

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CAMPUS A. C. SIMÕES
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LAURA MARIA MORALES NASCIMENTO

**Avaliação dos impactos do envelhecimento induzido por D-galactose no timo de
camundongos**

Maceió
2024

LAURA MARIA MORALES NASCIMENTO

Avaliação dos impactos do envelhecimento induzido por D-galactose no timo de camundongos

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

Orientador (a): Prof^a Dr^a Maria Danielma dos Santos Reis.

Maceió

2024

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

N244a Nascimento, Laura Maria Morales.

Avaliação dos impactos do envelhecimento induzido por D-galactose no timo de camundongos / Laura Maria Morales Nascimento. – Maceió, 2024.
35 f. : il.

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, 2024.

Bibliografia: f. 29-35.

1. Imunossenescência. 2. Timo. 3. Galactose. I. Título.

CDU: 599.323:616.438

LAURA MARIA MORALES NASCIMENTO

Avaliação dos impactos do envelhecimento induzido por D-galactose no timo de camundongos

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado em 24/01/2024 ao curso de
Bacharelado em Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Alagoas, como
requisito parcial à obtenção do título de
Bacharelado em Ciências Biológicas.

Documento assinado digitalmente
 MARIA DANIELMA DOS SANTOS REIS
Data: 28/02/2024 12:19:45-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profª Drª Maria Danielma dos Santos Reis (Orientadora)

Banca examinadora:

Documento assinado digitalmente
 LAIS COSTA AGRA
Data: 28/02/2024 12:57:16-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Examinadora 1: Profª Drª Lais Costa Agra
(Universidade Federal de Alagoas)

Documento assinado digitalmente
 MARIA CLAUDIA DA SILVA
Data: 29/02/2024 18:50:05-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Examinadora 2: Profª Drª Maria Cláudia da Silva
(Universidade Federal de Alagoas)

Agradecimentos

Ao meu passado, você me trouxe pessoas maravilhosas que estiveram comigo durante toda a jornada que me trouxe até aqui. Este trabalho é uma colcha de retalhos composta por pessoas que me deram a mão, mostraram empatia, enxugaram minhas lágrimas, elogiaram meu sorriso, acreditaram em mim quando nem eu mesma acreditei, me disseram a verdade que muitas vezes eu não queria ouvir. Eu espero um dia conseguir demonstrar a minha eterna gratidão por todos os passos que me trouxeram até esta linha de chegada.

Do momento em que eu nasci, aprendi a ler, me apaixonei por aprender e escolhi que queria ser bióloga, eu agradeço à minha mãe, que esteve do meu lado em todas as batalhas até o momento que eu venci a luta. Palavras nunca serão suficientes, mas obrigada por ter me feito a mulher que sou hoje, desde as historinhas para dormir até as caronas para o aeroporto nos meus desbravamentos ao mundo.

À minha madrinha, toda a admiração por ter sido uma profissional incrível e em quem eu me espelho até hoje, a primeira faísca da ciência acendida em mim foi por você.

Ao lugar que me ensinou perseverança, força, persistência, resiliência e paciência como nenhum outro, eu agradeço ao laboratório de biologia celular como um todo, mas especialmente à minha orientadora e as minhas companheiras que estão comigo desde o primeiro dia, me guiando mesmo quando todas estávamos no escuro. Vocês foram especiais e essenciais.

À música, que criou um mundo onde eu pudesse escapar das pontes que pareciam impossíveis de serem atravessadas e me fez sentir acolhida quando ouvir letras de músicas que diziam exatamente o que eu sentia me fez sentir menos sozinha no mundo. Por quando eu flutuei nas batidas alegres que sincronizaram com meu coração nas experiências maravilhosas que tive o privilégio de ter, com pessoas que eu tive o privilégio de conhecer, eu agradeço a sempre ter dado muito valor à trilha sonora da minha vida.

Ao meu presente, que me deu a dádiva de concluir a graduação num curso tão lindo e tão especial pra mim. A ciência sempre vai ter um lugar gigante no meu coração, e eu sou extremamente grata pela oportunidade e pela força de hoje poder me declarar cientista. A sabedoria não é só de uma bacharel em ciências biológicas, mas de uma estudante que apanhou muito nesses quatro anos da depressão, ansiedade e da insegurança, mas que apesar de tudo isso, conseguiu chegar até aqui.

Ao meu futuro, eu peço que não me falte vontade de continuar. Continuar aprendendo, vivendo, acertando, errando e principalmente tentando. Eu peço que eu nunca desista de tentar.

“Somos guiados pelos nossos instintos, pela nossa intuição, pelos nossos desejos e medos, pelas nossas cicatrizes e pelos nossos sonhos. Coisas difíceis irão acontecer. Nós vamos nos recuperar, vamos aprender com elas. Nos tornaremos mais resilientes por causa disso. E enquanto tivermos a sorte de respirar, vamos inspirar, respirar profundamente, expirar. E então vamos continuar dançando.” (Taylor Swift)

RESUMO

As alterações deletérias no sistema imunológico que acompanham o envelhecimento são conhecidas como imunossenescência, e podem se relacionar com a incidência de doenças infecciosas, metabólicas e autoimunes, câncer e distúrbios neurológicos em pessoas idosas. A compreensão de como os diferentes marcadores da imunossenescência são regulados e sua heterogeneidade em estados diferenciais de senescência é essencial para a escolha dos métodos corretos para medi-los, e, conseqüentemente, tratá-los. Dessa forma, este trabalho objetivou a investigação de alterações no timo em modelo murino de envelhecimento induzido precocemente com a D-galactose (D-gal), sendo mais especificamente verificados o peso relativo, celularidade e expressão gênica no timo e o peso dos animais. Para isso, foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6 tratados com D-gal (200 mg/kg) ou solução salina (controles não-senescentes), por via subcutânea, diariamente, por 45 dias. Após o último dia de tratamento, os animais foram eutanasiados, o timo foi retirado, pesado e posteriormente macerado, e as células foram contadas em câmara de Neubauer sob o método de exclusão por azul de Trypan 0,02%. Além disso, foi realizado PCR quantitativo em tempo real para análise da expressão gênica de genes para enzimas antioxidantes (*Sod2*, *Cat*, *Gpx*) e de proteínas relacionadas à senescência celular (*P21* e *Tnf- α*) e à fisiologia tímica (*Il-7*, *Foxn1* e *Pparg*). O tratamento com a D-gal não alterou o peso dos animais, o peso relativo ou a celularidade total do timo, mas diminuiu a expressão do gene para a enzima antioxidante catalase (*Cat*) e aumentou a do gene marcador de senescência *P21*.

Palavras-chave: imunossenescência; timo; D-galactose

ABSTRACT

The deleterious changes in the immune system that accompany aging are known as immunosenescence, and may be related to the incidence of infectious, metabolic and autoimmune diseases, cancer and neurological disorders in elderly people. Understanding how different markers of immunosenescence are regulated and their heterogeneity in differential states of senescence is essential for choosing the correct methods to measure them, and, consequently, treat them. Therefore, this work aimed to investigate changes in the thymus in a murine model of early-induced aging with D-galactose (D-gal), more specifically verifying the relative weight, cellularity and gene expression in the thymus and the animals' weight. For this purpose, male mice of the C57BL/6 lineage were used and treated with D-gal (200 mg/kg) or saline solution (non-senescent controls), subcutaneously, daily, for 45 days. After the last day of treatment, the animals were euthanized, the thymus was removed, weighed and subsequently macerated, and the cells were counted in a Neubauer chamber using the 0.02% Trypan blue exclusion method. Furthermore, real-time quantitative PCR was performed to analyze the gene expression of genes for antioxidant enzymes (*Sod2*, *Cat*, *Gpx*) and proteins related to cellular senescence (*P21* and *Tnf- α*) and thymic physiology (*Il-7*, *Foxn1* and *Pparg*). Treatment with D-gal did not change the animals' weight, the relative weight or the total cellularity of the thymus, but it decreased the expression of the gene for the antioxidant enzyme catalase (*Cat*) and increased that of the senescence marker gene *P21*.

