

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

BEATRIZ SANTANA MENDONÇA

**Caracterização morfológica e molecular de células epiteliais tímicas humanas
após estímulo com TGF- β 1 *in vitro***

MACEIÓ-AL

2024

BEATRIZ SANTANA MENDONÇA

Caracterização morfológica e molecular de células epiteliais tímicas humanas após estímulo com TGF- β 1 *in vitro*

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto

Coorientadora: Prof^a Dr^a Maria Danielma dos Santos Reis

MACEIÓ-AL

2024

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

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

M539c Mendonça, Beatriz Santana.

Caracterização morfológica e molecular de células epiteliais tínicas humanas após estímulo com TGF- β 1 *in vitro* / Beatriz Santana Mendonça. – 2024.

70 f. : il.

Orientador: Emiliano de Oliveira Barreto.

Co-orientadora: Maria Danielma dos Santos Reis.

Dissertação (mestrado em ciências da saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2024.

Bibliografia: f. 53-69.

1. Timo. 2. Células epiteliais. 3. TGF- β 1 (Proteína). I. Título.

CDU: 612.438

Folha de Aprovação

BEATRIZ SANTANA MENDONCA

Caracterização morfológica e molecular de células epiteliais tímicas humanas após estímulo com TGF- β 1 in vitro

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 21 de março de 2024.

Banca Examinadora

Documento assinado digitalmente
 **MARIA DANIELMA DOS SANTOS REIS**
Data: 21/03/2024 16:58:26-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Presidente – MARIA DANIELMA DOS SANTOS REIS
(COORDENADORA)

Documento assinado digitalmente
 **CAMILA BRAGA DORNELAS**
Data: 21/03/2024 15:09:45-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a – CAMILA BRAGA DORNELAS – UFAL

Documento assinado digitalmente
 **JULIANE CABRAL SILVA**
Data: 21/03/2024 15:17:35-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr.^a – JULIANE CABRAL SILVA – UFAL

À minha família e amigos que me deram o suporte necessário durante esses anos de estudo e à Cookie, por fazer parte da minha vida e ter sido meu cãozinho companheiro por 9 anos nos momentos mais difíceis, te levarei sempre comigo.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha família por ter me dado o suporte necessário durante esses anos na pesquisa e por ter acreditado em mim muito mais do que eu mesma. Agradeço especialmente a minha avó Regina, que sempre fala com um orgulho enorme sobre a neta cientista. Agradeço também aos meus familiares que moram comigo e tiveram paciência enquanto eu estava estudando na frente do computador, muito obrigada a minha mãe Lílian, minhas tias Natália e Eveline e meu primo Túlio, vocês fizeram toda a diferença no meu crescimento pessoal e profissional.

Gostaria de agradecer também às pessoas que estiveram comigo de alguma forma durante esse tempo e me deram forças, agradeço em especial à Sally, cujo incentivo e paciência me fizeram acreditar em mim e no meu potencial, você sabe o quanto fez diferença nessa minha conquista. Agradeço ainda as minhas amigas e companheiras de graduação e pós-graduação que estiveram comigo, ter vocês comigo nessa caminhada tornou tudo mais leve. Além disso, agradeço aos amigos que mesmo de longe fizeram parte desse meu tempo na ciência.

Agradeço especialmente aos meus companheiros do Laboratório de Biologia Celular, do qual faço parte desde 2018 e posso chamar de segunda casa, toda a minha trajetória na pesquisa aconteceu graças a vocês e a confiança que depositaram em mim. Muito obrigada a todos que de alguma forma me ajudaram a desenvolver esse trabalho, em especial aos PIBICs Alef e Erick, que sempre me auxiliaram e a pós-doutoranda Jordana. Agradeço também às integrantes do meu grupo Laura, Beatriz e Vanessa por todo o suporte. Agradeço ainda a Everlaine e a técnica do laboratório Juliane, que sempre estiveram disponíveis. E por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer ao meu orientador Prof. Dr. Emiliano Barreto, que é uma inspiração para todos que o conhecem e confiou em mim e também a minha coorientadora Prof^a Dr^a Maria Danielma, sem dúvida você é a maior responsável por eu chegar onde cheguei, sou grata por toda a paciência e ensinamentos durante esses quase 6 anos no Laboratório de Biologia Celular.

RESUMO

O timo é um órgão linfoide responsável por eventos fundamentais para o desenvolvimento da imunidade celular do organismo, tais como maturação, diferenciação e seleção de linfócitos T. Neste contexto, as células epiteliais tímicas (TECs), que compõem a maior parte do microambiente tímico, participam ativamente das etapas de diferenciação dos linfócitos T funcionalmente competentes. O TGF- β 1 é uma proteína relacionada a transição epitelial-mesenquimal (TEM) e estresse oxidativo, eventos importantes para o processo de involução do timo com a idade. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar as alterações morfológicas e moleculares induzidas pelo TGF- β 1 em células epiteliais tímicas *in vitro*. Para isso, foram utilizadas TECs da linhagem humana THPN e foram avaliados os parâmetros de morfologia, produção de laminina, ativação da via canônica do TGF- β e expressão de genes relacionados a TEM e estresse oxidativo. Além disso, foi vista a expressão dos genes do fator inibidor de leucemia (LIF) e de seu receptor, LIF-R. O TGF- β 1 foi capaz de induzir alterações na morfologia das TECs, que apresentaram uma morfologia maior e mais alongada com relação as células sem estímulo. Além disso, foi visto um aumento na intensidade de fluorescência para a SMAD3 fosforilada quando as células foram estimuladas com o TGF- β 1 e um aumento na produção de laminina. Através de qPCR, foi possível observar que o TGF- β 1 aumentou a expressão relativa do gene para N-caderina, um marcador de TEM, e diminuiu a expressão do gene *LIFR*. Por último, foi vista uma redução na expressão relativa do gene para a enzima Catalase (*CAT*) quando as TECs foram estimuladas com o TGF- β 1. Assim, pode-se concluir que as TECs, quando estimuladas com TGF- β 1, apresentam modificações celulares e moleculares semelhantes àquelas encontradas em TEC durante a involução tímica, como o aumento de matriz extracelular, modificação para um perfil mesenquimal e perda da homeostase antioxidante, tornando-a um possível instrumento para o estudo das alterações nas TECs durante o envelhecimento.

Palavras-chave: timo; células epiteliais tímicas; TGF- β 1

ABSTRACT

The thymus is a lymphoid organ responsible for fundamental events for the development of the organism's cellular immunity, such as maturation, differentiation and selection of T lymphocytes. In this context, thymic epithelial cells (TECs), which make up the majority of the thymic microenvironment, they actively participate in the differentiation stages of functionally competent T lymphocytes. TGF- β 1 is a protein related to epithelial-mesenchymal transistion (EMT) and oxidative stress, important events for the process of thymus involution with age. Therefore, the objective of this work was to evaluate the morphological and molecular changes induced by TGF- β 1 in thymic epithelial cells *in vitro*. For this, TECs from the human THPN lineage were used and the parameters of morphology, laminin production, activation of the canonical TGF- β pathway and expression of genes related to TEM and oxidative stress were evaluated. Furthermore, expression of the leukemia inhibitory factor (LIF) and its receptor, LIF-R, genes was seen. TGF- β 1 was able to induce changes in the morphology of TECs, which presented a larger and more elongated morphology compared to cells without stimulation. Furthermore, an increase in fluorescence intensity for phosphorylated SMAD3 was seen when cells were stimulated with TGF- β 1 and an increase in laminin production. Through qPCR, it was possible to observe that TGF- β 1 increased the relative expression of the gene for N-cadherin, a marker of EMT, and decreased the expression of the *LIFR* gene. Finally, a reduction in the relative expression of the gene for the Catalase enzyme (*CAT*) was seen when TECs were stimulated with TGF- β 1. Thus, it can be concluded that TECs, when stimulated with TGF- β 1, present cellular and molecular modifications similar to those found in TECs during thymic involution, such as an increase in extracellular matrix, modification to a mesenchymal profile and loss of antioxidant homeostasis, making it a possible instrument for studying changes in TECs during aging.

Keywords: thymus; thymic epithelial cells; TGF- β 1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Histologia do timo	17
Figura 2: Microambiente tímico	18
Figura 3: Diferenciação de linfócitos T	18
Figura 4: Desenvolvimento das TECs	21
Figura 5: Alterações decorrentes da involução tímica	23
Figura 6: Via canônica TGF- β /SMAD	28
Figura 7: Efeitos do TGF- β	32
Figura 8: Expressão <i>p-smad3</i> nas TECs após estímulo com TGF- β 1	39
Figura 9: Alterações morfológicas nas TECs estimuladas com TGF- β 1	41
Figura 10: Efeito do TGF- β 1 no citoesqueleto de actina das TECs	43
Figura 11: Produção de laminina nas TECs após estímulo com TGF- β 1	44
Figura 12: Expressão de vimentina nas TECs após estímulo com TGF- β 1	46
Figura 13: Expressão relativa dos genes <i>N-CAD</i> e <i>E-CAD</i> após estímulo com TGF- β 1	48
Figura 14: Expressão relativa dos genes <i>LIF</i> e <i>LIFR</i> em TECs após estímulo com TGF- β 1	49
Figura 15: Expressão relativa dos genes <i>CAT</i> e <i>SOD2</i> em TECs após estímulo com TGF- β 1	50
Figura 16: Resumo dos efeitos do TGF- β 1 em TEC	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequências <i>forward</i> e <i>reverse</i> de cada gene-alvo	38
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTB: Actina beta

Aire: Regulador da autoimunidade

AKT: Proteína quinase B

APC: Antigen presenting cells (Célula apresentadora de antígeno)

BCL-2: Linfoma de células B2

BSA: Albumina sérica bovina

CAT: Catalase

CCL25: Ligante de quimiocina 25

CD147: Basigina

CD205: Antígeno linfocitário 75

CD25: Cadeia alfa do receptor de Interleucina-2

CD4: Grupamento de diferenciação 4

CD44: Grupamento de diferenciação 44

CD8: Grupamento de diferenciação 8

Cld3: Claudina-3

Cld4: Claudina-4

Co-SMAD: SMAD comum

cTEC: Célula epitelial tímica cortical

CXCL12: Fator 1 derivado de células estromais

C/EBPs: Proteínas de ligação ao intensificador CCAAT

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DLL4: Ligante do tipo delta 4

DN: Duplo-negativo

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DP: duplo-positivo

E-CAD: E-caderina

EpCAM: Molécula de adesão celular epitelial

EROs: Espécies reativas de oxigênio

Fezf2: Forebrain-expressed zinc finger 2 (dedo de zinco expresso no prosencéfalo2)

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

FOXC2: Proteína C2 da caixa de forquilha

FoxN1: Proteína Forkhead box N1

FSP-1: Proteína supressora de ferroptose 1

GPX: Glutathione peroxidase

GP130: Glicoproteína 130

GSH: Glutathione

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

IF: Filamentos individuais esparsos de tamanho

IL-1: Interleucina-1

IL-6: Interleucina-6

IL-7: Interleucina-7

I-SMADs: SMADs inibitórios

JCM: Junção córtico-medular

LAP: Proteína associada latente

LIF: Leukemia inhibitory factor (fator inibidor de leucemia)

LIFR: Receptor of leukemia inhibitory factor (receptor do fator de inibição de leucemia)

mABs: Anticorpos monoclonais ativadores

MAPK: MAP quinase

MHC: Complexo principal de histocompatibilidade

mTEC: Célula epitelial tímica medular

mRNA: RNA mensageiro

N-CAD: N-caderina

Nf-KB: Nuclear factor kappa B (fator nuclear kappa B)

NK: Células natural killer

O₂: Oxigênio

PBS: Solução salina fosfatada tamponada

PFA: Paraformaldeído

PPAR γ : Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama

PRX: Peroxirredoxina

p-SMAD: Smad fosforilada

PTA: Antígeno de tecido periférico

qPCR: PCR quantitativo em tempo real

RANK: Ativador do receptor do fator nuclear κ B

RNA: Ácido ribonucleico

RSMADs: SMADs regulados por receptor

SBF: Soro bovino fetal

SNC: Sistema nervoso central

SOD: Superóxido dismutase

SOD2: Superóxido dismutase 2

SP: Simples-positivo

SSEA-1: Antígeno embrionário específico do estágio -1

TEC: Thymic epithelial cell (Célula epitelial tímica)

TEM: Transição epitelial-mesenquimal

TGF- β : Transforming growth fator beta (fator de crescimento transformador beta)

THPN: Thymic human postnatal (Linhagem de TEC humana pós-natal)

TNC: Thymic nurse cell complex (Complexo *Nurse* tímico)

Treg: Célula T reguladora

T β RI: Receptor I do TGF- β

T β RII: Receptor II do TGF- β

VLA-6: Integrina alfa 6

ZSC: Zona subcapsular

α -SMA: α -actina de músculo liso

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo geral	15
2.2. Objetivos específicos	15
3. REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1. Timo	16
3.1.1. Células epiteliais tímicas (TECs)	19
3.1.2. Involução do timo associada a imunossenescência	22
3.2. TGF- β	26
3.2.1 O TGF- β na fisiologia tímica	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1. Cultivo celular e tratamento <i>in vitro</i>	34
4.2. Análise morfológica	34
4.3. Marcação do citoesqueleto de actina	35
4.4. Ensaio de imunofluorescência	35
4.4.1 Laminina	35
4.4.2 Vimentina	36
4.4.3 <i>p</i> -SMAD3	36
4.5. Análise de expressão gênica por PCR quantitativo (PCRq)	37
4.6. Análises estatísticas	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1. Ativação da via canônica do TGF- β 1 em linhagem de TEC humana	39
5.2. Efeito do TGF- β 1 sobre a morfologia das células epiteliais tímicas humanas	40
5.3. Efeito do TGF- β 1 no conteúdo do citoesqueleto de actina em TEC	42
5.4. Efeito do TGF- β 1 sobre a produção de laminina em TECs humanas	43
5.5. Efeito do TGF- β 1 na expressão de vimentina em TEC	45
5.6. Efeito do TGF- β 1 na expressão dos genes para N- e E- caderina em TEC	47
5.7 Efeito do TGF- β 1 na expressão dos genes para LIF e LIFR em TEC	49
5.8 Efeito do TGF- β 1 na expressão dos genes para CAT e SOD2 em TEC	50

6. CONCLUSÃO	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
MATERIAL SUPLEMENTAR	70

1. INTRODUÇÃO

O timo é um órgão linfoide relacionado com eventos fundamentais para o desenvolvimento da imunidade celular do organismo, tais como maturação, diferenciação e seleção de linfócitos T imunocompetentes (Rezzani *et al.*, 2014). Além disso, ele é caracterizado por ser grande na infância, período em que é responsável por estabelecer o repertório inicial de células T, permanecendo homeostático durante um tempo, seguido por um processo de involução gradual com o aumento da idade, que continua pela fase adulta, conhecido como involução tímica (Hale *et al.*, 2021).

Durante a involução, o timo passa por uma série de modificações, tais como diminuição no tamanho e no peso do órgão, além de diminuir também a celularidade e aumentar a quantidade de tecido adiposo no timo involuído (Barbouti *et al.*, 2020). Nesse contexto, as células epiteliais tímicas (TECs) compõem o microambiente tímico e possuem grande importância para o estabelecimento da imunidade do organismo, já que participam diretamente do processo de desenvolvimento e maturação dos linfócitos T e acabam sendo um dos tipos celulares afetados durante a involução tímica (Petrie *et al.*, 2000).

O TGF- β 1 é uma proteína que tem sido relacionada com os processos de transição epitelial-mesenquimal (TEM) e estresse oxidativo, eventos importantes durante a involução do timo que ocorre com o aumento da idade (Lee; Massagué, 2022; Ishikawa *et al.*, 2014).

Sabendo-se que o envelhecimento é um problema de saúde pública que tem sido associado à diversas patologias e aumento da incidência de doenças ligadas ao sistema imunológico (Minato *et al.*, 2020) e a importância do timo para a imunidade do organismo, torna-se necessário entender os mecanismos que possam estar relacionados ao processo de involução tímica principalmente em humanos, que pode ser associado ao aumento da idade e prejuízo da resposta imune em pessoas idosas. O TGF- β 1 pode participar ativamente das alterações tímicas no envelhecimento, contudo os mecanismos celulares e moleculares ainda são pouco compreendidos, assim como ocorre uma escassez de dados envolvendo a utilização de células epiteliais tímicas de linhagem humana no contexto da involução. Em vista disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar as alterações morfológicas e moleculares em TECs humanas após estímulo com o TGF- β 1 *in vitro*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar as alterações morfológicas e moleculares induzidas por TGF- β 1 em células epiteliais tímicas (TECs) *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os aspectos morfológicos das TECs após estimulação com TGF- β 1;
- Avaliar a produção de moléculas de matriz extracelular por TECs após estimulação com TGF- β 1;
- Analisar marcadores de transição epitelial-mesenquimal em TECs após estimulação com TGF- β 1;
- Analisar marcadores de estresse oxidativo em TECs estimuladas com TGF- β 1.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

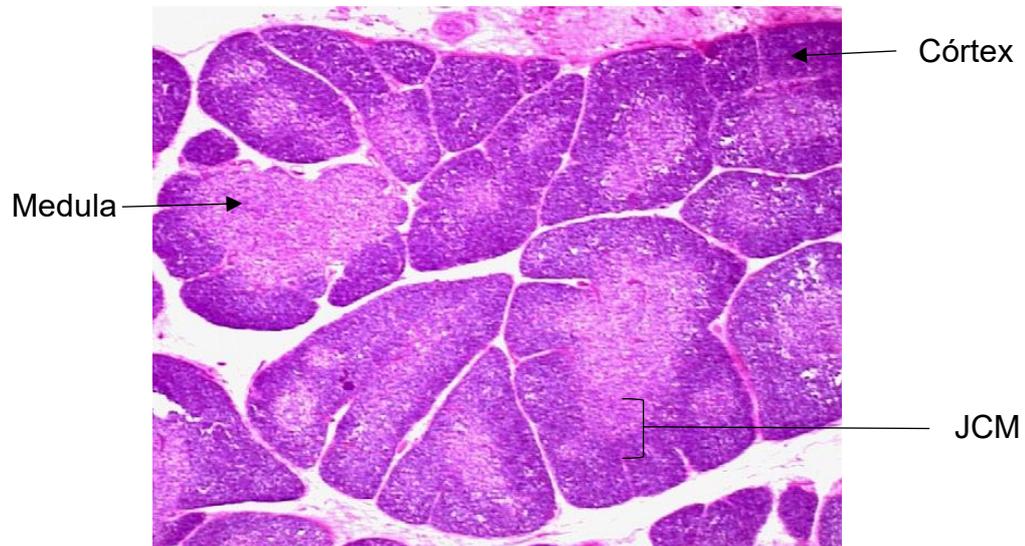
3.1 Timo

O timo é um importante órgão linfoide responsável pela seleção, desenvolvimento e maturação de linfócitos imunocompetentes, sendo fundamental para a imunidade do organismo (Rezzani *et al.*, 2014). Durante muitos anos, o exato papel do timo não era totalmente conhecido, porém a partir da década de 1960 alguns trabalhos começaram a tentar entender a função desse órgão, quando foi demonstrado o papel do timo utilizando camundongos timectomizados após o nascimento, sendo visto que estes tinham tecidos linfoides que não foram bem desenvolvidos e respostas imunológicas prejudicadas. A partir de então, a função do timo para a imunidade do organismo passou a ter uma nova perspectiva (Miller *et al.*, 2002; Bartke, 1965).

Localizado no mediastino, o timo fica sobre o coração, atrás do esterno e é caracterizado por possuir dois lobos em forma de pirâmide, sendo o direito ligeiramente maior que o esquerdo. Ambos os lobos são envoltos por uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso, a qual divide o órgão em lóbulos (Safieddine; Keshavjee, 2011). O timo possui um microambiente (ou estroma) especializado composto por duas regiões: uma região externa, de coloração mais escura devido a uma maior quantidade de células, denominada córtex; uma região interna, de coloração mais clara, com baixa densidade celular denominada medula (Figura 1). Essas duas regiões são separadas por uma junção chamada de córtico-medular, rica em vasos sanguíneos (Taub; Longo, 2005).

