



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR**

**FELIPE LIMA PORTO**

**Papel funcional do triterpeno natural friedelina sobre células epiteliais  
tímidicas senescentes**

**MACEIÓ – AL,**

**2024**

FELIPE LIMA PORTO

**Papel funcional do triterpeno natural friedelina sobre células epiteliais  
tímidas senescentes**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Profª. Drª. Maria Danielma dos Santos Reis

Co-orientador: Prof. Dr. Marvin Paulo Lins

**MACEIÓ – AL,**

**2024**

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

Bibliotecária Responsável: Lívia Silva dos Santos - CRB 1670

P839p Porto, Felipe Lima.

Papel funcional do triterpeno natural friedelina sobre células epiteliais tímicas senescentes / Felipe Lima Porto.

126 f.:il. color.

Orientadora: Maria Danielma dos Santos Reis.

Coorientador: Marvin Paulo Lins.

Tese (Doutorado 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. 91-111

1. Células epiteliais tímicas. 2. Estresse oxidativo - Envelhecimento. 3. Senescência celular. I. Título.

CDU: 624.01

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha família. Aos meus filhos, Maya e Joaquim, pois todo esse trabalho foi, acima de tudo, para eles. A Karol, por ter assumido grande parte das responsabilidades com nossos filhos, pelo apoio incondicional e pelo companheirismo em todos os momentos. Aos meus pais, Gentil e Rita, cuja presença foi essencial em cada etapa desta jornada. Seu apoio inabalável, tanto emocional quanto financeiro, tornou possível a realização deste sonho. Nunca permitiram que eu desistisse, sempre acreditaram em mim e estiveram ao meu lado nos momentos mais desafiadores. Ao meu irmão, Gustavo, pelo apoio constante ao longo dessa jornada.

Aos meus avós, Eduardo e Deraldo, que, mesmo não estando mais aqui, foram essenciais na minha formação pessoal e educacional. Às minhas avós, Dalcira e Selma, por todo carinho e suporte.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Danielma dos Santos Reis, cuja importância nesta trajetória não pode ser descrita em poucas palavras. Profissionalmente, ela foi o início, o meio e o fim deste trabalho. Sem ela, nada disso existiria. Foi a primeira pessoa a me acolher como aluno de Iniciação Científica, depois como orientanda de TCC, mestrado e, agora, doutorado. Minha eterna gratidão, professora.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Marvin Paulo Lins, que conheci ainda quando ele também era aluno de pós-graduação. Hoje, um professor universitário brilhante e uma das pessoas mais fantásticas que tive o prazer de conhecer.

Ao Laboratório de Biologia Celular (LBC), minha segunda casa por quase uma década, que me proporcionou toda a infraestrutura necessária para a realização deste trabalho. A todos os professores do LBC: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Salete Smaniotto, Prof. Dr. Emiliano Barreto, Prof. Dr. Alexandre Borbely, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Danielma Reis e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Jamylle Ferro. Vocês foram muito mais do que referências científicas; foram fundamentais na minha formação pessoal e ética profissional.

Um agradecimento especial à técnica de laboratório Juliane Barreto, cuja dedicação e liderança garantem o funcionamento impecável do LBC. Além de profissional exemplar, é uma pessoa de coração gigante, sempre preocupada com todos. Obrigado, Ju, por todas as horas extras operando os equipamentos e, mais do que isso, pelo apoio emocional quando foi necessário. Você é, sem dúvida, a "mãezona" do laboratório.

A todos que passaram pelo LBC, seria impossível nomear cada um sem correr o risco de esquecer alguém. Obrigado pelos ensinamentos, pelos momentos de descontração, desabafo e companheirismo. Em um meio acadêmico cada vez mais competitivo, encontrar um ambiente de colaboração e confiança é raro. Posso dizer, com orgulho, que o LBC foi, de fato, minha segunda casa.

À Navylla Candeia, *in memoriam*, uma cientista brilhante que, infelizmente, nos deixou devido à Covid-19 e à negligência de um governo criminoso que desprezou a ciência no momento mais crítico da pandemia. Parceira de pesquisas sobre o timo e de muitas conversas sobre a vida, relacionamentos e sonhos. Você faz falta, Navylla.

À Fiocruz/RJ e ao Laboratório de Pesquisa sobre o Timo (LPT), onde tive o privilégio de passar um ano trabalhando com alguns dos melhores cientistas que já conheci. Agradeço aos pesquisadores do LPT por me receberem como um verdadeiro membro do laboratório. Em especial, à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daniella Areas Mendes-da-Cruz e ao Prof. Dr. Wilson Savino, que abriram as portas do LPT para mim e tornaram tudo isso possível. Trabalhar ao lado de um cientista do calibre do Savino foi um divisor de águas na minha vida acadêmica e pessoal.

Aos alunos e funcionários do LPT, TODOS, sem exceção, que me receberam tão bem e tornaram essa experiência inesquecível. Um agradecimento especial à Liliane, também aluna do LBC, que preparou minha chegada ao LPT e ao Rio de Janeiro. Seu carisma e profissionalismo são admiráveis. Obrigado, Lili, por todo o apoio. À Luciana Veneziani, minha parceira de bancada, que ficou até meia-noite comigo em diversos experimentos, além de oferecer companheirismo e suporte pessoal. Muito obrigado, Lu!

A Daniel Mafra e Marina Mafra, que tornaram minha estadia no Rio de Janeiro a melhor possível. A sorte de tê-los encontrado é algo que nunca conseguirei expressar em palavras. Não conseguiria pagar por metade da segurança que vocês me proporcionaram ao abrirem as portas de suas casas para mim. Minha eterna gratidão!

Aos professores que participaram da minha banca de qualificação e defesa: Prof. Dr. Igor Melo, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fabiana Moura, Prof. Dr. Marcelo Duzzioni, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Jamylle Ferro, Prof. Dr. Enio Bassi, Prof. Dr. Rafael Brito e Prof. Dr. Geraldo Passos. Obrigado pela disponibilidade, pelas contribuições e pelo olhar crítico que ajudaram a aperfeiçoar esta tese.

Agradeço à Universidade Federal de Alagoas (UFAL) por ter sido minha casa acadêmica ao longo dessa trajetória, proporcionando a estrutura necessária para meu desenvolvimento científico e profissional. Meu sincero reconhecimento à CAPES, ao CNPq, à FAPEAL e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Neuroimunomodulação (INCT-NIM) pelo apoio financeiro que viabilizou a realização deste doutorado. O investimento em pesquisa e ciência é essencial para o avanço do conhecimento, e sou grato por ter contado com esse suporte ao longo da minha formação.

Escrever estes agradecimentos foi a última etapa desta jornada. Certamente, deixei de mencionar muitas pessoas importantes. Peço desculpas por qualquer esquecimento.

Por fim, agradeço a mim mesmo. Não desisti. No fim, sobrevivi.

## RESUMO

A involução do timo, essencial para a maturação de linfócitos T, ocorre com o envelhecimento e resulta em um declínio na função imune. Esse processo está intimamente relacionado à senescência celular das células epiteliais tímicas (TECs), induzida principalmente por estresse oxidativo. O acúmulo de danos oxidativos em TECs compromete a sua função e contribui para a degeneração do microambiente tímico. A friedelina, um triterpeno com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, apresenta potencial para modular a biologia das TECs e combater a senescência. Diante desses argumentos, o presente trabalho investigou os efeitos da friedelina sobre TECs murinas em condições normais e de senescência induzida. TEC murinas da linhagem 2BH4 foram cultivadas em diferentes condições: controle (sem tratamento), tratadas com friedelina (0,1 e 1  $\mu$ M) e submetidas à indução de senescência por D-galactose (40 mg/mL), com ou sem tratamento com friedelina. Foram avaliadas a viabilidade celular, a proliferação, a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a expressão do marcador de senescência p16 por PCR. A produção de laminina e fibronectina foi verificada por imunofluorescência. A função das TECs foi avaliada por ensaio de adesão e ensaio de sobrevivência de timócitos. A friedelina não apresentou toxicidade para as TECs nas concentrações testadas. Em células não senescentes, a friedelina aumentou a produção de laminina e promoveu a adesão de timócitos, principalmente os duplo-positivos (CD4 $^+$ CD8 $^+$ ) e simples-positivos (CD4 $^+$ ). No entanto, a friedelina não foi capaz de reverter a senescência induzida por D-galactose, marcada pela redução da proliferação celular, o aumento de ERO e da expressão de p16. Em cocultura com TECs senescentes, a friedelina não alterou significativamente a adesão e a sobrevivência de timócitos. Os resultados deste estudo demonstram que a friedelina possui potencial para modular a biologia das TECs, aumentando a produção de laminina e a adesão de timócitos, o que pode ser benéfico para a função tímica. No entanto, no modelo experimental de senescência usado neste trabalho, a friedelina não reverteu a senescência induzida por estresse oxidativo. Mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos de ação da friedelina e seu potencial terapêutico no contexto da involução tímica e do envelhecimento, incluindo a investigação de diferentes doses, vias de administração e combinações com outros compostos bioativos.

**Palavras-chave:** células epiteliais tímicas, estresse oxidativo, produtos naturais, imunomodulação

## ABSTRACT

Thymic involution, essential for T lymphocyte maturation, occurs with aging and results in a decline in immune function. This process is closely related to cellular senescence of thymic epithelial cells (TECs), primarily induced by oxidative stress. The accumulation of oxidative damage in TECs compromises their function and contributes to thymic microenvironment degeneration. Friedelin, a triterpene with antioxidant and anti-inflammatory properties, shows potential to modulate TEC biology and combat senescence. Based on these arguments, the present work investigated the effects of friedelin on murine TECs under normal and senescent conditions. Murine TECs from the 2BH4 cell line were cultured under different conditions: control (untreated), treated with friedelin (0.1 and 1  $\mu$ M), and subjected to D-galactose-induced senescence (40 mg/mL), with or without friedelin treatment. Cell viability, proliferation, reactive oxygen species (ROS) production, and p16 senescence marker expression were evaluated by PCR. Laminin and fibronectin production were assessed by immunofluorescence. TEC function was evaluated through thymocyte adhesion and survival assays. Friedelin did not exhibit toxicity towards TECs at the tested concentrations. In non-senescent cells, friedelin increased laminin production and promoted thymocyte adhesion, particularly double-positive (CD4+CD8+) and single-positive (CD4+) cells. However, friedelin did not reverse D-galactose-induced senescence, characterized by reduced cell proliferation, increased ROS, and p16 expression. In co-culture with senescent TECs, friedelin did not significantly alter thymocyte adhesion or survival. The results of this study demonstrate that friedelin has potential to modulate TEC biology, increasing laminin production and thymocyte adhesion, which may benefit the thymic function. However, in the experimental model of senescence used in this work, friedelin did not reverse oxidative stress-induced senescence. Further studies are needed to elucidate the mechanisms of friedelin action and its therapeutic potential in the context of thymic involution and aging, including the investigation of different doses, administration routes, and combinations with other bioactive compounds.

