

De acordo com da Silva e da Silva (2005), entre os principais fatores que contribuem para o envelhecimento celular estão:

- **Danos ao DNA:** Lesões no material genético, como quebras de fita dupla, desencadeiam mecanismos de reparo que nem sempre são eficientes, acumulando mutações ao longo do tempo.
- **Telômeros encurtados:** A cada ciclo de divisão celular, os telômeros, estruturas que protegem as extremidades dos cromossomos, encurtam-se, sinalizando a senescência celular.

- **Acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS):** O desequilíbrio entre a produção de ROS e os mecanismos antioxidantes acelera o dano celular, promovendo a ativação de vias pró-senescentes.

No esquema a seguir (figura 2), são destacadas as nove marcas do envelhecimento descritas por López-Otín et al. (2013), que sintetizam os principais mecanismos subjacentes, desde a instabilidade genômica até a comunicação intercelular alterada, oferecendo uma visão integrada das alterações que moldam esse fenômeno.

Figura 2 - Marcas do envelhecimento



Fonte: Adaptado de The hallmarks of aging, López-Otín et al., Cell 2013.

De acordo com González-Puertos e colaboradores (2015), as células senescentes apresentam características distintas, como aumento de tamanho, aspecto aplanado e presença de vacúolos. Embora sejam metabolicamente ativas, têm expressão gênica perturbada e não respondem adequadamente a estímulos que promovem a divisão celular ou a morte celular programada. Um marcador do estado senescente é o aumento da enzima β -galactosidase, que está associada à atividade lisossomal e ao envelhecimento celular, refletindo uma elevação da massa lisossomal durante a senescência (Lee et al., 2006). Além disso, essas células exibem modificações na heterocromatina, conhecidas como "focos de heterocromatina" associados à senescência, que ajudam a silenciar genes promotores de proliferação (Aird e Zhang, 2013).

No contexto do sistema imunológico, o envelhecimento está associado a um fenômeno complexo e multifatorial conhecido como imunossenescência, que se refere à deterioração progressiva da estrutura e função imunológica ao longo do tempo (Santoro, Bientinesi e Monti, 2021). Esse processo envolve diversas alterações, incluindo a remodelação dos órgãos linfoides e a redução da eficácia das respostas imunes, resultando em maior suscetibilidade a infecções, doenças autoimunes e neoplasias (Lian et al., 2020).

Com o avanço da idade, ocorrem mudanças significativas no sistema imune, como a diminuição da produção de anticorpos específicos e a redução da proliferação de linfócitos T. Essas modificações comprometem a eficiência da resposta imunológica, aumentando a morbidade e mortalidade entre os idosos (Esquinazi, 2009). Além disso, a deterioração do sistema imune está diretamente relacionada ao fenômeno do "inflammaging", um estado de inflamação crônica de baixo grau caracterizado por níveis elevados de marcadores inflamatórios (Liu et al., 2023). Esse ambiente pró-inflamatório agrava ainda mais a disfunção das defesas do organismo, intensificando seus efeitos negativos (Zhu et al., 2023; Pajak, Nowicka e Szepietowski, 2023).

Embora tradicionalmente vista como um processo degenerativo, essa reconfiguração do sistema imunológico tem sido interpretada, em estudos recentes, como uma adaptação às demandas acumuladas ao longo da vida (Alves e Bueno, 2019). Esse ajuste funcional pode ser uma resposta à carga antigênica persistente, permitindo ao organismo lidar com a exposição contínua a diversos patógenos (Accardi e Caruso, 2018).

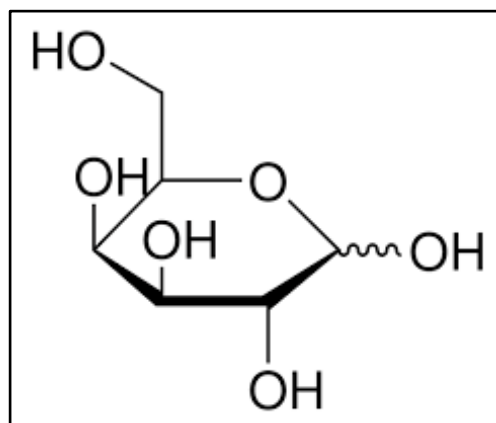
O avanço no entendimento desse fenômeno tem impulsionado a busca por estratégias para reduzir o declínio imunológico relacionado à idade. No entanto, as interações entre a senescência celular e os componentes do sistema imune ainda não são completamente compreendidas, exigindo mais pesquisas para o desenvolvimento de intervenções eficazes (Lian et al., 2020).

2.3 Estresse oxidativo induzido por D-galactose

A D-galactose (D-gal) é um monossacarídeo redutor que ocorre naturalmente como um epímero C-4 da glicose. Esse açúcar é um dos componentes da lactose, o principal dissacarídeo encontrado no leite e seus derivados (Umbayev et al., 2020), distribuído em diversos alimentos, como frutas, vegetais e hortaliças, laticínios, mel e produtos fermentados (Shwe et al., 2018). Além disso, alimentos enriquecidos, como chocolate e amendoim, também são fontes de D-gal. O xarope de hidrolisado de lactose, utilizado como adoçante em biscoitos, confeitaria e

sobremesas lácteas, destaca-se como uma fonte significativa de galactose na forma monossacarídica (Bo-Htay et al., 2018).

Figura 3 - Estrutura molecular da D-Galactose



Fonte: Sigma-Aldrich

Estudos indicam que a galactose, presente nesses produtos, está associada a diversos distúrbios relacionados ao envelhecimento, incluindo doença de Alzheimer, catarata, inflamações crônicas e envelhecimento precoce (Xu et al., 2018). Esse açúcar induz danos celulares e moleculares por meio de três vias principais: o acúmulo de galactitol e estresse oxidativo, que gera espécies reativas de oxigênio (ROS) e contribui para a inflamação e senescência imunológica; a formação de produtos de glicação avançada (AGEs), resultante da reação com grupos de aminoácidos livres, ativando respostas inflamatórias por meio de receptores específicos; e a disfunção colinérgica, caracterizada pelo aumento da acetilcolinesterase (AChE), o que agrava os danos inflamatórios (Ruan et al., 2013). Quando presente em níveis elevados, a galactose também pode ser metabolizada pela enzima galactose oxidase, formando compostos como D-galacto-exodialdose e hidroperóxido, que contribuem ainda mais para o aumento do estresse oxidativo (Remigante, 2021). Esses processos não apenas impactam a função celular e o sistema imunológico, mas também resultam em neurodegeneração, disfunções neurovasculares e estão associados a diversas condições patológicas (Wei et al., 2020).

No timo, a substância é utilizada como modelo experimental para estudar a involução tímica, acelerando esse processo por meio da redução da viabilidade das TECs, o que interfere na seleção e maturação dos linfócitos T. Como resultado, compromete a tolerância imune central e aumenta o risco de doenças autoimunes (Guo et al., 2020). Esses efeitos simulam a

involução tímica associada ao envelhecimento natural, que envolve a perda progressiva da função tímica, e estão diretamente relacionados à imunossenescência. Assim, a substância se destaca como um modelo valioso para investigar os impactos do envelhecimento no sistema imunológico e explorar possíveis intervenções terapêuticas (Du et al., 2019).