O estroma tímico é composto por diversos tipos celulares, entre eles as células epiteliais tímicas (TECs), células dendríticas, macrófagos, células endoteliais, células mesenquimais, fibroblastos e linfócitos B (Figura 2). Este microambiente promove a maturação dos timócitos, regulando a timopoiese e consequentemente a homeostase do órgão (Manley *et al.*, 2011; Han; Zúñiga-Pflucker, 2021).

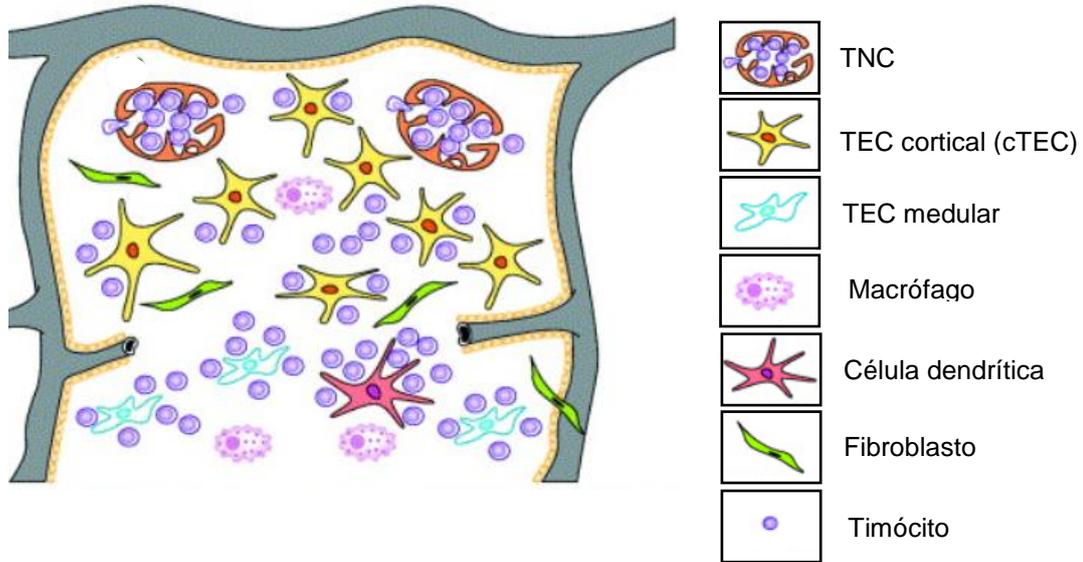
Figura 1: Histologia do timo



A figura mostra um corte histológico do timo, indicando suas duas áreas: o córtex (mais externo) e a medula (mais interna), sendo possível observar também a área de ligação entre essas duas regiões, chamada de junção córtico-medular. JCM = Junção córtico-medular. Imagem adaptada de ANATPAT – Unicamp/ Timo normal, lam A. 365. Disponível em: <https://anatpat.unicamp.br/lamhemo19.html>.

Uma das principais funções do timo é o desenvolvimento, seleção e maturação de linfócitos T, que quando imaturos são chamados de timócitos. Os progenitores de células T, provenientes da medula óssea, entram no timo pela zona subcapsular onde tem início o processo de maturação, a qual é determinada pela expressão dos marcadores de superfície CD4 e CD8. Ao entrarem no timo, os progenitores de células T são negativos para CD4 e CD8, sendo chamados de timócitos duplo-negativos (DN) (Germain, 2002). As células DN começam a se expandir na região subcapsular do córtex e se diferenciar através da expressão de CD44 e CD25. Enquanto isso, elas migram para o córtex interno e para a medula (Ewijk, 1991; Taub; Longo, 2005). É nesse momento de migração do córtex para a medula que os timócitos passam a expressar ambas as moléculas CD4 e CD8, tornando-se duplo-positivos (DP) e em seguida timócitos simples-positivos (SP) para CD4 ou CD8 (Figura 3). Todo esse processo é possível devido a seleção positiva e negativa dos timócitos, mediada por sinais celulares e moleculares provenientes do estroma, especialmente das TECs, presentes em abundância no microambiente tímico (Alves *et al.*, 2009; Petrie, 2002).

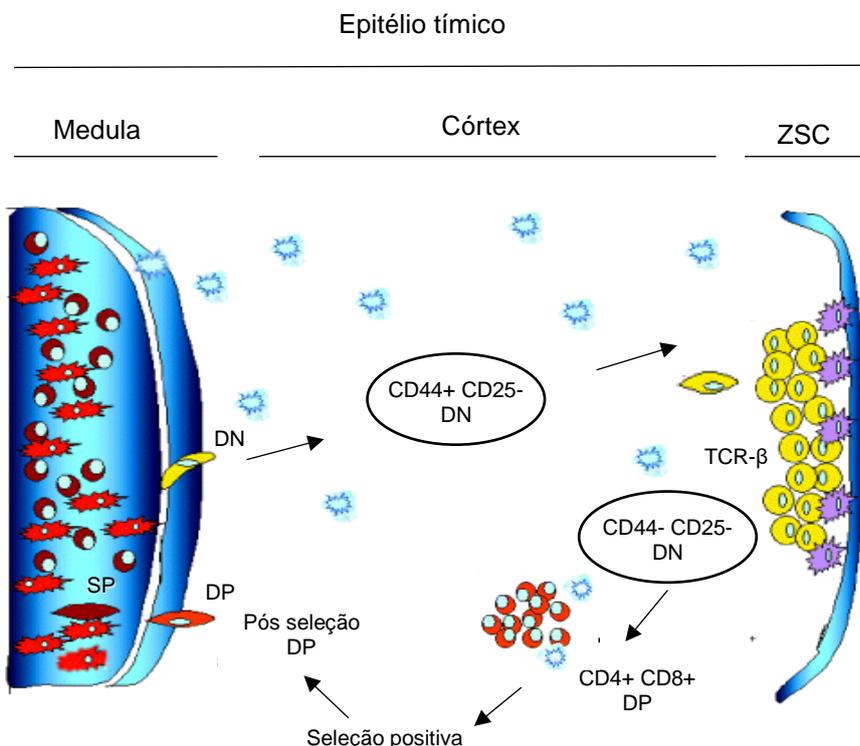
Figura 2: Microambiente tímico



A figura mostra as células que fazem parte do microambiente especializado do timo. cTEC = Célula epitelial tímica cortical; mTEC = Célula epitelial tímica medular. TNC = Complexo *Nurse* tímico. Adaptado de Savino *et al.* (2002).

Além dos linfócitos T, outras células são importantes para a organogênese do timo, como por exemplo os macrófagos e células dendríticas, que secretam citocinas que auxiliam na proliferação, maturação e diferenciação dos timócitos, além de ajudarem também na imunidade (Liu *et al.*, 2013; Luo *et al.*, 2012; Bonasio *et al.*, 2006).

Figura 3: Diferenciação de linfócitos T



A figura mostra os diferentes estágios de diferenciação dos timócitos em células T maduras com base na expressão de CD44 e CD25. Ao entrarem no microambiente tímico, os progenitores de células T são duplo-negativos (CD4⁻ CD8⁻), eles migram da medula para o córtex, passando pela rede de células estromais tímicas e chegam na zona subcapsular (ZSC), momento em que ocorre a expressão da cadeia do TCR- β , que sofre um rearranjo. Ao saírem dessa zona, eles passam por eventos proliferativos e se diferenciam em DP (CD4⁺ CD8⁺). Quando migram de volta do córtex para medula, eles passam a expressar os receptores CD4 ou CD8, junto com o TCR, tornando-se células T maduras. Adaptado de Taub & Longo (2005).

3.1.1 Células epiteliais tímicas (TECs)

As células epiteliais tímicas (TECs) são a população celular mais abundante do microambiente tímico e podem ser subdivididas com base na sua localização em TEC corticais (cTECs) e TEC medulares (mTECs) (Wang *et al.*, 2020). Essas células são extremamente importantes para produção de fatores de crescimento, quimiocinas, citocinas e moléculas da matriz extracelular, que favorecem a diferenciação e maturação dos timócitos (Barbouti *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020; Manley *et al.*, 2011; Petrie, 2002). Os primeiros estágios de diferenciação no timo são totalmente dependentes das TECs, em que os timócitos interagem com as cTECs, que vão fornecer as moléculas de sinalização necessárias para o comprometimento das células precursoras com a linhagem T, como também estimulam a sobrevivência e proliferação dos timócitos (Petrie *et al.*, 2000).

Ambos os tipos de TECs expressam o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II e a molécula de adesão epitelial (EpCAM), um conhecido marcador epitelial. Além disso, é possível distinguir os tipos de TEC com base no seu fenótipo e na expressão de citoqueratinas (Gray *et al.*, 2006). Porém mesmo com essas diferenças, durante a organogênese tímica, as TECs se originam de um progenitor epitelial comum, que continua presente no timo pós-natal (Alves *et al.*, 2009; Bleul *et al.*, 2006; Rossi *et al.*, 2006). Nas primeiras fases da organogênese do timo, o ligante do tipo delta 4 (DLL4) e a interleucina 7 (IL-7) são expressos pela grande maioria das TECs, sendo considerados os principais fatores timopoiéticos, porém essa expressão diminui com a idade (Koch *et al.*, 2008; Alves *et al.*, 2009).

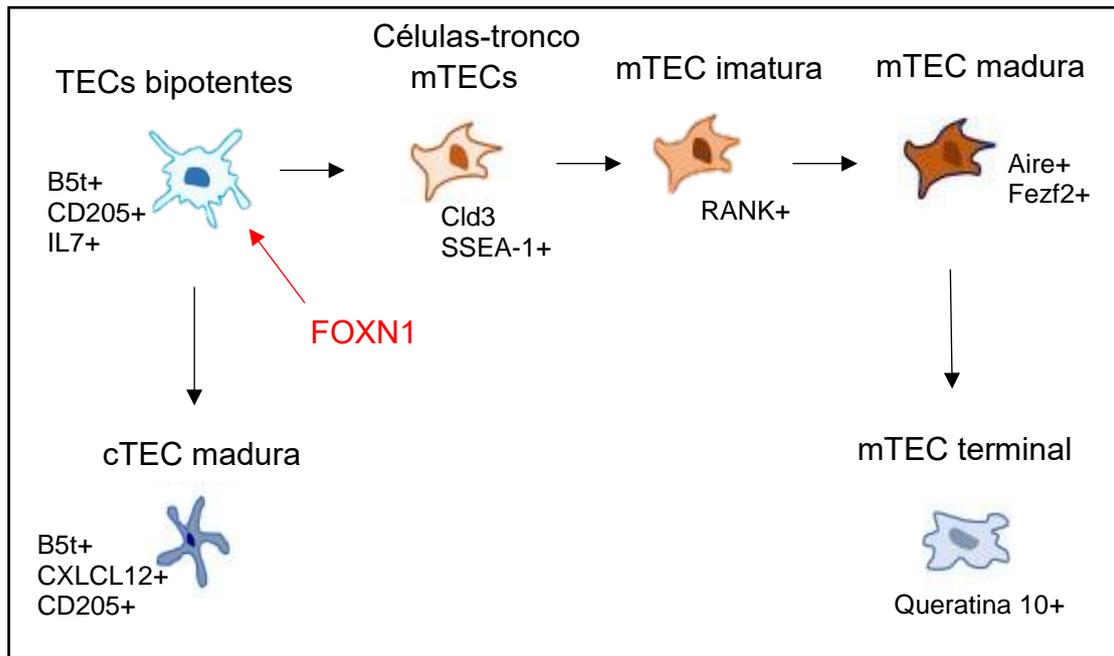
Para o desenvolvimento das TECs, as TECs bipotentes expressam a subunidade catalítica B5t+, além do antígeno linfocitário 75 (CD205+) e IL7+ e podem se diferenciar diretamente em cTECs maduras que expressam o fator 1 derivado de células estromais (CXCL12) e continuam expressando B5t+ ou em mTECs (Alawam *et al.*, 2020). Acredita-se que o surgimento da linhagem mTEC esteja relacionado com

a expressão dos componentes de junção estreita Claudina 3 e 4 (Cld3, 4) e o marcador de células estaminais SSEA-1, que levam ao desenvolvimento de mTECs intermediárias imaturas que expressam RANK+ e são capazes de dar origem a mTECs Aire+ (regulador autoimune), sendo RANK (ativador do receptor do fator nuclear κ B) um regulador chave da maturação das mTECs (Alawam *et al.*, 2020; Rossi *et al.*, 2007; Hikosaka *et al.*, 2008). As mTECs maduras e positivas para Aire também podem expressar o fator de transcrição Fezf2, sendo este necessário para expressão de genes independentes de Aire (Alawam *et al.*, 2020; Takaba *et al.*, 2015). Essas mTECs podem ainda se diferenciar em mTECs terminais pós-aire se tornando marcadores TECs de queratinócitos diferenciados, com a expressão de queratina-10 (Figura 4) (Yano *et al.*, 2008).

O fator de transcrição forkhead box N1 (FOXN1) regula o desenvolvimento das TECs, isso porque ele expressa os genes responsáveis por codificar o ligante de quimiocina 25 (CCL25) e o CXCL12, importantes para o desenvolvimento das células (Figura 4) (Calderón; Boehm, 2012). A expressão de FOXN1 não é importante apenas durante o período de desenvolvimento, mas a sua expressão ainda é necessária durante a vida adulta para manter a funcionalidade das TECs, regulando o desenvolvimento e a diferenciação dessas células (Chen *et al.*, 2009), por isso mutações nesta proteína provocam falhas que acarretam deficiência de células T (Nehls *et al.*, 1996). Já foi visto que a perda de FOXN1 em camundongos resulta no processo de atrofia tímica e também induz um fenótipo sem pelos nesses camundongos (Zuklys *et al.*, 2016).

Outra molécula sinalizadora que também apresenta relação com as mTECs são as proteínas WNT, importantes para mecanismos relacionados com sobrevivência, proliferação e diferenciação celular (Wodarz; Nusse, 1998). Já foi visto que essas proteínas são expressas por TECs e podem controlar a transcrição de FOXN1 por meio da fosforilação de AKT (Balciunaite *et al.*, 2002). Além do FOXN1, as TEC em desenvolvimento recebem auxílio das células mesenquimais derivadas da crista neural que produzem fatores de crescimento que auxiliam em seu desenvolvimento (Jenkinson *et al.*, 2003). As células epiteliais tímicas humanas também são capazes de produzir diversas citocinas hematopoiéticas, como a interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), IL-7 e também o fator inibidor de leucemia (LIF) (Sempowski *et al.*, 2000; Le *et al.*, 1990; Le *et al.*, 1991).

Figura 4: Desenvolvimento das TECs



No processo de desenvolvimento das TECs, os progenitores de TEC epiteliais bipotentes originam as duas linhagens cTEC e mTEC. Como as cTECs já são semelhantes as células progenitoras, elas não precisam passar por um processo de diferenciação mais longo. O FOXN1 participa diretamente do processo de desenvolvimento das TECs, visto que ele expressa os genes responsáveis por codificar CCL25 e CXCL12. Essas mTEC maduras podem passar por um processo de diferenciação em mTEC terminal que origina outros subconjuntos de TEC. Adaptado de Alawam *et al.* (2020).

As cTECs são conhecidamente importantes para a seleção positiva das células T, enquanto que as mTECs são responsáveis pela indução da seleção negativa de células T autorreativas (Abramson; Anderson, 2017). As cTECs possuem uma estrutura tridimensional e são capazes de interagir com timócitos DN e DP, além de formar complexos multicelulares (chamados de células *nurse* tímicas) que podem abranger até 20 timócitos (Klein *et al.*, 2014). As células corticais são essenciais para o comprometimento e o desenvolvimento dos progenitores de células T como também participam do processo de seleção positiva de células DP (Alves *et al.*, 2009; Takahama, 2006). A função essencial dessas cTECs é resultado dos mecanismos que elas utilizam para o processamento de antígenos, o que as torna distintas de qualquer outra célula apresentadora de antígeno (APC) (Klein *et al.*, 2009).

Já as mTECs participam dos estágios finais da diferenciação das células T, fazendo a seleção negativa e auxiliando na sobrevivência dos timócitos SP (Takahama, 2006; Anderson *et al.*, 2007). Para que consigam realizar a seleção

negativa, as mTECs expressam antígenos de tecidos periféricos (PTAs) carregados ao MHC, fazendo com que os timócitos SP interajam com autoantígenos antes da sua liberação para a periferia, deletando as células autorreativas ou convertendo em células T reguladores (Tregs) como forma de prevenir a autoimunidade (Michelson *et al.*, 2022; Derbinski *et al.*, 2001). Nesse contexto, já foi observado que o Aire é importante como um indutor da expressão dos PTAs, visto que mutações em Aire levam a autoimunidade contra antígenos em camundongos e humanos, além de predispor doenças autoimunes como artrite reumatoide e diabetes do tipo 1 (Anderson *et al.*, 2002; Oftedal *et al.*, 2015; Terao *et al.*, 2011).

Alguns estudos ainda demonstram que essas células do epitélio tímico podem sofrer alterações a partir do processo de envelhecimento do organismo, já foi observado que todo o microambiente tímico, mas particularmente as TECs, sofrem modificação com o aumento da idade (Cepeda; Griffith, 2018). O declínio funcional e numérico das TECs é acompanhado pelo aumento de fibroblastos e adipócitos, e há evidências que indicam a transdiferenciação de TEC em células mesenquimais (que podem se diferenciar em adipócitos), sendo um evento chave para a involução do timo pois tem implicações diretas na timopoiese (Youm *et al.*, 2009).

3.1.2 Involução do timo associada a imunossenescência

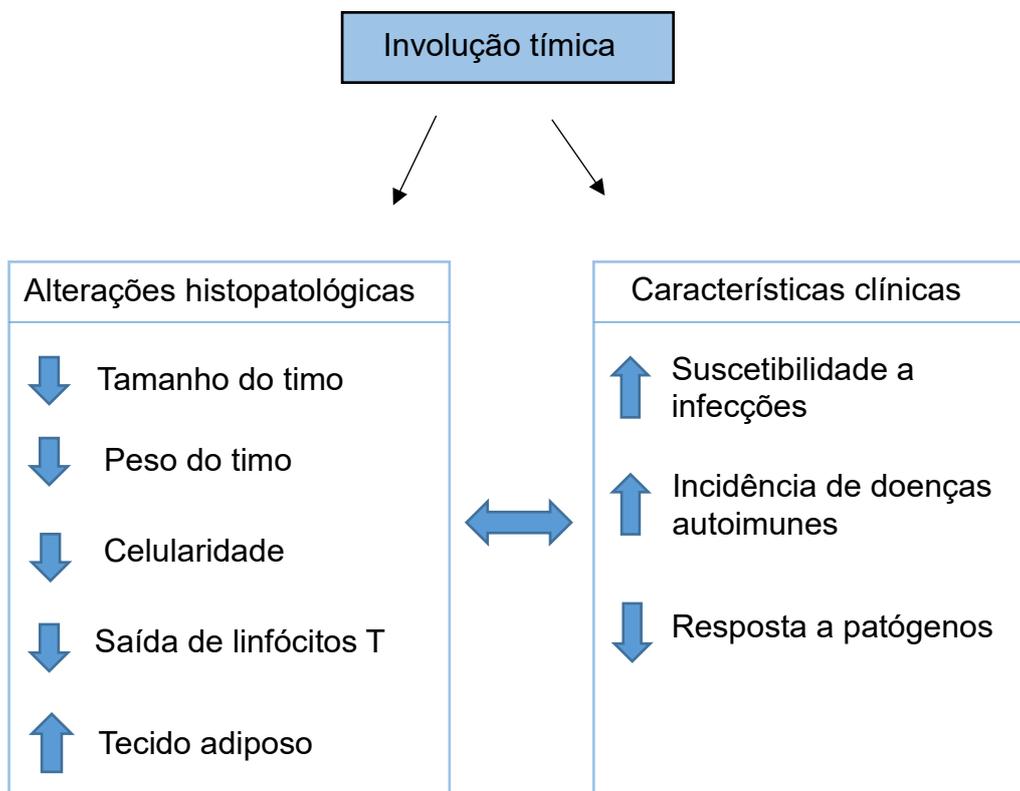
A senescência ou envelhecimento celular é um processo que acontece no organismo de maneira natural com o aumento da idade, caracterizado por um declínio da função celular e pelo acúmulo de defeitos moleculares, que levam a uma parada irreversível do ciclo celular (Palacio *et al.*, 2019). A partir do momento em que a senescência fisiológica atinge as células do sistema imunológico, esse processo passa a ser chamado de imunossenescência e está diretamente relacionado ao fato de que o sistema imunológico começa a apresentar dificuldade em retirar essas células envelhecidas, fazendo com que elas fiquem acumuladas, o que acarreta uma maior propensão de indivíduos idosos desenvolverem doenças e infecções (Minato *et al.*, 2020).