Keywords: thymic epithelial cells, oxidative stress, natural products, immunomodulation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Senescência celular.....	18
Figura 2. Causas da senescência celular.....	19
Figura 3. Possíveis mecanismos envolvidos no envelhecimento induzido por D-galactose.....	22
Figura 4. Posição anatômica do timo murino.....	24
Figura 5. Arquitetura microscópica e microambiente tímico.....	25
Figura 6. Diferenciação intratímica de linfócitos T e o microambiente tímico.....	27
Figura 7. Alterações anatômicas e estruturais na involução tímica.....	34
Figura 8. Estrutura molecular do triterpeno pentacíclico friedelina.....	40
Figura 9. Morfologia das células 2BH4 por microscopia eletrônica.....	55
Figura 10. Expressão de receptores de superfície em células epiteliais tímicas 2BH4.....	56
Figura 11. Ensaio de viabilidade celular após tratamento com friedelina.....	57
Figura 12. Expressão de CXCL12 em TEC após tratamento com friedelina.....	58
Figura 13. Análise qualitativa e quantitativa da produção de moléculas de matriz pela TEC após tratamento com friedelina.....	59
Figura 14. Expressão de receptores nas células epiteliais tímicas após tratamento com friedelina.....	61
Figura 15. Adesão de timócitos à TEC após tratamento com friedelina.....	62
Figura 16. Análise da adesão de subpopulações de timócitos às células epiteliais tímicas após tratamento com friedelina.....	63
Figura 17. A análise da sobrevivência de timócitos em cocultura com células epiteliais tímicas após tratamento in vitro com friedelina e expressão de moléculas de MHC na superfície das células epiteliais tímicas.....	64
Figura 18. Efeitos da D-gal em células epiteliais tímicas. ....	67
Figura 19. D-gal não induz a morte celular em células epiteliais tímicas. ....	69
Figura 20. Efeitos da D-gal na morfometria nuclear das células epiteliais tímicas. ....	70

Figura 21. O tratamento com friedelina não reverte a senescência induzida por D-gal em células epiteliais tímicas.....	72
Figura 22. Efeito da senescência e do tratamento com friedelina na expressão e distribuição de laminina nas células epiteliais tímicas.....	74
Figura 23. Efeito da senescência e do tratamento com friedelina na expressão e distribuição de fibronectina nas TECs.....	76
Figura 24. Figuras representativas da adesão dos timócitos às células epiteliais tímicas.....	78
Figura 25. Sobrevida de timócitos em cocultura com TECs senescentes.....	79

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AIRE: Fator de Transcrição Regulador Autoimune (autoimmune regulator)  
BSA: Albumina Sérica Bovina  
CCL25: CC- Chemokine Ligand 25  
CD11a/CD18: Cluster of Differentiation 11a/18 (LFA-1)  
CD11b/CD18: Cluster of Differentiation 11b/18 (Mac-1)  
CD4+: Timócitos simples-positivos  
CD4+CD8+: Timócitos duplo-positivos  
CD54: Cluster of Differentiation 54 (ICAM-1)  
CD90: Cluster of Differentiation 90 (Thy-1)  
cDNA: DNA Complementar  
cTEC: Células Epiteliais Tímidas Corticais  
CXCL12: CXC- Chemokine Ligand 12  
D-gal: D-galactose  
DHR-123: Dihydrorhodamine 123  
DMSO: Dimetilsulfóxido  
DN: Duplo-negativo  
DP: Duplo-positivo  
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético  
ELISA: Ensaio de Imunoabsorção Enzimática  
EMT: Transição Epitelial-Mesenquimal  
ERO: Espécies Reativas de Oxigênio  
ETP: Células Progenitoras Tímidas Iniciais (early thymic progenitor)  
FACS: Citometria de Fluxo  
FN: Fibronectina  
FOXN1: Fator de Transcrição Forkhead Box N1  
GAR-FITC: IgG de cabra conjugado ao isotiocianato de fluoresceína  
HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico  
IA: Índice de Adesão  
ICAM-1: Molécula de Adesão Intercelular-1

IL-1R: Receptor de Interleucina-1

IL-7: Interleucina-7

LM: Laminina

LFA-1: Antígeno-1 Associado à Função Leucocitária

Mac-1: Macrófago-1 Antígeno

MEC: Matriz Extracelular

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

MFI: Intensidade Mediana de Fluorescência

MHC: Complexo principal de histocompatibilidade

mTEC: Células Epiteliais Tímidas Medulares

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NII: Índice de Irregularidade Nuclear

NMA: Ensaio de Morfometria Nuclear (Nuclear Morphometry Assay)

NP-1: Neuropilina-1

p16: Proteína p16INK4a

PBS: Tampão Fosfato Salino

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PCRq: PCR quantitativo em tempo real

PI: Iodeto de Propídeo (Propidium Iodide)

SBF: Soro Fetal Bovino

SEMA-3A: Semaforina de classe 3

SP: Simples-positivo

SV40: Vírus símio 40

TCR: Receptor de Células T (T cell receptor)

TECs: Células Epiteliais Tímidas

TNC: Complexo Nurse Tímico (thymic nurse complex)

TRA: Antígenos Tecido-específicos (tissue-restricted antigens)

UEA-1: Aglutinina 1 de *Ulex europaeus*

VLA-5: Very Late Antigen-5

VLA-6: Very Late Antigen-6

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 SENESCÊNCIA CELULAR .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1.1 SENESCÊNCIA CELULAR E O PAPEL DO ESTRESSE OXIDATIVO NO ENVELHECIMENTO.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1.2 MODELO DE ENVELHECIMENTO INDUZIDO POR ESTRESSE OXIDATIVO COM D-GALACTOSE .....</b>	<b>21</b>
<b>2.2 O TIMO.....</b>	<b>23</b>
<b>2.2.1 HISTÓRICO, ANATOMIA E HISTOLOGIA.....</b>	<b>23</b>
<b>2.2.2 DIFERENCIACÃO INTRATÍMICA DE LINFÓCITOS T.....</b>	<b>26</b>
<b>2.2.3 CÉLULAS EPITELIAIS TÍMICAS .....</b>	<b>30</b>
<b>2.2.4 INVOLUÇÃO TÍMICA RELACIONADA À IDADE E O PAPEL DA SENESCÊNCIA NAS TECS .....</b>	<b>32</b>
<b>2.2.5 IMPACTO DO ESTRESSE OXIDATIVO NAS TECS E O TIMO.....</b>	<b>36</b>
<b>2.3 PRODUTOS NATURAIS.....</b>	<b>37</b>
<b>2.3.1 FRIEDELINA.....</b>	<b>39</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>42</b>
<b>3.1 OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>42</b>
<b>3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....</b>	<b>42</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>43</b>
<b>4.1 SEÇÃO A – EFEITO <i>IN VITRO</i> DA FRIEDELINA SOBRE CÉLULAS EPITELIAIS TÍMICAS MURINAS .....</b>	<b>43</b>
<b>4.1.1 CULTURA DE CÉLULAS .....</b>	<b>43</b>
<b>4.1.2 ANIMAIS .....</b>	<b>44</b>
<b>4.1.3 TRATAMENTO <i>IN VITRO</i>.....</b>	<b>44</b>
<b>4.1.4 ANÁLISE MORFOLÓGICA .....</b>	<b>44</b>
<b>4.1.5 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR.....</b>	<b>44</b>
<b>4.1.6 IMUNOFLUORESCÊNCIA.....</b>	<b>45</b>
<b>4.1.7 CITOMETRIA DE FLUXO .....</b>	<b>46</b>
<b>4.1.9 ENSAIO DE ADESÃO CÉLULA-CÉLULA .....</b>	<b>47</b>
<b>4.1.10 ENSAIO DE SOBREVIVÊNCIA PELO MÉTODO DE EXCLUSÃO POR TRY PAN BLUE .....</b>	<b>47</b>
<b>4.2 SEÇÃO B – EFEITO DA FRIEDELINA EM CÉLULAS EPITELIAIS TÍMICAS MURINAS INDUZIDAS À SENESCÊNCIA POR ESTRESSE OXIDATIVO .....</b>	<b>47</b>

4.2.1 INDUÇÃO DA SENESCÊNCIA POR ESTRESSE OXIDATIVO COM D-GALACTOSE.....	47
4.2.2 TRATAMENTOS COM FRIEDELINA .....	47
4.2.3 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR.....	48
4.2.4 ENSAIO DE ANÁLISE MORFOLÓGICA.....	48
4.2.5 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	48
4.2.6 IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	49
4.2.7 ENSAIO DE APOTOSE/VIABILIDADE POR ANEXINA V/PI .....	49
4.2.8 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO POR DIHYDRORHODAMINA 123 .....	50
4.2.9 ENSAIO DE MORFOMETRIA NUCLEAR (NUCLEAR MORPHOMETRY ASSAY (NMA)) .....	50
4.2.10 PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (PCRQ).....	52
4.2.11 OBTENÇÃO DOS TIMÓCITOS MURINOS .....	53
4.2.12 ENSAIO DE ADESÃO DE TIMÓCITOS A CÉLULAS EPITELIAIS TÍMICAS .....	53
4.2.13 ENSAIO DE SOBREVIVÊNCIA DE TIMÓCITOS EM COCULTURA COM CÉLULAS EPITELIAIS TÍMICAS .....	54
4.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	54
5 RESULTADOS.....	55
5.1 SEÇÃO A – EFEITO <i>IN VITRO</i> DA FRIEDELINA SOBRE CÉLULAS EPITELIAIS TÍMICAS .....	55
5.1.1 CARACTERIZAÇÃO DA LINHAGEM CELULAR DE CÉLULAS EPITELIAIS TÍMICAS 2BH4 .....	55
5.1.2 VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS 2BH4 APÓS TRATAMENTO COM FRIEDELINA.....	57
5.1.4 PRODUÇÃO DE MATRIZ EXTRACELULAR POR TECS TRATADAS COM FD .....	59
5.1.5 EFEITO DO TRATAMENTO <i>IN VITRO</i> COM FRIEDELINA NA EXPRESSÃO DE RECEPTORES DE SUPERFÍCIE EM CÉLULAS 2BH4.....	60
5.1.6 EFEITOS DO TRATAMENTO <i>IN VITRO</i> COM FRIEDELINA NA ADESÃO DE TIMÓCITOS À TEC.....	62
5.1.7 EFEITOS DO TRATAMENTO <i>IN VITRO</i> COM FRIEDELINA NA SOBREVIVÊNCIA DE TIMÓCITOS EM COCULTURA COM TEC E EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE MHC NA SUPERFÍCIE DAS CÉLULAS EPITELIAIS TÍMICAS.....	64
5.2 SEÇÃO B – EFEITO DA FRIEDELINA EM CÉLULAS EPITELIAIS TÍMICAS MURINAS INDUZIDAS À SENESCÊNCIA POR ESTRESSE OXIDATIVO .....	66

5.2.1 DIMINUIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DAS TECS ATRAVÉS DO ESTRESSE OXIDATIVO.....	66
5.2.2 D-GAL INDUZIU SENESCÊNCIA CELULAR NAS TECS.....	68
5.2.3 AVALIAÇÃO DA SENESCÊNCIA CELULAR POR MORFOMETRIA NUCLEAR.....	70
5.2.4 EFEITO DA FRIEDELINA SOBRE A SENESCÊNCIA INDUZIDA EM CÉLULAS EPITELIAIS TÍMICAS .....	71
5.2.5 FRIEDELINA MODULA A EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DA MATRIZ EXTRACELULAR DE TECS ENVELHECIDAS.....	73
5.2.6 EFEITO DA FRIEDELINA SOBRE ADESÃO DE TIMÓCITOS EM COCULTIVO COM CÉLULAS EPITELIAIS TÍMICAS SENESCENTES .....	77
6 DISCUSSÃO .....	80
7 CONCLUSÃO .....	90
REFERÊNCIAS.....	91
ANEXOS .....	112
ANEXO A - THYMIC EPITHELIAL CELL RESPONSES TO THE FRIEDELIN TRITERPENE <i>IN VITRO</i> – SUBMETIDO À REVISTA NATURAL PRODUCT RESEARCH EM 30/12/23 ACEITO EM 20/20/24 .....	112
ANEXO B - CERTIFICADOS DE APROVAÇÃO PARA O USO DE ANIMAIS EM EXPERIMENTAÇÃO (CEUA/UFAL) .....	124

## 1 INTRODUÇÃO

A senescência celular é um processo de parada irreversível do ciclo celular, acompanhado por alterações fenotípicas e funcionais, e tem sido implicada como um dos principais mecanismos subjacentes ao declínio da função imune associado ao envelhecimento, incluindo a involução tímica (López-Otín *et al.*, 2013). O estresse oxidativo desempenha um papel central nesse processo, atuando como um dos principais indutores da senescência celular e, consequentemente, da involução tímica (Barbouti *et al.*, 2020a). Resultante do desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e os sistemas antioxidantes celulares, o estresse oxidativo tem sido diretamente relacionado à perda da função das células estromais tímicas, como as TECs (Tan *et al.*, 2022). Estudos demonstraram que o acúmulo de danos oxidativos nessas células contribui para a substituição do tecido tímico funcional por tecido adiposo e fibroso (Griffith *et al.*, 2015; Youm *et al.*, 2016). Adicionalmente, o estresse oxidativo pode induzir a transição epitelial-mesenquimal (EMT) nas TECs, processo no qual essas células perdem suas características epiteliais e adquirem um fenótipo mesenquimal, contribuindo para a fibrose e a adipogênese no timo envelhecido (Tan *et al.*, 2022).

O timo, um órgão linfoide primário localizado no mediastino anterior, desempenha um papel crucial no sistema imunológico adaptativo, sendo responsável pela produção e maturação dos linfócitos T, células essenciais para a defesa do organismo contra patógenos e células tumorais (Abbas *et al.*, 2017). A função tímica depende de um microambiente complexo e dinâmico, composto por células estromais, como as células epiteliais tímicas (TECs), e uma rede de moléculas sinalizadoras e da matriz extracelular (Savino *et al.*, 2003). As TECs desempenham um papel fundamental na seleção, diferenciação e maturação dos timócitos, garantindo a geração de um repertório de células T funcional e tolerante aos autoantígenos (Abramson; Anderson, 2017).