2.4 A espectroscopia RAMAN

A espectroscopia Raman é uma técnica analítica baseada no espalhamento inelástico da luz, fenômeno descrito por Raman em 1928, no qual fótons interagem com moléculas de uma amostra, resultando em mudanças na energia da luz espalhada (Alcantara Jr, 2002). Essas alterações energéticas, classificadas como Stokes ou anti-Stokes, fornecem informações detalhadas sobre as vibrações e rotações moleculares, permitindo a caracterização precisa da estrutura, composição e interações moleculares de diferentes materiais (Liendl et al., 2020).

Diferenciando-se por ser não destrutiva e não exigir reagentes, a espectroscopia Raman tem aplicações crescentes nas áreas de biologia e medicina, como a quantificação de biomoléculas, imagens moleculares hiperespectrais de células e tecidos, diagnóstico médico e caracterização de tecidos tumorais (Auner et al., 2018). Cada amostra possui um perfil espectroscópico único, permitindo a discriminação precisa de diferentes tipos de tecidos e a análise *in vivo*, como na identificação de células tumorais circulantes e na avaliação de tecidos cancerígenos (Alcantara Jr, 2002; Shipp, Sinjab e Notingher, 2017).

O método espectroscópico destaca-se como uma técnica analítica versátil e poderosa, capaz de medir a composição química de amostras e fornecer informações biológicas detalhadas (de Faria et al., 2002). Com espectros característicos para diversos materiais, a técnica possui aplicações estabelecidas em áreas como geologia, ciência dos materiais e polímeros. Na biologia, sua utilização tem se expandido rapidamente, graças à capacidade de obter informações químicas e estruturais sem preparação extensiva de amostras ou necessidade de rotulagem, além de ser pouco afetada por moléculas de água (Butler et al., 2016).

Recentemente, a espectroscopia Raman tem impulsionado avanços em biologia química, aproveitando efeitos ópticos que refletem diretamente as condições químicas e estruturais de moléculas em células e tecidos vivos (Álvarez et al., 2017). Sua independência das capacidades de fluorescência das moléculas possibilita a visualização direta de respostas químicas em amostras biológicas. Um exemplo é o uso de etiquetas Raman, que, por meio de vibrações moleculares únicas, permitem rastrear pequenas moléculas em células vivas sem os inconvenientes associados a fluoróforos volumosos (Dodo, Fujita e Sodeoka, 2022).

No entanto, até o momento, não há relatos na literatura sobre sua aplicação específica na investigação da senescência celular no timo. Este estudo inova ao explorar a espectroscopia Raman como uma ferramenta inédita para analisar alterações biomoleculares associadas ao envelhecimento tímico, oferecendo uma nova perspectiva para a compreensão dos processos envolvidos na senescência celular nesse órgão. Ao possibilitar a identificação de assinaturas espectroscópicas características da senescência, essa abordagem tem potencial para abrir novos caminhos na pesquisa sobre o envelhecimento imunológico.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral:

Avaliar as alterações moleculares e celulares de TEC humana após a indução da senescência celular com a D-galactose *in vitro*.

3.2 Objetivos Específicos:

- Analisar a morfologia das TEC humanas após a indução de senescência com D-galactose.
- Avaliar a viabilidade, taxas de morte celular e capacidade proliferativa das TEC humanas envelhecidas *in vitro* com D-galactose.
- Avaliar através da espectroscopia Raman, alterações bioquímicas das TEC humanas envelhecidas *in vitro* com D-galactose.

4. Material e Métodos

4.1 Cultivo Celular

Para a realização dos experimentos, utilizou-se a linhagem de TECs pós-natal THPN (Fernández et al., 1994, gentilmente cedidas pelo Laboratório de Pesquisas sobre o timo, FIOCRUZ). As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Gibco), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco), 1% de L-glutamina (Sigma-Aldrich) e 0,02% dos antibióticos estreptomicina e penicilina (Gibco), sob condições de 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂. As passagens das células foram realizadas utilizando uma solução de Tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich) quando necessário.

4.2 Indução da senescência celular com D-galactose

As TECs foram submetidas a um protocolo experimental para indução do envelhecimento *in vitro*. Para isso, foram divididas em dois grupos: controle e tratado com D-gal (Sigma-Aldrich). Um dia após o plaqueamento, o meio de cultura foi substituído por RPMI suplementado com 2% de SBF, com a adição de D-gal no grupo tratado.

4.3 Ensaio de viabilidade celular

Para verificar a viabilidade celular, foi utilizado o método colorimétrico de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) (Sigma-Aldrich) em formazan. As células THPN (7×10^3 células/poço) foram cultivadas em placas de 96 poços com RPMI contendo 2% de SBF e tratadas com D-gal nas concentrações de 10, 20 e 40 mg/mL durante 24 e 48 horas, a fim de determinar as concentrações e o tempo de tratamento ideal. As células mantidas nas mesmas condições, mas sem tratamento, foram consideradas como controle. Após o período de incubação, a absorbância foi mensurada a 540 nm no equipamento Polaris Celer, e os valores obtidos foram utilizados para calcular o percentual de viabilidade celular, considerando o controle como 100%.

4.4 Ensaio de morte celular

As células THPN (1×10^4 células/poço) foram cultivadas em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro de 13 mm e submetidas à senescência celular in vitro com D-gal, na concentração de 40 mg/mL, por 24 h e 48 h. Logo após, a avaliação da morte celular foi realizada por meio da coloração fluorescente dupla de laranja de acridina/iodeto de propídio (LA-IP) (Sigma-Aldrich) na concentração de 5 µg/mL, visualizada sob um microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse 50i). A análise foi conduzida qualitativamente a partir de imagens de fluorescência, utilizando o programa ImageJ para a contagem celular, baseada em referências morfológicas das próprias células. Essa metodologia permitiu identificar se o tratamento com D-galactose (40 mg/mL) por 48 horas causaria alterações na membrana e no núcleo das células THPN, associadas à apoptose ou necrose. Os dados obtidos foram utilizados para calcular a porcentagem de células viáveis, apoptóticas e necróticas em relação ao número total de células analisadas por campo.

4.5 Proliferação celular

As células THPN (1×10^4 células/poço) foram cultivadas em placas de 48 poços e submetidas à indução do envelhecimento celular in vitro com D-gal na concentração de 40 mg/mL por 24 e 48 horas. Após o tratamento, as células foram coradas com Trypan Blue (Gibco) para exclusão de células mortas e, em seguida, contadas em uma câmara de Neubauer utilizando um microscópio de luz invertido (Nikon Eclipse TS100), permitindo a avaliação da proliferação celular. A contagem foi realizada em quatro quadrantes, aplicando-se o cálculo $x/4 = Y$, seguido da multiplicação pela fórmula padrão da câmara de Neubauer:

$$Y \times 10^4 \times 2 \text{ (fator de diluição)} \times \text{volume total da suspensão}$$

Esse procedimento permitiu estimar a densidade celular e comparar a proliferação entre os grupos experimentais.

4.6 Morfologia celular

As células THPN (1×10^4 células/poço) foram cultivadas em placas de 24 poços e submetidas à indução do envelhecimento celular in vitro com D-gal (40 mg/mL) por 24 e 48

horas. Após o tratamento, foram fixadas com paraformaldeído a 4% e coradas com cristal violeta para análise morfológica. A observação foi realizada em um microscópio óptico de luz acoplado à câmera digital (Olympus IX 70, aumento 20x), permitindo a avaliação inicial das alterações celulares.