Keywords: immunosenescence; thymus; D-galactose

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
1.1 Senescência celular	7
1.2 A involução tímica relacionada à idade	10
1.3 Estresse oxidativo	12
1.4 D-galactose	14
2. OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos	17
3. METODOLOGIA.....	18
3.1 Tratamento crônico com a D-galactose para indução da senescência <i>in vivo</i>	18
3.2 Análise da celularidade e peso relativo	18
3.3 Extração de ácido ribonucleico (RNA) e síntese de DNA complementar (cDNA)	18
3.4 PCR quantitativo (PCRq) em tempo real	19
3.5 Análises estatísticas	19
4. RESULTADOS	20
4.1 Avaliação do peso relativo do timo e do peso dos animais submetidos ao tratamento crônico com a D-galactose	20
4.2 Análise da celularidade do timo de animais envelhecidos com D-galactose	21
4.3 Avaliação de genes oxidantes no timo de animais envelhecidos com D-galactose galactose.....	21
4.4 Avaliação de genes relacionados à senescência celular no timo de animais envelhecidos com D-galactose.....	22

4.5 Avaliação de genes relacionados à fisiologia tímica em animais envelhecidos com D-galactose.....	23
5. DISCUSSÃO	25
6. CONCLUSÃO.....	28
REFERÊNCIAS	29

1 INTRODUÇÃO

1.1 Senescência celular

O mundo está testemunhando uma rápida mudança demográfica em direção a uma população mais velha, em que aproximadamente 900 milhões de indivíduos têm mais de 60 anos, número projetado para subir cada vez mais ao longo dos anos. Em 2019, o número de pessoas com 60 anos ou mais era de um bilhão. Este número aumentará para 1,4 mil milhões até 2030 e 2,1 mil milhões até 2050. Este aumento está ocorrendo a um ritmo sem precedentes e irá acelerar nas próximas décadas, especialmente nos países em desenvolvimento, onde a saúde na velhice pode ser negligenciada devido à falta de recursos (Organização Mundial da Saúde, 2023).

O envelhecimento é associado a inúmeras mudanças negativas a níveis tecidual, celular e molecular, sendo caracterizado pela desregulação de diferentes sistemas fisiológicos, como o sistema imunológico, de seu estado homeostático ideal (Sadighi, 2018). As alterações deletérias no sistema imunológico que acompanham o envelhecimento são comumente conhecidas como imunossenescência, e podem resultar em modificações no organismo como aumento progressivo na incidência de doenças infecciosas, metabólicas e autoimunes, câncer e distúrbios neurológicos (Müller; Di Benedetto; Pawelec, 2019). Essa disfunção no sistema imune não só induz uma resposta insuficiente a patógenos invasores, como também impulsiona o acúmulo de células com mau funcionamento, como as células senescentes.

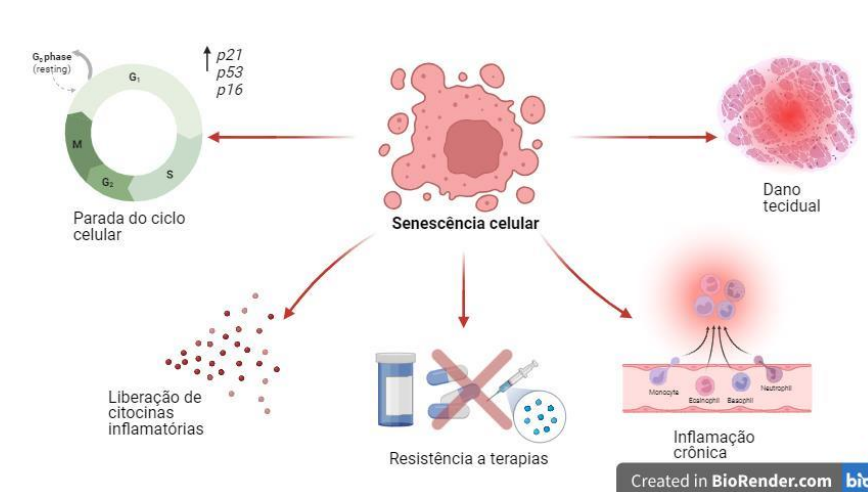
A senescência celular é caracterizada pela parada irreversível do ciclo celular, causada por estresse ou dano intracelular excessivo, tendo como objetivo limitar a proliferação de células danificadas (Dodig, 2019). Além da cessão do ciclo celular, as características das células senescentes incluem atividade secretora de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, moduladores de crescimento, fatores angiogênicos e metaloproteinases de matriz (MMPs), atividade aumentada da enzima β -galactosidase associada à senescência (SA- β -gal) e dano macromolecular, como o encurtamento dos telômeros devido à proliferação ou dano oxidativo (Homann et al., 2022).

A parada do ciclo celular é iniciada para garantir que células danificadas ou transformadas não propaguem mutações, assim sua manutenção deve ser rigorosamente controlada. Essas etapas requerem a ação de reguladores-chave do ciclo celular que respondem a sinais indutores extra e intracelulares, onde a sinalização da senescência

induz aumento nos inibidores de quinases dependentes de ciclina (CDK). A regulação de CDK através da expressão de seus inibidores, incluindo as proteínas p21 (codificada pelo gene *CDKN1A*) e p16-INK4A (codificada pelo gene *CDKN2A*), tem especial relevância em todos os tipos de senescência (Roger; Tomas; Gire, 2021). Essas vias são desencadeadas por vários estímulos internos ou externos e pela resposta a danos no DNA que levam à ativação das vias de ativação das proteínas p53 e/ou p16-INK4A. As proteínas p53 (codificada pelo gene *TP53*) e p21 são essenciais para a fase inicial da senescência, na qual as células param de se dividir, mas permanecem metabolicamente ativas. O papel da p53 durante esta fase depende da sua concentração e modificação pós-tradução, bem como do microambiente. A expressão de p21, que é o principal efetor da via da p53, aumenta dramaticamente durante a fase inicial, mas depois diminui à medida que a senescência progride. Uma vez que as células passam do ponto crítico e a senescência se torna irreversível, elas entram na segunda fase, a manutenção da senescência, que é controlada por p16-INK4A/pRb (proteína retinoblastoma), que inibe a atividade dos complexos ciclina-CDK e, assim, regulam a fosforilação dos membros da família Rb e a expressão do gene alvo E2F. Em particular, a progressão da senescência em células humanas depende fortemente de um complexo de Rb12/p130 e E2F-4, que regula os genes alvo de E2F. Este complexo é inativado pelas CDKs em resposta a estímulos de progressão do ciclo celular. No entanto, se as CDKs forem inibidas, as proteínas Rb permanecem ativas e reprimem a progressão do ciclo celular, tornando essas moléculas importantes biomarcadores da senescência (Kudlova; De Sanctis; Hajduch, 2022).

Outra característica das células senescentes é a liberação de numerosas moléculas no ambiente circundante (Figura 1), as quais compõem o fenótipo secretor associado à senescência (FSAS). O FSAS é composto principalmente de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e diferentes fatores de crescimento (Homann et al., 2022); é extremamente diversificado e depende do modo de indução da senescência, do tipo de célula e do ambiente celular. Foi observado que o transplante de um pequeno número de células senescentes é suficiente para induzir inflamação sistêmica, aumentando a expressão dos marcadores e mediadores da senescência, como p16-INK4A e componentes do FSAS como o fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6) (Xu et al., 2018).

Figura 1. Alterações observadas na senescência celular



Alterações observadas na senescência celular, como a parada do ciclo celular, dano tecidual, liberação de citocinas inflamatórias, resistência à terapias e inflamação crônica (Fonte: Adaptado de Dodig, 2019; Homann et al., 2022; Roger; Tomas; Gire, 2021; Xu et al., 2018).

Células senescentes estão fisiologicamente (muitas vezes transitoriamente) presentes nos tecidos de indivíduos jovens/saudáveis, onde elas desempenham papéis importantes em processos como a cicatrização de feridas (Demaria et al., 2014), regeneração tecidual (Da Silva-Álvarez et al., 2019), reprogramação de tecidos (Mosteiro et al., 2016) e limitação de cicatrizes fibróticas (Krizhanovsky et al., 2008). Contudo, as células senescentes persistem em tecidos envelhecidos ou danificados, propagando o fenótipo senescente e induzindo senescência secundária (ou parácrina) para outras células situadas no mesmo tecido ou localizadas em locais distantes através do FSAS. Vários estudos apontam que este acúmulo de células velhas pode subsidiar um estado de inflamação crônica, e assim, resultar em alterações patológicas relacionadas a idade (Birch, Gil, 2020).

O acúmulo de células senescentes foi recentemente quantificado em vários tecidos de camundongos envelhecidos naturalmente do tipo selvagem (WT) e em camundongos progeróides deficientes enzima de reparo de DNA ERCC1 (Excision Repair Cross-complementation Group 1). Em ambos os modelos, os marcadores de senescência foram encontrados elevados nas células T periféricas e na maioria dos órgãos (Yousefzadeh, 2020), abrindo portas para teorias de que a elevada carga de células senescentes associada à idade resultaria de uma combinação de aumento da formação (devido ao acúmulo de danos dependente do tempo) e diminuição da eliminação, sendo esta última ligada a estratégias de evasão da imunovigilância ou declínio na aptidão das células imunológicas responsáveis pela remoção de células senescentes. Tal achado

reforça a hipótese de que um sistema imunológico disfuncional/envelhecido atuaria como principal impulsionador da senescência sistêmica (Giannoula; Kroemer; Pietrocola, 2023).

O envelhecimento do sistema imunológico pode não só refletir alterações funcionais em diversos componentes celulares do próprio sistema imune, bem como de forma sistêmica no organismo, tornando-se importante estudar a imunosenescência a partir da perspectiva do timo, um órgão linfoide primário, e discutir o seu potencial envolvimento nas patologias associadas à idade.