Por ser um importante órgão imunológico, o timo é o primeiro afetado durante a imunossenescência, que passa por um processo de involução, apresentando modificações nas TECs e também nas subpopulações de células T CD4⁺ e CD8⁺, que

diminuem a sua capacidade de migração (Barbouti *et al.*, 2020; Akbar *et al.*, 2016). Com a diminuição principalmente na população de TECs, ocorre um declínio na frequência de células T virgens, que também apresentam uma diminuição em sua função e um conseqüente aumento na frequência das células T de memória (Hale *et al.*, 2021; Chin *et al.*, 2012).

No processo de involução tímica ocorre uma substituição do estroma tímico por tecido adiposo; além disso, pode ocorrer diminuição do tamanho e peso relativo do órgão (Liang, 2022; Hale, 2004). Alguns estudos trazem a hipótese de que a involução tímica pode ser dividida em duas fases, a involução inicial e dependente do crescimento; e a involução tardia e dependente da idade, sendo a fase inicial decorrente de uma compensação bioenergética (Aw; Palmer, 2012; Boehm; Swann, 2013). Na figura 5 é possível observar algumas das mudanças que ocorrem durante o processo de involução do timo.

Figura 5: Alterações decorrentes da involução tímica



A figura mostra a relação entre as alterações histopatológicas e fisiológicas e as alterações clínicas que são observadas durante a involução do timo. A diminuição do tamanho e do peso do timo são acompanhadas por uma queda na celularidade e na saída de novos linfócitos T, além de um aumento de tecido adiposo. Essas alterações na fisiologia do órgão acarretam um aumento na suscetibilidade a infecções e doenças autoimunes, dificultando a resposta a patógenos. Adaptado de Barbouti (2020).

É sugerido que, com a involução, as células do epitélio tímico perdem as suas funções, sendo convertidas em células mesenquimais, o processo responsável pela conversão de células epiteliais em células mesenquimais é a transição epitélio-mesenquima (TEM), que pode estar relacionada ao acúmulo de fibroblastos observado em órgãos envelhecidos, resultando em fibrose (Yang *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2012). Na TEM, as células epiteliais perdem as suas características e a polaridade em conjunto com uma reorganização do citoesqueleto, passando a exibir um fenótipo mesenquimal e invasivo (Lamouille *et al.*, 2014). É um evento reversível regulado por eventos genéticos e epigenéticos que induzem alterações na sua sinalização intracelular e na expressão gênica das células (Thiery; Sleeman, 2006). A TEM pode ser induzida por diversos fatores, como o estresse oxidativo e citocinas como o TGF- β (Yang *et al.*, 2023).

Alguns estudos *in vivo* trazem evidências de que as TECs podem passar pelo processo de TEM, se tornando fibroblastos, os quais podem se diferenciar em pré-adipócitos, fazendo com que haja uma ligação entre TEM e o envelhecimento do timo (Yang *et al.*, 2009). Tal fenômeno parece envolver o declínio na secreção da proteína Wnt4 e o aumento na expressão do polipeptídeo 2 α associado a laminina, o que estimula a conversão de TECs em fibroblastos, os quais são convertidos em adipócitos pela ativação das vias pró-adipogênicas com auxílio do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ) e da proteína aP2, uma proteína de ligação a ácidos graxos (Yang *et al.*, 2023; Kvell *et al.*, 2010). Além disso, a proteína supressora de ferroptose 1 (FSP-1), presente em fibroblastos derivados do epitélio, é uma reguladora pró-TEM que estimula a superexpressão de PPAR γ nos fibroblastos, contribuindo para um aumento da adipogênese e declínio da timopoiese (Yang *et al.*, 2023; Dixit, 2010; Zeisberg; Neilson, 2009). A participação de PPAR γ na transdiferenciação de TEC é corroborada pelo trabalho de Ernszt *et al.* (2017), onde é demonstrado que a diminuição na atividade de PPAR γ pode prevenir a involução do timo em camundongos.

Ainda no contexto da involução tímica, no estudo de Sempowski e colaboradores (2000), foi observado que ocorre um aumento na expressão do mRNA para o fator inibidor de leucemia (LIF) no seu estado estacionário, estando esse

aumento correlacionado com a idade. Nesse mesmo trabalho, o mRNA para LIF também foi expresso no tecido adiposo de maneira semelhante ao timo involuído.

Sabe-se que durante o envelhecimento e atrofia tímica, o estresse oxidativo é um dos principais fatores associado às alterações decorrentes desse processo. As células epiteliais tímicas sofrem impacto direto do estresse oxidativo, que passam a exibir níveis elevados de espécies reativas de oxigênio (EROs) com o aumento da idade, devido a uma falta de catalase (CAT), o que acelera a atrofia do timo (Yang *et al.*, 2023; Barbouti *et al.*, 2020). Já foi demonstrado que um aumento na expressão gênica e na atividade bioquímica de enzimas antioxidantes consegue melhorar a atrofia do timo (Griffith *et al.*, 2015). Um estudo *in vivo* utilizando um modelo de indução do envelhecimento com D-galactose, demonstrou que ratos idosos passaram por um processo de atrofia do timo com níveis elevados de estresse oxidativo (Li *et al.*, 2014). E de maneira oposta, esse mesmo trabalho mostrou que quando um antioxidante foi direcionado às mitocôndrias, a atrofia do timo foi retardada em ratos normais.

Estresse oxidativo é o processo que ocorre quando o equilíbrio entre substâncias oxidantes e antioxidantes é perturbado a favor dos oxidantes. Esse conceito foi introduzido por Helmut Sies em 1985, e fala que o desequilíbrio leva a uma quebra da sinalização e controle redox, levando ao dano molecular (Sies; Jones, 2007). As espécies reativas de oxigênio estão presentes no organismo em estado normal e quando aumentadas levam ao dano oxidativo promovendo o processo de senescência acelerada com uma parada permanente do ciclo celular (Barbouti *et al.*, 2020). As mitocôndrias têm papel importante neste fenômeno, já que são fontes endógenas e também alvos das espécies reativas de oxigênio (Barja, 2014; López-Lluch *et al.*, 2015). Então, uma falha no controle mitocondrial e a perda do genoma da mitocôndria estão associados ao envelhecimento, sendo o estresse oxidativo o principal mecanismo de dano ao DNA mitocondrial (Yakes; Houten, 1997; Pinto; Moraes, 2015).

Na resposta antioxidante do organismo, as enzimas necrófagas tentam metabolizar e reduzir os níveis das espécies reativas de oxigênio, para que elas se tornem menos reativas e prejudiciais (Sies, 2015). Nesse contexto, as superóxido dismutases (SODs) são responsáveis por catalisar a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 e O_2 onde o H_2O_2 é eliminado do organismo por diversas enzimas, que incluem catalases

(CAT), glutathiona peroxidases (GPX) e peroxirredoxinas (PRX) (Davies *et al.*, 2017; Lei *et al.*, 2016). Já foi observado que um aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio em indivíduos idosos, está relacionado com uma baixa produção de moléculas antioxidantes, como SOD, CAT e GPX, que favorecem o estresse oxidativo (Kedziora-Kornatowska *et al.* 2007).

Outro fator que pode estar envolvido na involução tímica é o TGF- β . Isto porque a inibição do TGF- β e de CD147 em TECs impede a involução do timo (Chen *et al.*, 2021). Contudo, ainda são escassos os estudos que descrevem o papel do TGF- β durante o envelhecimento do timo.

3.2 TGF- β

O TGF- β (Fator de crescimento transformador beta) é uma proteína responsável por controlar a diferenciação, proliferação e outras funções celulares (Derynck *et al.*, 2014). O TGF- β 1 faz parte da família de polipeptídeos dos TGFs que possui cinco membros, com três isoformas para mamíferos, sendo elas: TGF- β 1, β 2 e β 3, essas isoformas são sintetizadas ainda inativadas, contendo uma LAP (proteína associada latente) e uma forma madura, que é clivada e produz a molécula ativa (Schimid *et al.*, 1991; Lyons; Moses, 1990). Quando são ativados após a liberação de uma LAP, os TGFs são capazes de desencadear uma sinalização intracelular se ligando ao complexo receptor do TGF- β , que contém dois receptores, sendo eles o receptor I do TGF- β (TGF- β RI) e o receptor II do TGF- β (TGF- β RII) (Voisin *et al.*, 2020).

Alguns estudos *in vitro* mostraram que o TGF- β 1 possui efeitos mitogênicos sobre fibroblastos e é capaz de diminuir a proliferação de células epiteliais, estimulando a expressão de moléculas de matriz extracelular (Schimid *et al.*, 1991). Já durante o desenvolvimento embrionário, na fase de gastrulação, o TGF- β estabelece os eixos do corpo e direciona a padronização do tecido, a partir da indução de *Snail1* e *Twist1*, diminuindo a expressão de E-caderina e aumentando a expressão de N-caderina, eventos chave durante a gastrulação e típicos de TEM (Schafer *et al.*, 2014). Já foi demonstrado que uma diminuição na expressão de Snail em embriões de camundongos impede a regulação negativa de E-caderina, o que acarreta defeitos na formação da mesoderme (Carver *et al.*, 2001).

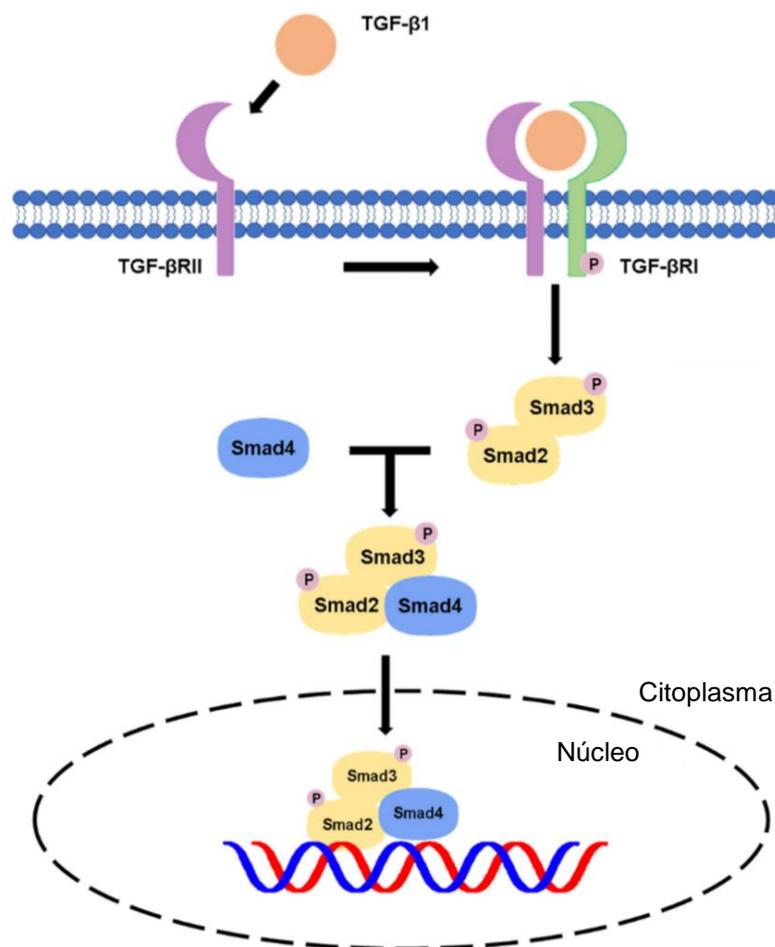
O TGF- β é um dos principais responsáveis por ativar a expressão de fatores de transcrição que desencadeiam o processo de TEM (Lee; Massagué, 2022). O efeito do TGF- β na modulação de TEM já foi visto em diferentes estudos, por exemplo, em um trabalho *in vivo* que demonstrou que o TGF- β causa mudanças fenotípicas em células epiteliais mamárias de camundongos (Miettinen *et al.*, 1994). Além do mais, outros estudos mostraram o efeito do TGF- β durante o desenvolvimento de diversos tipos de fibrose e no câncer (Katsuno; Derinck, 2021). A combinação de TGF- β com o câncer parece ser bastante prejudicial para o organismo, já que a TEM induzida por TGF- β provoca resistência a quimioterapia e irradiação, além de diminuir a apoptose das células cancerígenas (Fischer *et al.*, 2015; Zheng *et al.*, 2015).

Uma via importante que está relacionada com o TGF- β 1 e com TEM é a via do fator de transcrição SMAD. As citocinas do TGF- β se ligam aos seus receptores serina-quinases que fosforilam as SMADs 2 e 3, que formam complexos triméricos com a SMAD4 para regular os genes-alvo (Lee; Massagué, 2022). As SMADs são transportadas do citoplasma para o núcleo, onde se ligam ao genoma para atuar na regulação de genes específicos, sendo a escolha dos genes-alvo influenciada por diferentes fatores (Inman *et al.*, 2002; Macias *et al.*, 2015; David; Massagué, 2018;).

As proteínas SMAD são formadas por dois domínios, o domínio N-terminal e o domínio C-terminal, sendo a principal função do primeiro de se ligar ao DNA e do segundo de mediar a interação proteína-proteína com proteínas reguladoras e efetoras, assim como com os receptores de TGF- β (Macias *et al.*, 2015; Massagué, 2012). Em humanos, a família SMAD possui 8 membros e a especificidade da sinalização é determinada por meio dos receptores de tipo I ou II que cada membro pode se ligar e conduzir a sinalização, como por exemplo os receptores para TGF- β e activina que sinalizam através das SMADs 2 e 3 (Massagué, 2012; Pardali *et al.*, 2010). Esses membros da família são classificados em 3 grupos: SMADs reguladas por receptor (R-SMADs), SMAD comum (Co-SMAD) e SMADs inibitórios (I-SMADs), sendo a SMAD3 regulada por receptor (R-SMAD) (Xu *et al.*, 2016). No caso das R-SMADs, elas se ligam a receptores de serina/treonina e são ativadas por meio da atividade quinase, além disso as R-SMADs ativadas ligam-se a Co-SMAD formando um complexo que faz uma translocação para o núcleo (Xu *et al.*, 2016; Calvo *et al.*, 2009). De maneira oposta, os I-SMADs podem inibir os efeitos das R-SMADs, tendo um efeito inibitório na sinalização do TGF- β (Blank; Karlsson, 2011).

Para fazer a sinalização da via SMAD, o TGF- β 1 se liga ao T β RII, que então faz a ativação da quinase do T β RI, levando a fosforilação da SMAD3, que ativada forma complexos oligoméricos com a SMAD4 (Xu *et al.*, 2016; Conidi *et al.*, 2011). São esses complexos oligoméricos que fazem a translocação para o núcleo e regulam a transcrição dos genes-alvo (Xie *et al.*, 2014) (Figura 6). Além de ativar as vias dependentes de SMAD, o TGF- β 1 é capaz de ativar vias independentes de SMAD, como a MAPK, NF- κ B e PI3K (West, 2010; Derynck; Zhang, 2003).

Figura 6: Via canônica TGF- β /SMAD



A figura mostra a cascata de sinalização da via canônica TGF- β /SMAD, onde o TGF- β 1 se liga ao receptor II do TGF- β (T β RII), que faz a ativação da quinase e fosforila o receptor do tipo I (T β RI). O TGF- β RI ativado leva a fosforilação das SMAD2 e SMAD3 associados ao receptor, fazendo com que eles formem um complexo oligomérico com a SMAD4. Esses complexos oligoméricos fazem a translocação para o núcleo e regulam a transcrição dos genes-alvo. Adaptado de Chung *et al.* (2021).

Um dos processos estimulados pela ativação da via TGF- β 1 e SMADs é a TEM, a qual induz a diminuição na expressão de E-caderina e um consequente aumento na

expressão de N-caderina, vimentina e também de FSP-1 (Giannonni *et al.*, 2012). A N-caderina faz parte da superfamília de caderinas e é expressa principalmente em tecidos não-epiteliais, estando relacionada com um fenótipo mesenquimal. Em diversos estudos, a expressão aumentada de N-caderina é vista como um marcador de transição epitélio-mesênquima (Loh *et al.*, 2019; Jennbacken *et al.*, 2010). Assim como a N-caderina, a E-caderina é um membro da superfamília de caderinas, sendo uma proteína de adesão encontrada em células epiteliais conhecida por ser uma supressora de tumor. Essa proteína é necessária para a formação de junções aderentes e é um determinante principal do fenótipo epitelial, tendo influência na polaridade da célula e também na integridade do tecido (Sommariva; Gagliano, 2020). A atividade da E-caderina como uma molécula adesiva é regulada de dentro para fora, envolvendo uma regulação alostérica, visto que anticorpos monoclonais ativadores (mAbs) para caderinas aumentam de maneira rápida a adesão celular e geram uma diminuição do movimento celular (Na *et al.*, 2020; Maiden *et al.*, 2016).

Durante a TEM, a N-caderina sofre uma regulação positiva enquanto a E-caderina é regulada negativamente, fazendo com que aumente a característica migratória e invasiva, que torna o indivíduo mais vulnerável a progressão dos cânceres e metástase, por exemplo (Mrozik *et al.*, 2018). Ainda nesse contexto, já foi observado que células tumorais que expressam N-caderina aumentam a proliferação e migração, podendo isso ocorrer através da ativação da via MAPK/ERK (Hulit *et al.*, 2007; Qi *et al.*, 2005). Por outro lado, a N-caderina também é importante em outros processos, como por exemplo para os cardiomiócitos, em que atua nas interações célula-célula no coração em processo de desenvolvimento, e que um problema nessas interações pode levar à hipoplasia das células do miocárdio (Radice, 2013; Luo *et al.*, 2006).

A perda na expressão da E-caderina durante o processo de TEM colabora com a promoção de metástase e a invasão das células cancerígenas em outros tecidos (Valastyan; Weinberg, 2011). Com a diminuição da expressão da E-caderina, ocorre uma perda das junções celulares, sendo a regulação dinâmica da E-caderina importante para a migração celular e desenvolvimento celular normal (Shamir *et al.*, 2014). É essa regulação negativa da E-caderina que é uma das responsáveis pelas células epiteliais perderem suas características e passarem a exibir um fenótipo mesenquimal (Peinado *et al.*, 2007).

Um outro fator que é estimulado pelo TGF- β durante a TEM é a vimentina. A vimentina é uma das proteínas mais expressas e conservadas da família de proteínas com filamentos individuais esparsos de tamanho intermediário (IF), começando a sua expressão ainda no estágio de linha primitiva do desenvolvimento embrionário murino (Franke *et al.*, 1982). Já nos animais adultos, a expressão da vimentina é presente apenas em células mesenquimais do tecido conjuntivo, no músculo e no sistema nervoso central (SNC) (Satelli; Li, 2011; Larsson *et al.*, 2004). Porém, a vimentina passou a ganhar mais importância em estudos que demonstraram a sua participação como um marcador canônico de TEM, onde é possível observar a expressão dos filamentos de vimentina (Thiery, 2002).

O TGF- β 1 está envolvido no complexo proteico que é promotor da vimentina, sendo importante para regular a expressão dessa proteína em células musculares e sua participação na TEM (Wu *et al.*, 2007). Além do TGF- β 1, o promotor de vimentina também interage com o fator de transcrição NF- κ B, o qual pode induzir a superexpressão de vimentina durante a transição de epitélio para mesênquima (Min *et al.*, 2008). A vimentina é vista como um marcador mesenquimal, sendo seu aumento relatado em tecidos tumorais e diversas linhagens celulares (Satelli, Li, 2011). Em um estudo com camundongos *knockout* para vimentina, foi observado um prejuízo na cicatrização de feridas devido a um enfraquecimento dos fibroblastos, que perderam a capacidade de migração (Eckes *et al.*, 2000). No contexto imunológico, linfócitos com deficiência em vimentina tiveram uma capacidade diminuída de migração para os linfonodos e para o baço (Nieminen *et al.*, 2006).