Para a análise por MEV, as células foram cultivadas em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro de 13mm. Após o tratamento, foram lavadas com PBS e fixadas com glutaraldeído a 0,5% por 5 minutos. Em seguida, as lamínulas foram submetidas ao processo de secagem e metalização, permitindo a obtenção de imagens de alta resolução. A análise foi realizada em um microscópio eletrônico de varredura (Shimadzu, modelo Superscan SSX-550) acoplado ao sistema de energia dispersiva de raios-X (EDS), possibilitando uma avaliação detalhada da arquitetura celular e das alterações morfológicas associadas à senescência.

4.7 Análise de espectroscopia RAMAN

As células THPN (1×10^4 células/poço) foram cultivadas em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro de 13mm e submetidas à senescência celular *in vitro* com D-gal, na concentração de 40 mg/mL, por 48h. Após a exposição, as células foram lavadas com PBS e fixadas com glutaraldeído a 0,5% em PBS por 5 minutos. Após secagem, as células foram analisadas no espectrômetro XploRA (Horiba) acoplado a um microscópio Olympus, e equipado com um laser de 532nm focalizado na região nuclear das células através de uma objetiva de 100x, por onde também foi coletada a luz espalhada após a interação com a amostra. Foram medidas 100 células de cada grupo de tratamento na faixa espectral de 700 – 1800 cm^{-1} (Miranda et al., 2022).

4.8 Análises estatísticas

Para as análises estatísticas dos dados obtidos e confecção dos gráficos, foi utilizado o programa de computador GraphPad Prism versão 8.00 (GraphPad Prism Software, Inc.). Os resultados estão representados como média e erro-padrão da média (EPM), e avaliados estatisticamente através do teste t ou através do teste ANOVA, com um nível de significância selecionado para $p < 0,05$. A Análise de Componentes Principais (PCA) foi utilizada para identificar e visualizar as diferenças na composição bioquímica entre os grupos celulares.

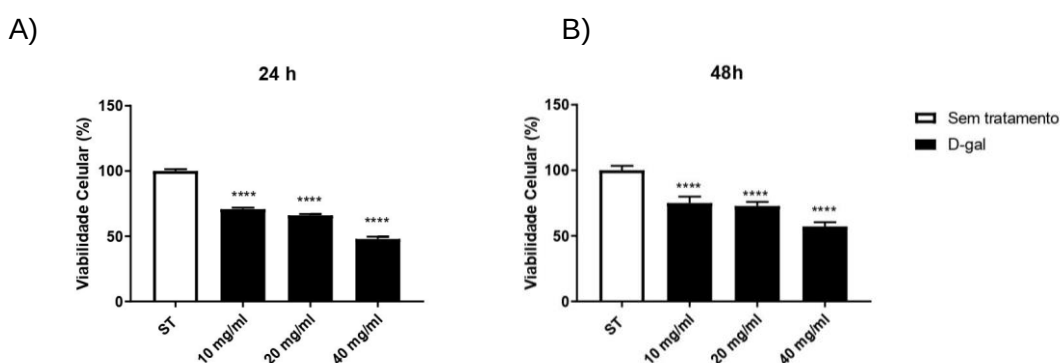
5. Resultados

5.1 Viabilidade das células THPN após exposição a D-galactose

Ao analisar o percentual de células viáveis tratadas com D-gal nas concentrações de 10, 20 e 40 mg/mL, foi observado que todas as concentrações resultaram em uma redução significativa na viabilidade celular em comparação com o grupo de controle não tratado (Figuras 4A e 4B). Após 24 horas de tratamento (Figura 4A), as médias de viabilidade celular foram de 70,84% para 10 mg/mL, 66,11% para 20 mg/mL e 47,96% para 40 mg/mL. Já após 48 horas (Figura 4B), os valores foram de 72,79% para 10 mg/mL, 60,71 % para 20 mg/mL e 57,24% para 40 mg/mL.

A concentração de 40 mg/mL demonstrou a maior redução percentual em ambos os tempos, indicando seu impacto mais expressivo na viabilidade celular. Esses resultados sugerem que 40 mg/mL de D-gal é mais eficiente na simulação dos aspectos naturais do envelhecimento celular, reduzindo a viabilidade das TECs em até metade. Por esse motivo, essa concentração foi escolhida para o restante do trabalho.

Figura 4- Efeito da D-Galactose na viabilidade das células epiteliais tímica humanas

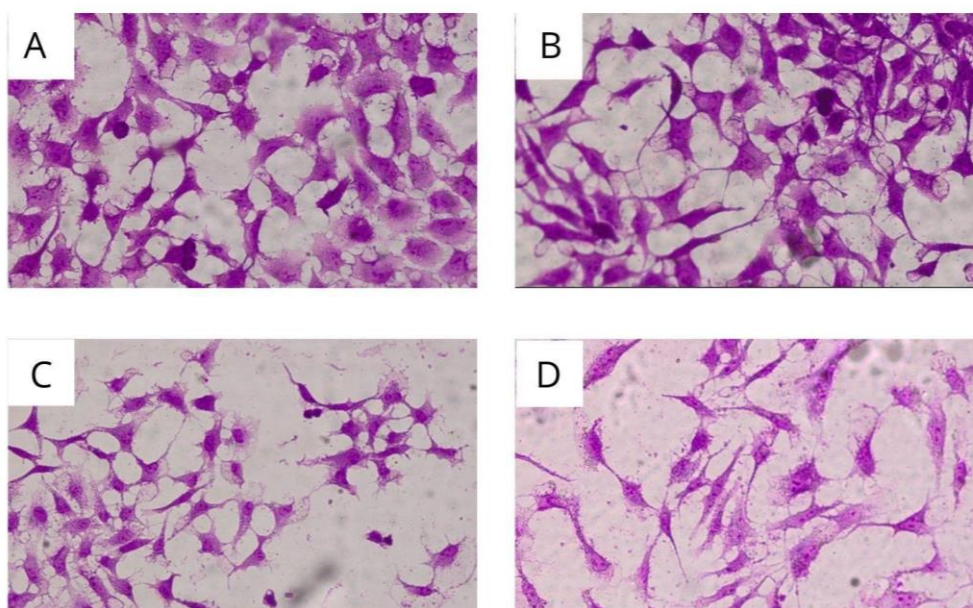


O gráfico representa a média $\pm$ erro-padrão do percentual médio de viabilidade celular de TECs humanas pós-natais após 24 e 48h de exposição à D-galactose. ST = grupo sem tratamento. As diferenças estatísticas foram determinadas pelo teste ANOVA seguido de Tukey (com (*) $p < 0.05$), onde (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,001$; e (****) $p < 0,0001$ em comparação ao grupo ST.

5.2 Análise da morfologia das células THPN após exposição a D-galactose

Na análise morfológica (Figuras 5A-D), utilizando a coloração de cristal violeta, foram avaliadas células após tratamento com D-gal por 24h e 48h. No grupo sem tratamento (Figuras 5A e 5B), as células apresentaram formato característico, com bordas bem definidas, núcleos arredondados e organização em rede. Em contrapartida, no grupo tratado com D-gal (Figuras 5C e 5D), as células exibiram alterações progressivas conforme o tempo de exposição, caracterizadas por um formato mais alongado, irregularidades no tamanho e na morfologia, além de uma redução no número de células por campo.