1.2 A involução tímica relacionada à idade

O sistema imunológico compreende uma rede complexa de componentes celulares e moleculares subdivididos em inatos e adaptativos que funcionam sinergicamente em todas as respostas imunes. O sistema imunológico adaptativo consiste em linfócitos T e B que expressam receptores específicos de reconhecimento de antígenos e desenvolvem funções efetoras altamente especializadas com a capacidade de formar memória imunológica de longo prazo. Os linfócitos T se desenvolvem no timo, um órgão linfoide primário, onde etapas críticas de diferenciação ocorrem anteriormente à maturação e a exportação dessas células. Os processos de diferenciação de células T dependentes do timo incluem a expressão de um receptor de células T de superfície celular específico de antígeno (TCR) através da recombinação de segmentos gênicos codificados pela linha germinativa e “educação” tímica envolvendo seleção negativa de células T potencialmente auto-reativas e seleção positiva de células T com capacidade de reconhecer antígenos encontrados na periferia. Esses importantes processos tímicos garantem que as células T possam reconhecer antígenos no contexto do próprio complexo principal de histocompatibilidade (MHC), mas não provocando autorreatividade. Após maturação, os diferentes tipos de linfócitos T são exportados para a periferia, em que irão mediar diversas funções, como respostas inflamatórias, citotoxicidade celular direta contra células infectadas por vírus ou células tumorais, auxílio às células B a se diferenciarem em células secretoras de anticorpos e a troca de classe de diferentes isotipos de anticorpos (Thapa; Farber, 2019).

Surpreendentemente, o timo é o primeiro órgão do corpo que apresenta alterações associadas à idade, conhecidas como regressão ou involução tímica, que se manifesta através da diminuição e substituição progressiva das células do órgão por tecido adiposo,

causando uma ruptura da arquitetura tecidual, redução da massa tímica e, portanto, um declínio no número de linfócitos T (Mittelbrunn; Kroemer, 2021).

Os principais componentes do timo incluem timócitos (linfócitos T em desenvolvimento) de origem hematopoiética e células epiteliais tímicas (TECs) de origem não-hematopoiética. As TEC são essenciais para o desenvolvimento e maturação das células T, sendo distribuídas pelo órgão em regiões histologicamente denominadas córtex e medula. O epitélio tímico começa a diminuir já no primeiro ano de vida humana a uma taxa de 3% ao ano durante a idade adulta, paralelamente a uma expansão do espaço perivascular que progressivamente se enche de adipócitos e linfócitos periféricos, perda da demarcação da medula e do córtex tímico, e uma desorganização da junção corticomedular (Aw et al., 2009; Taub; Longo, 2005).

Além das alterações relacionadas à arquitetura tímica, há evidências de que alterações nas funções moleculares do estroma tímico também afetam o desenvolvimento das células T. A interleucina 7 (IL-7) é um fator de crescimento hematopoiético secretado pelas células do estroma no timo e necessário para a sobrevivência de timócitos duplo-negativos (DN) imaturos e indução do rearranjo do receptor de células T (TCR), além de auxiliar na maturação de células T. A expressão intratímica de IL-7 diminui com a idade, enquanto a neutralização de IL-7 em camundongos jovens induz atrofia reversível do timo (Bhatia et al., 1995). Em contrapartida, a administração sistêmica de IL-7 aumenta a recuperação imunológica após depleção de células T (Snyder; Mackall; Fry, 2006).

Outra molécula importante é o fator de transcrição FoxN1, que é expresso pelas células epiteliais tímicas e é necessário para a proliferação e diferenciação das TECs durante a organogênese do timo, sendo um alvo molecular direto da glicolipoproteína Wnt4 (Wingless-type MMTV integration site family, member 4). Mutações no gene para FoxN1 em humanos e camundongos resultam em uma condição atímica e deficiência imunológica grave. Pode-se observar que existe um papel importante exercido pelo FoxN1 na maturação funcional das TECs, cujas funções diminuídas contribuem para a involução do timo associada à idade (Ortman, 2002).

No envelhecimento, as TECs secretam menos Wnt4, que enfraquece a identidade epitelial do timo e leva à expansão do tecido adiposo do timo orquestrada pelo fator de transcrição PPAR γ (proliferador de peroxissomo gama). O aumento na expressão de PPAR γ no timo está associado ao aumento da involução do timo e a ativação do ligante do PPAR γ reduz a produção de células T virgens e restringe a diversidade do repertório de TCR (Yang; Youm; Dixit, 2009; Youm et al., 2010). Tais achados foram corroborados

quando a redução do PPAR γ induzido por restrição calórica preveniu a adipogênese e a involução tímica (Yang; Youm; Dixit, 2009).

Além das modificações apresentadas acima, foi observado um acúmulo de TEC senescentes em timos de humanos adultos, acompanhado pela presença de danos no DNA, danos oxidativos e aumento de mediadores pró-inflamatórios (Budamagunta et al., 2021). Tais alterações indicam que a senescência celular pode ser um fator importante no desenvolvimento da involução tímica (Barbouti et al., 2020), especialmente aquela induzida pelo aumento de radicais livres durante o estresse oxidativo.

1.3 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre a formação de radicais livres e mecanismos de defesa antioxidante. Este fenômeno aumenta com a idade e afeta o funcionamento normal de diversos tecidos. Além disso, inúmeras doenças crônicas associadas à idade avançada, como diabetes e distúrbios cardiovasculares, renais, pulmonares e musculares, também estão diretamente relacionadas ao estresse oxidativo (Cabello-Verrugio et al., 2017).

A geração de radicais livres é um processo básico e útil para o bom funcionamento, proteção e sobrevivência das células dentro dos limites fisiológicos, desempenhando um papel significativo nos mecanismos de defesa. Dentre os principais tipos de radicais livres, destacam-se as espécies reativas de oxigênio (EROS), as quais são produzidas naturalmente durante a respiração celular ou de forma induzida pelas células fagocíticas.

A fim de manter a homeostase, as células de mamíferos eliminam as EROS em formas não-tóxicas através de um complexo sistema de defesa antioxidante que inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX). No entanto, um desequilíbrio na geração e neutralização dessas moléculas, seja por estimulação com íons cálcio do ciclo do ácido tricarboxílico, aumento na atividade das cadeias respiratórias, no transporte de elétrons ou na atividade do NADPH (fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina), pode levar ao acúmulo de EROS (Dröge, 2002). A produção excessiva de EROS reduz a atividade do sistema de defesa enzimática antioxidante e também diminui o conteúdo de proteínas não-enzimáticas, afetando assim

o sistema de defesa antioxidante geral e tornando-o incapaz de eliminar o excesso de radicais livres.

A teoria dos radicais livres, que surgiu em 1956, sugere que estas moléculas produzidas pelas mitocôndrias como subprodutos do seu metabolismo normal, atacam posteriormente os constituintes celulares (Harman, 1956). Atualmente, sabe-se que os radicais livres causam danos oxidativos a macromoléculas, como ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas. Estas modificações são percebidas em condições de hiperóxia, inflamação, redução na capacidade antioxidante e na senescência celular.

A senescência celular é acompanhada por disfunção mitocondrial, em que ocorre redução funcional de enzimas, proteínas e outras biomoléculas. Foi relatado que a depleção da superóxido dismutase e da catalase mitocondrial causa elevação no estresse oxidativo em camundongos, o que leva ao envelhecimento prematuro e a alterações patológicas associadas à idade (Bjelakovic; Nikolova; Gluud, 2014). O aumento de EROS mitocondrial também acelera o dano peroxidativo a lipídios de membrana, diminui os ácidos graxos e degrada as proteínas, além de prejudicar o sistema de reparo do DNA mitocondrial, gerando um acúmulo de proteínas e lipídios envelhecidos e diminuindo a capacidade replicativa do DNA (Hajam et al., 2022). Além disso, os EROS podem induzir quebras no DNA de fita simples e dupla que também estão associadas ao envelhecimento prematuro (Auten; Whorton; Mason, 2002).

Dois principais mecanismos bioquímicos conectam a imunosenescência com estresse oxidativo, (1) uma diminuição nas funções celulares devido ao dano oxidativo de proteínas, lipídios e carboidratos, e (2) apoptose celular após acúmulo de moléculas oxidadas. Foi relatado que o dano oxidativo às proteínas e lipídios nas membranas mitocondriais e o acúmulo de pigmentos de lipofuscina comprometem a eficiência geral da explosão oxidativa nas células T envelhecidas (Hung et al., 2010). O conjunto de linfócitos diminui globalmente na imunossenescência devido a uma diminuição da produção de linfócitos T e B virgens de órgãos linfáticos primários senescentes, bem como a um aumento na morte celular induzida por danos. O estresse oxidativo contribui para este último, aumentando o número de células que sofrem apoptose devido ao acúmulo de biomoléculas danificadas por oxidação (De Martinis et al., 2007). Foi demonstrado que o acúmulo de proteínas modificadas com AGE (produtos finais de glicação avançada) induz morte celular por apoptose em células T (Hung et al., 2010).