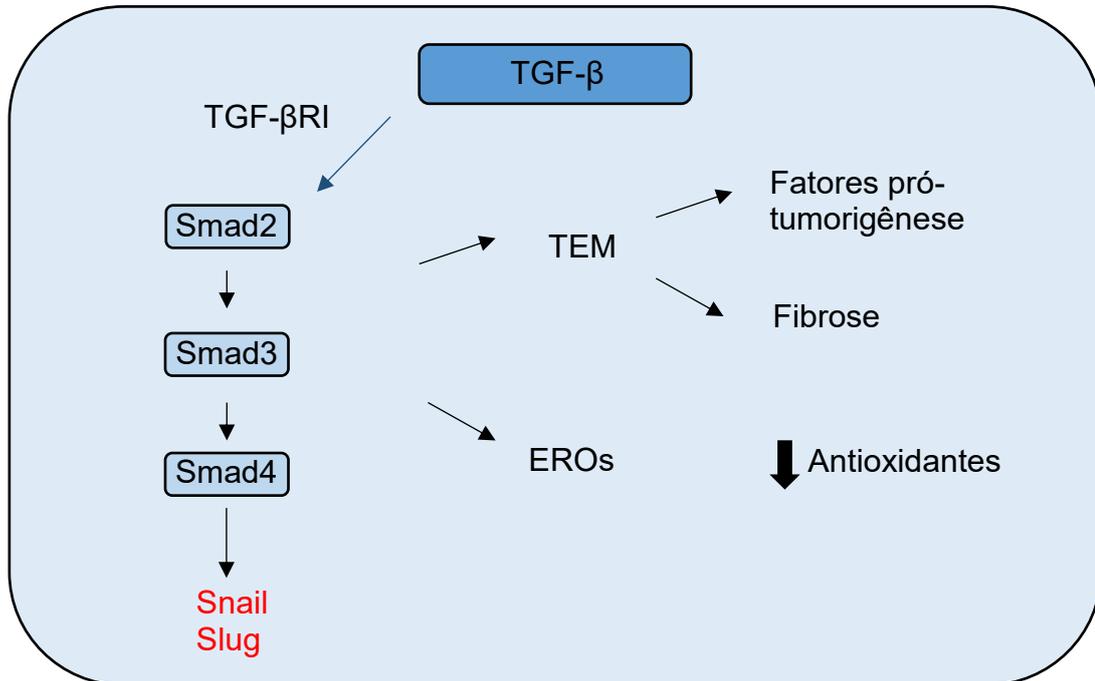
Ainda em um contexto imunológico, TGF- β é capaz de regular a geração e a função de diferentes tipos de células, como as células Natural Killer (NK), células dendríticas, macrófagos e neutrófilos, assim como as células do timo (Batlle; Massagué, 2019; Flavell *et al.*, 2010). Outro tipo celular que é afetado pelo TGF- β são as células T CD4⁺ e CD8⁺. Já foi observado em modelos tumorais que o bloqueio do TGF- β previne a recorrência do tumor, levando ao aumento na atividade citotóxica dos linfócitos T CD8⁺ (Terabe *et al.*, 2000; Nam *et al.*, 2008). Também já foi visto que o TGF- β pode promover a apoptose das células CD8⁺ regulando negativamente a expressão do Linfoma de células B2 (BCL-2) (Sanjabi *et al.*, 2009). Além disso, níveis elevados de células T reguladoras isoladas do baço de camundongos foram encontrados em pacientes com câncer de pâncreas e relacionados ao TGF- β , com

uma conversão das células T virgens em células Treg (Curiel *et al.*, 2004; Moo-Young *et al.*, 2009).

O fator inibitório de leucemia (LIF) é uma citocina pleiotrópica da família da IL-6, responsável por exercer diversas funções, como o estímulo da proliferação de mioblastos, manutenção de células-tronco da medula óssea e também a indução de células precursoras de macrófagos (Matsuoka *et al.*, 1997; Patterson, 1994). O LIF apresenta grande importância para o sistema nervoso, onde já foi visto que ele afeta o fenótipo transmissor, a diferenciação e a sobrevivência de neurônios (Cheema *et al.*, 1994; Kotzbauer *et al.*, 1994). No estudo de Matsuoka e colaboradores (1997), utilizando células de Schwann, foi observado que o TGF- β 1 teve influência nos níveis de mRNA de LIF encontrado nessas células, aumentando a sua expressão em cerca de 3 a 6 vezes. Sabendo-se da relação entre transição epitélio-mesênquima e câncer, a expressão de LIF e seu receptor LIFR, tem sido ligada a uma diversidade de cânceres humanos, estando relacionado a promoção do crescimento do tumor e metástases (Christianson *et al.*, 2021).

O TGF- β também pode estar relacionado ao estresse oxidativo, as espécies reativas de oxigênio são capazes de iniciar os efeitos do TGF- β na tumorigênese, controlando a transdução do sinal do TGF- β a jusante, incluindo a via SMAD e o NF- κ B (Chung *et al.*, 2021; Liu; Pravia, 2010). O TGF- β é capaz de aumentar o nível de EROs ao mesmo tempo que diminui a atividade de antioxidantes; de maneira oposta, níveis elevados de EROs também podem acarretar em um aumento na expressão e liberação do TGF- β (Ishikawa *et al.*, 2014; Annes *et al.*, 2003). Evidências mostram que a sinalização de SMAD2 é influenciada pelas espécies reativas de oxigênio, tendo em vista que a N-acetilcisteína e glutatona reduzida com L-cisteína podem prevenir a fosforilação da SMAD2, que é estimulada por TGF- β (Li *et al.*, 2004). As espécies reativas de oxigênio também podem aumentar a expressão e a secreção do TGF- β , facilitando as vias canônicas e não canônicas, ao ativar o TGF- β em sua forma latente (Chung *et al.*, 2021). Além disso, o TGF- β pode causar senescência nos primeiros estágios da tumorigênese, por um mecanismo que está relacionado com a produção das espécies reativas de oxigênio (Roberts; Wakefield, 2003). Essa relação EROs-TGF- β pode facilitar a progressão do câncer, com as espécies reativas alterando a função do TGF- β para pró-tumorigênese (Nogueira; Hay, 2013).

Figura 7: Efeitos do TGF- β



A figura mostra os diferentes efeitos do TGF- β sobre o organismo. A ação do TGF- β está relacionada a via de sinalização de SMAD, a partir da fosforilação de SMAD 2 ou 3, que formam complexos com a SMAD 4 e induzem a expressão de SNAIL e SLUG com o auxílio do TGF- β RI. Através dessa via, o TGF- β induz o processo de transição epitélio-mesênquima, que ocorre nos cânceres e também no processo de fibrose. Além disso, o TGF- β também estimula a produção de espécies reativas de oxigênio, a partir da diminuição na produção de enzimas antioxidantes. Adaptado de Yang *et al.* (2023).

3.2.1 O TGF-beta na fisiologia tímica

O primeiro estudo que trouxe o potencial papel do TGF- β no timo foi realizado por Schimid e colaboradores em 1991, que demonstrou a expressão de TGF- β 1 em células do microambiente tímico embrionário, tendo importância direta no desenvolvimento do órgão. Com o passar dos anos novos trabalhos foram realizados e foram capazes de demonstrar um aumento nos níveis de mRNA de TGF- β 1 no timo em processo de envelhecimento, trazendo uma nova perspectiva relacionada ao processo de involução e a relação com o TGF- β (Bernasconi *et al.*, 2003).

Na timopoiese, o TGF- β é responsável por regular a progressão, desenvolvimento e diferenciação do ciclo celular, sendo esta via regulada positivamente no timo fetal (Ucar *et al.*, 2016). A sinalização por membros da família TGF- β parece ter um papel secundário na regulação do desenvolvimento e função do timo (Jurberg *et al.*, 2015). Acredita-se ainda que o TGF- β atue através de grandes distâncias, sendo produzido por outros órgãos e conseguindo alcançar o timo pelo

sistema circulatório (Loffredo *et al.*, 2013). O TGF- β também é expresso na medula e a sua expressão está relacionada a seleção negativa de timócitos e diferenciação de células T (Moreau *et al.*, 2022).

Já foi observado que o TGF- β é regulado positivamente com o aumento da idade em células do estroma tímico humano e de camundongos, estimulando o processo de atrofia do timo (Yang *et al.*, 2023; Tan *et al.*, 2016). Além disso, em TEC, o silenciamento do receptor para TGF- β tipo II estimula um aumento no compartimento de mTEC e inibe a progressão da senescência (Hauri-Hohl *et al.*, 2014). Em contrapartida, a expressão desse receptor em mTEC acarreta uma redução no peso e na celularidade do órgão, levando a um processo de atrofia precoce (Bravo-Nuevo *et al.*, 2011). Em um contexto do timo adulto, o TGF- β pode diminuir o tamanho do compartimento das células epiteliais tímicas medulares (Wang *et al.*, 2020). Além disso, já foi observado que o estímulo com o TGF- β 1 em células epiteliais tímicas diminuiu os níveis de expressão da E-caderina, através da sua regulação negativa, sugerindo a participação de TEM induzida por TGF- β 1 no processo de involução tímica (Chen *et al.*, 2021).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultivo celular e tratamento *in vitro*

Para este trabalho, foram utilizadas células epiteliais tímicas humanas (TECs) da linhagem de TEC humana pós-natal THPN (Fernández *et al.*, 1994), doadas pelo Laboratório de Pesquisas sobre o Timo (IOC/FIOCRUZ-RJ). A linhagem THPN é considerada uma linhagem mista, onde é possível observar tanto células epiteliais corticais (cTECs) quanto células epiteliais medulares (mTECs), ela foi obtida a partir do timo de crianças submetidas a cirurgia cardíaca por explante tímico, passando posteriormente por clonagem por diluição limitante (Fernández *et al.*, 1994).

Para a realização dos diferentes experimentos, as células foram divididas em dois grupos: um grupo controle, que não passou por nenhum estímulo e o grupo TGF- β 1 (Sigma-Aldrich – H8541), em que as células foram estimuladas com o TGF- β 1 na concentração de 5 ng/mL. Para o plaqueamento, as células foram semeadas nas diferentes placas dependendo da metodologia necessária em meio RPMI contendo 10% de soro bovino fetal (SBF) e mantidas por 24 horas em estufa. Após as 24 horas, o meio foi retirado e foi adicionado novo meio RPMI contendo 2% de SBF no grupo controle e no grupo estimulado foi adicionado o meio RPMI contendo 2% de SBF, acrescido do TGF- β 1 a 5 ng/mL.

4.2 Análise morfológica

Para a realização da análise morfológica, as células foram semeadas em placas de 12 poços para formação de uma monocamada na proporção de 1×10^5 por poço, mantidas por 24 horas em estufa e estimuladas com o TGF- β 1 na concentração de 5 ng/mL por mais 24 horas. Após este tempo foram realizadas fotomicrografias em campo aberto em microscópio invertido de contraste de fase para avaliação qualitativa das modificações morfológicas no aumento de 200x. Além disso, em outra placa de 12 poços, as células foram fixadas e coradas com o corante cristal violeta na concentração de 2 mg/mL em etanol 2% durante 50 segundos e novas fotomicrografias foram realizadas em microscópio no aumento de 200x tanto para o grupo estimulado com TGF- β 1 quanto para o grupo controle. Para cada grupo foram tiradas 10 fotomicrografias tanto em campo aberto quanto após a coloração com o cristal violeta. Para a realização das análises foram considerados como parâmetro o tamanho da célula e o seu formato, assim como o contato célula-a-célula.

4.3 Marcação do citoesqueleto de actina

Para uma análise morfológica mais completa, foi realizada a marcação do citoesqueleto de F-actina com faloidina conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC; Sigma-Aldrich – P5282) e posterior observação através microscópio de fluorescência. As células foram semeadas em placas de 24 poços contendo lamínulas redondas (13mm de diâmetro) na proporção de 5×10^4 por poço, e após 24 horas estimuladas com TGF- β 1, posteriormente sendo mantidas por 24 horas em estufa. Após o tempo de tratamento, as células foram fixadas com paraformaldeído (PFA) a 4% por 10 minutos e as lamínulas foram retiradas da placa, colocadas em lâminas e lavadas com PBS. Então, as células foram permeabilizadas com PBS/Triton x-100 (0,05%) por 10 minutos e bloqueadas com PBS/glicina 3% por 30 minutos e pele de peixe 0,05% pelo mesmo tempo. Após os bloqueios, as células foram incubadas com a faloidina-FITC por 1 hora seguido da contramarcação com 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI) a 1500 μ g/mL por 10 minutos para marcação do núcleo. As células marcadas foram observadas ao microscópio de fluorescência (Modelo Eclipse 50i da Nikon acoplado a câmera Nikon D5-Ri1), no aumento de 200x. Para cada grupo foram tiradas 10 fotomicrografias. Para a realização das análises foram considerados como parâmetro o tamanho, a morfologia da célula e a intensidade de fluorescência da marcação com faloidina.

4.4 Ensaios de imunofluorescência

Os ensaios de imunofluorescência foram realizados após as células serem semeadas em placas de 24 poços contendo lamínulas redondas na proporção de 5×10^4 por poço, estimuladas 24 horas depois com TGF- β 1 e mantidas durante 24 horas em estufa. Após esse tempo, as células foram fixadas com PFA 4% por 10 minutos e lavadas com PBS. Após a fixação, as lamínulas foram retiradas da placa, colocadas nas lâminas e foi seguido o protocolo para cada marcação específica conforme detalhado abaixo:

4.4.1 Laminina

Para avaliação da produção de laminina (LAMA1 – subunidade α 1 de laminina), sítios inespecíficos foram bloqueados utilizando PBS/glicina 3% por 30 minutos e posteriormente pele de peixe 0,05% pelo mesmo tempo. Após os bloqueios, foi adicionado o anticorpo primário anti-laminina (Sigma-Aldrich – L9393) na proporção

de 1:100 diluído em pele de peixe 0,05% e mantido durante 1 hora. Após esse tempo, o anticorpo primário foi removido, foi feita lavagem com PBS e as células foram incubadas com o anticorpo secundário FITC (FITC-Goat Anti- Rabbit; Invitrogen - 656111) na proporção de 1:100 em pele de peixe 0,05% por 45 minutos. Foi realizada então a marcação com DAPI (1:1000) por 10 minutos para observação no microscópio de fluorescência, no aumento de 200x. Para cada grupo foram tiradas 10 fotomicrografias de campos semelhantes. Para a realização das análises foi considerado como parâmetro a intensidade de fluorescência nas células considerando cada célula.

4.4.2 Vimentina

Para a marcação com vimentina, foi adicionada a solução de Triton x-100 (0,05%) por 10 minutos sobre as lamínulas para permeabilização seguida do bloqueio de sítios inespecíficos utilizando PBS/glicina 3% por 30 minutos e posteriormente pele de peixe 0,05% pelo mesmo tempo. Após os bloqueios, foi adicionado o anticorpo primário anti-vimentina (Abcam – ab16700) na concentração de 1:100 diluído em pele de peixe 0,05% overnight à 4°C. No outro dia, o anticorpo primário foi removido, foi feita lavagem com PBS e as células foram incubadas com o anticorpo secundário FITC na concentração de 1:100 em pele de peixe 0,05% por 45 minutos. Após esse tempo, foi feita a marcação com DAPI (1:1000) por 10 minutos para observação no microscópio de fluorescência, no aumento de 200x e 400x. Para cada grupo foram tiradas 10 fotomicrografias de campos semelhantes. Para a realização das análises foi considerado como parâmetro a intensidade de fluorescência nas células considerando cada célula.

4.4.3 *p*-SMAD3

Para a marcação de *p*-SMAD3, as células foram permeabilizadas com Triton X-100 (0,05%) por 10 minutos seguido do bloqueio de sítios inespecíficos utilizando PBS/glicina 3% por 30 minutos e posteriormente com albumina sérica bovina (BSA) 5% também por 30 minutos. Após os bloqueios, foi adicionado o anticorpo primário anti-SMAD3 fosforilada (Boster Biological Technology – P00059-1) na concentração de 1:50 em PBS/BSA 5% overnight à 4°C. No outro dia, o anticorpo primário foi removido, foi feita lavagem com PBS e as células foram incubadas com o anticorpo secundário FITC na concentração de 1:100 em PBS/BSA 5% por 45 minutos. Após

esse tempo, foi feita a marcação com DAPI (1:1000) por 10 minutos para observação no microscópio de fluorescência, no aumento de 1000x. Para cada grupo foram tiradas 10 fotomicrografias de campos semelhantes. Para a realização das análises foi considerado como parâmetro a intensidade de fluorescência nas células considerando cada célula.

4.5 Análise de expressão gênica por PCR quantitativo (PCRq)

Para a realização da reação de PCRq, inicialmente as células foram semeadas em placas de 12 poços para formação de uma monocamada na proporção de 2×10^5 por poço, mantidas por 24 horas em estufa e estimuladas com o TGF- β 1 na concentração de 5 ng/mL por mais 24 horas. Após esse tempo, a placa foi congelada no freezer -80°C. Posteriormente, foi realizada a extração do RNA total utilizando kit Relia Prep RNA Cell Miniprep System (Promega – Z6011) seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram quantificadas no espectrofotômetro Nanodrop One (Thermo Scientific), considerando as razões de pureza 260/280 e 230/280. O RNA foi então transcrito reversamente para obtenção do DNA complementar (cDNA) utilizando o kit GoScript Reverse Transcription Mix, Oligo(dt) (Promega – A2791), sendo as reações realizadas no Termociclador SimpliAmp (Applied Biosystems).

Para a análise da expressão gênica por PCRq, 2 μ L de cDNA (1:10) diluídos de cada amostra foram adicionados a 8 μ L de Power SYBR Green qPCR Master Mix contendo 0,2 μ M de cada par dos oligonucleotídeos iniciadores para os genes *N-CAD*, *E-CAD*, *LIF*, *LIFR*, *CAT* e *SOD2* e para o gene endógeno da β -actina, *ACTB* (Tabela 1). O *ACTB* foi escolhido como gene endógeno a ser utilizado, já que o Ct na amplificação deste gene se manteve constante nos dois grupos de tratamento (Fig. Supl.1). Os experimentos foram realizados em triplicata, para cada grupo de tratamento (controle e TGF- β 1), contendo 3 réplicas técnicas para cada replicata. As reações foram realizadas no equipamento QuantiStudio 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). A análise da expressão relativa dos genes foi realizada com o algoritmo PCR miner (<http://miner.ewindup.cn/miner/>). (Zhao e Fernald, 2005). Este algoritmo utiliza dados brutos de fluorescência (obtidos após as reações) em modelos logísticos e regressão linear para o cálculo da média de eficiência das reações e da média de Ct para cada gene-alvo. Estes valores são utilizados na fórmula abaixo para obtenção da expressão relativa.

$$\text{Expressão relativa} = 1/(1 + E)^{CT}$$

Onde, E = média de eficiência dos genes e CT = média de CT das replicatas técnicas de cada grupo de tratamento.