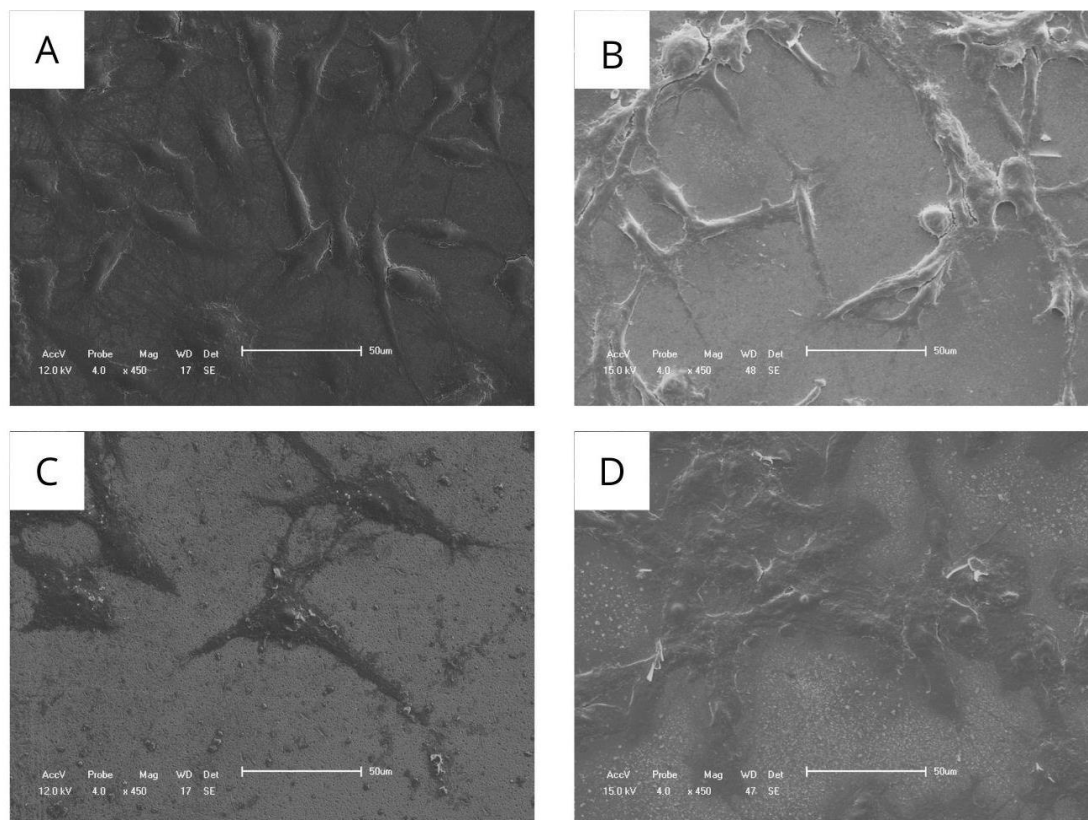
Figura 5- Morfologia das células THPN após exposição a D-galactose por 24 horas através de coloração com cristal violeta



Fotomicroscopias das células epiteliais tímica humanas coradas com cristal violeta. (A) Controle 24h; (B) Controle 48h; (C) D-GAL 24h; (D) D-GAL 48h. Aumento 200x.

Também foi realizada a análise morfológica por MEV (Figuras 6A-D) após tratamento com a D-GAL por 24h e 48h. Nas figuras 6A e 6B, observamos células pertencentes ao grupo sem tratamento, apresentando morfologia característica com formato bem definido, aparência rugosa e com relevos proeminentes. Nas figuras 6C e 6D, observamos células pertencentes ao grupo tratado com a D-GAL, apresentando-se mais alongadas, achatadas, com delimitações e superfícies sombreadas, além de ausência de relevos.

Figura 6- Morfologia das células THPN após exposição a D-galactose através de microscopia eletrônica de varredura

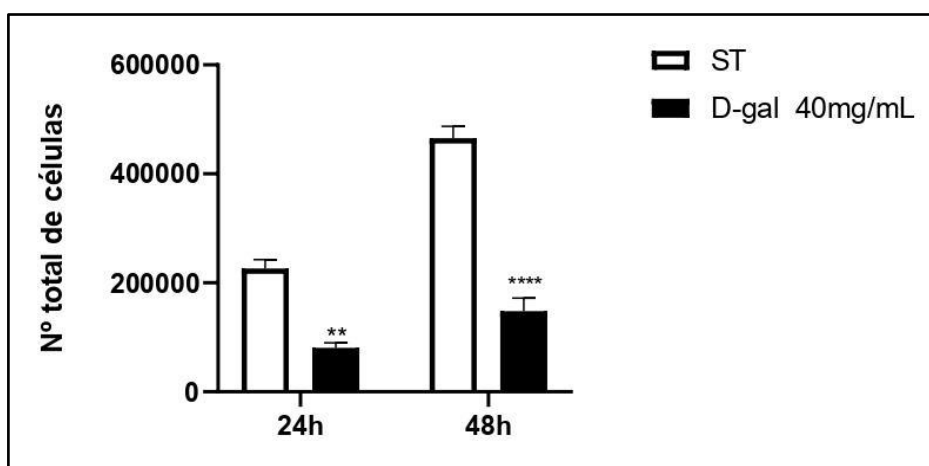


Fotomicrografias eletrônicas de varredura de células THPN sob diferentes condições experimentais, com aumento de 450x. (A) Controle 24h; (B) Controle 48h; (C) D-GAL 24h; (D) D-GAL 48h.

5.3 Proliferação das células THPN após exposição a D-galactose

O ensaio de proliferação celular (Figura 7) demonstrou uma redução significativa no crescimento de mais da metade da população de células tratadas com D-gal em comparação com as células não tratadas após 24 horas de exposição. Após 48 horas de tratamento, observamos que as células do grupo controle continuam a proliferar de forma consistente, enquanto as células do grupo tratado mantêm níveis de proliferação semelhantes aos registrados nas primeiras 24 horas.

Figura 7- Proliferação das células THPN após exposição a D-galactose



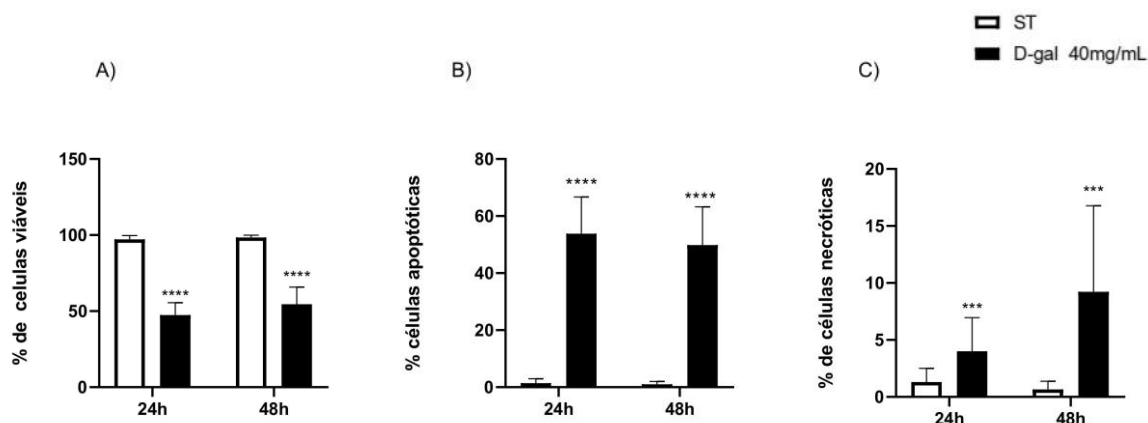
O gráfico representa a média $\pm$ erro-padrão do valor total médio da proliferação celular de THPN, após tratamento com a D-GAL por 24 e 48 horas. Os valores de significância estatística foram determinados pelo teste t, seguido do pós-teste de Sidak, onde (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,001$; e (****) $p < 0,0001$ em comparação ao grupo ST (sem tratamento).