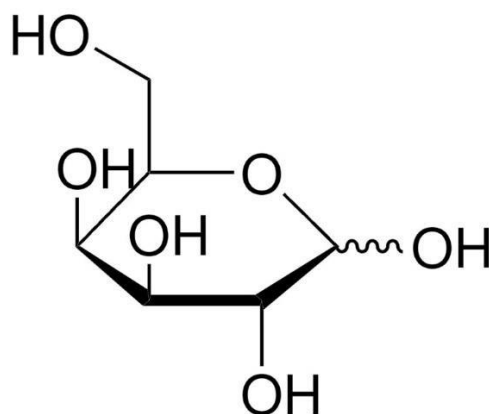
1.4 D-galactose

Usar seres humanos como sujeitos em pesquisas sobre envelhecimento é dificultado por questões éticas, pela longa expectativa de vida natural, pelas influências ambientais e por vários outros fatores limitantes. Portanto, modelos animais foram desenvolvidos para estudar a biologia fundamental do envelhecimento, mimetizando as mudanças que ocorrem com a idade, com o controle de influências intrínsecas e extrínsecas, como antecedentes genéticos, dieta e ambiente. Os camundongos fornecem boas características para testar tanto modelos de envelhecimento precoce como potenciais terapêuticos, combinando o valor de um sistema mamífero com um sujeito de teste de baixo custo, vida útil curta e facilidade de manipulação genética (Vanhooren; Libert, 2013).

Geralmente, os modelos de envelhecimento podem ser classificados em duas categorias: modelo de envelhecimento natural e modelo de envelhecimento acelerado. O modelo de envelhecimento natural consome tempo e acarreta grandes gastos, portanto os modelos de envelhecimento acelerado são mais acessíveis devido à sua fácil aplicação, menor duração do estudo e maior taxa de sobrevivência dos animais ao longo do período experimental. Existem vários tipos de modelos de envelhecimento acelerado, sendo o modelo de envelhecimento induzido por D-galactose (D-gal) um dos mais utilizados devido à sua conveniência, menos efeitos colaterais e maior taxa de sobrevivência (Azman; Zakaria, 2019).

A D-galactose (Figura 2) é uma aldohexose, um açúcar redutor que ocorre naturalmente no corpo e em muitos alimentos, como leite, manteiga, queijo, iogurte, mel, beterraba, ameixa, cereja, figo e aipo (Acosta; Gross, 1995). Porém, em níveis elevados, pode ser convertida em aldose e hidróperóxido, resultando em estresse oxidativo por meio do acúmulo de espécies reativas de oxigênio e produção de radicais livres, além de atenuar a atividade de enzimas antioxidantes. Isto desempenha um papel crítico na mediação das alterações relacionadas à idade em diferentes órgãos (Fatemi et al., 2018; Wu et al., 2008).

Figura 2. Molécula de D-galactose



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

Foi visto que após a administração de D-galactose durante oito semanas, os camundongos do grupo modelo apresentaram perda de peso no estágio inicial, os pesos relativos do baço e do timo foram visivelmente mais baixos do que aqueles do grupo normal, e foi observada uma diminuição acentuada na atividade de enzimas antioxidantes essenciais como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX) nos tecidos hepáticos e renais dos camundongos tratados (Kong et al., 2018). Em outra pesquisa, foram investigadas as atividades de SOD e CAT e o nível de malondialdeído (MDA), um marcador de estresse oxidativo, no fígado, plasma e cérebro de camundongos após o tratamento com D-gal por seis semanas, onde a atividade de SOD diminuiu em camundongos modelo em todos os três tecidos, e a atividade da CAT foi reduzida no grupo tratado com D-gal no fígado e no plasma. Enquanto isso, o nível de MDA aumentou no grupo tratado com D-gal no fígado, plasma e cérebro. Além disso, o grupo tratado com D-gal aumentou significativamente a expressão dos genes *p16*, *p19* e *p21* no fígado e hipocampo (Sun et al., 2018).

Com relação ao timo, o tratamento com D-gal por oito semanas gerou desorganização estrutural e morfologia anatômica do timo atrofica, e a expressão proteica de FoxN1 no grupo de envelhecimento induzido por D-gal foi diminuída em comparação com a do grupo de controle normal (Guo et al., 2020).

A compreensão de como esses diferentes marcadores são regulados e de sua heterogeneidade em estados diferenciais de senescência, é essencial para a escolha dos métodos corretos para medi-los, e, conseqüentemente, tratá-los (Hernandez-Segura; Nehme; Demaria, 2018). Dessa forma, este trabalho objetivou a investigação de alterações tímicas em modelo animal de envelhecimento induzido precocemente com a

D-galactose, visto que na literatura ainda não foi explorado o impacto da administração dessa substância no timo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar as alterações provocadas pelo envelhecimento precoce induzido pela D-galactose no timo de camundongos.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Avaliar o impacto da administração de D-galactose no peso dos animais;
- 2) Avaliar o impacto da administração de D-galactose no peso relativo e celularidade do timo;
- 3) Avaliar o impacto da administração de D-galactose na expressão de genes para enzimas antioxidantes (*Sod2*, *Cat*, *Gpx*), relacionados à senescência celular (*P21* e *Tnf α*) e à fisiologia tímica (*IL7*, *Foxn1* e *Pparg*) no timo de camundongos.

3 METODOLOGIA

3.1 Tratamento crônico com a D-galactose para indução da senescência *in vivo*

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6, com 8 semanas de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório de Biologia Celular em condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas), com livre acesso à ração e água. Os procedimentos foram submetidos e aprovados pela Comissão de ética do Uso de Animais da UFAL (CEUA 19/2019) (ANEXOS I e II). Para indução da senescência *in vivo*, os animais foram tratados com D-galactose (PubChem ID: 329757362; $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) na concentração de 200 mg/kg, por via subcutânea, diariamente, por seis semanas. Animais tratados apenas com solução salina (0,9% NaCl) foram considerados controles não-senescentes. Vinte e quatro horas após o último tratamento, os animais foram pesados e em seguida eutanasiados por aprofundamento anestésico com Tiopental (120 mg/Kg).

3.2 Análise da celularidade e o peso relativo

Para avaliar o peso relativo e celularidade, o timo de cada animal foi removido com pinça, pesado e posteriormente macerado 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. O cálculo do peso relativo foi feito pela divisão do peso do órgão pelo peso do animal respectivo.

3.3 Extração de ácido ribonucleico (RNA) e síntese de DNA complementar (cDNA)

Após pesagem, um fragmento do timo foi homogeneizado em Trizol. O RNA foi extraído segundo o método fenol-clorofórmio e quantificado com o equipamento NanoDrop One (ThermoFisher Scientific) a partir da razão das absorbâncias nos comprimentos de onda 230, 260 e 280 nm. Após quantificação, foi realizada uma

eletroforese em gel de agarose a 1,5% por 30 minutos sob voltagem 90 para avaliar a integridade do RNA. As bandas correspondentes ao RNA ribossomal foram visualizadas sob a luz ultravioleta pela coloração com brometo de etídio. O RNA total então foi tratado com a enzima DNase para remoção de resíduos de DNA genômico. Posteriormente, as amostras tratadas foram submetidas a síntese do DNA complementar (cDNA) utilizando enzima transcriptase reversa (M-MLV-RT, Thermofisher Scientific), seguindo instruções do fabricante.

3.4 PCR quantitativo (PCRq) em tempo real

Para a análise da expressão gênica por PCRq, o cDNA diluído de cada amostra foi adicionado a um mix contendo Power SYBR® Green PCR Master Mix (Thermo Scientific, Califórnia, EUA) ou GoTaq qPCR Master Mix (Promega, Wisconsin, EUA) e os pares dos oligonucleotídeos iniciadores para os genes *Sod2*, *Cat*, *Gpx*, *IL7*, *Foxn1*, *Ppparg*, *P21*, *Tnfa* e para o gene endógeno *Actb*. As reações foram realizadas no equipamento QuantiStudio 5 Real- Time PCR System (Applied Biosystems), seguindo o protocolo especificado pelo fabricante. A expressão relativa foi obtida a partir dos dados brutos de fluorescência utilizando o algoritmo PCR miner (Zhao e Fernald, 2005).

3.5 Análises estatísticas

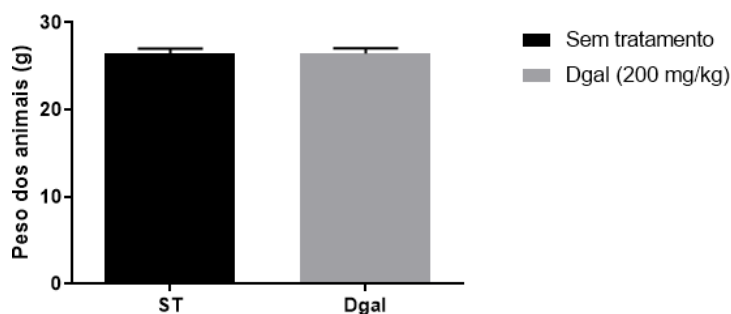
Para as análises estatísticas e confecção dos gráficos foi utilizado o programa de computador GraphPad Prism versão 7.00 (GraphPad Prism Software, Inc.). Os resultados foram representados como média e erro-padrão da média, e avaliados estatisticamente através do teste *t* de Student, com um nível de significância selecionado para $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação do peso relativo do timo e do peso dos animais submetidos ao tratamento crônico com a D-galactose

Ao analisar o peso dos animais após o tratamento crônico com a D-gal por 45 dias, não foi possível observar diferença significativa entre o grupo controle e tratado (Figura 3).