Tabela 1: Sequências *forward* e *reverse* para cada gene-alvo

Gene-alvo	Sequência <i>Forward</i> (F')	Sequência <i>Reverse</i> (R')
<i>N-CAD</i>	GGTGGAGGAGAAGAAGACCAG	GGCATCAGGCTCCACAGTG
<i>E-CAD</i>	TGCCCAGAAAATGAAAAAGG	GTGTATGTGGCAATGCGTTC
<i>LIF</i>	TGAACCAGATCAGGAGCCA	CCACATAGCTTGTCCAGGTTGTT
<i>LIFR</i>	GTGGCAGTGGCTGTCATTGTTGGAGTGGT	TCATCTGCGGCTGGGTTTGGTATTTCTTC
<i>CAT</i>	TCTGGACAAGTACAATGCCA	GGTTACACGGATGAACGCT
<i>SOD2</i>	GGGGCTTGGTTTCAATAA	AGGTAGTAAGCGTGCTCCCA
<i>ACTB</i>	AGATGTGGATCAGCAAGCAG	GCGCAAGTTAGGTTTTGTCA

4.6 Análises estatísticas

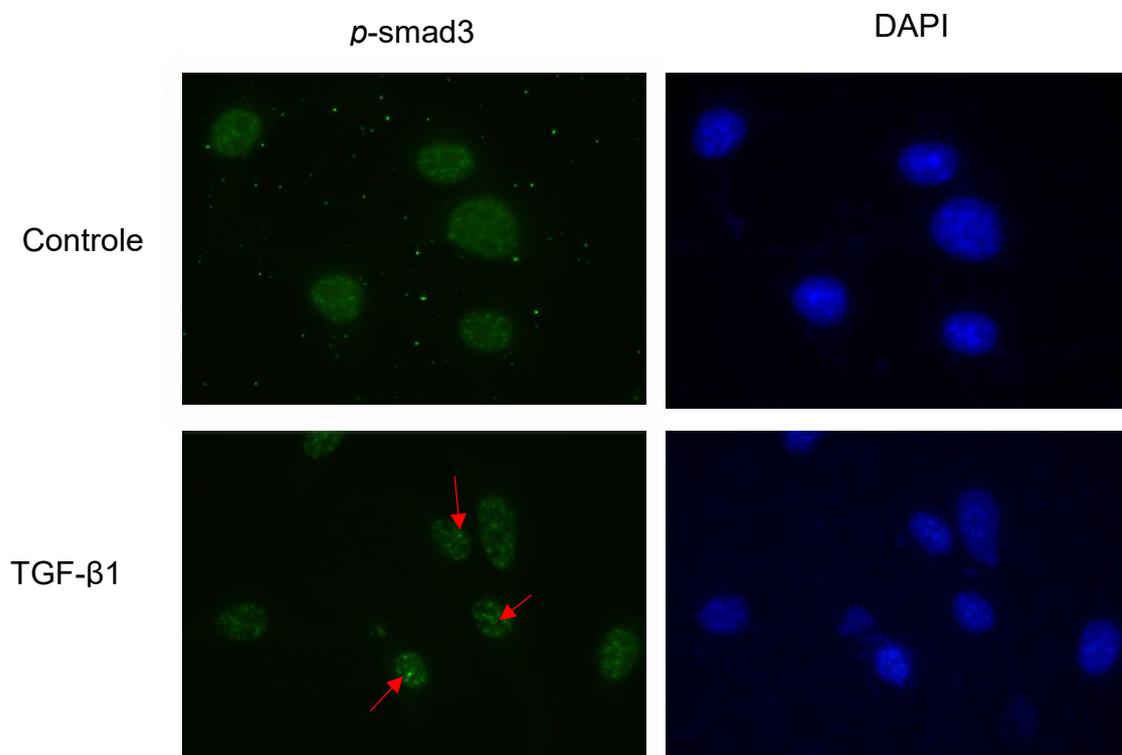
Para as análises estatísticas dos dados obtidos e confecção dos gráficos foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 5.00 (GraphPad Prism Software, Inc.). Os resultados foram representados como média e erro-padrão da média (EPM), e avaliados estatisticamente através do teste t de student não-paramétrico,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

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ativação da via canônica do TGF- β em linhagem de TEC humana

Foi realizada imunofluorescência para a SMAD3 fosforilada (p -SMAD3) para verificar a preservação desta via na linhagem humana THPN. Pode-se observar que após o tratamento com o TGF- β 1, a expressão da proteína é aumentada quando comparado ao grupo sem estímulo, mesmo que a p -SMAD já esteja sendo expressa em sua forma basal no grupo controle. Isto é mostrado pela presença de regiões focais com aumento da intensidade de fluorescência (Figura 8).

Figura 8: Expressão de p -SMAD3 nas TECs após estímulo com TGF- β 1



Fotomicrografias representativas revelando a disposição das células expressando p -SMAD3 (verde) quando estimuladas com TGF- β 1 por 24 horas. DAPI em azul marca o núcleo das células. As setas apontam para as células em que é possível observar as regiões focais com aumento de fluorescência quando estimuladas com o TGF- β 1. Fotomicrografias realizadas por imersão (Aumento de 1000x).

A proteína SMAD3 é amplamente conhecida por estar relacionada a via do TGF- β 1. Para que ocorra a sinalização do TGF- β , um dímero do TGF- β se liga ao receptor do TGF- β do tipo I (T β RI) e ao T β RII, então quando ativado e fosforilado pelo dímero do TGF- β , o T β RI fosforila os mediadores SMAD2 e 3 que se ligam à

SMAD4 e se movem para o núcleo, onde atuam na regulação da expressão gênica (Chung *et al.*, 2021).

Sabe-se que durante o processo de TEM, o TGF- β 1 é capaz de transduzir sinais intracelulares através da fosforilação de SMADs (Cai *et al.*, 2019). No estudo de Chen e colaboradores de 2021, o TGF- β 1 induziu um aumento na expressão de *p*-SMAD do tipo 2, que levou a um aumento na expressão de FOXC2 em células epiteliais tímicas de camundongos. No contexto da fibrose hepática, camundongos knockout para SMAD3 apresentaram uma diminuição na resposta das células T ao TGF- β , já que a SMAD3 se liga diretamente ao DNA da célula e regula os genes alvo, demonstrando que o TGF- β age através da via Smad (Xu *et al.*, 2016).

Em um contexto imunológico, já foi visto que a deleção de SMAD3 acarreta um prejuízo na imunidade da mucosa de camundongos, diminuindo a vida útil desses animais (Yang *et al.*, 1999). No estudo utilizando células epiteliais tubulares renais primárias, foi demonstrada uma redução nos níveis de E-caderina e α -SMA quando as células foram induzidas com o TGF- β 1, porém nas células que eram nulas para SMAD3, essas mesmas alterações não foram observadas (Sato *et al.*, 2003). Ainda no estudo de Sato e colaboradores, foi investigado se os níveis de TGF- β 1 resultavam de efeitos autócrinos, para isso foi medida a expressão de mRNA do TGF- β 1 na presença ou ausência de TGF- β 1 exógeno, e foi observado aumento na expressão do mRNA para TGF- β 1 nas células estimuladas, porém não nas células nulas para SMAD3, sugerindo que a sinalização SMAD é importante para a produção autócrina de TGF- β 1.

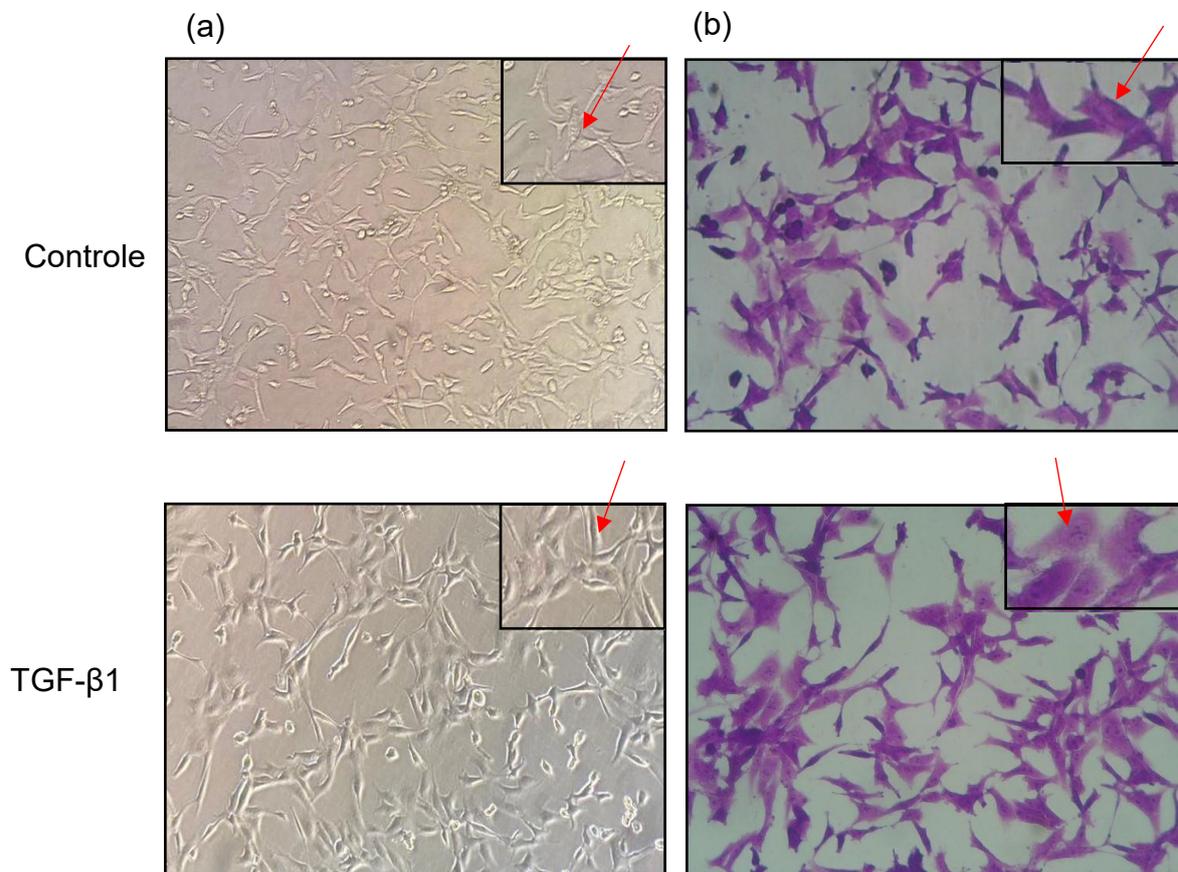
Dessa forma, esses trabalhos corroboram com os nossos resultados, que demonstram que a via do TGF- β 1 continua preservada em cultivo de TEC humana *in vitro*, podendo ser utilizada para estudar os fenômenos relacionados ao envelhecimento do timo.

5.2 Efeito do TGF- β 1 sobre a morfologia das células epiteliais tímicas humanas

Na figura 9a, é possível observar que o estímulo com TGF- β 1 foi capaz induzir mudança morfológica nas células, as quais apresentam um aspecto mais alongado. Pode-se ver que no grupo estimulado, as células estão maiores e mais espriadas

quando comparado ao grupo controle. Após a observação das células em campo aberto, foi utilizado o corante cristal violeta para melhor observação das TECs. Assim como em campo aberto, é possível observar que o tratamento com o TGF- β 1 induziu uma mudança na morfologia das células, em que estas se mostraram mais alongadas e com prolongamentos maiores quando comparado às células do grupo controle, além de apresentarem um aumento do tamanho nuclear (Figura 9b). A figura 9 exibe as fotomicrografias, no aumento de 200x, das células em cultivo após tratamento por 24 horas.

Figura 9: Alterações morfológicas nas TECs estimuladas com TGF- β 1



Fotomicrografias representativas de células THPN após estímulo com TGF- β 1 por 24 horas. Após estímulo com TGF- β 1, foram tiradas fotos em campo aberto e um outro grupo de células foi corado com cristal violeta e posteriormente visualizadas em microscópio de luz. As setas apontam para as células em que é possível observar o aumento no tamanho celular, assim como dos prolongamentos celulares quando estimuladas com o TGF- β 1. (a) Fotomicrografias em campo aberto; (b) Fotomicrografias após coloração com cristal violeta. Aumento de 200x.

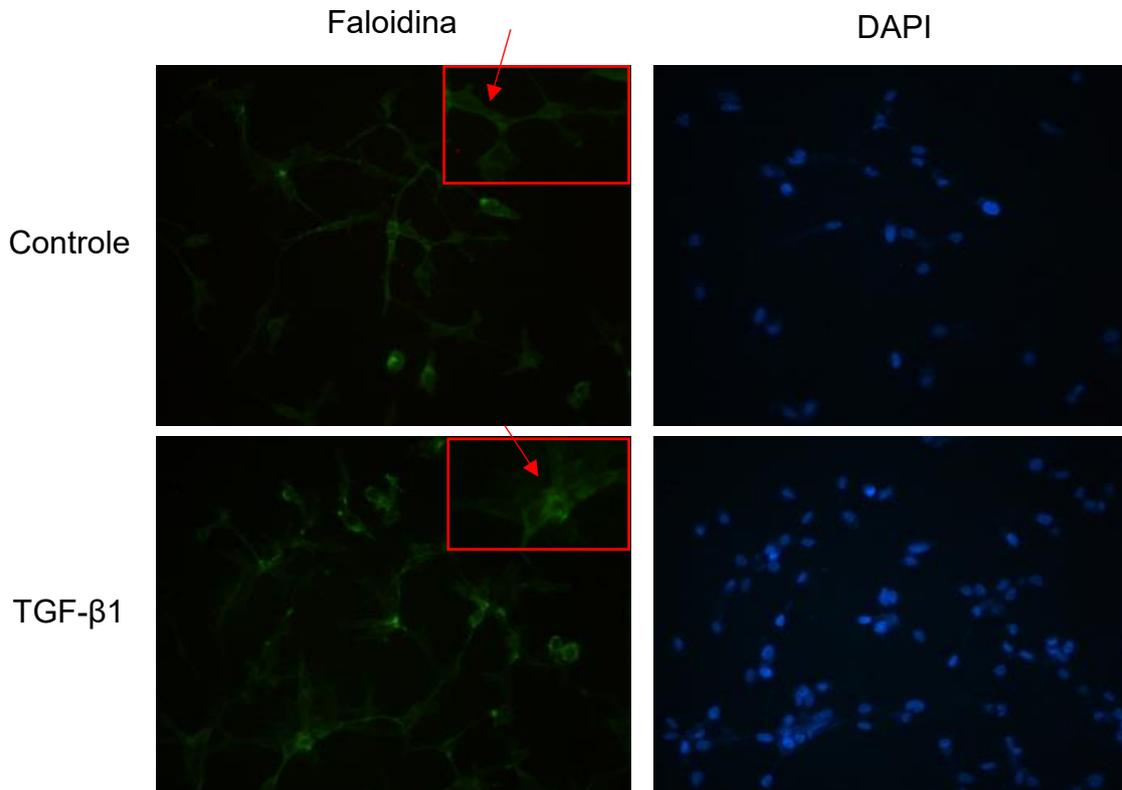
Estudos mostraram que o TGF- β é regulado positivamente no timo envelhecido e que o fator pode participar da involução induzindo o processo de TEM nas TECs (Hauri-Hohl *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2016). Já foi demonstrado que o TGF- β 1 é capaz de desempenhar papel na atrofia do timo de maneira direta ou indireta, regulando positivamente as citocinas timossupressoras como o IL-6 e LIF (Schluns *et al.*, 1997). Os níveis de mRNA do TGF- β estão aumentados no timo em envelhecimento, o que causa alterações morfológicas e fisiológicas nas células estromais (Sempowski *et al.*, 2000).

Em um trabalho *in vitro* realizado com células epiteliais tubulares renais primárias, o estímulo com TGF- β 1 provocou uma alteração do fenótipo cuboide comum de células epiteliais para uma aparência fibroblástica fusiforme, característica de células mesenquimais (Sato *et al.*, 2003). Alguns estudos trazem que as células mesenquimais semelhantes a fibroblastos que são geradas durante o processo de TEM, expressam PPAR γ e por isso possuem a capacidade de se transdiferenciar em adipócitos, processo esse relacionado com o envelhecimento (Tan *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2009). Porém, a sinalização do TGF- β é considerada um inibidor da adipogênese, já que na sinalização TGF- β /SMAD ocorre uma supressão da atividade de transativação das proteínas de ligação ao intensificador CCAAT (C/EBPs), que são ativadores do PPAR γ e conseqüentemente da adipogênese (Choy; Derynck, 2003; Roelen; Dijke, 2003).

5.3 Efeito do TGF- β 1 no conteúdo do citoesqueleto de actina em TEC

A marcação com faloidina permitiu avaliar de maneira qualitativa as alterações promovidas pelo TGF- β 1 no citoesqueleto de actina das TEC THPN. Conforme apresentado na Figura 10, as células expostas ao TGF- β 1 exibiram uma forte marcação de actina distribuída ao longo da célula e ao redor do núcleo, enquanto as células controles apresentam uma marcação fraca, o que pode indicar alteração na distribuição da actina de forma filamentar (F-actina). Esse resultado, em conjunto com a análise morfológica, demonstra que o TGF- β 1 é capaz de promover alteração na morfologia em TEC, tornando-as mais próximas ao perfil mesenquimal.

Figura 10: Efeito do TGF- β 1 no citoesqueleto de actina das TECs

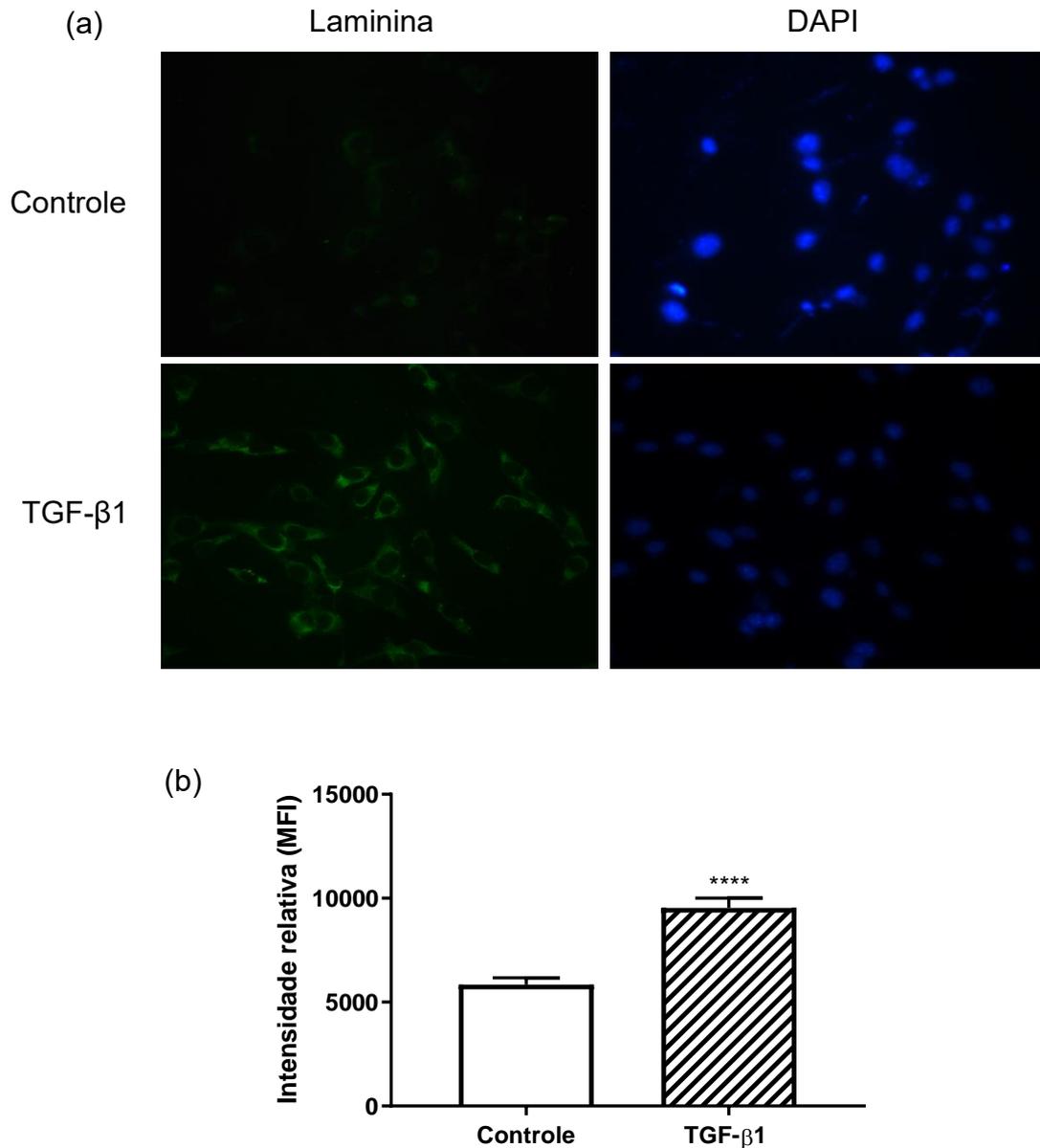


Fotomicrografias representativas revelando a disposição dos filamentos de actina marcados com faloidina-FITC em TECs estimuladas com TGF- β 1 por 24 horas. As setas apontam para as células em que é possível observar um aumento na marcação de actina distribuída ao longo da célula e ao redor do núcleo quando estimuladas com o TGF- β 1. DAPI em azul marca o núcleo das células e faloidina em verde marca o citoesqueleto. Aumento de 200x.