5.4 Ensaio de morte celular com Laranja de acridina e Iodeto de Propídio após exposição a D-galactose

Dando continuidade às análises, foi verificado que os resultados obtidos no ensaio de morte celular corroboram os dados observados no ensaio de proliferação. Tanto em 24 horas quanto em 48 horas de tratamento, constatou-se uma redução significativa na porcentagem de células viáveis no grupo tratado comparado ao grupo controle sem tratamento (Figura 8A).

Além disso, foi visto um aumento significativo no percentual de células apoptóticas no grupo tratado com D-gal (Figura 8B), em comparação ao grupo controle. Paralelamente, foi detectada a presença de poucas células necróticas no grupo tratado (Figura 8C).

Figura 8- Ensaio para avaliar taxa de morte celular com Laranja de acridina e Iodeto de Propídio após exposição a D-galactose



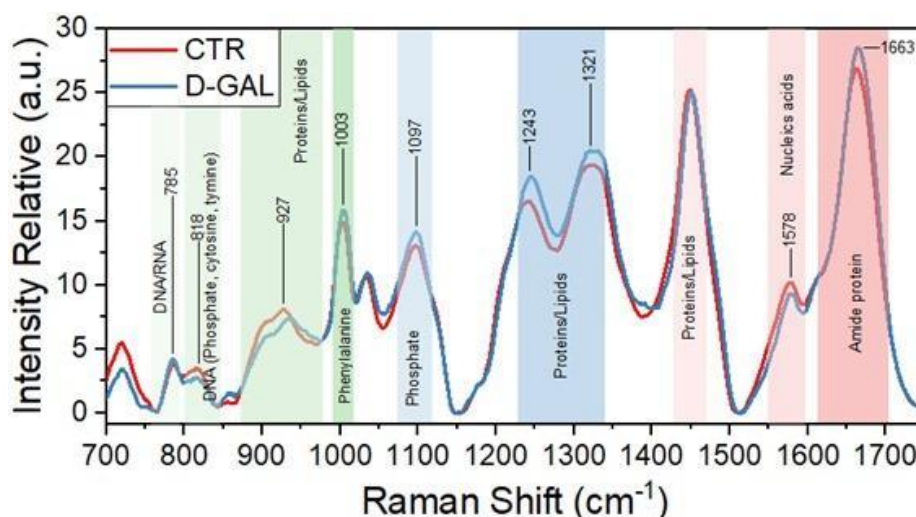
O gráfico representa a média $\pm$ erro-padrão do valor total médio da taxa de morte celular em células THPN após tratamento com D-GAL na concentração de 40 mg/mL. (A) % de células viáveis; (B) % de células apoptóticas; (C) % de células necróticas. Os valores de significância estatística foram determinados pelo teste t, seguido do pós-teste de Sidak, onde (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,001$; e (****) $p < 0,0001$ em comparação ao grupo controle.

5.5 Análise do perfil bioquímico através de espectroscopia Raman

Após 48 horas de tratamento, quando se compara o grupo controle com o grupo exposto à D-gal (Figura 9, linha vermelha e linha azul, respectivamente) é possível observar que as principais mudanças nas bandas Raman correspondem ao estiramento de moléculas presentes no DNA (fosfato, citosina, timina) em 818 cm^{-1} , onde foi observada uma redução considerável no grupo de células tratadas com D-gal. Da mesma forma, pode ser observada redução na banda referente ao estiramento C–C na região de 927 cm^{-1} de proteínas/lipídios. Já nas bandas centradas em 1003 cm^{-1} e em 1097 cm^{-1} relacionadas aos estiramentos de fenilalanina e fosfatos, respectivamente, pode ser observado aumento considerável da sua intensidade no grupo de células tratadas com D-gal.

Ainda pode ser observado nestes espectros Raman diferenças de intensidade relativa nos picos na região espectral de $1243 - 1321\text{ cm}^{-1}$. Esta região é uma parte complexa dos espectros, pois muitas frequências vibracionais relacionadas às proteínas, aos lipídios e aos ácidos nucleicos se sobrepõem. Por fim, também é observada diferença de intensidade no pico de 1578 cm^{-1} referente aos ácidos nucleicos e do pico relacionado às vibrações na banda da amida I centrada em 1662 cm^{-1} .

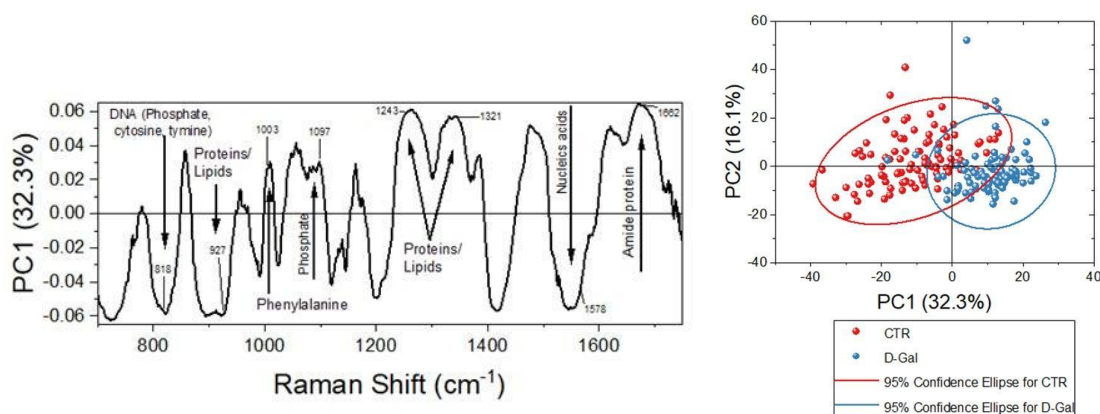
Figura 9- Espectro Raman de células THPN após exposição a D-galactose



Espectro Raman dos grupos de THPN: células controle (linha vermelha) e células expostas à D-GAL (linha azul)

Como mostra a Figura 10, 32,3% das células do grupo D-GAL (pontos azuis) começam a se distinguir do grupo controle (pontos vermelhos) pelos dois primeiros PCs, representando 48,4% da variância, indicando diferenças espectrais significativas entre os grupos. O principal discriminante foi o escore do PC1, onde o grupo controle apresentou escores negativos e o grupo D-gal, escores positivos, aparentando duas populações distintas.

Figura 10 - Análise de componente principal (PCA)



Análise de Componente Principal (PCA). Gráfico de score e gráfico de peso para o PC1 para as células dos grupos: controle e D-GAL.

6. Discussão

Os resultados do ensaio de viabilidade celular (Figuras 4) demonstraram que a concentração de 40 mg/mL da D-gal reduz significativamente a viabilidade das células THPN, possivelmente devido ao comprometimento metabólico causado pelo estresse oxidativo gerado pelo excesso do açúcar (Xu et al., 2018).