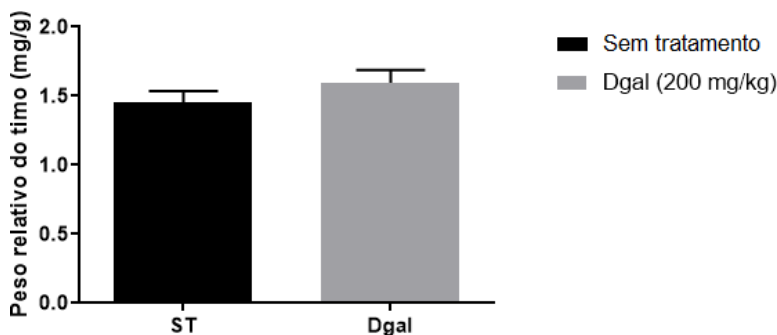
Figura 3. Avaliação do peso dos animais submetidos ao tratamento crônico com a D-galactose.



O gráfico mostra a média $\pm$ erro-padrão da média do peso dos animais após tratamento por 45 dias com a D-galactose na concentração de 200mg/kg. Os dados obtidos foram avaliados estatisticamente através do teste *t* de Student, com um nível de significância selecionado para $p < 0,05$. Foram realizados 3 experimentos independentes com $n = 5$ animais por grupo em cada.

Conforme mostrado na figura 4, o tratamento com D-gal na concentração de 200mg/kg não alterou significativamente o peso relativo do timo dos animais tratados em relação ao grupo controle.

Figura 4. Avaliação do peso relativo do timo após tratamento crônico com a D-galactose



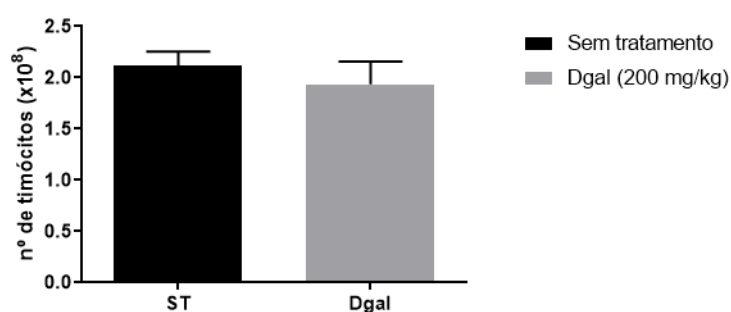
O gráfico mostra a média $\pm$ erro-padrão da média do peso relativo do timo após tratamento por 45 dias com a D-galactose na concentração de 200mg/kg. O cálculo do peso relativo foi feito pela divisão do peso do

órgão (mg) pelo peso do respectivo animal (g) e os dados obtidos foram avaliados estatisticamente através do teste *t* de Student, com um nível de significância selecionado para $p < 0,05$. Foram realizados 3 experimentos independentes com $n = 5$ animais por grupo em cada.

4.2 Análise da celularidade do timo de animais envelhecidos com D-galactose

Não foi observada diferença significativa entre os grupos controle e tratado com a D-galactose com relação à celularidade total do timo (Figura 5), resultado já esperado visto que o peso relativo deste órgão também permaneceu constante nos dois grupos.

Figura 5. Análise da celularidade do timo de animais envelhecidos com D-galactose

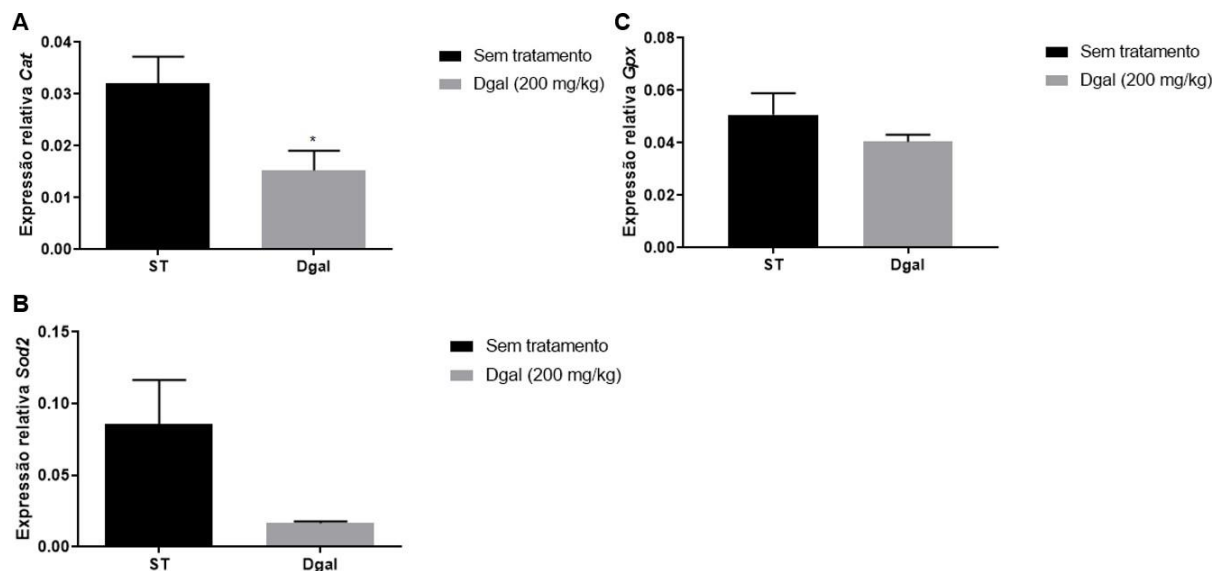


O gráfico mostra a média $\pm$ erro-padrão da média do número de células do timo após tratamento por 45 dias com a D-galactose na concentração de 200mg/kg. As células foram obtidas do timo macerado e contadas em câmara de Neubauer sob o método de exclusão por azul de Trypan 0,02%. Os dados obtidos foram avaliados estatisticamente através do teste *t* de Student, com um nível de significância selecionado para $p < 0,05$. Foram realizados 3 experimentos independentes com $n = 5$ animais por grupo em cada.

4.3 Avaliação de genes de enzimas antioxidantes no timo de animais envelhecidos com D-galactose

A fim de investigar um dos mecanismos de indução do envelhecimento desse modelo, a perturbação do sistema antioxidante, avaliou-se a expressão dos genes para algumas enzimas antioxidantes essenciais. Conforme a figura 6, houve uma diminuição significativa na expressão do gene para a enzima catalase, *Cat* (A), enquanto os genes das enzimas glutathiona peroxidase, *Gpx* (C), e superóxido dismutase 2, *Sod2* (B), apresentaram redução sem significância estatística.

Figura 6. Análise da expressão de genes de enzimas antioxidantes no timo de animais envelhecidos com D-galactose

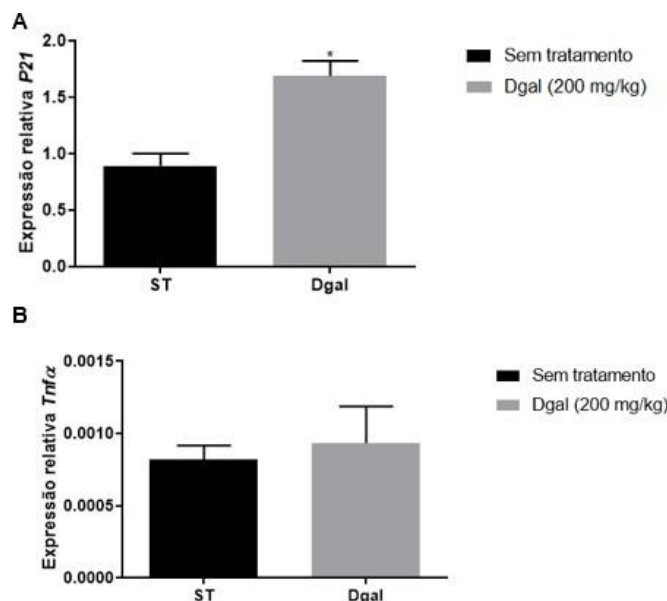


O gráfico mostra a média $\pm$ erro-padrão da média da expressão relativa para o gene da enzima catalase (*Cat*) (A), para o gene da enzima superóxido dismutase 2 (*Sod2*) (B) e para o gene da enzima glutathione peroxidase (*Gpx*) (C). Os dados obtidos foram avaliados estatisticamente através do teste *t* de Student, com um nível de significância selecionado para $p < 0,05$, utilizando um *n* de 6 animais por grupo.