Entretanto, o timo sofre um processo de involução progressiva ao longo da vida, caracterizado pela redução do tamanho e da funcionalidade do órgão, com consequente declínio na produção de células T virgens (Palmer, 2013). Essa involução está associada a um aumento da suscetibilidade a infecções, doenças

autoimunes e câncer, como leucemia mieloide crônica (LMC) e câncer cerebral, especialmente em indivíduos idosos (Palmer *et al.*, 2018).

Diante desse cenário, a busca por compostos bioativos capazes de modular a biologia das TECs e mitigar os efeitos deletérios do estresse oxidativo representa uma estratégia promissora para o desenvolvimento de terapias que visem à preservação da função imune em indivíduos mais velhos. Nesse contexto, os produtos naturais, como metabólitos secundários obtidos de plantas, têm sido historicamente uma fonte rica de compostos bioativos com diversas propriedades farmacológicas, incluindo atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e imunomoduladoras (Mishra; Tiwari, 2011; Dias *et al.*, 2012; Saldívar-González *et al.*, 2022; Fijałkowski *et al.*, 2022). A friedelina, um triterpeno pentacíclico amplamente distribuído em diversas fontes vegetais, tem despertado o interesse da comunidade científica devido ao seu potencial antioxidante, anti-inflamatório e imunomodulador (Alves *et al.*, 2018; Singh, 2023). No entanto, a sua influência na biologia do timo e, mais especificamente, nas TECs, permanece pouco elucidada.

Diante disso, o presente estudo propõe investigar os efeitos da friedelina sobre as células epiteliais tímicas *in vitro*, tanto em condições normais quanto em um modelo de senescência celular induzida por estresse oxidativo. Este trabalho busca contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na involução tímica e avaliar o potencial terapêutico de compostos bioativos, como a friedelina, na preservação da função do timo.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Senescência celular

#### 2.1.1 Senescência celular e o papel do estresse oxidativo no envelhecimento

A senescência celular é um fenômeno caracterizado pela parada irreversível do ciclo celular, acompanhada por alterações morfológicas e fisiológicas, conforme descrito por Hayflick e Moorhead (1961). Entre as principais características dessas células estão o aumento do tamanho celular, o aparecimento de vacúolos e a aparência achatada, além da expressão da enzima  $\beta$ -galactosidase associada à senescência (SA- $\beta$ -gal), detectável em pH 6 (Dimri *et al.*, 1995). Essas mudanças distinguem as células senescentes das células quiescentes, que podem retornar à proliferação em resposta a estímulos apropriados (Campisi & D'adda Di Fagagna, 2007).

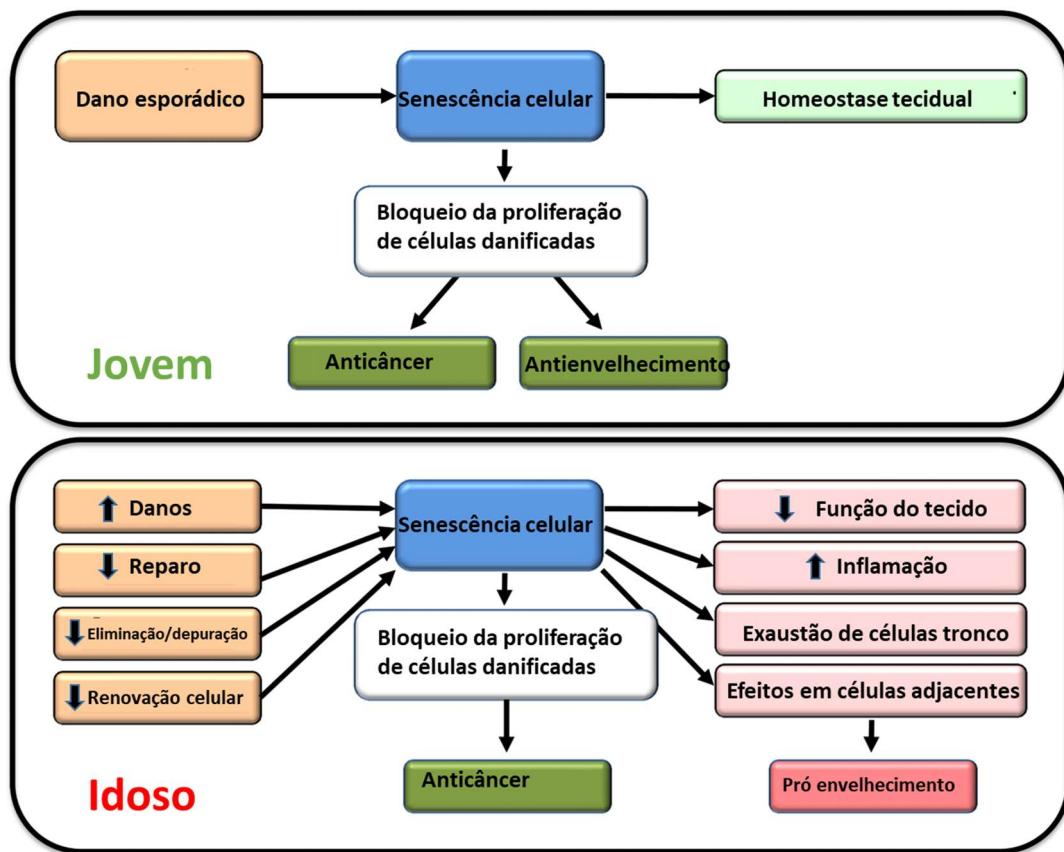
Além disso, as células senescentes apresentam modificações bioquímicas e estruturais que as tornam facilmente identificáveis, como o acúmulo de dano celular, especialmente em seu DNA, proteínas e lipídios, muitas vezes causado por processos de estresse oxidativo (Muñoz-Espín & Serrano, 2014).

As células senescentes, além das alterações morfológicas, secretam uma variedade de fatores bioativos, constituindo o Fenótipo Secretor Associado à Senescência (SASP), conforme descrito por Coppé *et al.* (2008). O SASP inclui citocinas pró-inflamatórias (como IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ ), fatores de crescimento, quimiocinas e metaloproteinases de matriz (MMPs), que podem ter efeitos tanto benéficos quanto deletérios, dependendo do contexto e da duração da secreção (Liu & Hornsby, 2007; Minamino *et al.*, 2009; Davalos *et al.*, 2010; Deursen, 2014).

Enquanto a secreção temporária do SASP pode facilitar a reparação tecidual e a eliminação de células danificadas pelo sistema imune, sua secreção prolongada, especialmente em organismos envelhecidos, contribui para um estado de inflamação crônica de baixo grau, conhecido como inflammaging (Franceschi *et al.*, 2000). Esse estado inflamatório sistêmico pode levar à desorganização tecidual e ao desenvolvimento de doenças associadas ao envelhecimento, como câncer,

aterosclerose e doenças neurodegenerativas (Figura 1, pág. 18) (Minamino *et al.*, 2002; Price *et al.*, 2002; López-Otín *et al.*, 2013; Schosserer *et al.*, 2017).

Figura 1 - Senescência celular.

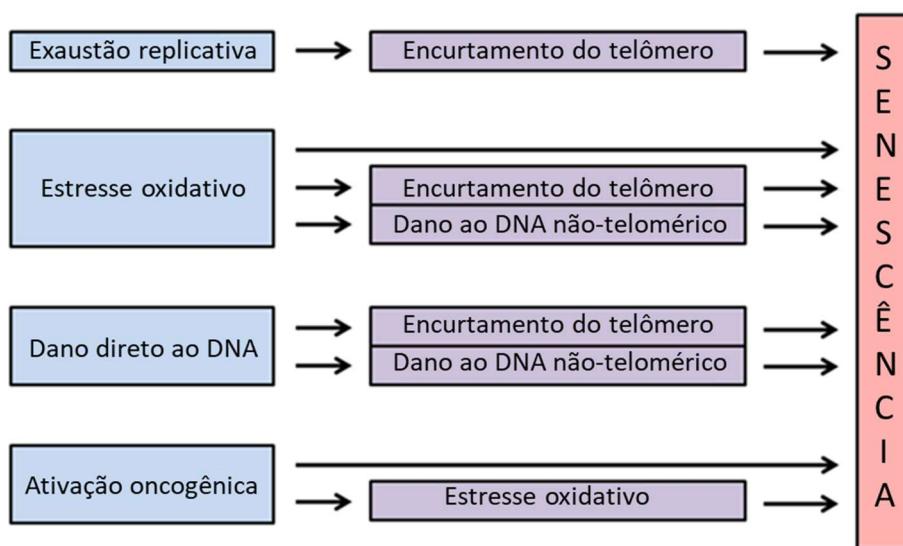


Em organismos jovens, a senescência celular previne a proliferação de células danificadas, portanto, protegendo contra o câncer e contribuindo para a homeostase tecidual. Em organismos velhos, o dano generalizado e a eliminação/depuração e reposição deficientes das células senescentes resultam em seu acúmulo, e isso tem uma série de efeitos deletérios sobre a homeostase tecidual que contribuem para o envelhecimento. Adaptado de López-Otín *et al.*, 2013.

A senescência celular é ativada em resposta a vários fatores estressantes, sendo categorizada em senescência dependente e independente de telômeros (senescência replicativa) e senescência prematura induzida por estresse (Figura 2, pág. 19) (Aravindhan, 2015). A senescência replicativa está ligada ao encurtamento dos telômeros (Harley *et al.*, 1990), enquanto a senescência prematura ocorre devido a danos no telômero ou a danos telômero-independentes (Sikora *et al.*,

2011). Dentre os fatores capazes de induzir senescência pode-se destacar o estresse oxidativo.

Figura 2 - Causas da senescência celular.



A figura representa as causas comuns de senescência celular (em azul) e suas interconexões. Adaptado de Aravinthan, 2015.

Evidências experimentais demonstraram que organismos aeróbicos geram cronicamente EROs, levando ao acúmulo de danos oxidativos em componentes celulares, incluindo DNA, proteínas e lipídios, ao longo do tempo. Este processo induz senescência celular e apoptose, estando mecanicamente ligado a doenças degenerativas associadas ao envelhecimento (Harman, 1998; Giorgio *et al.*, 2007; Muller *et al.*, 2007).

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre moléculas antioxidantes e substâncias oxidantes, favorecendo estas últimas (Lennicke *et al.*, 2016). É conhecido que as células utilizam antioxidantes não enzimáticos (vitaminas C, E, A; bilirrubina; glutationa) e enzimáticos (Superóxido Dismutases - SODs, Glutationa Peroxidase - GPx, Catalase - CAT) para neutralizar as ERO (Guemouri, 1991). No entanto, esses mecanismos de defesa podem ser prejudicados com o envelhecimento, com a diminuição da atividade de SODs e aumento compensatório de catalase e glutationa peroxidase em indivíduos mais velhos (Bolzán; Bianchi; Bianchi, 1997; Kedziora-Kornatowska *et al.*, 2007).

Estudos sobre efeitos reguladores redox específicos de oxidantes demonstraram que, quando em equilíbrio, as ERO desempenham um papel importante nas cascatas de sinalização celular, aumentando ou suprimindo os diversos processos das células, como proliferação ou diferenciação (Sies, 2015; Castro; Grune; Speckmann, 2016). Contudo, o estresse oxidativo crônico, resultante do desequilíbrio na produção e na neutralização de ERO, é um fator que induz a senescência celular (Bauer, 2016). De fato, o tratamento experimental com peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), uma das principais ERO intracelulares, estabelece um forte fenótipo senescente em diferentes linhagens celulares, incluindo fibroblastos e células epiteliais, sugerindo seu papel como potente indutor da senescência celular (Ben-Porath; Weinberg, 2005; Pieńkowska *et al.*, 2020; Cai *et al.*, 2022; Bramey *et al.*, 2023).

O estresse oxidativo desencadeia a senescência celular ao provocar danos ao DNA, ativando mecanismos de reparo mediados pela proteína p53, o que resulta na interrupção da proliferação celular (Liu & Xu, 2011). Codificada pelo gene TP53, a p53 exerce um papel essencial na resposta ao dano celular, funcionando como um sensor que detecta danos no DNA. Dependendo da gravidade do dano, a p53 pode promover a parada do ciclo celular, induzindo a senescência ou, em casos de dano irreversível, a apoptose (Gambino *et al.*, 2013; Nicolai *et al.*, 2015).

Além disso, a p53 regula a expressão de genes associados à senescência, como CDKN1A, que codifica a proteína p21Waf1/Cip1, um inibidor de cinases dependentes de ciclina (CDKs) (Herbig *et al.*, 2004). A p21 é um mediador essencial da parada do ciclo celular, interagindo com o complexo ciclina E/CDK2 e bloqueando a transição G1/S, impedindo que células danificadas prossigam para divisão celular (Ju *et al.*, 2007).