5.4 Efeito do TGF- β 1 sobre a produção de laminina nas TECs humanas

Em nosso trabalho, foi possível observar que o estímulo com TGF- β 1 aumentou a expressão de laminina nas TEC humanas, demonstrado por uma maior intensidade de fluorescência quando comparado ao grupo controle, o que pode ser visto tanto nas fotomicrografias quanto no gráfico que demonstra a intensidade de fluorescência (Figura 11a e b). O aumento na intensidade de fluorescência pode estar relacionado ao fato de que durante o processo de TEM induzido pelo TGF- β 1 ocorre um aumento das moléculas de matriz extracelular, já que as células passam a exibir um fenótipo mesenquimal.

Figura 11: Produção de laminina nas TECs após estímulo com TGF- β 1



(a) Fotomicrografias representativas revelando células com depósito de laminina (em verde) após estímulo com TGF- β 1 por 24 horas; (b) Gráfico demonstrando a média da intensidade de fluorescência da produção de laminina das células do grupo controle e estimulado com TGF- β 1, para obtenção do gráfico foram consideradas 10 fotos de cada grupo e a intensidade de fluorescência foi medida por célula. DAPI em azul marca o núcleo das células. Aumento de 200x.

No timo, as lamininas em suas diferentes isoformas são distribuídas de maneira heterogênea nos lóbulos, com a medula contendo uma rede mais densa de laminina quando comparado ao córtex (Savino *et al.*, 2015; Lannes-Vieira *et al.*, 1991). Estudos *in vitro* demonstraram que as TECs também são capazes de produzir laminina (Berrih *et al.*, 1985). Considerando outros aspectos, a adesão de timócitos às TECs é

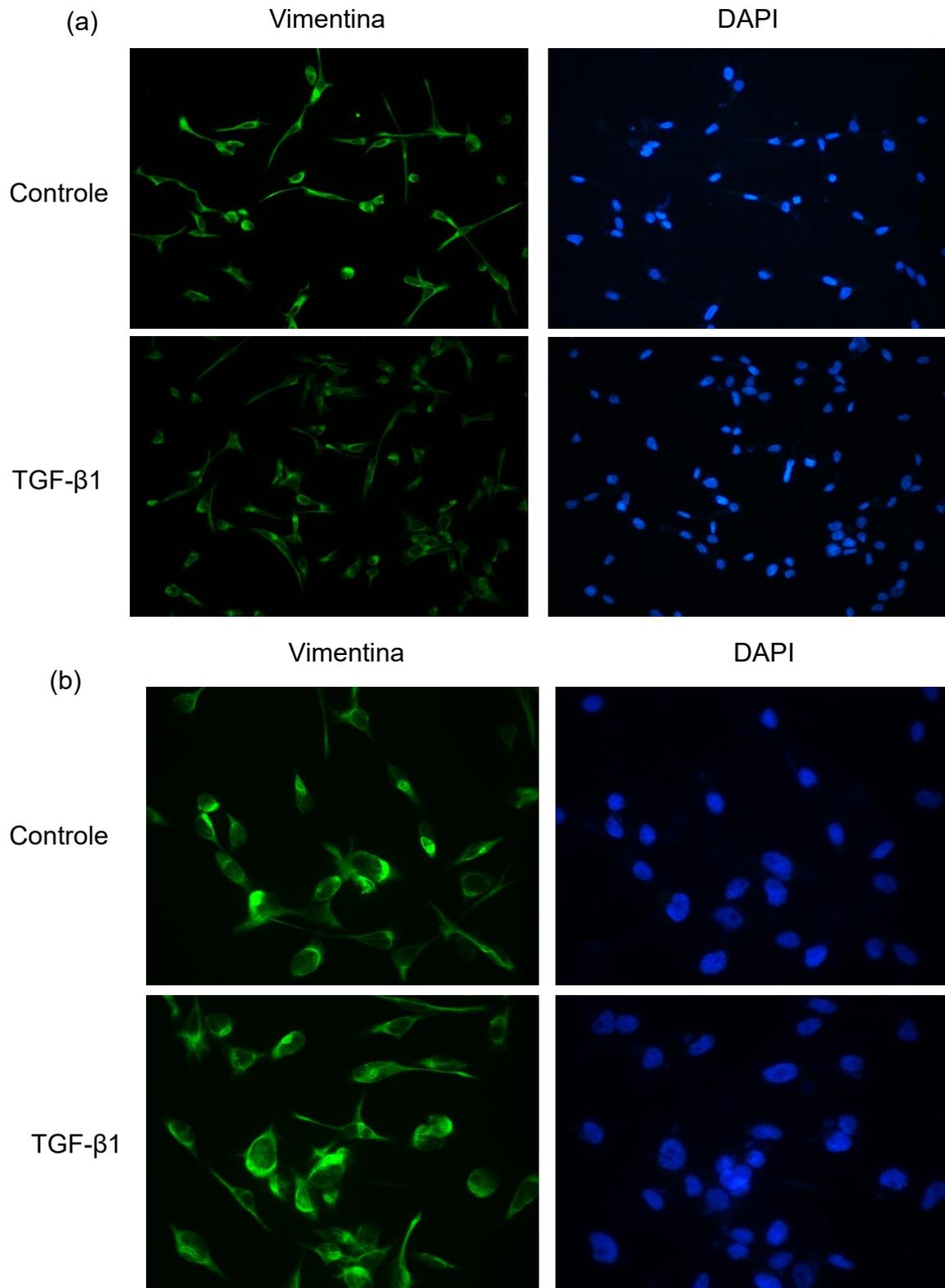
mediada pela interação entre laminina e a integrina VLA-6, sendo possível observar também um aumento na adesão dos timócitos quando as TECs são tratadas com estímulos que aumentam a produção de lamininas (Lannes-Vieira *et al.*, 1993). Além disso, já foi visto que as interações mediadas por laminina são importantes para a entrada dos precursores de células T no timo e para a migração de timócitos ainda em desenvolvimento (Savino *et al.*, 2004; Ocampo *et al.*, 2008).

Sendo a principal glicoproteína não-colágena presente na membrana basal, a laminina e suas isoformas também estão relacionadas com a progressão dos cânceres (Givant-Horwitz *et al.*, 2005). Já foi observado que a laminina aumenta o crescimento tumoral e a proliferação de células cancerígenas, além de aumentar a motilidade das células em alguns tipos de cânceres (Qin *et al.*, 2017). Com relação ao TGF- β , já foi demonstrado que ele aumenta a produção de proteinases presentes na matriz extracelular, o que leva a progressão tumoral (Padua; Massagué, 2009). A laminina em conjunto com o TGF- β foi capaz de induzir o processo de TEM no carcinoma hepatocelular (Giannelli *et al.*, 2005). O trabalho que Liu e colaboradores (2016), também demonstrou que a superexpressão de laminina estava associada a um mau prognóstico em pacientes com câncer de pulmão.

Em um contexto imunológico, os detalhes e vias moleculares relacionadas a laminina ainda são em sua grande parte desconhecidos (Simon; Bromberg, 2017). Assim, o resultado encontrado em nosso trabalho pode abrir possibilidades para demonstrar o papel do aumento da laminina estimulado pelo tratamento com o TGF- β 1 em células epiteliais tímicas humanas, sendo importante entender melhor essa produção de laminina no sistema imunológico.

5.5 Efeito do TGF- β 1 na expressão de vimentina em TEC

Na figura 12 é possível observar que o estímulo com o TGF- β 1 não foi capaz de gerar uma mudança na expressão da vimentina quando comparado ao grupo sem estímulo, onde vemos que a intensidade de fluorescência entre o grupo estimulado e o grupo controle são semelhantes.

Figura 12: Expressão de vimentina nas TECs após estímulo com TGF- β 1

Fotomicrografias representativas revelando a disposição de células expressando vimentina (verde) após tratamento com TGF- β 1 por 24 horas. DAPI em azul marca o núcleo das células. (a) Aumento de 200x; (b) Aumento de 400x.

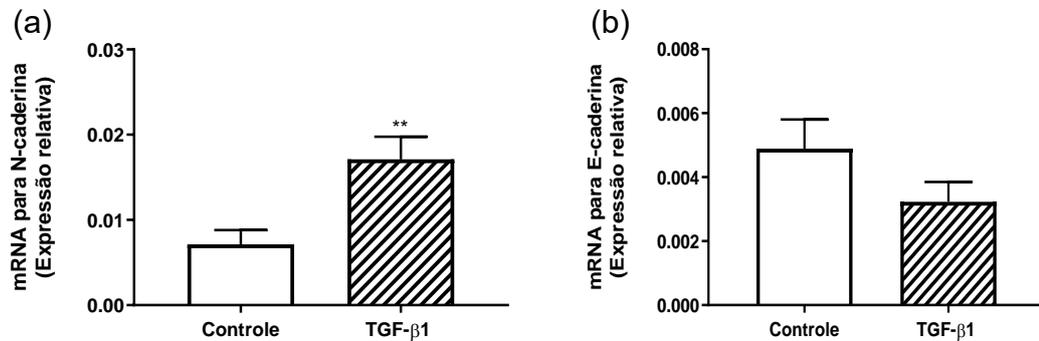
A revisão de Satelli e Li (2011), traz a vimentina como um alvo para a terapia do câncer, processo em que é observado a transição das células de epitélio para mesênquima. Esse trabalho mostra que a vimentina é expressa de maneira diferente nos diversos tipos de células, podendo desempenhar uma função específica em cada tecido. No processo de TEM, a vimentina costuma ser superexpressa e já foi observada a ativação do promotor de vimentina sob o estímulo pelo TGF- β 1 (Wu *et al.*, 2007). Além disso, foi observado um aumento na expressão de vimentina após estímulo com TGF- β 2, promovendo a transição de epitélio para mesênquima em células derivadas de uma paciente com câncer de mama (Qin *et al.*, 2016).

Foi visto que as TEC co-expressam marcadores mesenquimais e epiteliais simultaneamente, com as citoqueratinas (marcadores epiteliais) e a vimentina (marcador mesenquimal) sendo expressos, o que demonstra um possível fenótipo híbrido nessas células em estado normal (Campinoti *et al.*, 2020). Isso pode significar que as TECs já são capazes de expressar vimentina sem o estímulo com o TGF- β 1, o que é consistente com o nosso trabalho, em que não tem diferença entre os grupos. Porém, a literatura não traz de maneira específica um maior entendimento acerca da expressão da vimentina em células epiteliais tímicas, principalmente em humanos, não sendo possível inferir alguma conclusão desse resultado.

5.6 Efeito do TGF- β 1 na expressão dos genes para N- e E- caderina em TEC

Diante dos resultados acima, podemos sugerir que a exposição ao TGF- β 1 induz um perfil mesenquimal nas células epiteliais tímicas humanas THPN. Para avaliar este processo, foram avaliados dois marcadores típicos de TEM, a N-caderina (marcador mesenquimal) e a E-caderina (marcador epitelial). As células TEC submetidas a estimulação com TGF- β 1 exibiram níveis aumentados de expressão do mRNA para N-caderina quando comparados às células não-estimuladas de maneira significativa (Figura 13a). Por outro lado, foi possível observar que as TEC submetidas a estimulação com TGF- β 1 exibiram uma tendência a diminuição na expressão do mRNA para E-caderina quando comparados às células não-estimuladas (Figura 13b).

Figura 13: Expressão relativa dos genes *N-CAD* e *E-CAD* em TECs após estímulo com TGF- β 1



Os gráficos mostram a média \pm erro-padrão da média de expressão relativa dos genes para (a) N-caderina e (b) E-caderina em TEC após estímulo com TGF- β 1 por 24 horas. * $p < 0.05$. Os gráficos são representativos de 2 experimentos independentes.

No trabalho realizado por Chen e colaboradores (2021), foi observado que o estímulo com o TGF- β 1 em um sistema de co-cultura com TECs EPCAM⁺ isoladas e células T CD147⁺ CD4⁺, levou a uma diminuição nos níveis de expressão de E-caderina, através da regulação negativa dessa proteína, resultado esse semelhante ao observado em nosso trabalho.

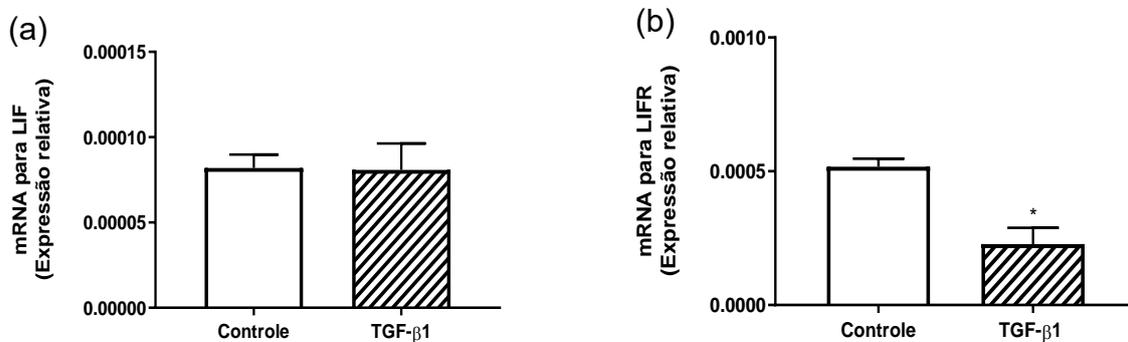
No tecido em situação normal, a N-caderina é geralmente expressa no sistema nervoso, no tecido endotelial e no miocárdio e está relacionado com diversas vias de sinalização intracelular, além de mediar o contato entre as células e a matriz extracelular (Hatta *et al.*, 1987; Hazan *et al.*, 1997; Derycke; Brarcke, 2004). Já nos cânceres, acredita-se que o provável mecanismo pelo qual a N-caderina faz com que as células tumorais se tornem mais móveis é através da adesão homofílica a outras células, primeiro mediando uma adesão dinâmica, que acarreta interações enfraquecidas entre as células adjacentes quando comparado a E-caderina (Jennbacken *et al.*, 2010; Chu *et al.*, 2004).

Esses dois resultados em conjunto sugerem que o TGF- β 1 pode modular o processo de TEM nas células epiteliais típicas humanas, contribuindo para o aparecimento de células mesenquimais com potencial para formar fibroblastos e adipócitos no timo involuído.

5.7 Efeito do TGF- β 1 na expressão dos genes para LIF e LIFR em TEC

Em nossos resultados, não houve diferença na expressão do gene para *LIF* após a indução com o TGF- β 1 quando comparado ao grupo controle (Figura 14a). Porém, em relação a expressão do gene para o receptor de LIF (*LIFR*), o estímulo com o TGF- β 1 gerou uma diminuição de maneira significativa na sua expressão relativa quando comparado ao grupo controle (Figura 14b).

Figura 14: Expressão relativa dos genes *LIF* e *LIFR* em TECs após estímulo com TGF- β 1



É possível observar a média \pm erro-padrão da expressão relativa dos genes para (a) *LIF* e (b) *LIFR* em TEC após estímulo com TGF- β 1 por 24 horas. * $p < 0.05$. LIF = Fator inibidor de leucemia; LIFR = Receptor do fator inibidor de leucemia. Os gráficos são representativos de 2 experimentos independentes.

O fator inibitório de leucemia (LIF) é uma citocina pleiotrópica da família da IL-6, responsável por exercer diversas funções, como o estímulo da proliferação de mioblastos, manutenção de células-tronco da medula e também a indução de células precursoras de macrófagos (Matsuoka *et al.*, 1997; Patterson, 1994). O LIF-R é um heterodímero composto por LIFR β e pela glicoproteína 130 (gp130), enquanto o LIF é uma das citocinas que são capazes de se ligar ao LIFR β , assim como outras citocinas, incluindo ligantes da família de IL-6 (Christianson *et al.*, 2021). Já foi visto em um estudo recente que o indutor de TEM semelhante a interleucina (ILEI) é um dos ligantes para LIFR β , demonstrando que o LIF pode ter alguma relação com esse processo de transição epitélio para mesênquima (Christianson *et al.*, 2021; Woosley *et al.*, 2019). No trabalho de Woosley e colaboradores (2019) foi observado que o estímulo com o TGF- β 1 por 24 horas foi capaz de induzir a sinalização de pSTAT3 em

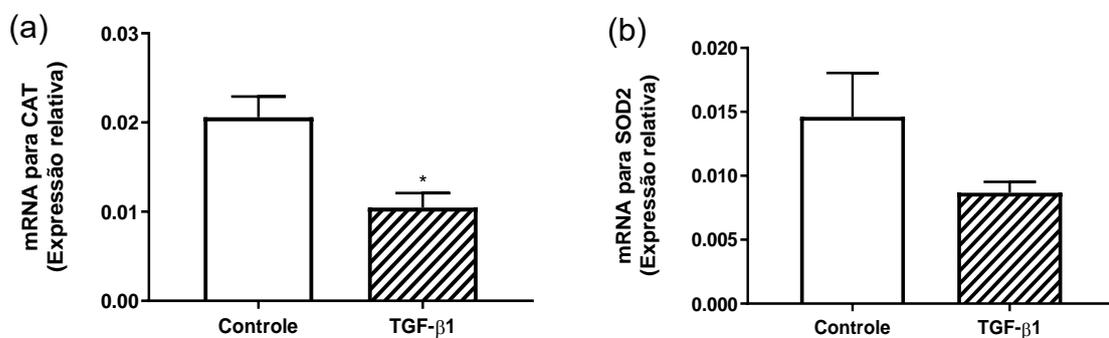
células epiteliais mamárias através da ativação de LIF-R. Porém, em contraste, a expressão do LIFR β também parece estar relacionada à via supressora de tumor Hippo e levar a uma diminuição do crescimento tumoral e metástase, aumentando a capacidade de sobrevivência dos pacientes (Christianson *et al.*, 2021). Assim, o LIFR β parece estar negativamente relacionado com o crescimento do câncer de mama e metástase, enquanto a de LIF está relacionada de maneira positiva (Chen *et al.*, 2012; Kellokumpu-Lethinen *et al.*, 1996).

Esses resultados concordam com o nosso trabalho, já que foi possível observar uma diminuição na expressão de mRNA para *LIFR* quando as células epiteliais tímicas humanas são induzidas com o TGF- β 1. Como os resultados na literatura envolvendo *LIF* e *LIFR* ainda são conflitantes no contexto de células epiteliais tímicas em TEM e na indução com o TGF- β 1 ainda são escassos, é necessária uma maior investigação relacionada a essa citocina nesse contexto.

5.8 Efeito do TGF- β 1 na expressão dos genes para CAT e SOD2 em TEC

Pode-se observar que o estímulo com o TGF- β 1 gerou uma diminuição significativa na expressão relativa do gene para catalase quando comparado ao grupo sem estímulo nas TEC humanas (Figura 15a). Semelhante à expressão do gene *CAT*, o estímulo com o TGF- β 1 demonstrou uma tendência a diminuição na expressão do gene *SOD2* quando comparado ao grupo controle (Figura 15b).

Figura 15: Expressão relativa dos genes *CAT* e *SOD2* em TECs após estímulo com TGF- β 1



Os gráficos mostram média \pm erro-padrão da média da expressão relativa dos genes (a) *CAT* e (b) *SOD2* nas TEC após estímulo com TGF- β 1 por 24 horas. *p < 0.05. CAT = Catalase; SOD2 = Superóxido dismutase 2. Os gráficos são representativos de 2 experimentos independentes.

O estresse oxidativo já foi apontado como um mecanismo-chave para a indução da junção célula a célula das células epiteliais e conseqüentemente do processo de transição epitélio-mesênquima (Inumaru *et al.*, 2009). Já foi relatado que as espécies reativas de oxigênio agem como um mediador ajusante do TGF- β , também participando do processo de TEM (Das *et al.*, 2016). Sabe-se que o TGF- β estimula a produção de EROs em diversos compartimentos celulares, esse controle das espécies reativas e da expressão do TGF- β pode ocorrer através de uma reação nas mitocôndrias de troca de cisteína tiol-dissulfeto (Chung *et al.*, 2021; Ishikawa *et al.*, 2014). O TGF- β também é capaz de diminuir a expressão de genes de enzimas antioxidantes como *CAT*, *GPX*, *SOD* e *GSH*, controlando diretamente a atividade das espécies reativas de oxigênio (Liu; Pravia, 2010). O TGF- β também aumenta a expressão da NADPH oxidase 4 (Nox4), o que contribui para a produção de EROs por um mecanismo que depende da via de SMAD3, levando ao desenvolvimento de TEM no câncer de mama (Yoon *et al.*, 2005).