Dados da literatura indicam que a D-gal em excesso pode levar à produção elevada de espécies reativas de oxigênio (ROS) e à formação de produtos finais de glicação (AGEs), resultando em estresse oxidativo, inflamação e apoptose (Du et al., 2019; Cai et al., 2022). A correlação entre os efeitos observados e os dados obtidos sugere que a diminuição da viabilidade celular está associada à disfunção mitocondrial, que amplifica a produção de ROS e o estresse oxidativo.

Esses processos ativam vias de sinalização ligadas à senescência celular, promovendo a interrupção do ciclo celular e a secreção de mediadores pró-inflamatórios (Shwe et al., 2018). Embora os efeitos observados após 24 e 48 horas sejam semelhantes, o período mais prolongado possibilita uma análise mais abrangente de possíveis alterações cumulativas ou progressivas na função celular. Esses achados indicam que a concentração utilizada e o modelo experimental são adequados para induzir alterações celulares associadas à senescência, embora sejam necessários estudos adicionais, como análise da produção de ROS e avaliação de marcadores genéticos, para auxiliar na validação dessas observações.

A análise morfológica com cristal violeta das células tratadas com D-gal, conforme apresentado na figura 5, revelou alterações estruturais significativas associadas ao envelhecimento celular. As células tratadas apresentaram-se mais alongadas, com tamanhos e formas irregulares, além de exibirem uma rede desorganizada e menor densidade celular por campo em comparação ao grupo controle, que manteve a morfologia característica das células epiteliais tímicas, com aparência uniforme e bem organizada. Normalmente, essas células exibem forma poligonal alongada, núcleos ovais ou arredondados centralizados e prolongamentos citoplasmáticos que formam uma rede tridimensional interconectada, conhecida como "rede tímica" (Fernandez et al., 1994).

Essas alterações são consistentes com características descritas na literatura para células envelhecidas. Segundo Rico-Rosillo, Oliva-Rico e Vega-Robledo (2018), células senescentes apresentam uma morfologia mais aplanada, aumento na proporção núcleo-citoplasma e maior número de vacúolos. Essas características estão alinhadas com os sinais de degeneração descritos por Muñoz-Espín e Serrano (2014), como aumento do tamanho celular, deformações

nucleares, vacuolização do citoplasma e danos em organelas, incluindo o retículo endoplasmático e as mitocôndrias. Essas mudanças estruturais contribuem para a aparência irregular e desorganizada das células, conforme confirmado nos experimentos realizados.

Complementando essas observações, a análise por MEV (Figura 6) corrobora com as alterações observadas anteriormente. As células do grupo controle exibiram bordas bem definidas, superfície rugosa e relevos proeminentes, caracterizando uma morfologia preservada. Já as células tratadas com D-gal apareceram mais alongadas e achatadas, com delimitações menos precisas, ausência de relevos e superfície sombreada e escura. Esses achados reforçam que o tratamento com D-gal induz alterações morfológicas características da senescência celular, afetando tanto a estrutura individual quanto a organização em rede das células epiteliais tímicas.

Os ensaios de proliferação celular (Figura 7) evidenciaram o impacto do tratamento com D-gal na capacidade proliferativa. Após 24 horas de exposição, houve uma redução significativa no crescimento celular. No grupo tratado, observou-se uma sutil proliferação entre 24 e 48 horas, sugerindo que nem todas as células cessaram a divisão e algumas ainda tentam reparar os danos causados pela D-gal. Enquanto isso, as células do grupo controle continuaram a proliferar normalmente.

Paralelamente, os ensaios de morte celular utilizando Laranja de Acridina e Iodeto de Propídio (Figura 8) confirmaram um aumento significativo na proporção de células apoptóticas e uma redução na fração de células viáveis no grupo tratado. Esses resultados sugerem que a exposição à D-gal interfere na capacidade das células de completar ciclos celulares regulares, característica marcante da senescência celular (Wyld et al., 2020).

Além disso, o aumento de células apoptóticas no grupo tratado indica que o provável estresse oxidativo gerado pela D-gal pode induzir apoptose nas células THPN após 24 e 48 horas de tratamento, em conformidade com estudos de Barbouti et al. (2020), que observou um aumento de TECs com marcadores de apoptose durante o envelhecimento do timo. Embora células senescentes geralmente sejam resistentes à apoptose devido à expressão de proteínas antiapoptóticas, como descrito por Hu et al. (2022), o estresse oxidativo causado pela D-galactose parece superar essa resistência nas condições experimentais. Isso indica que o tratamento induz tanto características de senescência quanto processos apoptóticos, evidenciando a complexidade das vias envolvidas no envelhecimento celular.

Grivicich, Regner e da Rocha (2007) ressaltam que a apoptose, além de desempenhar um papel crucial na manutenção da homeostase, atua como um mecanismo de defesa, sendo ativada em circunstâncias de invasão por agentes patogênicos ou como resposta a danos no

DNA. Instabilidades nesse processo, como a redução da proliferação celular e o aumento da apoptose, estão frequentemente ligadas ao acúmulo de estresse oxidativo, que desempenha um papel essencial na mediação de danos ao DNA, disfunção mitocondrial e ativação de vias apoptóticas. No caso das TECs, esse processo pode contribuir para a disfunção tímica associada ao envelhecimento, refletindo-se na diminuição da renovação celular e no comprometimento da seleção e maturação de linfócitos T.

A espectroscopia Raman revelou alterações significativas no perfil bioquímico das células tratadas, indicando danos em componentes fundamentais, como DNA, proteínas e lipídios. Esses achados estão em consonância com a literatura, que destaca a sensibilidade da espectroscopia Raman para detectar mudanças estruturais e metabólicas em componentes celulares (Eberhard et al., 2017). A análise multivariada (PCA) complementou esses resultados, evidenciando diferenças bioquímicas robustas entre os grupos controle e tratado.

Enquanto as técnicas biológicas tradicionais oferecem informações detalhadas sobre processos celulares, a espectroscopia Raman apresenta a vantagem de fornecer uma visão global e rápida das alterações bioquímicas, sem necessidade de preparações complexas ou uso de reagentes.

7. Conclusão

Os resultados deste trabalho evidenciaram os impactos significativos da indução de senescência celular com D-gal em células epiteliais tímicas humanas, destacando alterações na viabilidade, proliferação e morfologia celular, além de danos bioquímicos detectados por espectroscopia Raman. Observou-se uma redução expressiva na viabilidade e proliferação celular, acompanhada de importantes modificações morfológicas, como variações no tamanho, delimitação celular e estrutura do citoplasma. Paralelamente, foram identificadas alterações bioquímicas em componentes essenciais, incluindo DNA, proteínas e lipídios, evidenciando o amplo impacto da senescência induzida.

Verificou-se também um aumento na porcentagem de células apoptóticas no grupo tratado, um aspecto relevante, visto que células senescentes são geralmente descritas como resistentes à apoptose. Embora as razões para esse comportamento ainda não estejam completamente esclarecidas, tais observações destacam a importância do modelo de indução de senescência com D-galactose como ferramenta promissora para investigar os mecanismos do envelhecimento celular e suas implicações no microambiente tímico.

O estudo também permitiu um comparativo entre técnicas biológicas tradicionais e a espectroscopia Raman. Enquanto os métodos convencionais forneceram dados detalhados sobre viabilidade, proliferação e morfologia celular, a espectroscopia Raman demonstrou-se uma alternativa mais versátil e eficiente para análises integradas, permitindo a detecção não invasiva e sensível de alterações bioquímicas associadas à senescência.