Na senescência celular também ocorre aumento na expressão da proteína p16INK4a, que induz a parada do ciclo celular (Gil; Peters, 2006). Codificada pelo gene CDKN2A, essa proteína inibe as cinases CDK4 e CDK6, mantendo a proteína do retinoblastoma (pRB) ativa e bloqueando a progressão do ciclo celular em G1. O gene CDKN2A, expresso em baixos níveis em tecidos jovens, tem sua expressão aumentada com o envelhecimento (Krishnamurthy *et al.*, 2004).

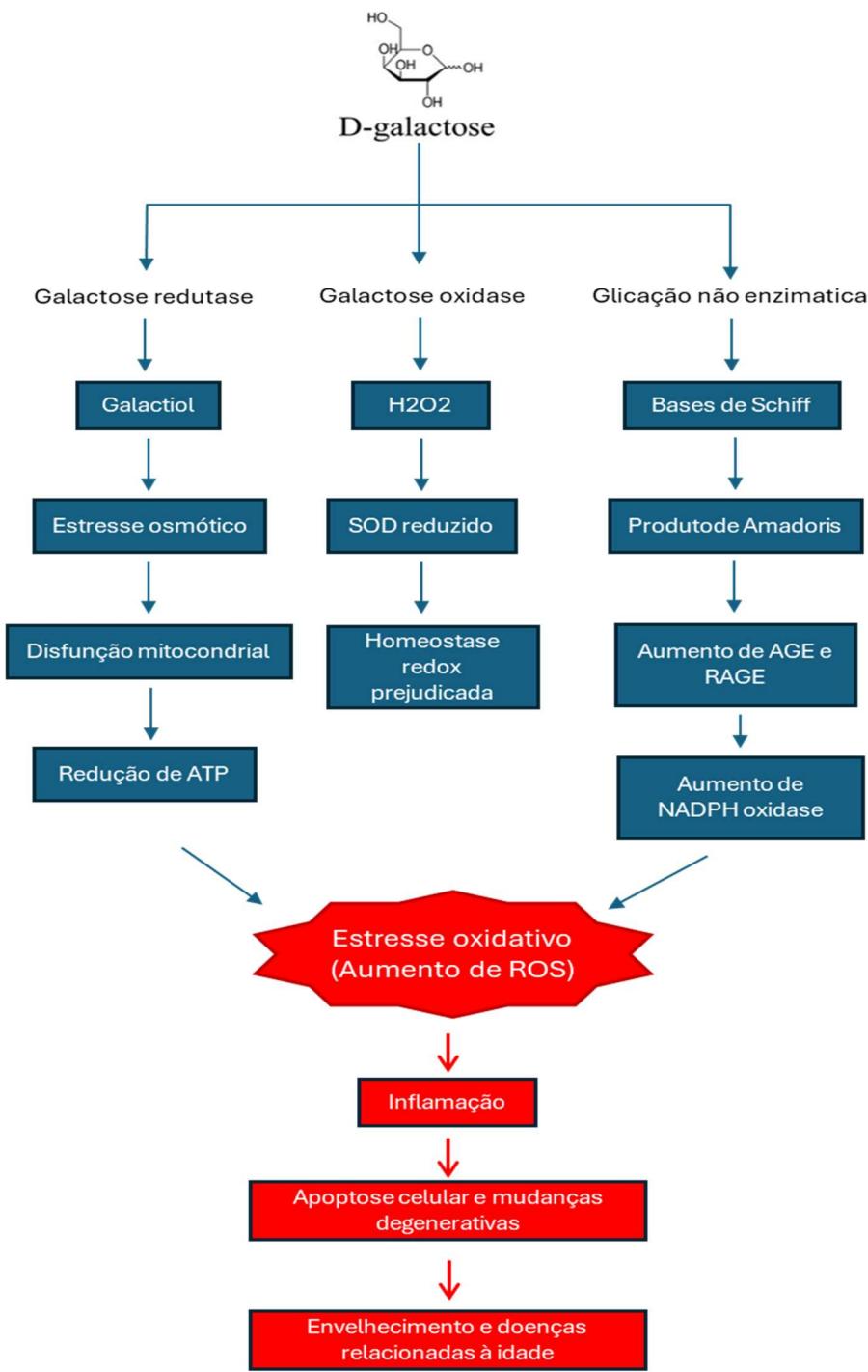
Um estudo demonstrou que a eliminação de células senescentes que expressam p16INK4a em camundongos com envelhecimento acelerado resultou em um atraso significativo no desenvolvimento de fenótipos relacionados à idade, como catarata, perda de massa muscular e perda de tecido adiposo (Baker *et al.*, 2011). Estes resultados evidenciam o papel da via p16/Rb, juntamente com a via p53/p21, como importantes indutores da senescência celular e sugerem que a remoção de células senescentes pode ser uma estratégia promissora para combater o envelhecimento e doenças relacionadas à idade.

Nesse contexto, diversos modelos experimentais têm sido desenvolvidos para investigar os mecanismos da senescência celular induzida por estresse oxidativo. Entre eles, o modelo de envelhecimento induzido por D-galactose tem se destacado por sua eficácia em replicar os processos de envelhecimento celular *in vivo* e *in vitro*.

### **2.1.2 Modelo de envelhecimento induzido por estresse oxidativo com D-galactose**

A D-galactose é amplamente utilizada como um modelo experimental para estudar o envelhecimento induzido por estresse oxidativo tanto *in vivo* quanto *in vitro*. A administração crônica de D-galactose resulta no aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que causam danos oxidativos a componentes celulares, como DNA, proteínas e lipídios, promovendo a senescência celular (Wei *et al.*, 2005; Hsieh *et al.*, 2020). Esse modelo também se destaca pela capacidade de induzir o acúmulo de produtos finais de glicação avançada (AGEs), que exacerbam o estresse oxidativo e estão associados à inflamação crônica e disfunção celular (Figura 3, pág. 22) (Xu *et al.*, 2020).

Figura 3 - Possíveis mecanismos envolvidos no envelhecimento induzido por D-galactose



Os mecanismos envolvidos no envelhecimento induzido por D-galactose incluem: (1) a redução de D-galactose pela galactose redutase, resultando na formação de galactitol, que causa estresse osmótico e disfunção mitocondrial; (2) a oxidação da D-galactose pela galactose oxidase, gerando peróxido de hidrogênio, o que diminui os níveis de SOD e prejudica a homeostase redox; e (3) a reação da D-galactose com aminas, formando

compostos de base de Schiff e produtos de Amadori, o que aumenta AGE, RAGE e NADPH oxidase. Esses processos levam ao estresse oxidativo e à ativação de vias inflamatórias, resultando em apoptose celular e alterações degenerativas, culminando em envelhecimento e doenças relacionadas à idade. Adaptado de Azman e Zakaria (2019).

Além dos efeitos em tecidos periféricos, o modelo de D-galactose afeta diretamente o sistema imunológico. Ele tem sido utilizado para estudar a involução tímica e a senescência das células estromais tímicas, resultando no acúmulo de EROs no microambiente tímico. Isso leva à degradação da arquitetura do timo e à redução da produção de linfócitos T, comprometendo assim a função imunológica (Kawata *et al.*, 2021; Tan *et al.*, 2022).

Esse modelo de indução de senescência tem se mostrado uma ferramenta eficaz para investigar os mecanismos moleculares do envelhecimento e as suas consequências sistêmicas. Estudos sugerem que a combinação de intervenções antioxidantes com o modelo de D-galactose pode atenuar os efeitos deletérios do estresse oxidativo, abrindo caminho para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que visem retardar o envelhecimento e prolongar a saúde (Xu *et al.*, 2020; Kawata *et al.*, 2021).

Compreender os mecanismos de envelhecimento e senescência celular é fundamental para analisar como esses processos afetam diferentes órgãos e tecidos, particularmente o sistema imunológico. Entre os órgãos mais impactados pelo envelhecimento está o timo (Hakim *et. al.*, 2004a).

## 2.2 O Timo

### 2.2.1 Histórico, anatomia e histologia

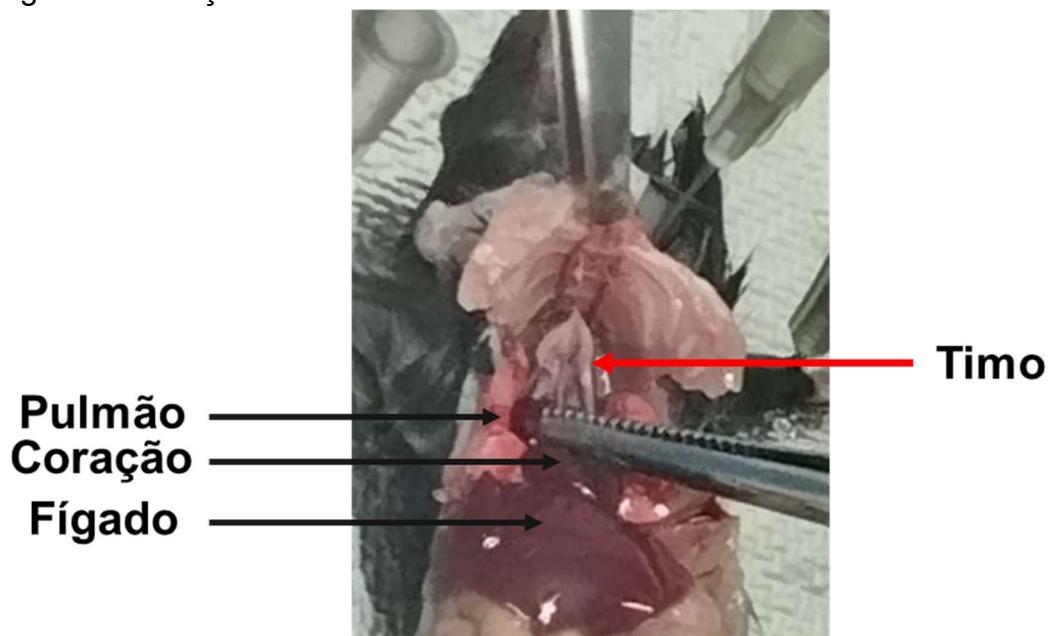
Galen (cerca de 129-216 d.C.), um proeminente médico grego, foi o primeiro a descrever a glândula timo, ainda que com o conhecimento limitado de sua época (Laios, 2018). Ele a associou ao sistema linfático e acreditava em seu papel na produção do "pneuma", ou espírito vital. Suas observações, baseadas em dissecações de animais, lançaram as bases para futuras explorações do timo. Curiosamente, Galeno também foi o pioneiro em observar que o tamanho e o peso do timo diminuem com a idade, um fenômeno que hoje é conhecido como involução

tímica. Embora muitas de suas teorias tenham sido refutadas com o avanço da ciência, suas descrições anatômicas iniciaram um importante diálogo sobre a função do timo (Csaba, 2016).

Séculos depois, no século 20, o imunologista franco-australiano Jacques Miller revolucionou a compreensão do papel do timo no sistema imunológico (Ribatti *et al.*, 2006; Liu; Ellis, 2016;). Através de timectomias em camundongos, ele descobriu a importância crucial do timo para o desenvolvimento dos linfócitos T, células essenciais para a imunidade adaptativa. Sua pesquisa demonstrou que a ausência de um timo funcional resulta em grave imunodeficiência, consolidando o timo como um órgão central na imunidade (Miller, 1961; Askin; Young, 2001). Além disso, seu trabalho lançou as bases para a compreensão da involução tímica, processo de diminuição do tamanho e da função do timo com o envelhecimento, que leva a um declínio na produção de células T (Dowling; Hodgkin, 2009).

Em camundongos, o timo tem sua origem na terceira bolsa faríngea durante o desenvolvimento embrionário. Assim como nos humanos, ele migra para a sua localização final no mediastino anterior, posicionando-se à frente dos grandes vasos que irrigam o coração (Figura 4, pág. 24) (Campinoti *et al.*, 2020).