4.4 Avaliação da expressão de genes relacionados à senescência celular no timo de animais envelhecidos com D-galactose

Inflammaging, termo cunhado pela primeira vez em 2000 por Claudio Franceschi, refere-se ao estado de inflamação crônica de baixo grau que se desenvolve com a idade. É caracterizada por altas concentrações séricas de citocinas inflamatórias e mediadores como proteína C reativa (PCR), IL-6, IL-8 e TNF- α . O envelhecimento prematuro das células T tem sido causalmente ligado à regulação negativa da nuclease de reparo de quebra de fita dupla MRE11A, levando à regulação positiva do marcador de senescência inibidor da quinase dependente de ciclina 1 (CDKN1A, mais conhecido como p21) (Li et al., 2016). Dessa forma, foi avaliada a expressão do gene para a citocina TNF- α (*Tnfa*) e para a proteína p21 (*P21*), sendo possível observar um aumento na expressão dos dois genes, sendo significativo para o gene *P21* (Figura 7).

Figura 7. Análise da expressão de genes relacionados a senescência no timo de animais envelhecidos com D-galactose

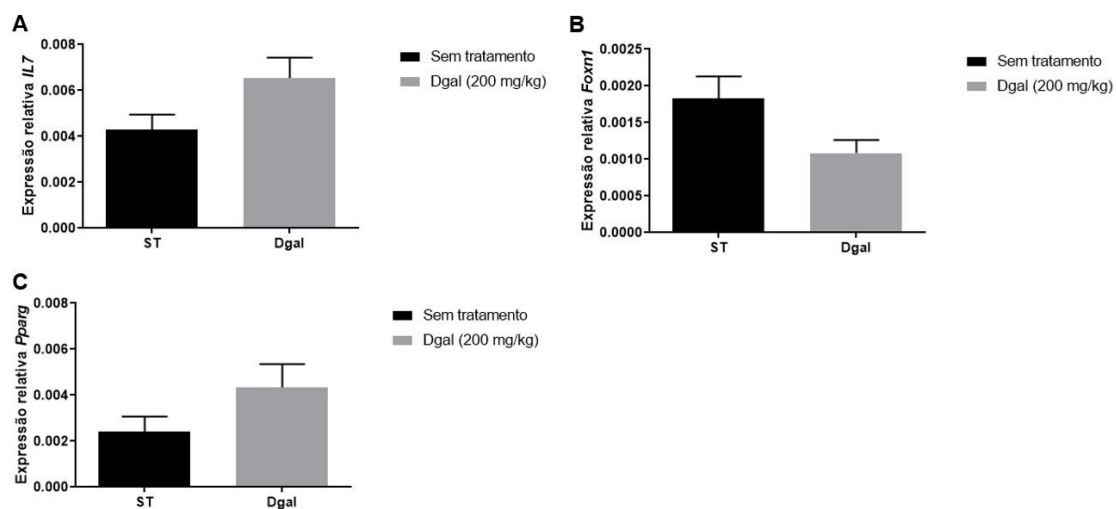


Análise da expressão de genes relacionados a senescência no timo após tratamento por 45 dias com a D-galactose na concentração de 200mg/kg. O gráfico mostra a média $\pm$ erro-padrão da média da expressão relativa do gene para a proteína p21 (*P21*) (A) e para o gene da citocina TNF- α (*Tnfα*) (B). Os dados obtidos foram avaliados estatisticamente através do teste *t* de Student, com um nível de significância selecionado para $p < 0,05$, utilizando um *n* de 6 animais por grupo.

4.5 Avaliação de genes relacionados à fisiologia tímica em animais envelhecidos com D-galactose

Moléculas relacionadas à proliferação, sobrevivência e maturação de timócitos e ao desenvolvimento de células T, como a citocina IL-7 e o fator de transcrição FoxN1, são bons marcadores da regulação e manutenção do timo. De uma outra maneira, fatores de transcrição como o proliferador de peroxissoma gama (PPAR γ), que desempenham um papel central na captação de ácidos graxos e subsequente adipogênese, consequência da involução tímica pelo envelhecimento, são sinalizadores da desregulação tímica. Dessa forma, foi avaliada a expressão dos genes para a citocina IL-7 (*Il7*) e para as proteínas FoxN1 e PPAR γ , sendo possível observar uma tendência à diminuição na expressão do gene *Foxn1*, e um aumento nas expressões dos genes *Il-7* e *Pparg* (Figura 8).

Figura 8. Expressão relativa de genes relacionados à fisiologia tímica em animais envelhecidos com D-galactose



Os gráficos mostram a média $\pm$ erro-padrão da média da expressão relativa do gene *IL-7* (A), *Foxn1* (B) e *Pparg* (C) no timo após tratamento por 45 dias com a D-galactose na concentração de 200mg/kg. Os dados obtidos foram avaliados estatisticamente através do teste *t* de Student, com um nível de significância selecionado para $p < 0,05$, utilizando um *n* de 6 animais por grupo.

5 DISCUSSÃO

Como mostrado nos resultados, o tratamento com a D-gal por 45 dias na concentração de 200mg/kg não foi capaz de alterar o peso dos animais, o peso relativo ou a celularidade total do timo. Com isso, pode-se sugerir um aumento no período de tratamento ou na concentração utilizada da substância, visto que em estudos onde a D-gal na dose de 250 mg/kg/dia foi injetada subcutaneamente durante 56 dias em camundongos Kunming, o peso relativo do baço e do timo dos camundongos do grupo modelo foram visivelmente mais baixos do que aqueles do grupo normal, indicando que o sistema imunológico do animal foi afetado (Kong et al., 2018). Em outro estudo, doses diárias injetadas subcutaneamente de 50 e 200 mg/kg de D-gal foram avaliadas pela primeira vez em um ensaio piloto. Embora tenham sido observados aumento na formação de malondialdeído (MDA) e regulação negativa na atividade da SOD para ambas as doses, não houve atrofia tímica significativa. Portanto, doses de 200, 500 e 1000 mg/kg diariamente foram utilizadas para determinar se o efeito da D-gal era dependente da dose, e as duas doses mais altas induziram atrofia do timo, com a dose diária de 1000 mg/kg tendo o maior impacto. Consequentemente, tanto o peso relativo do timo como a contagem absoluta de timócitos foram diminuídos ao máximo neste grupo de dose mais elevada (Du et al., 2019).

O processo do uso da D-galactose como modelo de indução da senescência é conhecido por envolver aumento na produção de ânions superóxido, alterações nas atividades de enzimas antioxidantes e acúmulo de danos oxidativos. Assim, foi observada a expressão de genes para enzimas antioxidantes essenciais no timo, onde houve uma diminuição na expressão dos genes para a enzima catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase 2, corroborando com estudos que mostraram resultados parecidos em outros tecidos. He e colaboradores (2009) observaram que as atividades de T-SOD e GSH-Px no hipocampo de camundongos modelo tratados com D-gal na dose de 150 mg/kg, diariamente, por seis semanas, diminuiu significativamente em comparação com aqueles do grupo controle. Outra pesquisa mostrou que os sistemas de defesa antioxidante *in vivo*, como SOD, CAT e GSH em camundongos administrados com D-gal na concentração de 100mg/kg por 42 dias exibiram uma diminuição significativa nos tecidos do fígado, cérebro e rim quando comparados aos camundongos do grupo controle (Reshma et al., 2022).

Em relação à expressão de moléculas marcadoras da senescência, verificou-se um aumento significativo no gene *P21*, consolidando resultados anteriores da literatura onde já foram observadas expressões aumentadas de p53, p21 e p16 no fígado e rim de animais tratados com D-gal (800mg/kg por 7 semanas) em comparação com o grupo controle, confirmando que o tratamento com D-gal desencadeia os principais fatores de ativação do envelhecimento, e eventualmente leva à senescência prematura (Sha et al., 2021). Além disso, camundongos tratados com D-gal (100 mg/kg por 42 dias) aumentaram significativamente os níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias que fazem parte do FSAS, como IL-1 β e TNF- α (Hadzi-Petrushev et al., 2014), contudo, não foi observada diferença significativa na expressão do gene *Tnfa* no timo de camundongos expostos a D-gal.

Guo et al. (2020) mostraram que o tratamento intraperitoneal com D-gal na concentração de 120mg/kg por oito semanas resultou na diminuição da expressão proteica de FoxN1 no grupo de envelhecimento induzido por D-gal em comparação com a do grupo controle. De uma outra maneira, a literatura mostra que a regulação positiva forçada de FoxN1 no timo totalmente involuído de camundongos idosos resulta em regeneração robusta do timo caracterizada por aumento na timopoiese e aumento na produção de células T virgens. Foi demonstrado que o órgão regenerado se assemelha muito ao timo juvenil em termos de arquitetura e perfil de expressão gênica, estabelecendo que a regulação positiva de um único fator de transcrição pode reverter substancialmente a involução tímica relacionada à idade, identificando o FoxN1 como um alvo específico para melhorar a função do timo (Bredenkamp; Nowell; Blackburn, 2014). Este trabalho mostrou uma tendência à diminuição na expressão desse gene, o que resultaria em uma desregulação do microambiente tímico e da timopoiese.