Os achados ressaltam a necessidade de estudos futuros para analisar marcadores específicos de senescência e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem estar envolvidos nos mecanismos observados. Além disso, é fundamental aprofundar a compreensão das vias moleculares associadas à indução da senescência e sua relação com os processos de apoptose e estresse oxidativo. Essas investigações poderão ampliar o entendimento sobre os mecanismos do envelhecimento celular e explorar o potencial da espectroscopia Raman como ferramenta complementar ou alternativa no estudo da senescência celular.

8. Perspectivas

Este estudo abre novas perspectivas para a aplicação da espectroscopia Raman na pesquisa da senescência celular no timo, um órgão essencial para a defesa do organismo. A ausência de estudos prévios nessa área reforça a necessidade de investigações adicionais para consolidar essa técnica como uma ferramenta bioquímica sensível e não invasiva.

Futuramente, pesquisas devem investigar os mecanismos moleculares da senescência induzida pela D-gal no envelhecimento tímico. Isso inclui a análise de marcadores genéticos, avaliação de ROS, estudo da expressão genética e das vias de sinalização, e investigação da relação entre senescência celular e apoptose. Essas investigações podem fornecer esclarecimentos sobre os mecanismos que regulam a involução tímica e contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas.

Comparar a espectroscopia Raman com outras técnicas bioquímicas pode validar sua precisão na detecção de alterações celulares e impulsionar seu uso como ferramenta diagnóstica. Assim, este estudo não apenas contribui para o conhecimento da senescência celular no timo, mas também abre caminho para novas aplicações da espectroscopia Raman na biologia celular e no envelhecimento.

9. Referências Bibliográficas

ACCARDI, Giulia; CARUSO, Calogero. Immune-inflammatory responses in the elderly: an update. *Immunity & Ageing*, v. 15, p. 1-4, 2018.

AIRD, Katherine M.; ZHANG, Rugang. Detection of senescence-associated heterochromatin foci (SAHF). *Cell Senescence: Methods and Protocols*, p. 185-196, 2013.

ALCANTARA JR, Petrus. Espectroscopia molecular. Curso Física Moderna II, 2002.

ALVES, Amanda Soares; BUENO, Valquiria. Immunosenescence: participation of T lymphocytes and myeloid-derived suppressor cells in aging-related immune response changes. *Einstein (Sao Paulo)*, v. 17, p. eRB4733, 2019.

AUNER, Gregory W. et al. Applications of Raman spectroscopy in cancer diagnosis. *Cancer and Metastasis Reviews*, v. 37, p. 691-717, 2018.

AZMAN, Khairunnuur Fairuz; ZAKARIA, Rahimah. D-Galactose-induced accelerated aging model: an overview. *Biogerontology*, v. 20, n. 6, p. 763-782, 2019.

BARBOUTI, Alexandra et al. Implications of oxidative stress and cellular senescence in age-related thymus involution. *Oxidative medicine and cellular longevity*, v. 2020, n. 1, p. 7986071, 2020.

BO-HTAY, Cherry et al. Effects of d-galactose-induced ageing on the heart and its potential interventions. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 22, n. 3, p. 1392-1410, 2018.

DURAND, Marie-José et al. Contribution of RAMAN Spectroscopy to Assess Cadmium Toxicity on Marine Mussel (*Mytilus Edulis*). In: *International Conference on Chemistry and the Environment–ICCE 2023*. 2023. p. 664-687.

CAMPISI, Judith. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annual review of physiology*, v. 75, n. 1, p. 685-705, 2013.

CAI, Nanshuo; WU, Yifan; HUANG, Yan. Induction of accelerated aging in a mouse model. *Cells*, v. 11, n. 9, p. 1418, 2022.

COWAN, Jennifer E. et al. Postnatal involution and counter-involution of the thymus. *Frontiers in Immunology*, v. 11, p. 897, 2020.

DA SILVA, Marcos Mendes; DA SILVA, Valquíria Helena. Envelhecimento: importante fator de risco para o câncer. *Arquivos médicos do ABC*, v. 30, n. 1, 2005.

DE FARIA, Dalva Lúcia A.; AFONSO, Marisa C.; EDWARDS, Howell GM. Espectroscopia Raman: uma nova luz no estudo de bens culturais. *Revista do Museu de Arqueologia e Etnologia*, v. 12, p. 249, 2002.

DODO, Kosuke; FUJITA, Katsumasa; SODEOKA, Mikiko. Raman spectroscopy for chemical biology research. *Journal of the American Chemical Society*, v. 144, n. 43, p. 19651-19667, 2022.

DU, H. M. et al. Defective central immune tolerance induced by high-dose D-galactose resembles aging. *Biochemistry (Moscow)*, v. 84, p. 617-626, 2019.

EBERHARDT, Katharina et al. Raman and infrared spectroscopy distinguishing replicative senescent from proliferating primary human fibroblast cells by detecting spectral differences mainly due to biomolecular alterations. *Analytical chemistry*, v. 89, n. 5, p. 2937-2947, 2017.

ESQUINAZI, Danuza de A. et al. Imunossenescência: as alterações do sistema imunológico provocadas pelo envelhecimento. 2009.

FERNANDEZ, Edgar et al. Establishment and characterization of cloned human thymic epithelial cell lines. Analysis of adhesion molecule expression and cytokine production. 1994.

FUJIMORI, Sayumi; OHIGASHI, Izumi. The role of thymic epithelium in thymus development and age-related thymic involution. *The Journal of Medical Investigation*, v. 71, n. 1.2, p. 29-39, 2024.

GARCÍA-TREJO, Semiramis Stephania et al. Protective Effect of Curcumin on D-Galactose-Induced Senescence and Oxidative Stress in LLC-PK1 and HK-2 Cells. *Antioxidants*, v. 13, n. 4, p. 415, 2024.

GONZÁLEZ-PUERTOS, Viridiana Yazmín et al. Participación del fenotipo secretor de las células senescentes en el desarrollo del cáncer, el envejecimiento y las enfermedades asociadas a la edad. *Gac Med Mex*, v. 151, p. 491-500, 2015.

GRIVICICH, Ivana; REGNER, Andréa; DA ROCHA, Adriana Brondani. Morte celular por apoptose. *Revista brasileira de cancerologia*, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

GULLA, Surendra et al. Role of thymus in health and disease. *International Reviews of Immunology*, v. 42, n. 5, p. 347-363, 2023.

GUO, Li et al. Gallic acid attenuates thymic involution in the d-galactose induced accelerated aging mice. *Immunobiology*, v. 225, n. 1, p. 151870, 2020.

GUO, Jun et al. Aging and aging-related diseases: from molecular mechanisms to interventions and treatments. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 7, n. 1, p. 391, 2022.

HALE, Laura P. et al. T cell-depleted cultured pediatric thymus tissue as a model for some aspects of human age-related thymus involution. *GeroScience*, v. 43, p. 1369-1382, 2021.

HU, Li et al. Why senescent cells are resistant to apoptosis: an insight for senolytic development. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 10, p. 822816, 2022.

JAMES, Kieran D. et al. Assembling the thymus medulla: Development and function of epithelial cell heterogeneity. *BioEssays*, v. 46, n. 3, p. 2300165, 2024.

KADOURI, Noam et al. Thymic epithelial cell heterogeneity: TEC by TEC. *Nature Reviews Immunology*, v. 20, n. 4, p. 239-253, 2020.