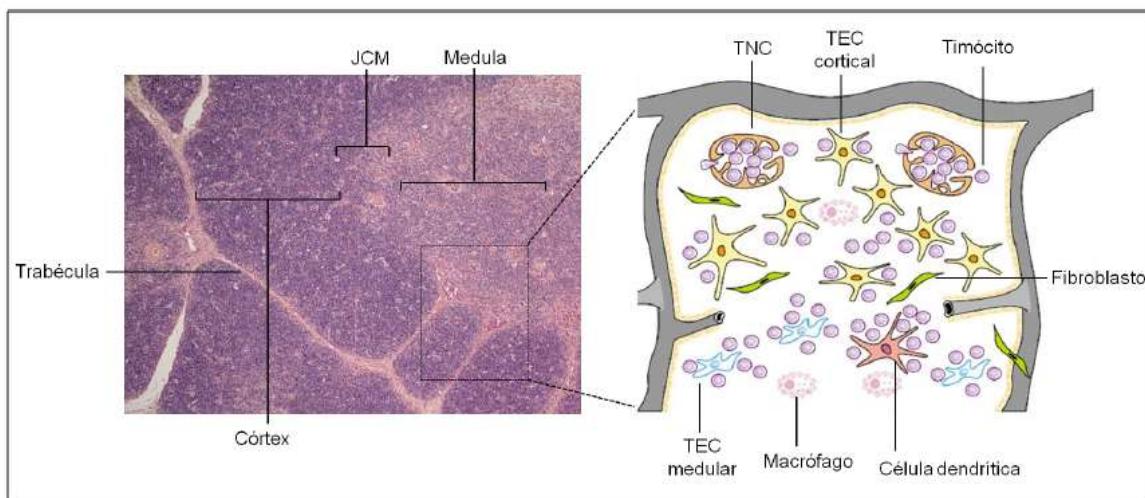
Figura 4 - Posição anatômica do timo murino.



Localização do timo murino. Fonte: Autor.

Este órgão bilobado, revestido por uma cápsula fibrosa que o subdivide em lóbulos, possui uma arquitetura única composta por fibroblastos, células endoteliais, macrófagos, células dendríticas e, principalmente, células epiteliais tímicas (TECs), além de uma matriz extracelular de suporte, que juntos criam o microambiente necessário para o desenvolvimento dos timócitos em linfócitos T competentes (Nitta, 2016; Campinoti *et al.*, 2020) (Figura 5, pág. 25).

Figura 5 - Arquitetura microscópica e microambiente tímico



Fotomicrografia mostra à esquerda a arquitetura microscópica do timo humano por coloração de hematoxilina-eosina. No inserto estão representados graficamente os componentes do microambiente tímico. TEC: célula epitelial tímica; JCM: Junção córticomedular; TNC: complexo Nurse tímico. Fonte: Reis (2015).

Cada lóbulo tímico é dividido em duas regiões distintas: o córtex, localizado na porção mais externa e de coloração mais escura, que abriga muitos linfócitos imaturos (timócitos) e células estromais, como as TECs e macrófagos, sendo o local onde ocorre a seleção positiva dos timócitos; e a medula, região interna e mais clara devido ao menor número de linfócitos, contém linfócitos maduros ou em estágios finais de diferenciação, TECs, células dendríticas e linfócitos B, e é responsável pela seleção negativa (Pearse, 2006; Vaidya *et al.*, 2016).

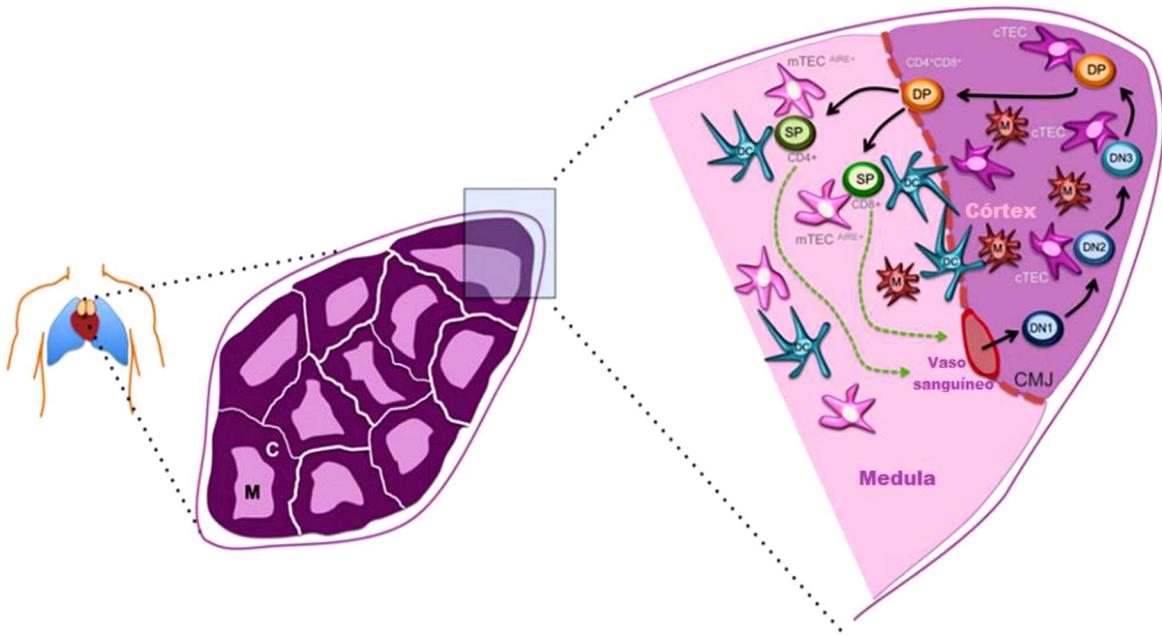
Entre o córtex e a medula, encontra-se a junção córticomedular, rica em vasos sanguíneos, que atua como ponto de entrada para os precursores de

linfócitos T e de saída para as células maduras, garantindo a dinâmica do processo de maturação (Pearse, 2006).

### **2.2.2 Diferenciação intratímica de linfócitos T**

No timo, as células precursoras hematopoiéticas provenientes da medula óssea entram em um processo complexo de diferenciação que culmina na produção de linfócitos T imunocompetentes, que são exportados para a periferia, onde exerçerão papel importante na imunidade. A diferenciação intratímica inicia-se ainda no timo fetal com a entrada de células precursoras hematopoiéticas, atraídas pela ação quimiotática das quimiocinas produzidas pelo estroma tímico (Ladi *et al.*, 2006; Ramond *et al.*, 2014). Essas células precursoras são constituídas pelas células progenitoras tímicas iniciais (ETP; *early thymic progenitor*), que iniciam a sua diferenciação progredindo em diferentes estágios de desenvolvimento definidos de acordo com a expressão das moléculas co-receptoras CD4 (*cluster* de diferenciação 4) e CD8 (*cluster* de diferenciação 8) (Figura 6), reconhecidos como duplo-negativo (DN), duplo-positivo (DP) e simples-positivo (SP). Em camundongos, o estágio duplo negativo (DN) contém quatro subtipos de timócitos definidos pela expressão diferencial de CD44 e CD25 denominados de DN1, DN2, DN3 e DN4. Já em humanos, os estágios das populações DN são caracterizadas pela expressão sequencial de CD34, CD38 e CD1a (Figura 6, pág. 27) (Majumdar; Nandi, 2018).

Figura 6 - Diferenciação intratímica de linfócitos T e o microambiente tímico.



Representação esquemática da diferenciação dos timócitos, mostrando a entrada de precursores de linfócitos T através de vasos sanguíneos localizados na junção córtico-medular (CMJ). Após entrarem no timo, durante o processo de diferenciação, os timócitos migram para o córtex e, posteriormente, para a medula. O painel mostra um lóbulo tímico onde estão ilustrados os vários componentes celulares do microambiente tímico que interagem com os timócitos. DC: célula dendrítica; M: macrófagos; cTEC: célula epitelial tímica cortical; mTEC: célula epitelial tímica medular; DN: timócito duplo-negativo; DP: timócito duplo-positivo; SP: timócito simples-positivo. Modificado de Vaidya, Leon, Blackburn, 2016.

As ETPs entram no timo através das grandes vênulas presentes na junção córticomedular, e são fenotipicamente identificadas como células DN1 (camundongos:  $CD44^+CD25^-$ ; humanos:  $CD34^+$ ,  $CD38^-$ ,  $CD1a^-$ ). Por sua vez, os timócitos DN1 interagem com as TEC presentes na região cortical através de ligantes da família NOTCH, como *Delta-like ligand 1* (DLL1) e 4 (DLL4), ativando a maquinaria celular que os direciona para diferenciação em linfócitos T (Schmitt *et al.*, 2004; Heinzel *et al.*, 2007). As células DN1 ativadas proliferam e originam a população de timócitos DN2 ( $CD44^+CD25^+$ ;  $CD34^+$ ,  $CD38^+$ ,  $CD1a^-$ ) que, por sua vez, modula a expressão de moléculas de superfície e migra para a região subcapsular do timo, enquanto iniciam o rearranjo dos loci gênicos das cadeias  $\beta$ ,  $\delta$

e  $\gamma$  do receptor de células T (TCR, *T cell receptor*). Durante esse processo, os timócitos DN2 entram no estágio DN3 (CD44-CD25 $^{+}$ ; CD34 $^{+}$ , CD38 $^{+}$ , CD1a $^{+}$ ), em que as células param de proliferar e sofrem o primeiro ponto de checagem do processo de diferenciação chamado de seleção  $\beta$ .

Na seleção  $\beta$ , a cadeia  $\beta$  do TCR rearranjada se associa a uma cadeia  $\alpha$  invariante (pTa) e às moléculas CD3, para formar um complexo pré-TCR que interage com moléculas do estroma tímico. Essa interação ativa sinais que inibem a morte por apoptose, estimulam a expansão celular e inibem a recombinação do lócus do TCR $\beta$  por exclusão alélica. Os timócitos que não expressam o TCR $\beta$  eficientemente não recebem os sinais de sobrevivência e morrem por apoptose. Dessa maneira, a seleção  $\beta$  assegura que somente os timócitos contendo TCR $\beta$  correto prossigam na diferenciação (Ciofani; Zúñiga-Pflücker, 2007). Os timócitos DN3 de camundongos diminuem a expressão de CD25, formando a população DN4 (CD44-CD25 $^{-}$ ), que rapidamente expressa as moléculas co-receptoras CD4 e CD8, dando origem aos timócitos DP, os quais iniciam o rearranjo no lócus gênico da cadeia  $\alpha$  definitiva do TCR (Boudil *et al.*, 2015).

Os timócitos DP que expressam corretamente o TCR (CD4 $^{+}$ CD8 $^{+}$ TCR $^{\text{low}}$ ) iniciam o processo de seleção positiva, o segundo ponto de checagem da diferenciação intratímica, interagindo com moléculas MHC (do inglês Major Histocompatibility Complex) carregadas com peptídeos de抗ígenos próprios (complexo MHC:peptídeo) expressas por TECs presentes na região cortical (Klein *et al.*, 2014). Uma interação de afinidade/avidez intermediária entre o TCR e o complexo MHC:peptídeo de classe I leva a diminuição da expressão de CD4, mantendo somente a expressão de CD8. Enquanto uma interação com o complexo MHC:peptídeo de classe II diminui a expressão de CD8 e mantém a do CD4 na membrana. Aqueles que não interagem ou que interagem com grande afinidade/avidez com o complexo são eliminados por apoptose (Kurobe *et al.*, 2006).

A seleção positiva origina os timócitos SP CD4 $^{+}$  (CD4 $^{+}$ CD3 $^{+}$ TCR $^{\text{high}}$ ) e CD8 $^{+}$  (CD8 $^{+}$ CD3 $^{+}$ TCR $^{\text{high}}$ ), que migram para a região medular do timo, onde ocorre o ponto de checagem final chamado de seleção negativa. Nesse processo, as TECs da região medular apresentam aos timócitos SP peptídeos de抗ígenos tecido-específicos (TRAs, *tissue-restricted antigens*) expressos pelas mTECs sob a

regulação do fator de transcrição *autoimmune regulator* (AIRE) (Liston *et al.*, 2003; Yamano *et al.*, 2015). AIRE é responsável por induzir a expressão de centenas de TRAs, facilitando a eliminação de timócitos autorreativos por meio da seleção negativa. Além disso, AIRE regula a transcrição de miRNAs, que desempenham um papel importante no controle pós-transcricional dos PTAs, garantindo a eliminação adequada de clones autorreativos e prevenindo autoimunidade (Passos *et al.*, 2015, 2017). Adicionalmente, AIRE colabora com moléculas como SIRT1, que desacetila o domínio SAND de AIRE, permitindo a progressão da transcrição de TRAs no timo. Essa interação com SIRT1 e RNA Pol II é fundamental para a regulação transcricional durante a seleção negativa (Santos *et al.*, 2022).

A interação forte entre os timócitos e os抗ígenos próprios leva à morte por apoptose, enquanto uma interação fraca favorece a sobrevivência e completa a diferenciação. Esse processo é crucial para a eliminação de timócitos autorreativos, parte da tolerância central, que previne respostas autoimunes. Além disso, alguns timócitos CD4+ autorreativos são redirecionados para diferenciação em linfócitos T reguladores, contribuindo ainda mais para a manutenção da tolerância central (Klein *et al.*, 2014).