Com relação à interleucina 7, uma potente citocina trófica para estimulação da timopoiese, foi possível identificar um aumento não significativo na expressão relativa do gene *Il7*. Sempowski et al. (2000) observaram que os níveis de mRNA de IL-7, permaneceram constantes no timo envelhecido. Estes dados levantaram a noção de que a produção de IL-7 pode ser compartimentada dentro do timo e que o local de produção de IL-7 pode mudar durante o envelhecimento. A IL-7 produzida no espaço perivascular pode não conduzir a timopoiese de maneira tão eficaz quanto a produção de IL-7 no espaço epitelial do timo, mesmo em quantidades iguais ou superiores ao timo jovem.

A composição e a organização das células estromais do timo são gravemente perturbadas após a puberdade e com o envelhecimento progressivo. A redução das células

epiteliais do timo (TECs) e o surgimento de adipócitos estão entre as alterações mais dramáticas relacionadas à idade no estroma do timo. O receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR γ) representa uma ligação direta entre as concentrações de ácidos graxos, a regulação da transcrição gênica, o desenvolvimento de adipócitos e a homeostase da glicose. Neste estudo, observamos um aumento não significativo na expressão do gene *Pparg* no timo de animais tratados com D-galactose. Pesquisas anteriores mostraram que camundongos com deficiência de grelina e de seus receptores desenvolvem involução tímica acelerada acompanhado da expressão mais elevada de PPAR γ em células estromais tímicas, sugerindo que a molécula pode estar funcionalmente ligada à perda de timopoiese no envelhecimento (Youm et al., 2010).

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho indicam que a administração *in vivo* de D-galactose na dose de 200mg/kg por 45 dias provoca alterações no timo de camundongos. Apesar da dose administrada não interferir no peso relativo e celularidade do timo, importantes alterações provocadas pelo envelhecimento natural foram observadas no timo, tais como a desregulação do sistema antioxidante, como a redução da expressão do gene da catalase, e aumento da expressão do gene para a proteína p21, importante marcador da senescência celular, indicando que esse tratamento provoca modificações consideráveis nesse órgão.

REFERÊNCIAS

ACOSTA PB, GROSS KC. **Hidden sources of galactose in the environment.** Eur J Pediatr. 1995;154(7 Suppl 2):S87-92. doi: 10.1007/BF02143811. PMID: 7671974.

AUTEN RL, WHORTON MH, MASON S. **Blocking neutrophil influx reduces DNA damage in hyperoxia-exposed newborn rat lung.** Am J Respir Cell Mol Biol. 2002 Apr;26(4):391-7. doi: 10.1165/ajrcmb.26.4.4708. PMID: 11919074.

AW D, et al. **Phenotypical and morphological changes in the thymic microenvironment from ageing mice.** Biogerontology. 2009 Jun;10(3):311-22. doi: 10.1007/s10522-008-9182-2. Epub 2008 Oct 18. PMID: 18931936.

AZMAN KF, ZAKARIA R. **D-Galactose-induced accelerated aging model: an overview.** Biogerontology. 2019 Dec;20(6):763-782. doi: 10.1007/s10522-019-09837-y. Epub 2019 Sep 20. PMID: 31538262.

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

BHATIA SK. et al. **The effect of in vivo IL-7 deprivation on T cell maturation.** J Exp Med. 1995 Apr 1;181(4):1399-409. doi: 10.1084/jem.181.4.1399. PMID: 7699326; PMCID: PMC2191957.

BIRCH J, GIL J. **Senescence and the SASP: many therapeutic avenues.** Genes Dev. 2020 Dec 1;34(23-24):1565-1576. doi: 10.1101/gad.343129.120. PMID: 33262144; PMCID: PMC7706700.

BJELAKOVIC G, NIKOLOVA D, GLUUD C. **Antioxidant supplements and mortality.** Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2014 Jan;17(1):40-4. doi: 10.1097/MCO.0000000000000009. PMID: 24241129.

BREDENKAMP N, NOWELL CS, BLACKBURN CC. **Regeneration of the aged thymus by a single transcription factor.** Development. 2014 Apr;141(8):1627-37. doi: 10.1242/dev.103614. PMID: 24715454; PMCID: PMC3978836.

BUDAMAGUNTA V. et al. **Cellular senescence in lymphoid organs and immunosenescence.** Aging. 2021, vol. 13,15, p. 19920-19941, 2021.

CABELLO-VERRUGIO C et al. **Oxidative Stress in Disease and Aging: Mechanisms and Therapies.** Oxid Med Cell Longev. 2017;2017:4310469. doi: 10.1155/2017/4310469. Epub 2017 Jan 26. PMID: 28246551; PMCID: PMC5299193.

DA SILVA-ÁLVAREZ S. et al. **Cell senescence contributes to tissue regeneration in zebrafish.** Aging Cell. 2020 Jan;19(1):e13052. doi: 10.1111/accel.13052. Epub 2019 Oct 31. PMID: 31670873; PMCID: PMC6974711.

DE MARTINIS M. et al. **Apoptosis remodeling in immunosenescence: implications for strategies to delay ageing.** Curr Med Chem. 2007;14(13):1389-97. doi: 10.2174/092986707780831122. PMID: 17584051.

DEMARIA M. et al. **An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA.** Dev Cell. 2014 Dec 22;31(6):722-33. doi: 10.1016/j.devcel.2014.11.012. Epub 2014 Dec 11. PMID: 25499914; PMCID: PMC4349629.

DODIG S., CEPELAK I., PAVIC I. **Hallmarks of senescence and aging.** Biochem Med (Zagreb). 2019, vol 29(3): 030501.

DRÖGE W. **Free radicals in the physiological control of cell function.** Physiol Rev. 2002 Jan;82(1):47-95. doi: 10.1152/physrev.00018.2001. PMID: 11773609.

DU HM et al. **Defective Central Immune Tolerance Induced by High-Dose D-Galactose Resembles Aging.** Biochemistry (Mosc). 2019 Jun;84(6):617-626. doi: 10.1134/S000629791906004X. PMID: 31238861.

FATEMI I. et al. **Protective effect of metformin on D-galactose-induced aging model in mice.** Iran J Basic Med Sci. 2018 Jan;21(1):19-25. doi: 10.22038/IJBMS.2017.24331.6071. PMID: 29372032; PMCID: PMC5776431.

Franceschi C. et al. **Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence.** Ann N Y Acad Sci. 2000 Jun;908:244-54. doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06651.x. PMID: 10911963.

GIANNOULA Y, KROEMER G, PIETROCOLA F. **Cellular senescence and the host immune system in aging and age-related disorders.** Biomed J. 2023 Jun;46(3):100581. doi: 10.1016/j.bj.2023.02.001. Epub 2023 Feb 4. PMID: 36746349; PMCID: PMC10210012.

GUO L. et al. **Gallic acid attenuates thymic involution in the d-galactose induced accelerated aging mice.** Immunobiology. 2020 Jan;225(1):151870. doi: 10.1016/j.imbio.2019.11.005. Epub 2019 Nov 19. PMID: 31822433.

HADZI-PETRUSHEV N. et al. **D-galactose induced inflammation lipid peroxidation and platelet activation in rats.** Cytokine. 2014 Sep;69(1):150-3. doi: 10.1016/j.cyto.2014.05.006. Epub 2014 Jun 6. PMID: 24907931.

HAJAM YA, et al. **Oxidative Stress in Human Pathology and Aging: Molecular Mechanisms and Perspectives.** Cells. 2022 Feb 5;11(3):552. doi: 10.3390/cells11030552. PMID: 35159361; PMCID: PMC8833991.

HARMAN D. **Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry.** J Gerontol. 1956 Jul;11(3):298-300. doi: 10.1093/geronj/11.3.298. PMID: 13332224.

HE M. et al. **Neuroprotective effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on aging mice induced by D-galactose.** Biol Pharm Bull. 2009 Jan;32(1):55-60. doi: 10.1248/bpb.32.55. PMID: 19122281.

HERNANDEZ-SEGURA A., NEHME J., DEMARIA M. **Hallmarks of Cellular Senescence.** Trends Cell Biol. 2018 Jun;28(6):436-453. doi: 10.1016/j.tcb.2018.02.001. Epub 2018 Feb 21. PMID: 29477613.

HOMANN L. et al. **IFN- γ and TNF Induce Senescence and a Distinct Senescence-Associated Secretory Phenotype in Melanoma.** Cells. 2022 Apr 30;11(9):1514. doi: 10.3390/cells11091514. PMID: 35563820; PMCID: PMC9103004.