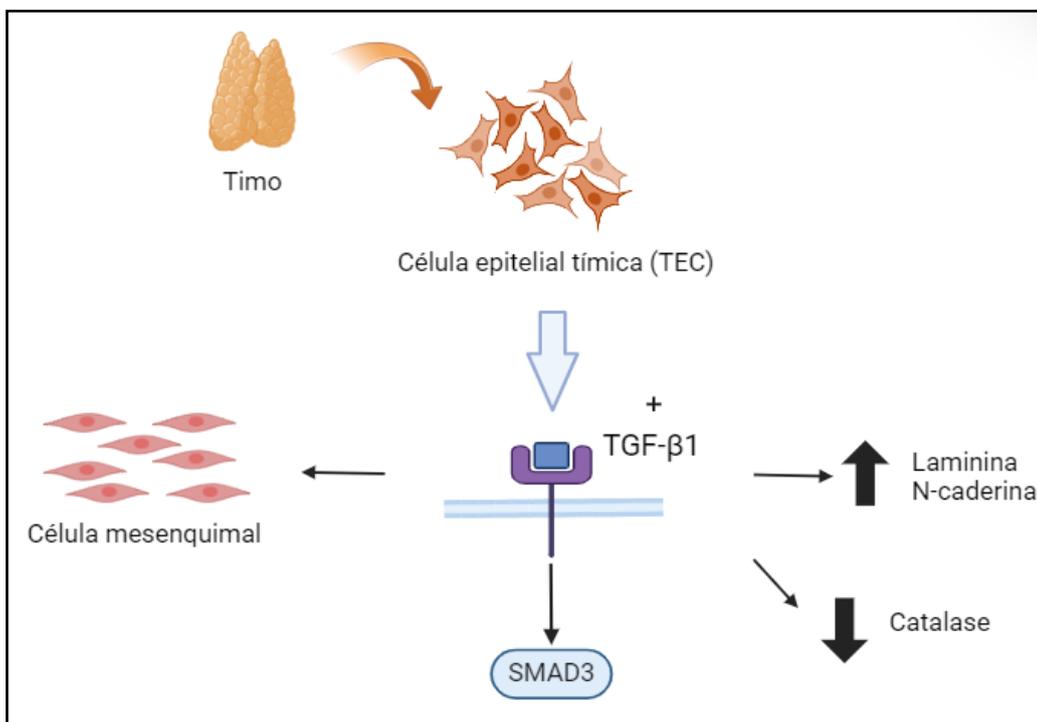
No contexto do estresse oxidativo e involução tímica, as células corticais do estroma tímico são as mais afetadas durante o processo de envelhecimento (Griffith *et al.*, 2012). Sabe-se que as TECs corticais e medulares apresentam níveis elevados de espécies reativas de oxigênio devido à falta de catalase, processo responsável por acelerar a atrofia do timo (Barbouti *et al.*, 2020). Por isso e devido a evidências na literatura acerca da possibilidade de um dano oxidativo ser resultante da deficiência de catalase, resolvemos investigar os níveis dessa enzima quando as TECs são estimuladas com o TGF- β 1. Esses resultados relacionados a expressão de *SOD2* e *CAT* após indução com o TGF- β 1, podem sugerir que o estímulo é capaz de induzir nas células epiteliais tímicas humanas um processo de estresse oxidativo, visto a diminuição na expressão relativa dessas enzimas.

Assim, os nossos resultados sugerem que o TGF- β 1, através da via de ativação de SMAD, é capaz de gerar alterações nas TEC humanas semelhantes ao processo de transição epitélio-mesênquima, com modificação na sua morfologia, além de induzir o estresse oxidativo, observados quando o timo passa pelo processo de involução.

6. CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos, pode-se concluir que as células epiteliais tímicas humanas THPN, quando estimuladas com TGF- β 1 e através da via de SMAD, apresentam modificações celulares e moleculares semelhantes àsquelas encontradas em TEC durante a involução tímica, tais como aumento de matriz extracelular, modificação fenotípica para um perfil mesenquimal e perda da homeostase antioxidante, como demonstrado na Figura 16. Tornando-a um possível instrumento para o estudo das alterações nas TEC durante o envelhecimento.

Figura 16: Resumo dos efeitos do TGF- β 1 em TEC



Resumo das alterações que o TGF- β 1 causa nas células epiteliais tímicas humanas da linhagem THPN através da via de SMAD3, sendo elas: mudança fenotípica para um perfil mesenquimal, aumento de produção de laminina, aumento na expressão gênica relativa de N-caderina e diminuição da expressão gênica relativa de catalase. Figura feita através do Biorender.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMSON, J. & ANDERSON, G. Thymic epithelial cells. **Annual Review of Immunology**. 2017, vol. 35, p. 85-118.
- AKBAR, A. N. *et al.* Senescence of T lymphocytes: Implications for enhancing human immunity. **Trends in Immunology**. 2016, vol. 37, n. 12, p. 866-876.
- ALAWAM, A. S. *et al.* Generation and Regeneration of Thymic Epithelial Cells. **Frontiers in Immunology**. 2020, vol. 11:858.
- ALVES, N. L. *et al.* Characterization of the thymic IL-7 niche in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 2009, vol. 106, n. 5, p. 1512-1507.
- ALVES, N. L. *et al.* Thymic epithelial cells: the multi-tasking framework of the T cell "cradle". **Trends in Immunology**. 2009, vol. 30, n. 10, p. 468-474.
- ANNES, J. P. *et al.* Making sense of latent TGFbeta activation. **Journal of Cell Science**. 2003, vol. 116 (Pt 2), p. 217-224.
- ANDERSON, G. *et al.* Generating intrathymic microenvironments to establish T-cell tolerance. **Nature Reviews, Immunology**. 2007, vol. 7, n. 12, p. 954-963.
- ANDERSON, M. S. *et al.* Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. **Science**. 2002, vol. 298, n. 5597, p. 1395-1401.
- AW, D. & PALMER, D. B. IT's not all equal: a multiphasic theory of thymic involution. **Biogerontology**. 2012, vol. 13, n. 1, p. 77-81.
- BALCIUNAITE, G. *et al.* Wnt glycoproteins regulate the expression of FoxN1, the gene defective in nude mice. **Nature immunology**. 2002, vol. 3, n. 11, p. 1102-1108.
- BARBOUTI, A. *et al.* Implications of oxidative stress and cellular senescence in age-related thymus involution. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. 2020, vol. 2020:7986071.
- BARJA, G. The mitochondrial free radical theory of aging. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**. 2014, vol. 127, p. 1-27.

- BARTKE, A. The response of two types of dwarf mice to growth hormone, thyrotropin, and thyroxine. **General and Comparative Endocrinology**. 1965, vol. 5, n. 4, p. 418-426.
- BATLLE, E. & MASSAGUÉ, J. Transforming growth factor- β signaling in immunity and cancer. **Immunity**. 2019, vol. 50, n. 4, p. 924-940.
- BERRIH, S. *et al.* Extracellular matrix of the human thymus: immunofluorescence studies on frozen sections and cultured epithelial cells. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**. 1985, vol. 33, n. 7, p. 655-664.
- BLANK, U. & KARLSSON, S. The role of Smad signaling in hematopoiesis and translational hematology. **Leukemia**. 2011, vol. 25, n. 9, p. 1379-1388.
- BLEUL, C. C. *et al.* Formation of a functional thymus initiated by a postnatal epithelial progenitor cell. **Nature**. 2006, vol. 441, n. 7096, p. 992-996.
- BOEHM, T. & SWANN, J. Thymus involution and regeneration: two sides of the same coin? **Nature Reviews, Immunology**. 2013, vol. 13, n. 11, p. 831-838.
- BONASIO, R. *et al.* Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus. **Nature Immunology**. 2006, vol. 7, n. 10, p. 1092-1100.
- BRAVO-NUEVO, A. *et al.* RhoB deficiency in thymic medullary epithelium leads to early thymic atrophy. **International Immunology**. 2011, vol. 23, n. 10, p. 593-600.
- BERNASCONI, P. *et al.* Expression of transforming growth factor-beta1 in thymus of myasthenia gravis patients: correlation with pathological abnormalities. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 2003, vol. 998, p. 278-283.
- CAI, J. *et al.* Tumor-associated macrophages derived TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition in colorectal cancer cells through Smad2,3-4/snail signaling pathway. **Cancer Research and Treatment**. 2019, vol. 51, n. 1, p. 252-266.
- CALVO, M. B. *et al.* Biology of BMP signalling and cancer. **Clinical and Translational Oncology**. 2009, vol. 11, n. 3, p. 126-137.
- CAMPINOTI, S. *et al.* Reconstitution of a functional human thymus by postnatal stromal progenitor cells and natural whole-organ scaffolds. **Nature Communications**. 2020, vol. 11, n. 1:6372.

- CEPEDA, S. & GRIFFITH, A. V. Thymic stromal cells: Roles in atrophy and age-associated dysfunction of the thymus. **Experimental Gerontology**. 2018, vol. 105, p. 113-117.
- CHEEMA, S. S. *et al.* Leukemia inhibitory factor prevents the death of axotomised sensory neurons in the dorsal root ganglia of the neonatal rat. **Journal of Neuroscience Research**. 1994, vol. 37, n. 2, p. 213-218.
- CHEN, D. *et al.* LIFR is a breast cancer metastasis suppressor upstream of the Hippo-YAP pathway and a prognostic marker. **Nature Medicine**. 2012, vol. 18, n. 10, p. 1511-1507.
- CHEN, L. *et al.* Foxn1 is required to maintain the postnatal thymic microenvironment in a dosage-sensitive manner. **Blood**. 2009, vol. 113, n. 3, p. 567-574.
- CHEN, R. *et al.* CD147 deficiency in T cells prevents thymic involution by inhibiting the EMT process in TECs in the presence of TGF β . **Cellular & Molecular Immunology**. 2021, vol. 18, n. 1, p. 171-181.
- CHIN, I. K. *et al.* Changes in primary lymphoid organs with aging. **Seminars in Immunology**. 2012, vol. 24, n. 5, p. 309-320.
- CHOY, L. & DERYNCK, R. Transforming growth factor-beta inhibits adipocyte differentiation by Smad3 interacting with CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) and repressing C/EBP transactivation function. **The Journal of Biological Chemistry**. 2003, vol. 278, n. 11, p. 9609-9619.
- CHRISTIANSON, J. *et al.* Emerging perspectives on Leukemia Inhibitory Factor and its Receptor in Cancer. **Frontiers in Oncology**. 2021, vol. 11:693724.
- CHU, Y. S. *et al.* Force measurements in E-cadherin-mediated cell doublets reveal rapid adhesion strengthened by actin cytoskeleton remodeling through Rac and Cdc42. **The Journal of Cell Biology**. 2004, vol. 167, n. 6, p. 1183-1194.
- CHUNG, J. *et al.* Correlation between Oxidative Stress and Transforming Growth Factor-Beta in Cancers. **International Journal of Molecular Sciences**. 2021, vol. 22, n. 24:13181.

- CHUNG, J. Y-F. *et al.* TGF- β Signaling: From Tissue Fibrosis to Tumor Microenvironment. **International Journal of Molecular Sciences**. 2021, vol. 22, n. 14:7575.
- CONIDI A. *et al.* Few smad proteins and many smad-interacting proteins yield multiple functions and action modes in TGF β /BMP signaling in vivo. **Cytokine & Growth Factor Reviews**. 2011, vol. 22, n. 5-6, p. 287-300.
- CURIEL, T. J. *et al.* Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. **Nature medicine**. 2004, vol. 10, n. 9, p. 942-949.
- DAS, S. *et al.* Nox4 Plays a Role in TGF- β -Dependent Lens Epithelial to Mesenchymal Transition. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**. 2016, vol. 57, n. 8, p. 3665-3673.
- DAVID, C. J. & MASSAGUÉ, J. Contextual determinants of TGF β action in development, immunity and cancer. **Nature Reviews, Molecular Cell Biology**. 2018, vol. 19, n. 7, p. 419-435.
- DAVIES, J. M. S. *et al.* The Oxygen Paradox, the French Paradox, and age-related diseases. **Geroscience**. 2017, vol. 39, n. 5-6, p. 499-550.
- DERBINSKI, J. *et al.* Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. **Nature Immunology**. 2001, vol. 2, n. 11, p. 1032-1039.
- DERYCKE, L. D. M. & BRACKE, M. E. N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling. **The International Journal of Developmental Biology**. 2004, vol. 48, n. 5-6, p. 463-476.
- DERYNCK, R. & ZHANG, Y. E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. **Nature**. 2003, vol. 425, n. 6958, p. 577-584.
- DERYNCK, R. *et al.* Signaling pathway cooperation in TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition. **Current Opinion in Cell Biology**. 2014, vol. 31, p. 56-66.
- DIXIT, V. D. Thymic fatness and approaches to enhance thymopoietic fitness in aging. **Current Opinion in Immunology**. 2010, vol. 22, n. 4, p. 521-528.

ECKES, B. *et al.* Impaired wound healing in embryonic and adult mice lacking vimentin. **Journal of Cell Science**. 2000, vol. 113, pt 13, p. 2455-2462.

ERNSZT, D. *et al.* PPARgamma deficiency counteracts thymic senescence. **Frontiers in Immunology**. 2017, vol. 8:1515.

EWIJK, W. V. T-cell differentiation is influenced by thymic microenvironments. **Annual Review of Immunology**. 1991, vol. 9, p. 591-615.

FERNÁNDEZ, E. *et al.* Establishment and characterization of cloned human thymic epithelial cell lines. Analysis of adhesion molecule expression and cytokine production. **Blood**. 1994, vol. 83, n. 11, p. 3245-3254.

FISCHER, K. R. *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. **Nature**. 2015, vol. 527, n. 7579, p. 472-476.

FLAVELL, R. A. *et al.* The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFbeta. **Nature Reviews, Immunology**. 2010, vol. 10, n. 8, p. 554-567.

FRANKE, W. W. *et al.* Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. III. Primary mesenchymal cells and the first appearance of vimentin filaments. **Differentiation; research in biological diversity**. 1982, vol. 23, n. 1, p. 43-59.

GERMAIN, R. N. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. **Nature reviews, Immunology**. 2002, vol. 2, n. 5, p. 309-322.

GIANNELLI, G. *et al.* Laminin-5 with transforming growth factor-beta1 induces epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology**. 2005, vol. 129, n. 5, p. 1375-1383.

GIANNONNI, E. *et al.* EMT and oxidative stress: a bidirectional interplay affecting tumor malignancy. **Antioxidants & Redox Signaling**. 2012, vol. 16, n. 11, p. 1248-1263.

GIVANT-HORWITZ, V. *et al.* Laminin-induced signaling in tumor cells. **Cancer Letters**. 2005, vol. 223, n. 1, p. 1-10.

GRAY, D. H. D. *et al.* Developmental kinetics, turnover, and stimulatory capacity of thymic epithelial cells. **Blood**. 2006, vol. 108, n. 12, p. 3777-3785.

GRIFFITH A. V. *et al.* Persistent degenerative changes in thymic organ function revealed by an inducible model of organ regrowth. **Aging Cell**. 2012, vol. 11, n. 1, p. 169-177.

GRIFFITH, A. V. *et al.* Metabolic Damage and Premature Thymus Aging Caused by Stromal Catalase Deficiency. **Cell Reports**. 2015, vol. 12, n. 7, p. 1071-1079.

HALE, L. P. Histologic and molecular assessment of human thymus. **Annals of Diagnostic Pathology**. 2004, vol. 8, n. 1, p. 50-60.

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

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

HATTA, K. *et al.* Spatial and temporal expression. Pattern of N-cadherin cell adhesion molecules correlated with morphogenetic processes of chicken embryos. **Developmental Biology**. 1987, vol. 120, n. 1, p. 215-227.

HAURI-HOHL, M. *et al.* TGF-beta signaling in thymic epithelial cells regulates thymic involution and postirradiation reconstitution. **Blood**. 2008, vol. 112, n. 3, p. 626-634.

HAURI-HOHL, M. *et al.* A regulatory role for TGF- β signaling in the establishment and function of the thymic medulla. **Nature Immunology**. 2014, vol. 15, n. 6, p. 554-561.

HAZAN, R. B. *et al.* N-cadherin promotes adhesion between invasive breast cancer cells and the stroma. **Cell Adhesion and Communication**. 1997, vol. 4, n. 6, p. 399-411.

HIKOSAKA, Y. *et al.* The cytokine RANKL produced by positively selected thymocytes fosters medullary thymic epithelial cells that express autoimmune regulator. **Immunity**. 2008, vol. 29, n. 3, p. 438-450.

HULIT, J. *et al.* N-cadherin signaling potentiates mammary tumor metastasis via enhanced extracellular signal-regulated kinase activation. **Cancer Research**. 2007, vol. 67, n. 7, p. 3106-3116.

INMAN, G. J. *et al.* Nucleocytoplasmic shuttling of Smads 2, 3 and 4 permits sensing of TGF-beta receptor activity. **Molecular Cell**. 2002, vol. 10, n. 2, p. 283-294.

INUMARU, J. *et al.* Molecular mechanisms regulating dissociation of cell-cell junction of epithelial cells by oxidative stress. **Genes to Cells: devoted to molecular & cellular mechanisms**. 2009, vol. 14, n. 6, p. 703-716.

ISHIKAWA, F. *et al.* A mitochondrial thioredoxin-sensitive mechanism regulates TGF- β -mediated gene expression associated with epithelial-mesenchymal transition. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 2014, vol. 443, n. 3, p. 821-827.

JENKINSON, W. E. *et al.* Differential requirement for mesenchyme in the proliferation and maturation of thymic epithelial progenitors. **The Journal of Experimental Medicine**. 2003, vol. 198, n. 2, p. 325-332.

JENNBACHEN, K. *et al.* N-cadherin increases after androgen deprivation and is associated with metastasis in prostate cancer. **Endocrine-related Cancer**. 2010, vol. 17, n. 2, p. 469-479.

JURBERG, A. D. *et al.* A Tale from TGF- β Superfamily for Thymus Ontogeny and Function. **Frontiers in Immunology**. 2015, vol. 6:442.

KATSUNO, Y. & DERYNCK, R. Epithelial plasticity, epithelial-mesenchymal transition, and the TGF- β family. **Developmental Cell**. 2021, vol. 56, n. 6, p. 726-746.

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

KELLOKUMPU-LEHTINEN, P. *et al.* Leukemia-inhibitory factor stimulates breast, kidney and prostate cancer cell proliferation by paracrine and autocrine pathways. **International Journal of Cancer**. 1996, vol. 66, n. 4, p. 515-519.

KLEIN, L. *et al.* Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. **Nature Reviews, Immunology**. 2009, vol. 9, n. 12, p. 833-844.

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

KOCH, U. *et al.* Delta-like 4 is the essential, nonredundant ligand for Notch1 during thymic T cell lineage commitment. **The Journal of Experimental Medicine**. 2008, vol. 205, n. 11, p. 2515-2523.

KOTZBAUER, P. T. *et al.* Postnatal development of survival responsiveness in rat sympathetic neurons to leukemia inhibitory factor and ciliary neurotrophic factor. **Neuron**. 1994, vol. 12, n. 4, p. 763-773.

KVELL, K. *et al.* Wnt4 and LAP2alpha as pacemarkers of thymic epithelial senescence. **PloS One**. 2010, vol. 5, n. 5:e10701.

LAMOUILLE, S. *et al.* Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. **Nature Reviews, Molecular Cell Biology**. 2014, vol. 15, n. 3, p. 178–196.

LANNES-VIEIRA, J. *et al.* Extracellular matrix components of the mouse thymus microenvironment: ontogenetic studies and modulation by glucocorticoid hormones. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**. 1991, vol. 39, n. 11, p. 1539-1546.

LARSSON, A. *et al.* Increased cell proliferation and neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of old GFAP (-/)/Vim(-/)-mice. **Neurochemical Research**. 2004, vol. 29, n. 11, p. 2069-2073.