Depois de alguns dias na região medular, os timócitos SP imunocompetentes emigram do timo pelas vênulas pós-capilares da junção córticomedular e vão povoar os tecidos e órgãos linfoideos secundários como baço, linfonodos e placas de Peyer, integrando a população de linfócitos náves periféricos e auxiliando na manutenção de diferentes repertórios de TCR (Majumdar; Nandi, 2018). Os linfócitos T CD4+ reconhecem抗ígenos carregados em moléculas MHC de classe II presentes na membrana de células apresentadoras de抗ígeno, de forma a auxiliar fagócitos na eliminação de microrganismos extracelulares e ativar a diferenciação de linfócitos B para produção de anticorpos (Taniuchi, 2018). Enquanto o principal papel dos linfócitos T CD8+ é de reconhecer抗ígenos carregados no MHC de classe I, direcionando a eliminação de células infectadas por vírus ou outros patógenos intracelulares (Biswas *et al.*, 2013).

Além dessas subpopulações clássicas de linfócitos T, também existe um grupo distinto de linfócitos, as células T gama-delta ( $\gamma\delta$ ). Esse grupo distinto de linfócitos T, caracterizado por receptores TCR formados pelas cadeias gama e delta,

desempenham papéis críticos tanto na imunidade inata quanto adaptativa. Elas se desenvolvem no timo a partir de timócitos duplo-negativos (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) e, ao contrário das células T alfa-beta, não passam pelos processos de seleção positiva e negativa dependentes de MHC, o que permite uma rápida resposta a infecções e danos teciduais, especialmente em superfícies epiteliais e mucosas. Subdivididas em dois principais subtipos, V $\delta$ 1, que atua na homeostase tecidual, e V $\delta$ 2, envolvido na vigilância imunológica, essas células também são reconhecidas pela sua capacidade de eliminar células tumorais por meio da liberação de moléculas citotóxicas e citocinas (Fiala *et al.*, 2020; Davis *et al.*, 2021).

O desenvolvimento e a maturação dos linfócitos T são altamente dependentes do microambiente tímico, onde diversas células estromais fornecem sinais cruciais. Entre essas células, as TECs desempenham um papel central, produzindo fatores solúveis e expressando ligantes e receptores que regulam a migração e a maturação dos linfócitos (Wang *et al.*, 2020).

### 2.2.3 Células epiteliais tímicas

As TECs são o tipo celular estromal mais abundante no timo, formando um tecido heterogêneo em termos de localização, de fenótipo e de função. Classicamente, essas células são divididas em dois subtipos de acordo com a sua localização no órgão: as TECs corticais (cTEC) e as medulares (mTEC) (Abramson; Anderson, 2017). Recentemente, estudos demonstraram a existência de diferentes subpopulações tanto de cTEC quanto de mTEC, determinadas pela expressão de diferentes moléculas de superfície e de fatores solúveis, evidenciando o alto grau de heterogeneidade dessas células (Bornstein *et al.*, 2018; Kadouri *et al.*, 2019).

As cTECs são caracterizadas pela expressão das moléculas de superfície EpCAM e Ly-51 além da produção da citoqueratina 8 (Wang *et al.*, 2020). Essas células também são as principais produtoras das quimiocinas CXC-*chemokine ligand* 12 (CXCL12) e CC-*chemokine ligand* 25 (CCL25), do Delta-like ligand 4 (DLL4) e da interleucina-7 (IL-7), que são importantes para o recrutamento de precursores hematopoiéticos, para o comprometimento com a linhagem de linfócitos T e pela proliferação e sobrevivência dos timócitos em maturação, respectivamente (Abramson; Anderson, 2017). Além disso, as cTECs também atuam na seleção

positiva dos timócitos, principalmente através da expressão das moléculas do MHC I e II (Ciofani; Zúñiga-Pflücker, 2007). As cTECs formam complexos linfoepiteliais denominados complexos *Nurse* tímicos (TNC, *thymic nurse complex*) que abrigam linfócitos em desenvolvimento (Wekerle *et al.*, 1980). Um Estudo mostrou que as cTECs possuem duas subpopulações distintas determinadas pela expressão de DLL4, as cTEC DLL4<sup>hi</sup> e DLL4<sup>lo</sup>, contudo ainda não foi esclarecido se esta diferença afeta a função das células (Fiorini *et al.*, 2008).

Já as mTECs são reconhecidas fenotipicamente pela expressão de EpCAM, aglutinina 1 de *Ulex europaeus* (UEA-1) e pela citoqueratina 5 (Wang *et al.*, 2020). Essas células parecem apresentar alta heterogeneidade, com a presença de diferentes subpopulações (Ragazzini *et al.*, 2023). Estudos realizados com o com timo de camundongos adultos revelaram que TEC positivas para podoplanina são componentes da junção córticomedular chamadas de jTEC e dão origem aos outros tipos de mTEC como as mTEC positivas para CCL21 e as mTEC positivas para o fator de transcrição AIRE, com alta expressão de MHC II, que por sua vez dão origem às mTEC semelhantes a corneócitos e as células *tuft* tímicas (Onder *et al.*, 2015; Miragaia *et al.*, 2018). Coletivamente, as mTECs são responsáveis pela atração dos timócitos positivamente selecionados, pela indução de tolerância central e migração das células T maduras para a periferia (Ciofani; Zúñiga-Pflücker, 2007; Nitta *et al.*, 2008).

Além da sua participação efetiva na diferenciação intratímica, já foi demonstrado que as TECs são capazes de produzir diversos tipos de moléculas de matriz extracelular (MEC) como fibronectina, colágeno IV, diferentes isoformas de laminina, galectinas e glicosaminoglicanos como heparan sulfato e ácido hialurônico que garante a manutenção da estrutura tridimensional do microambiente tímico, formando um arcabouço de sustentação propício para a migração dos timócitos (Savino *et al.*, 2004). Nesse cenário, destacam-se as lamininas, moléculas presentes por todo o parênquima tímico e que podem atuar em conjunto com quimiocinas e fatores de crescimento, direcionando a migração dos timócitos (Smaniotto *et al.*, 2005; Savino *et al.*, 2015).

Adicionalmente, as TECs expressam receptores pelos quais interagem com a MEC do ambiente e com timócitos (Lannes-Vieira *et al.*, 1993; Fernández *et al.*,

1994; Amarante-Mendes *et al.*, 1995). O epitélio tímico também serve como uma fonte de diversos tipos de hormônios e fatores de crescimento que contribuem para homeostasia do órgão, além de estar sob a influência de várias substâncias presentes na circulação sanguínea (Savino *et al.*, 2016).

Falhas no desenvolvimento das TECs, como aquelas observadas em indivíduos mutantes para o fator de transcrição forkhead box N1 (FOXN1), principal regulador da função dessas células, acarreta na falta do timo e consequente diminuição na produção de linfócitos T (Pignata *et al.*, 1996; Boehm, 2008). Além disso, fatores como o envelhecimento, estresse, infecções e doenças crônicas também podem interferir com a função e a manutenção das TECs (Wang *et al.*, 2020).

Diante desses argumentos, as TECs emergem como alvos promissores para o desenvolvimento de novas terapias contra distúrbios imunes, como a imunodeficiência combinada grave (SCID) e diversas doenças autoimunes, incluindo diabetes tipo 1 e miastenia gravis (Vogel *et al.*, 2002; Le Panse *et al.*, 2010; Geenen, 2014). Essas terapias podem ainda ser direcionadas à preservação da função imune em indivíduos mais velhos, durante a involução tímica relacionada à idade. Com o avanço da idade, as alterações nas TECs contribuem para o processo de involução tímica, que está intimamente associado ao declínio da função imunológica.

#### **2.2.4 Involução tímica relacionada à idade e o papel da senescência nas TECs**

A involução tímica, um processo fisiológico de redução gradual no tamanho e da função do timo, é um componente central da imunosenescênci (Taub; Longo, 2005), se inicia precocemente na vida e é influenciada por fatores genéticos, ambientais e hormonais (Guo *et al.*, 2022; Liang *et al.*, 2022). Além disso, a diminuição do compartimento linfoide no timo durante o envelhecimento reduz a geração de novos linfócitos, prejudicando a capacidade de resposta a novos抗ígenos e a eficácia da imunização em pessoas idosas (Cepeda; Griffith, 2018). Estudos matemáticos sugerem que a atrofia tímica associada ao envelhecimento pode aumentar o risco de desenvolvimento de neoplasias (Palmer *et al.*, 2018). Adicionalmente, falhas na expressão de抗ígenos relacionados ao tecido (TRAs)

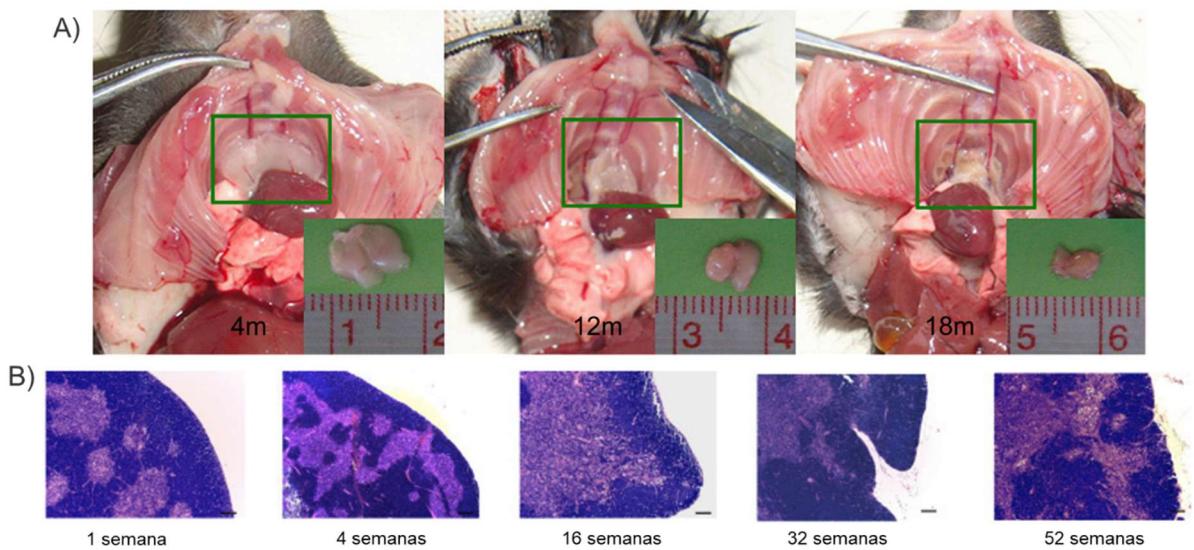
pelas mTEC podem comprometer a tolerância central e levar à geração de linfócitos autorreativos, desencadeando doenças autoimunes (Wang *et al.*, 2020).

A nível celular e molecular, a involução tímica é marcada pela diminuição das TECs e aumento do tecido adiposo, comprometendo o microambiente para a linfopoiese (Aw *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2009). A expressão do fator de transcrição FOXN1, crucial para a função das TECs, diminui com a idade, correlacionando-se com o início da involução e a perda da produção de timócitos (Chen *et al.*, 2009; Zook *et al.*, 2011). Além disso, processos inflamatórios e a desregulação de microRNAs também contribuem para esse processo (Youm *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2017). A diminuição da expressão de *AIRE* no timo durante o envelhecimento está associada à perda da função imune, especialmente pela falha na apresentação de TRAs pelas mTECs, o que pode levar ao aumento de linfócitos autorreativos e à autoimunidade (Passos *et al.*, 2017). Estudos demonstram que a senescência das TECs e a disfunção do *AIRE* podem resultar em uma diminuição da capacidade do timo de realizar a seleção negativa de timócitos autorreativos, exacerbando doenças autoimunes em modelos murinos e humanos idosos (Matsumoto *et al.*, 2023; Santos *et al.*, 2022)

Durante o envelhecimento do timo, ocorre uma transição significativa nas populações de TECs com uma diminuição das cTECs e um aumento relativo das células mTECs. A perda de cTECs, essenciais para a seleção positiva de timócitos e para a produção de linfócitos T naïves, está associada a processos como apoptose e transdiferenciação (Dumont-Lagacé *et al.*, 2015). Enquanto a quantidade de mTECs pode inicialmente diminuir, algumas delas podem proliferar em resposta a sinais específicos, mantendo um equilíbrio dinâmico (Lepletier *et al.*, 2018). Além disso, a expressão do *AIRE* nas mTECs é crucial para a tolerância central, e sua função pode ser afetada pelo estado do microambiente tímico durante a involução (Matsumoto *et al.*, 2023). Essas mudanças nas TECs impactam a produção e a diversidade dos linfócitos T, refletindo o impacto da involução tímica na imunossenescência (Guo *et al.*, 2013).