HUNG LF. et al. **Advanced glycation end products induce T cell apoptosis: Involvement of oxidative stress, caspase and the mitochondrial pathway.** Mech Ageing Dev. 2010 Nov-Dec;131(11-12):682-91. doi: 10.1016/j.mad.2010.09.005. Epub 2010 Oct 1. PMID: 20888855.

KONG SZ. et al. **Anti-Aging Effect of Chitosan Oligosaccharide on d-Galactose-Induced Subacute Aging in Mice.** Mar Drugs. 2018 May 24;16(6):181. doi: 10.3390/md16060181. PMID: 29794973; PMCID: PMC6025514.

KRIZHANOVSKY V. et al. **Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis.** Cell. 2008 Aug 22;134(4):657-67. doi: 10.1016/j.cell.2008.06.049. PMID: 18724938; PMCID: PMC3073300.

KUDLOVA N, DE SANCTIS JB, HAJDUCH M. **Cellular Senescence: Molecular Targets, Biomarkers, and Senolytic Drugs.** Int J Mol Sci. 2022 Apr 10;23(8):4168. doi: 10.3390/ijms23084168. PMID: 35456986; PMCID: PMC9028163.

MITTELBRUNN M, KROEMER G. **Hallmarks of T cell aging.** Nat Immunol. 2021 Jun;22(6):687-698. doi: 10.1038/s41590-021-00927-z. Epub 2021 May 13. PMID: 33986548.

MOSTEIRO L. et al. **Tissue damage and senescence provide critical signals for cellular reprogramming in vivo.** Science. 2016 Nov 25;354(6315):aaf4445. doi: 10.1126/science.aaf4445. PMID: 27884981.

MÜLLER L, DI BENEDETTO S., PAWELEC G. **The Immune System and Its Dysregulation with Aging.** Subcell Biochem. 2019, vol 91 p. 21-43.

Organização Mundial da Saúde. Retrieved November 30, 2023 from https://www.who.int/health-topics/ageing#tab=tab_1

WU DM. et al. **Purple sweet potato color repairs d-galactose-induced spatial learning and memory impairment by regulating the expression of synaptic proteins.** Neurobiol Learn Mem. 2008 Jul;90(1):19-27. doi: 10.1016/j.nlm.2008.01.010. Epub 2008 Mar 7. PMID: 18316211.

ORTMAN CL. et al. **Molecular characterization of the mouse involuted thymus: aberrations in expression of transcription regulators in thymocyte and epithelial compartments.** Int Immunol. 2002 Jul;14(7):813-22. doi: 10.1093/intimm/txf042. PMID: 12096041.

RESHMA BS. et al. **Antioxidant and Antiaging Properties of Agar Obtained from Brown Seaweed Laminaria digitata (Hudson) in D-Galactose-Induced Swiss Albino Mice.** Evid Based Complement Alternat Med. 2022 Feb 24;2022:7736378. doi: 10.1155/2022/7736378. PMID: 35251211; PMCID: PMC8894001.

ROGER L, TOMAS F, GIRE V. **Mechanisms and Regulation of Cellular Senescence.** Int J Mol Sci. 2021 Dec 6;22(23):13173. doi: 10.3390/ijms222313173. PMID: 34884978; PMCID: PMC8658264.

SADIGHI, A. **Aging and the immune system: An overview.** J Immunol Methods. 2018, vol. 463, p. 21-26.

SEMPOWSKI GD. et al. **Leukemia inhibitory factor, oncostatin M, IL-6, and stem cell factor mRNA expression in human thymus increases with age and is associated with thymic atrophy.** J Immunol. 2000 Feb 15;164(4):2180-7. doi: 10.4049/jimmunol.164.4.2180. PMID: 10657672.

SHA JY. et al. **The p53/p21/p16 and PI3K/Akt signaling pathways are involved in the ameliorative effects of maltol on D-galactose-induced liver and kidney aging and**

injury. Phytother Res. 2021 Aug;35(8):4411-4424. doi: 10.1002/ptr.7142. Epub 2021 May 24. PMID: 34028092.

SNYDER KM, MACKALL CL, FRY TJ. **IL-7 in allogeneic transplant: clinical promise and potential pitfalls.** Leuk Lymphoma. 2006 Jul;47(7):1222-8. doi: 10.1080/10428190600555876. PMID: 16923550.

SUN K. et al. **Matrine Attenuates D-Galactose-Induced Aging-Related Behavior in Mice via Inhibition of Cellular Senescence and Oxidative Stress.** Oxid Med Cell Longev. 2018 Nov 27;2018:7108604. doi: 10.1155/2018/7108604. PMID: 30598725; PMCID: PMC6288577.

TAUB DD, LONGO DL. **Insights into thymic aging and regeneration.** Immunol Rev. 2005 Jun;205:72-93. doi: 10.1111/j.0105-2896.2005.00275.x. PMID: 15882346.

THAPA P, FARBER DL. **The Role of the Thymus in the Immune Response.** Thorac Surg Clin. 2019 May;29(2):123-131. doi: 10.1016/j.thorsurg.2018.12.001. Epub 2019 Mar 7. PMID: 30927993; PMCID: PMC6446584.

VANHOOREN V. & LIBERT C. **The mouse as a model organism in aging research: usefulness, pitfalls and possibilities.** Ageing Res Rev. 2013, vol 12(1), p. 8-21.

XU M. et al. **Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age.** Nat Med. 2018 Aug;24(8):1246-1256. doi: 10.1038/s41591-018-0092-9. Epub 2018 Jul 9. PMID: 29988130; PMCID: PMC6082705.

YANG H, YOUM YH, DIXIT VD. **Inhibition of thymic adipogenesis by caloric restriction is coupled with reduction in age-related thymic involution.** J Immunol. 2009 Sep 1;183(5):3040-52. doi: 10.4049/jimmunol.0900562. Epub 2009 Jul 31. PMID: 19648267; PMCID: PMC2731487.

YOUM YH. et al. **Thiazolidinedione treatment and constitutive-PPARgamma activation induces ectopic adipogenesis and promotes age-related thymic involution.**

Aging Cell. 2010 Aug;9(4):478-89. doi: 10.1111/j.1474-9726.2010.00574.x. Epub 2010 Apr 1. PMID: 20374200; PMCID: PMC2910128.

YOUSSEFZADEH MJ. et al. **Tissue specificity of senescent cell accumulation during physiologic and accelerated aging of mice.** Aging Cell. 2020 Mar;19(3):e13094. doi: 10.1111/accel.13094. Epub 2020 Jan 25. PMID: 31981461; PMCID: PMC7059165.

ZHAO S, FERNALD RD. **Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction.** J Comput Biol. 2005 Oct;12(8):1047-64. doi: 10.1089/cmb.2005.12.1047. PMID: 16241897; PMCID: PMC2716216.



Serviço Público Federal
Universidade Federal de Alagoas
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

* 4ª Via

Certificamos que a proposta intitulada “*Avaliação do efeito imunomodulador do ácido p-cumárico em modelo murino de envelhecimento induzido por D-galactose*”, registrada com o nº **19/2019**, sob a responsabilidade da pesquisadora **Profa. Dra. Maria Danielma dos Santos Reis**, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), **para fins de pesquisa científica**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas (CEUA/UFAL), em reunião de 18 de outubro de 2021.

Vigência da autorização	18.08.2019 a 17.08.2023
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico C57BL/6
Nº de animais	306
Peso/idade	18-22g / 6 semanas
Sexo	180 machos
Origem/Local de manutenção	Biotério Central da Ufal / Biotério do Laboratório de Biologia Celular do Núcleo de Pesquisas Multidisciplinares da Ufal
Colaboradores	Salete Smanioto, Janylle N. S. Ferro, Juliane P. da Silva, Julianderson O. dos Santos, Felipe L. Porto, Rafael V. Calado, Mirele R. S. Santos e Beatriz S. Mendonça, Laura Maria Morales Nascimento, Klaya Moreira Ramos, Gabriel José Torres da Silva, Aline G. T. Duarte e Adrielly S. S. Pereira

Maceió, 18 de outubro de 2021.



Documento assinado digitalmente
Elvan Nascimento dos Santos Filho
Data: 18/10/2021 12:19:31-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Elvan Nascimento dos Santos Filho
Coordenador da CEUA
SIAPE 1756479



Serviço Público Federal
Universidade Federal de Alagoas
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética no Uso de Animais

PARECER

Certifico para os devidos fins que foi aprovado *ad referendum* a prorrogação do prazo de vigência do protocolo 19/2019 por um ano, solicitado através de ofício pela Profa. Dra. **MARIA DANIELMA DOS SANTOS REIS**. Ressalta-se que a prorrogação passa a contar a partir da data anteriormente aprovada para finalização da pesquisa.

Maceió, 09 de agosto de 2023.



Documento assinado digitalmente

TOBYAS MAIA DE ALBUQUERQUE MARIZ

Data: 09/08/2023 21:12:15-0300

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

Tobias Maia de Albuquerque Mariz
Coordenador em exercício da CEUA
SIAPE 1482631