LEAL, Angélica Seixas et al. Os diversos aspectos da imunossenescência: uma revisão sistemática The various aspects of immunosenescence: a systematic review. *Brazilian Journal of Development*, v. 8, n. 3, p. 15553-15584, 2022.

LEE, Bo Yun et al. Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase. *Aging cell*, v. 5, n. 2, p. 187-195, 2006.

LIAN, Jingyao et al. Immunosenescence: a key player in cancer development. *Journal of hematology & oncology*, v. 13, n. 1, p. 151, 2020.

LIANG, Zhanfeng et al. Age-related thymic involution: Mechanisms and functional impact. *Aging Cell*, v. 21, n. 8, p. e13671, 2022.

LIENDL, Lisa; GRILLARI, Johannes; SCHOSSERER, Markus. Raman fingerprints as promising markers of cellular senescence and aging. *GeroScience*, v. 42, n. 2, p. 377-387, 2020.

LIU, Zaoqu et al. Immunosenescence: molecular mechanisms and diseases. *Signal transduction and targeted therapy*, v. 8, n. 1, p. 200, 2023.

LÓPEZ-OTÍN, Carlos et al. The hallmarks of aging. *Cell*, v. 153, n. 6, p. 1194-1217, 2013.

LIMA, Flávia Afonso; CARNEIRO-SAMPAIO, Magda. O papel do timo no desenvolvimento do sistema imune. *Pediatria (São Paulo)*, v. 29, n. 1, p. 33-42, 2007.

MACENA, Wagner Gonçalves; HERMANO, Lays Oliveira; COSTA, Tainah Cardoso. Alterações fisiológicas decorrentes do envelhecimento. *Revista Mosaicum*, v. 15, n. 27, p. 223-238, 2018.

MARTINI, Hélène; PASSOS, João F. Cellular senescence: all roads lead to mitochondria. *The FEBS journal*, v. 290, n. 5, p. 1186-1202, 2023.

MIRANDA, Andrea L. et al. Krüppel-like factor 6 participates in extravillous trophoblast cell differentiation and its expression is reduced in abnormally invasive placenta. *FEBS letters*, v. 596, n. 13, p. 1700-1719, 2022.

MOLINA, Irviana; SOLÓRZANO, Eduvigis. ¿ La senescencia celular promueve el envejecimiento biológico? Scoping review. *Acta bioclinica*, v. 11, n. 22, p. 241-272, 2021.

NAWAZ, Haq et al. Raman micro spectroscopy study of the interaction of vincristine with A549 cells supported by expression analysis of bcl-2 protein. *Analyst*, v. 138, n. 20, p. 6177-6184, 2013.

NOTINGHER, I. et al. Spectroscopic study of human lung epithelial cells (A549) in culture: living cells versus dead cells. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, v. 72, n. 4, p. 230-240, 2003.

OHIGASHI, Izumi; KOZAI, Mina; TAKAHAMA, Yousuke. Development and developmental potential of cortical thymic epithelial cells. *Immunological reviews*, v. 271, n. 1, p. 10-22, 2016.

PAJAŁ, Justyna; NOWICKA, Danuta; SZEPIETOWSKI, Jacek C. Inflammaging and Immunosenescence as Part of Skin Aging—A Narrative Review. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 9, p. 7784, 2023.

PEZZOTTI, Giuseppe. Raman spectroscopy in cell biology and microbiology. *Journal of Raman Spectroscopy*, v. 52, n. 12, p. 2348-2443, 2021.

REGULSKI, Matthew J. Cellular senescence: what, why, and how. *Wounds: a compendium of clinical research and practice*, v. 29, n. 6, p. 168-174, 2017.

REMIGANTE, Alessia et al. d-Galactose induced early aging in human erythrocytes: role of band 3 protein. *Journal of cellular physiology*, v. 237, n. 2, p. 1586-1596, 2022.

REZZANI, Rita et al. Thymus and aging: morphological, radiological, and functional overview. *Age*, v. 36, p. 313-351, 2014.

RICO-ROSILLO, María Guadalupe; OLIVA-RICO, Diego; VEGA-ROBLEDO, Gloria Bertha. Envejecimiento: algunas teorías y consideraciones genéticas, epigenéticas y ambientales. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, v. 56, n. 3, p. 287-294, 2018.

RUAN, Qingwei et al. The neurovascular protective effects of huperzine A on D-galactose-induced inflammatory damage in the rat hippocampus. *Gerontology*, v. 60, n. 5, p. 424-439, 2014.

SANTORO, Aurelia; BIENTINESI, Elisa; MONTI, Daniela. Immunosenescence and inflammaging in the aging process: age-related diseases or longevity?. *Ageing research reviews*, v. 71, p. 101422, 2021.

SILVA, Wallison Junio Martins da; FERRARI, Carlos Kusano Bucalen. Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento. *Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia*, v. 14, p. 441-451, 2011.

SHIPP, Dustin W.; SINJAB, Faris; NOTINGHER, Ioan. Raman spectroscopy: techniques and applications in the life sciences. *Advances in Optics and Photonics*, v. 9, n. 2, p. 315-428, 2017.

SHWE, Thazin et al. Role of D-galactose-induced brain aging and its potential used for therapeutic interventions. *Experimental gerontology*, v. 101, p. 13-36, 2018.

- TEIXEIRA, Ilka Nicéia D.; GUARIENTO, Maria Elena. Biologia do envelhecimento: teorias, mecanismos e perspectivas. *Ciência & saúde coletiva*, v. 15, p. 2845-2857, 2010.
- THAPA, Puspa; FARBER, Donna L. The role of the thymus in the immune response. *Thoracic surgery clinics*, v. 29, n. 2, p. 123-131, 2019.
- TONG, Qing-Yue et al. Human thymic involution and aging in humanized mice. *Frontiers in Immunology*, v. 11, p. 1399, 2020.
- TORRADO, María Del Rosario Sanguino; MORENO, Adriana Patricia Rojas. La epigenética como protagonista en la senescencia celular. *Universitas Medica*, v. 63, n. 3, 2022.
- UMBAYEV, Bauyrzhan et al. Galactose-induced skin aging: the role of oxidative stress. *Oxidative medicine and cellular longevity*, v. 2020, n. 1, p. 7145656, 2020.
- VAN DEURSEN, Jan M. The role of senescent cells in ageing. *Nature*, v. 509, n. 7501, p. 439-446, 2014.
- VENEZIANI, Luciana Peixoto et al. Efeitos de análogos da acetilcolina e noradrenalina sobre interações entre timócitos e células epiteliais tímicas. 2020. Tese de Doutorado.
- XU, Yao et al. D-galactose induces premature senescence of lens epithelial cells by disturbing autophagy flux and mitochondrial functions. *Toxicology letters*, v. 289, p. 99-106, 2018.
- WANG, Ziwei et al. Glycine suppresses AGE/RAGE signaling pathway and subsequent oxidative stress by restoring Glo1 function in the aorta of diabetic rats and in HUVECs. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2019, n. 1, p. 4628962, 2019.
- WANG, Yunan et al. Immunosenescence, aging and successful aging. *Frontiers in immunology*, v. 13, p. 942796, 2022.
- WYLD, Lynda et al. Senescence and cancer: a review of clinical implications of senescence and senotherapies. *Cancers*, v. 12, n. 8, p. 2134, 2020.
- ZHU, Hongkang et al. Immunosenescence and macrophages: from basics to therapeutics. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, p. 106479, 2023.