Além disso, como demonstrado na figura 7 (pág. 34), o timo envelhecido sofre alterações estruturais, incluindo a desorganização da junção corticomedular e a perda dos lóbulos tímicos, que são substituídos por fibroblastos e adipócitos (Franckaert *et al.*, 2015). Essas mudanças resultam em uma menor produção de células T naïve, impactando a resposta imune adaptativa (Taub; Longo, 2005).

Figura 7 - Alterações anatômicas e estruturais na involução tímica.



A) Degeneração tímica e alterações fenotípicas causadas pelo envelhecimento. B) Alterações dependentes da idade na arquitetura tímica, conforme demonstrado por coloração representativa HE de seções tímicas. As barras de escala representam 150  $\mu$ m. As ilhas medulares coram-se em roxo claro, enquanto as regiões corticais coram-se em roxo escuro. Adaptado de Baran-Gale *et al.*, 2020 e Li *et al.*, 2024.

O circuito somatotrópico intratímico, composto por GH, IGF-1, grelina e somatostatina, desempenha um papel essencial na involução tímica (Reis *et al.*, 2023). A redução de sua atividade contribui diretamente para a perda da função do timo, especialmente com o envelhecimento. Estudos mostraram que a administração de GH e IGF-1 em modelos animais idosos não só restaura a arquitetura tímica como também aumenta a proliferação de timócitos, revertendo a involução do timo (Lévy *et al.*, 1991; Barbarin *et al.*, 2007; Rezzani *et al.*, 2008). Em ensaios clínicos, o tratamento com GH, em combinação com metformina e DHEA, resultou em aumento do tamanho do timo e reposição de linfócitos T naïve (Fahy *et al.*, 2019; Morrhaye *et al.*, 2024; Reis *et al.*, 2023). Dessa forma, os efeitos benéficos observados com a administração de GH e IGF-1 em modelos animais e ensaios clínicos encontram respaldo nos mecanismos moleculares subjacentes.

Estudos recentes demonstram que, além de restaurar a arquitetura tímica, o GH e o IGF-1 modulam diretamente as interações entre timócitos e células estromais, promovendo adesão, migração e sobrevivência celular, aspectos cruciais para a manutenção da homeostase do timo (Lins *et al.*, 2016; Vieira *et al.*, 2022;

Viana *et al.*, 2015; Lins *et al.*, 2020). Por exemplo, o GH estimula a produção de proteínas da matriz extracelular, como a laminina, e facilita a maturação de linfócitos T por meio de interações com moléculas de adesão, enquanto o IGF-1 aumenta a sobrevivência das células CD4+ e modula a expressão de citocinas no microambiente tímico (Lins *et al.*, 2016; Vieira *et al.*, 2022). Além disso, o IGF-1 tem sido associado ao aumento da expressão de proteínas da matriz extracelular, como laminina e fibronectina, essenciais para a organização estrutural do timo e para as interações célula-célula (Viana *et al.*, 2015). Finalmente, o IGF-1 também contribui para a preservação da função imunológica no envelhecimento, prolongando a sobrevida de células T funcionais (Lins *et al.*, 2020; Vieira *et al.*, 2022). Assim, a manipulação do eixo GH-IGF1 não apenas restaura a estrutura tímica, mas também melhora a função imunológica, promovendo a maturação contínua de células T funcionais.

Esses resultados sugerem que a manipulação do circuito somatotrópico é uma estratégia terapêutica promissora para reverter a involução tímica relacionada à idade, melhorar a resposta imunológica e reduzir a vulnerabilidade a doenças infecciosas em idosos (Napolitano *et al.*, 2008; Reis *et al.*, 2023).

Além disso, intervenções moleculares, como a superexpressão de FOXN1, e intervenções metabólicas, como a restrição calórica, também têm demonstrado potencial para mitigar a involução tímica e preservar a função do timo (Bredenkamp *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2009). A expressão de FOXN1, que está diretamente envolvida na regulação da senescência celular, diminui com a idade, possivelmente devido a mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA (Reis *et al.*, 2015). Assim, estratégias combinadas, que incluam a manipulação de fatores hormonais e epigenéticos, podem se mostrar eficazes para preservar a função do timo e prolongar a imunocompetência durante o envelhecimento.

Contudo, mesmo com essas intervenções promissoras, o estresse oxidativo persiste como um importante fator responsável pelo declínio funcional do timo durante o envelhecimento. Esse estresse contínuo exerce efeitos profundos no microambiente tímico, acelerando a senescência das células epiteliais tímicas (TECs) e comprometendo ainda mais a função imunológica.

## 2.2.5 Impacto do estresse oxidativo nas TECs e o timo

No timo, o estresse oxidativo desempenha um papel central na aceleração da senescência das células epiteliais tímicas (TECs), conforme demonstrado por Tan *et al.* (2022). Este órgão é particularmente sensível aos efeitos deletérios do estresse oxidativo, resultando em alterações estruturais e funcionais que incluem a redução do tamanho, desequilíbrios na composição das células T, aumento da senescência das TECs e inflamação crônica (Kawata *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2020; Guo *et al.*, 2022). Um estudo mostrou que há uma deficiência acentuada na enzima antioxidante catalase nas células estromais tímicas, especialmente nas TECs, o que as torna particularmente vulneráveis ao dano no DNA induzido por espécies reativas de oxigênio (ROS) (Griffith *et al.*, 2015).

Diversas vias de sinalização, como a Wnt, e a regulação mediada por microRNAs também estão envolvidas na regulação da senescência das TECs, destacando a complexidade desse processo (Kvell *et al.*, 2010; Talaber *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2013). A relação entre a senescência das TECs e o desenvolvimento de autoimunidade também é relevante: estudos com camundongos idosos deficientes no gene AIRE mostraram senescência acelerada das TECs, associada ao aumento de autoimunidade, enfatizando a importância das TECs na manutenção da tolerância imunológica (Zhang *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2019).

Além da senescência, o estresse oxidativo também promove a transição epitelial-mesenquimal (EMT), um processo em que as TECs perdem suas características epiteliais e adquirem um fenótipo mesenquimal, diferenciando-se em fibroblastos e adipócitos (Yang *et al.*, 2023). Essa transformação contribui para a fibrose e adipogênese no timo envelhecido, substituindo o tecido funcional por tecido conjuntivo fibroso e adiposo (Lepletier *et al.*, 2015; Tan *et al.*, 2022; Youm *et al.*, 2019).

O acúmulo de ROS nas células estromais tímicas, particularmente nas TECs, é um fator chave para a indução da EMT no envelhecimento (Barbouti *et al.*, 2020b). O estresse oxidativo causa danos nas junções intercelulares, facilitando o desprendimento das células epiteliais e o início da EMT. Esse processo envolve a remodelação do citoesqueleto e a expressão de marcadores mesenquimais, como

vimentina e N-caderina (Inumaru *et al.*, 2009). Além disso, o estresse oxidativo ativa vias de sinalização, como a MAPK e o fator de transcrição Snail, que são essenciais para a transição fenotípica durante a EMT (Scribble *et al.*, 2008). Esses mecanismos exacerbam a fibrose e a deposição de tecido adiposo, comprometendo ainda mais a função imunológica do timo.

Diante desse cenário, a busca por compostos naturais com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias que possam reverter ou atenuar os efeitos deletérios do estresse oxidativo no timo tem se intensificado (Wei *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2021). Compostos como a curcumina e o resveratrol demonstraram resultados promissores em modelos *in vivo*, protegendo o timo contra o envelhecimento acelerado. A curcumina, por exemplo, promove a proliferação celular, reduz a apoptose e aumenta a expressão de AIRE (Li *et al.*, 2021). Já o resveratrol restaura a proporção de células T CD4+ e CD8+, além de aumentar a expressão de AIRE e do receptor de linfotoxina-beta (LT $\beta$ R), contribuindo para a recuperação da função do timo (Wei *et al.*, 2020).

Esses achados reforçam o potencial terapêutico de compostos naturais na prevenção e tratamento de doenças relacionadas ao envelhecimento, como infecções recorrentes, câncer e doenças autoimunes, frequentemente associadas ao declínio da função imune (Kim *et al.*, 2019; Fang *et al.*, 2016). Compostos como fisetina e quercetina, que possuem propriedades senolíticas, têm mostrado eficácia na remoção de células senescentes e na melhoria da saúde geral em modelos pré-clínicos, contribuindo para a recuperação da função imunológica em idosos (Babbar *et al.*, 2020).

### 2.3 Produtos naturais

As plantas medicinais têm sido utilizadas como fonte de tratamentos para diversas condições e doenças desde a antiguidade. Esses tratamentos são possíveis devido à produção de metabólitos secundários, como alcaloides, flavonoides e terpenoides, que apresentam uma ampla gama de efeitos farmacológicos, incluindo atividades anticancerígenas, anti-inflamatórias e antioxidantes (Yang *et al.*, 2023; Niu *et al.*, 2024; Khan *et al.*, 2020). Os metabólitos secundários são produzidos pelas plantas devido a diversos fatores, como

adaptação ao clima, terreno e como mecanismo de defesa contra doenças e predadores (Dias; Urban; Roessner, 2012). A partir de estudos com produtos naturais foi possível desenvolver diferentes classes de fármacos que originaram medicamentos utilizados até hoje. Como exemplo tem-se a galegina, derivado da *Galega officinalis* L., modelo para a síntese de fármacos antidiabéticos como a metformina; a papaverina, derivada do *Papaver somniferum*, utilizada como base do anti-hipertensivo verapamil; e a quinina, isolada da casca da *G. officinalis* que foi utilizada como base para desenvolvimento do fármaco antimalárico cloroquina e mefloquina (Buss; Waigh, 1995; Fabricant; Farnsworth, 2001).

A partir de estudos recentes com produtos naturais, foi possível desenvolver novas classes de fármacos que têm sido introduzidas na prática clínica nos últimos anos. Como exemplo, tem-se a curcumina, derivada do *Curcuma longa*, amplamente estudada por suas propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras, sendo utilizada como adjuvante no tratamento de doenças autoimunes e no câncer, melhorando a eficácia de terapias convencionais (Huang *et al.*, 2020). A quercetina, um flavonoide presente em frutas e vegetais, mostrou potencial imunomodulador e antioxidante, sendo investigada para o tratamento de doenças autoimunes e inflamações crônicas (Miteva *et al.*, 2024). Outro exemplo é a apigenina, encontrada na salsa e camomila, que apresentou efeitos imunossupressores em ensaios clínicos, sendo explorada como agente terapêutico no manejo de inflamações crônicas e autoimunidade (Velikova *et al.*, 2024).

Nos últimos anos, o interesse no estudo e desenvolvimento de fármacos derivados de produtos naturais tem crescido significativamente (Chaachouay & Zidane, 2024). Esse aumento é impulsionado pelo potencial desses compostos em oferecer diversidade estrutural única e pela aplicação de novas tecnologias, como inteligência artificial e técnicas avançadas de caracterização, que têm facilitado a descoberta de novas moléculas bioativas (Saldívar-González *et al.*, 2022; Fijałkowski *et al.*, 2022)."

Com o crescente interesse no estudo de produtos naturais e suas aplicações terapêuticas, uma classe de compostos que tem se destacado são os triterpenos. Esses metabólitos secundários, amplamente presentes no reino vegetal, são encontrados em cascas, folhas, frutos, flores e raízes de diversas plantas

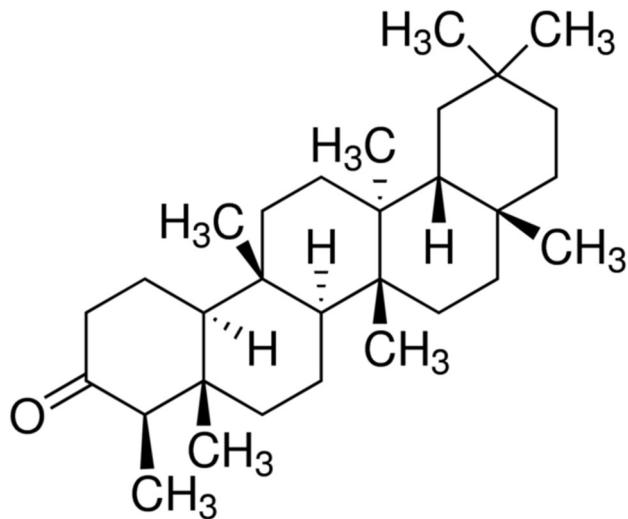
medicinais. Fontes medicinais relevantes incluem *Ziziphus mauritiana* (ácido betulínico), *Boswellia serrata* (ácido boswélico) e *Glycyrrhiza glabra* (glicirrizina) (Peron; Marzaro; Dall'acqua, 2018). A literatura mostra que os triterpenos, especialmente os cílicos, possuem uma ampla gama de atividades biológicas e farmacológicas. Por exemplo, o ácido betulínico, um triterpeno do tipo lupano, é reconhecido por seus efeitos anticancerígenos (Mullauer *et al.*, 2010), enquanto o ácido oleanólico, um triterpeno do tipo oleanano, apresenta efeitos antioxidantes (Peng *et al.*, 2013). Além disso, triterpenos como o ácido ursólico exibem atividades antivirais e antimicrobianas (Wolska *et al.*, 2010), e compostos como o uvaol e a  $\alpha,\beta$ -amyrina são conhecidos por suas propriedades anti-inflamatórias e pró-cicatrizantes (Almeida *et al.*, 2015; Agra *et al.*, 2016).