LE, P. T. *et al.* Human thymic epithelial cells produce IL-6, granulocyte-monocyte-CSF, and leukemia inhibitory factor. **Journal of Immunology**. 1990, vol. 145, n. 10, p. 3310-3315.

LE, P. T. *et al.* Regulation of cytokine production in the human thymus: epidermal growth factor and transforming growth factor alpha regulate mRNA levels of interleukin 1 alpha (IL-1 alpha), IL-1 beta, and IL-6 in human thymic epithelial cells at a post-transcriptional level. **The Journal of Experimental Medicine**. 1991, vol. 174, n. 5, p. 1147-1157.

LEE, J. H. & MASSAGUÉ, J. TGF- β in developmental and fibrogenic EMTs. **Seminars in Cancer Biology**. 2022, vol. 86 (pt 2), p. 136-145.

LEI, X. G. *et al.* Paradoxical Roles of Antioxidant Enzymes: Basic Mechanisms and Health Implications. **Physiological Reviews**. 2016, vol. 96, n. 1, p. 307-364.

LI, C. W. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition induced by TNF- α requires NF- κ B-mediated transcriptional upregulation of Twist1. **Cancer Research**. 2012, vol. 72, n. 5, p. 1290-1300.

LI, W. Q. *et al.* Transforming growth factor Beta1 induction of tissue inhibitor of metalloproteinases 3 in articular chondrocytes is mediated by reactive oxygen species. **Free Radical Biology & Medicine**. 2004, vol. 37, n. 2, p. 196-207.

LI, Y. N. *et al.* Saponins from *Aralia taibaiensis* attenuate D-galactose-induced aging in rats by activating FOXO3a and Nrf2 pathways. **Oxidative Medicine and Cell Longevity**. 2014; vol. 2014:320513.

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

LIU, C-C *et al.* Collagen XVII/laminin-5 activates epithelial-to-mesenchymal transition and is associated with poor prognosis in lung cancer. **Oncotarget**. 2016, vol. 9, n. 2, p. 1656-1672.

LIU, L-T. *et al.* Composition and characteristics of distinct macrophage subpopulations in the mouse thymus. **Molecular Medicine Reports**. 2013, vol. 7, n. 6, p. 1850-1854.

LIU, R-M & PRAVIA, K. A. G. Oxidative stress and glutathione in TGF-beta-mediated fibrogenesis. **Free Radical Biology and Medicine**. 2010, vol. 48, n. 1, p. 1-15.

LOFFREDO, F. S. *et al.* Growth differentiation factor 11 is a circulating factor that reverses age-related cardiac hypertrophy. **Cell**. 2013, vol. 153, n. 4, 828-839.

LOH, C. Y. *et al.* The e-cadherin and n-cadherin switch in epithelial-to-mesenchymal transition: signaling, therapeutic implications, and challenges. **Cells**. 2019, vol. 8, n. 10, p. 1118.

LÓPEZ-LLUCH, G. *et al.* Mitochondrial responsibility in ageing process: innocent, suspect or guilty. **Biogerontology**. 2015, vol. 16, n. 5, p. 599-620.

LUO, H. *et al.* Mouse forestomach carcinoma cells immunosuppress macrophages through transforming growth factor- β 1. **Molecular Medicine Reports**. 2012, vol. 5, n. 4, p. 988-992.

LUO, Y. *et al.* N-cadherin is required for neural crest remodeling of the cardiac outflow tract. **Developmental Biology**. 2006, vol. 299, n. 2, p. 517-528.

LYONS, R. M. & MOSES, H. L. Transforming growth factors and the regulation of cell proliferation. **European Journal of Biochemistry**. 1990, vol. 187, n. 3, p. 47-473.

MACIAS, M. J. *et al.* Structural determinants of Smad function in TGF- β signaling. **Trends in biochemical sciences**. 2015, vol. 40, n. 6, p. 296-308.

MAIDEN, S. L. *et al.* Microtubules inhibit E-cadherin adhesive activity by maintaining phosphorylated p120-catenin in a colon carcinoma cell model. **PLoS One**. 2016, vol. 11, n. 2:e0148574.

MANLEY, N. R. *et al.* Structure and function of the thymic microenvironment. **Frontiers in bioscience**. 2011, vol. 16, n. 7, p. 2461-2477.

MASSAGUÉ, J. TGF β signaling in context. **Nature Reviews, Molecular Cell Biology**. 2012, vol. 13, n. 10, p. 616-630.

MATSUOKA, I. *et al.* Induction of LIF-mRNA by TGF-beta 1 in Schwann cells. **Brain Research**. 1997, vol. 776, n. 1-2, p. 170-180.

MICHELSON, D. A. *et al.* Thymic epithelial cells co-opt lineage-defining transcription factors to eliminate autoreactive T cells. **Cell**. 2022, vol. 185, n. 14, p. 2542-2558.

MIETTINEN, P. J. *et al.* TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. **The Journal of Cell Biology**. 1994, vol. 127 (6, pt 2), p. 2021-2036.

MILLER, R. A. *et al.* Big mice die young: early life body weight predicts longevity in genetically heterogenous mice. **Aging Cell**. 2002, vol. 1, n. 1, p. 22-29.

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

MIN, C. *et al.* NF-KappaB and epithelial to mesenchymal transition of cancer. **Journal of Cellular Biochemistry**. 2008, vol. 104, n. 3, p. 733-744.

MOO-YOUNG, T. A. Tumor-derived TGF-beta mediates conversion of CD4+Foxp3+ regulatory T cells in a murine model of pancreas cancer. **Journal of Immunotherapy**. 2009, vol. 32, n. 1, p. 12-21.

MOREAU, J. M. *et al.* Transforming growth factor- β 1 in regulatory T cell biology. **Science Immunology**. 2022, vol. 7, n. 69:eabi4613.

MROZIK, K. M. *et al.* N-cadherin in cancer metastasis, its emerging role in haematological malignances and potential as a therapeutic target in cancer. **BMC Cancer**. 2018, vol. 18, n. 1, p. 939.

NA, T. Y. *et al.* The functional activity of E-cadherin controls tumor cell metastasis at multiple steps. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**. 2020, vol. 117, n. 11, p. 5931-5937.

NAM, J. S. *et al.* An anti-transforming growth factor beta antibody suppresses metastasis via cooperative effects on multiple cells compartments. **Cancer research**. 2008, vol. 68, n. 10, p. 3835- 3843.

NEHLS, M. *et al.* Two genetically separable steps in the differentiation of thymic epithelium. **Science**. 1996, vol. 272, n. 5263, p. 886-889.

NIEMINEN, M. *et al.* Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration. **Nature Cell Biology**. 2006, vol. 8, n. 2, p. 156-162.

NOGUEIRA, V. & HAY, N. Molecular pathways: reactive oxygen species homeostasis in cancer cells and implications for cancer therapy. **Clinical Cancer Research**. 2013, vol. 19, n. 16, p. 4309-4314.

OCAMPO, J. S. P. *et al.* Laminin-211 controls thymocyte--thymic epithelial cell interactions. **Cellular Immunology**. 2008, vol. 254, n. 1, p. 1-9.

OFTEDAL, B. E. *et al.* Dominant Mutations in the Autoimmune Regulator AIRE Are Associated with Common Organ-Specific Autoimmune Diseases. **Immunity**. 2015, vol. 42, n. 6, 1185-1196.

PADUA, D. & MASSAGUÉ, J. Roles of TGFbeta in metastasis. **Cell Research**. 2009, vol. 19, n. 1, p. 89-102.

PALACIO, L. *et al.* Restored immune cell function upon clearance of senescence in the irradiated splenic environment. **Aging cell**. 2019, vol. 18, n. 4: e12971.

PARDALI, E. *et al.* Signaling by members of the TGF-beta family in vascular morphogenesis and disease. **Trends in Cell Biology**. 2010, vol. 20, n. 9, p. 556-567.

PATTERSON, P. H. Leukemia inhibitory factor, a cytokine at the interface between neurobiology and immunology. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**. 1994, vol. 91, n. 17, p. 7833-7835.

PEINADO, H. *et al.* Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: na alliance against the epithelial phenotype? **Nature Reviews, Cancer**. 2007, vol. 7, n. 6, p. 415-428.

PETRIE, H. T. *et al.* Precursor thymocyte proliferation and differentiation are controlled by signals unrelated to the pre-TCR. **Journal of Immunology**. 2000, vol. 165, n. 6, p. 3094-3098.

PETRIE, H. T. Role of thymic organ structure and stromal composition in steady-state postnatal T-cell production. **Immunological reviews**. 2002, vol. 189, p. 8-19.

PINTO, M. & MORAES, C. T. Mechanisms linking mtDNA damage and aging. **Free Radical Biology and Medicine**. 2015, vol. 85, p. 250-258.

QI, J. *et al.* Transendothelial migration of melanoma cells involves N-cadherin-mediated adhesion and activation of the beta-catenin signaling pathway. **Molecular Biology of the Cell**. 2005, vol. 16, n. 9, p. 4386-4397.

QIN, W. *et al.* Exosomes in Human Breast Milk Promote EMT. **Clinical Cancer Research**. 2016, vol. 22, n. 17, p. 4517-4524.

QIN, Y. *et al.* Laminins and cancer stem cells: Partners in crime? **Seminars in Cancer Biology**. 2017, vol. 45, p. 3-12.

RADICE, G. L. N-cadherin-mediated adhesion and signaling from developmental to disease: lessons form mice. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**. 2013, vol. 116, p. 263-289.

REZZANI, R. *et al.* Thymus and aging: Morphological, radiological and functional view. **Age (Dordr)**. 2014, vol. 36, n. 1, p. 313-351.

ROBERTS, A. B. & WAKEFIELD, L. M. The two faces of transforming growth factor beta in carcinogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**. 2003, vol. 100, n. 15, p. 8621-8623.

- ROELEN, B. A. J. & DJIKE, P. T. Controlling mesenchymal stem cell differentiation by TGF β family members. **Journal of Orthopaedic Science**. 2003, vol. 8, n. 5, p. 740-748.
- ROSSI, S. W. *et al.* Clonal analysis reveals a common progenitor for thymic cortical and medullary epithelium. **Nature**. 2006, vol. 441, n. 7096, p. 988-991.
- ROSSI, S. W. *et al.* RANK signals from CD4(+)3(-) inducer cells regulate development of Aire-expressing epithelial cells in the thymic medulla. **The Journal of Experimental Medicine**. 2007, vol. 204, n. 6, p. 1267-1272.
- SAFIEDDINE, N. & KESHAVJEE, S. Anatomy of the thymus gland. **Thoracic surgery clinics**. 2011, vol. 21, n. 2, p. 191-195.
- SANJABI, S. *et al.* Opposing effects of TGF- β and IL-15 cytokines control the number of short-lived effector CD8⁺ T cells. **Immunity**. 2009, vol. 31, n. 1, p. 131-144.
- SATELLI, A. & LI, S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 2011, vol. 68, n. 18, p. 3033-3046.
- SATO, M. *et al.* Targeted disruption of TGF- β 1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. **The Journal of Clinical Investigation**. 2003, vol. 112, n. 10, p. 1486-1494.
- SAVINO, W. *et al.* Intrathymic T-cell migration: a combinatorial interplay of extracellular matrix and chemokines? **Trends in Immunology**. 2002; vol. 23, n. 6, p. 305-313.
- SAVINO, W. *et al.* Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix. **Journal of Leukocyte Biology**. 2004, vol. 75, n. 6, p. 951-961.
- SAVINO, W. *et al.* Laminin-Mediated Interactions in Thymocyte Migration and Development. **Frontiers in Immunology**. 2015, vol. 6:579.
- SCHAFER, G. *et al.* Cadherin switching during the formation and differentiation of the *Drosophila* mesoderm-implications for epithelial-to-mesenchymal transitions. **Journal of Cell Science**. 2014, vol. 127 (Pt 7), p. 1511-1522.

SCHIMID, P. *et al.* Differential expression of TGF beta 1, beta 2 and beta 3 genes during mouse embryogenesis. **Development**. 1991, vol. 111, n. 1, p. 117-130.

SCHLUNS, K. S. *et al.* TGF-beta differentially modulates epidermal growth factor-mediated increases in leukemia-inhibitory factor, IL-6, IL-1 alpha, and IL-1 beta in human thymic epithelial cells. **Journal of Immunology**. 1997, vol. 158, n. 6, p. 2704-2712.

SEMPOWSKI, G. D. *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. **Journal of Immunology**. 2000, vol. 164, n. 4, p. 2180-2187.

SHAMIR, E. R. *et al.* Twist1-induced dissemination preserves epithelial identity and requires E-cadherin. **The Journal of Cell Biology**. 2014, vol. 204, n. 5, p. 839-856.

SHI, M. *et al.* Latent TGF- β structure and activation. **Nature**. 2011, vol. 474, n. 7351, p. 343-349.

SIES, H. Oxidative stress: introductory remarks. Oxidative Stress. In: Sies H., editor. **Oxidative Stress, London: Academic Press**. 1985, p. 1-8.

SIES, H. & JONES, P. D. Oxidative Stress. In: Fink G., editor. **Encyclopedia of Stress, 2nd, Amsterdam: Elsevier**. 2007, p. 45-48.

SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**. 2015. Vol. 4, p. 180-183.

SIMON, T. & BROMBERG, J. S. Immune System by Laminins. **Trends in Immunology**. 2017, vol 38, n. 11, p. 858-871.

SOMMARIVA, M. & GAGLIANO, N. E-cadherin in pancreatic ductal adenocarcinoma: a multifaceted actor during EMT. **Cells**. 2020, vol. 9, n. 4:1040.

TAN, J. *et al.* Induction of epithelial to mesenchymal transition (EMT) and inhibition on adipogenesis: Two different sides of the same coin? Feasible roles and mechanisms of transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) in age related thymic involution. **Cell Biology International**. 2016, vol. 40, n. 8, p. 842-846.

TAUB, D. D. & LONGO, D. L. Insights into thymic aging and regeneration. **Immunological reviews**. 2005, vol. 205, p. 72-93.

TAKABA, H. *et al.* Fezf2 Orchestrates a Thymic Program of Self-Antigen Expression for Immune Tolerance. **Cell**. vol. 163, n. 4, p. 975-987.

TAKAHAMA, Y. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. **Nature Reviews, Immunology**. 2006, vol. 6, n. 2, p. 127-135.

TERABE, M. *et al.* NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4-R-STAT6 pathway. **Nature immunology**. 2000, vol. 1, n. 6, p. 515-520.

TERAO, C. *et al.* The human AIRE gene at chromosome 21q22 is a genetic determinant for the predisposition to rheumatoid arthritis in Japanese population. **Human Molecular Genetics**. 2011, vol. 20, n. 13, p. 2680-2685.

THIERY, J. P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. **Nature Reviews, Cancer**. 2002, vol. 2, n. 6, p. 442-454.

THIERY, J. P. & SLEEMAN, J. P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. **Nature reviews, Molecular Cell Biology**. 2006, vol. 7, n. 2, p. 131-142.

UCAR, O. *et al.* A Thymic Epithelial Stem Cell Pool Persists throughout Ontogeny and Is Modulated by TGF- β . **Cell Reports**. 2016, vol. 17, n. 2, p. 448-457.

VALASTYAN, S. & WEINBERG, R. A. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. **Cell**. 2011, vol. 147, n. 2, p. 275-292.

VOISIN, A. *et al.* Differential expression and localisation of TGF- β isoforms and receptors in the murine epididymis. **Scientific Reports**. 2020, vol. 10, n. 1, p. 995.

WANG, H. X. *et al.* Thymic epithelial cells contribute to thymopoiesis and T cell development. **Frontiers in Immunology**. 2020, vol. 10, p. 3099.

WEST, J. Cross talk between Smad, MAPK, and actin in the etiology of pulmonary arterial hypertension. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. 2010, vol. 661, p. 265-278.

WODARZ, A. & NUSSE, R. Mechanisms of Wnt signaling in development. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**. 1998, vol. 14, p. 59-88.

WOOSLEY, A. N. *et al.* TGF β promotes breast cancer stem cell self-renewal through an ILEI/LIFR signaling axis. **Oncogene**. 2019, vol. 38, n. 20, p. 3794-3811.

WU, Y. *et al.* TGFbeta1 regulation of vimentin gene expression during differentiation of the C2C12 skeletal myogenic cell line requires Smads, AP-1 and Sp1 family members. **Biochimica and Biophysica acta**. 2007, vol. 1773, n. 3, p. 427-439.

XIE, F. *et al.* Regulation of TGF- β superfamily signaling by SMAD mono-ubiquitination. **Cells**. 2014, vol. 3, n. 4, p. 981-993.

XU, F. *et al.* TGF- β /SMAD pathway and its regulation in hepatic fibrosis. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**. 2016, vol. 64, n. 3, p. 157-167.

YAKES, F. M. & HOUTEN, B. V. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**. 1997, vol 94, n. 2, p. 514-519.

YANG, H. *et al.* Inhibition of thymic adipogenesis by caloric restriction is coupled with reduction in age-related thymic involution. **Journal of Immunology**. 2009, vol. 183, n. 5, p. 3040-3052.

YANG, J. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition in age-associated thymic involution: Mechanisms and therapeutic implications. **Ageing Reserach Reviews**. 2023, vol. 92: 102115.

YANG, X. *et al.* Targeted disruption of SMAD3 results in impaired mucosal immunity and diminished T cell responsiveness to TGF-beta. **The EMBO Journal**. 1999, vol. 18, n. 5, p. 1980-1991.

YANO, M. *et al.* Aire controls the differentiation program of thymic epithelial cells in the medulla for the establishment of self-tolerance. **The Journal of Experimental Medicine**. 2008, vol. 205, n. 12, p. 2827-2838.

YOON, Y-S. *et al.* TGF beta1 induces prolonged mitochondrial ROS generation through decreased complex IV activity with senescent arrest in Mv1Lu cells. **Oncogene**. 2005, vol. 24, n. 11, p. 1895-1903.

YOUM, Y. H. *et al.* Deficient ghrelin receptor-mediated signaling compromises thymic stromal cell microenvironment by accelerating thymic adiposity. **The journal of biological chemistry**. 2009, vol. 284, n. 11, p. 7068–7077.

ZHAO, S. & FERNALD, R. D. Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. **Journal of Computational Biology**. 2005, vol. 12, n. 8, p. 1047-1064.

ZEISBERG, M. & NEILSON, E. G. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. **The Journal of Clinical Investigation**. 2009, vol. 119, n. 6, p. 1429-1437.

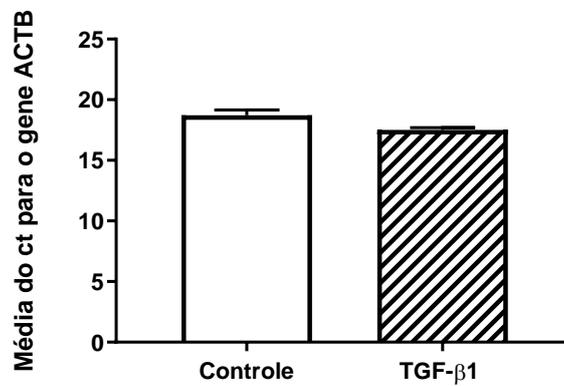
ZHENG, X. *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. **Nature**. 2015, vol. 527, n. 7579, p. 525-530.

ZUKLYS, S. *et al.* Foxn1 regulates key target genes essential for T cell development in postnatal thymic epithelial cells. **Nature Immunology**. 2016, vol. 17, n. 10 p. 1206-1215.

MATERIAL SUPLEMENTAR

A Figura Suplementar 1 mostra a média do Ct do gene endógeno *ACTB*, onde não é possível observar diferença significativa entre o grupo controle e o grupo estimulado com o TGF- β 1, e por isso sendo o *ACTB* escolhido como gene endógeno. Para cada grupo de tratamento (controle e TGF- β 1), foi utilizada uma triplicata contendo 3 réplicas técnicas para cada replicata. As reações foram realizadas no equipamento QuantiStudio 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Figura suplementar 1: Análise do Ct do gene endógeno *ACTB*



O gráfico mostra a média \pm erro-padrão da média do Ct do gene endógeno *ACTB* após estímulo com TGF- β 1 por 24 horas. O gráfico é representativo de 2 experimentos independentes em triplicata.