Além desses efeitos, já foi demonstrado que triterpenos podem atuar na função do timo. Um estudo realizado por Feng *et al.* (2013) observou que o tratamento com triterpenos derivados do extrato de *Ganoderma lucidum* (GLK) foi capaz de reverter a diminuição do peso do timo em camundongos tratados com o fármaco antitumoral ciclofosfamida. Outro estudo demonstrou que o tratamento in vivo de camundongos BALB/c com ácido betulínico (BetA), um triterpeno pentacíclico, induziu a expressão da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato diaforase (NADPH-d), um indicador indireto da síntese de óxido nítrico no timo, sem alterar a morfologia tímica. Esse efeito pode ser o mecanismo responsável pela imunomodulação tímica após o tratamento com BetA (Le Pang *et al.*, 2017).

### 2.3.1 Friedelina

A friedelina é um composto químico pertencente à classe dos triterpenoides pentacíclicos. Sua estrutura química (Figura 8, pág. 40) é caracterizada por uma complexa estrutura pentacíclica, típica de triterpenos, e é formada a partir de três unidades isoprénicas, sugerindo ser interessante para a interação com alvos biológicos, influenciando na sua bioatividade.

Figura 8 - Estrutura molecular do triterpeno pentacíclico friedelina.



Friedelina consiste em um metabólito secundário vegetal da classe dos terpenos. FONTE: Sigma Aldrich

A friedelina foi isolada pela primeira vez no início do século XIX e desde então foi identificada em inúmeras espécies vegetais em diferentes famílias, incluindo Celastraceae, Euphorbiaceae e Flacourtiaceae (Alves *et al.*, 2018; Singh, 2023). Tem sido descrita como abundante em diferentes espécies vegetais como *Maytenus rigida*, *Maytenus ilicifolia* e *Clusia nemorosa*, por exemplo (de Andrade; Almeida; Conserva, 1998; Niero; De Andrade; Cechinel Filho, 2011). Sua ocorrência generalizada na natureza sugere um papel ecológico significativo, possivelmente relacionado a mecanismos de defesa das plantas contra herbívoros e patógenos.

A biossíntese da friedelina envolve a enzima friedelina sintase, que catalisa a ciclização do esqualeno para formar o esqueleto da friedelina. Estudos recentes identificaram diferentes isoformas da friedelina sintase em espécies de *Maytenus* spp., que podem influenciar o rendimento e a eficiência da produção de friedelina (Souza-Moreira *et al.*, 2016; Alves *et al.*, 2018). Compreender as vias biossintéticas e a regulação genética da friedelina sintase pode aprimorar a produção desse composto por meio de abordagens biotecnológicas.

Estudos prévios já haviam demonstrado os efeitos anti-inflamatório, antipirético, analgésico e gastroprotetor da friedelina em modelos animais

(Antonisamy *et al.*, 2011; Ferro *et al.*, 2012). Adicionalmente, a friedelina tem se mostrado promissora em diversos outros contextos. Pesquisas *in silico* indicam seu potencial como inibidor da enzima spike do SARS-CoV-2, superando o remdesivir (Souza *et al.*, 2021). Em modelos animais, a friedelina atenuou a disfunção neuronal e o comprometimento da memória (Sandhu *et al.*, 2022), além de proteger contra a neurotoxicidade induzida por etanol (Sandhu *et al.*, 2023), além de demonstrar efeitos antidiabéticos (Sunil *et al.*, 2021). Apesar dessas evidências, o seu potencial imunomodulador, especialmente a sua ação sobre o timo, permanece pouco explorado.

Estudos anteriores conduzidos no Laboratório de Biologia Celular na UFAL demonstraram que a friedelina possui um potente efeito anti-inflamatório, evidenciado pela redução do recrutamento celular e da produção de citocinas em resposta a estímulos com LPS e ovalbumina (Ferro *et al.*, 2016). Complementando essas descobertas, resultados mais recentes mostraram que a friedelina exerce um efeito imunomodulador significativo, tanto *in vitro* *in vitro* quanto *in vivo* (Carmo, 2023). O tratamento com este triterpeno foi eficaz em regular a migração de timócitos, diminuir a produção de IL-2 em células imunes e, no modelo de asma alérgica experimental, reduziu o recrutamento de leucócitos e aumentou a proporção de linfócitos T reguladores, sem alterar a estrutura do timo, sugerindo seu potencial terapêutico no tratamento da asma alérgica (Carmo, 2023).

No entanto, ainda não se sabe o efeito da friedelina especificamente sobre as células epiteliais tímicas. Portanto, para considerar a friedelina como um possível agente terapêutico para disfunções do timo, como a involução tímica, são necessárias investigações mais aprofundadas. Assim, este trabalho propôs avaliar a ação *in vitro* da friedelina na biologia das células epiteliais tímicas, bem como explorar seus efeitos em um modelo de senescência celular induzida por estresse oxidativo em TECs murinas.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral:

Investigar a ação da friedelina na biologia de células epiteliais tímicas (TECs) murinas, tanto em condições normais quanto em um modelo de senescência celular induzida por estresse oxidativo.

#### 3.2 Objetivos Específicos:

Os objetivos específicos deste trabalho foram separados em seções conforme descrição abaixo:

##### Seção A – Efeito *in vitro* da friedelina em TECs:

- a) Avaliar a viabilidade e a proliferação de TECs após o tratamento *in vitro* com friedelina.
- b) Analisar o perfil de citocinas e quimiocinas produzidas por TECs tratadas *in vitro* com friedelina.
- c) Investigar a produção de moléculas da matriz extracelular e a expressão de seus receptores em TECs submetidas ao tratamento com friedelina *in vitro*.
- d) Analisar a interação entre timócitos e TECs após o tratamento *in vitro* com friedelina, através de ensaios de adesão célula-célula.

##### Seção B – Efeito da friedelina na senescência celular induzida por D-gal em TECs:

- a. Estabelecer o modelo de indução da senescência em TECs através do tratamento com D-galactose.
- b. Avaliar o efeito da friedelina na senescência de TECs induzida por D-galactose.
- c. Investigar a influência da friedelina na expressão de moléculas da matriz extracelular em TECs senescentes.
- d. Analisar o impacto da friedelina na adesão e sobrevivência de timócitos a TECs senescentes.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi executado no Laboratório de Biologia Celular (LBC) do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde – ICBS/UFAL com período de 1 ano de estágio no Laboratório de Pesquisas sobre o Timo (IOC/FIOCRUZ). Neste capítulo, as metodologias foram organizadas em duas seções, visando apresentar de forma clara os métodos utilizados para cada grupo de objetivos específicos.

### 4.1 Seção A – Efeito *in vitro* da friedelina sobre células epiteliais tímicas murinas

#### 4.1.1 Cultura de células

A linhagem celular 2BH4, uma linhagem imortalizada de células estromais tímicas, foi gerada através do isolamento de células estromais primárias de timos de camundongos C57BL/Ka de 6 semanas. As células foram transformadas com o vírus símio 40 (SV40) e o plasmídeo pSV2neo, conferindo resistência à neomicina. A seleção de células transformadas foi realizada com G418, um antibiótico que elimina células sem o gene de resistência. A clonagem por diluição limitante isolou colônias individuais derivadas de células únicas, e o clone 2BH4 foi selecionado. As células 2BH4 são positivas para pan-citoqueratina, Thy-1 (ou CD90), Antígeno-1 Associado à Função Leucocitária ou CD11a/CD18 (LFA-1), Molécula de Adesão Intercelular-1 ou CD54 (ICAM-1) e o antígeno epitelial gp23. Além disso, sintetizam laminina, mas não expressam vimentina, Mac-1 (ou CD11b/CD18) ou Receptor de Interleucina-1 (IL-1R) (Amarante-Mendes *et al.*, 1995).

A linhagem celular 2BH4 foi gentilmente enviada pelo Laboratório de Pesquisa sobre o Timo (LPT, FIOCRUZ/RJ) para uso em nosso laboratório (LBC ICBS/UFAL).

As TECs 2BH4 foram cultivadas em garrafas de cultura, em meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino, 1% de L-glutamina e 100 unidades/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (meio R10), em atmosfera aquecida a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Quando necessário, a passagem das células foi realizada com solução tripsina-EDTA.

#### **4.1.2 Animais**

Foram utilizados camundongos, machos e fêmeas, da linhagem C57BL/6, com idade entre 4 e 6 semanas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas), com livre acesso a ração e água. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFAL (CEUA 47/2016 e CEUA 19/2019).

#### **4.1.3 Tratamento *in vitro***

Sempre que necessário foi preparada uma solução de friedelina (Sigma-Aldrich, 855022) na concentração final de 2.343,45  $\mu\text{M}$  (1 mg/mL) diluída em tampão fosfato salino (PBS) contendo 1% de álcool absoluto. Inicialmente, as células em cultivo foram tratadas com friedelina nas concentrações de 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  ou 100  $\mu\text{M}$  em RPMI-SBF 2% (meio R2) por uma ou 24 horas. Posteriormente, somente as concentrações de 0,1  $\mu\text{M}$  e 1  $\mu\text{M}$  foram utilizadas. Células cultivadas na ausência de friedelina foram utilizadas como controles.

#### **4.1.4 Análise morfológica**

A análise morfológica das células 2BH4 foi realizada utilizando microscopia eletrônica de varredura. Para isso, as células foram cultivadas em placa de 24 poços contendo lamínulas circulares revestidas com 0,1% de albumina sérica bovina (BSA) por 24 horas. Após esse período foi realizada a fixação das células com PBS contendo glutaraldeído a 0,5%. Fotomicrografias foram adquiridas nos aumentos de 1500x e 2000x, no microscópio eletrônico de varredura (MEV, Shimadzu, modelo SSX-550 Superscan), no Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas.

#### **4.1.5 Ensaio de viabilidade celular**

A viabilidade das TECs foi avaliada utilizando o método colorimétrico de MTT, seguindo protocolo já estabelecido no laboratório. TECs murinas da linhagem 2BH4 foram plaqueadas ( $7 \times 10^3$  células por poço) em placas de 96 poços e colocados para adesão por até 16 horas em estufa de  $\text{CO}_2$  a  $37^{\circ}\text{C}$ . Passado esse

período, foi realizado o tratamento com friedelina nas concentrações de 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  por 1 e 24 horas. Após o tempo de tratamento, foi adicionado o MTT (5 mg/mL; Sigma-Aldrich) em cada um dos poços para incubação por 3 horas em estufa de  $\text{CO}_2$  a 37°C. Passado esse tempo, os cristais de formazan foram solubilizados com 150  $\mu\text{L}$  por poço de DMSO e após 10 minutos foi avaliada a densidade óptica resultante através de espectrofotometria no comprimento de onda 540 nm. Os resultados foram representados pela porcentagem de célula viáveis, a qual foi calculada a partir da seguinte fórmula:

$$\% \text{ de viabilidade celular} = \frac{\text{Densidade optica das células tratadas}}{\text{Densidade optica das celulas NÃO tratadas}} \times 100$$

#### 4.1.6 Imunofluorescência

A produção de laminina e fibronectinas nas TECs em estudo foi detectada através do ensaio de imunofluorescência indireta (Vieira, 2017). Células 2BH4 foram plaqueadas em lâminas tipo Lab-tek (Nunc), na concentração de  $5 \times 10^3$  por poço, seguindo o protocolo de cultura de células descrito no item 4.1.1. Após 16 horas, as células foram tratadas com R2 ou FD nas concentrações de 0,1  $\mu\text{M}$  ou 1  $\mu\text{M}$  por 24 horas. Após o tratamento, as células foram fixadas com metanol 100% por 10 minutos em temperatura ambiente e posteriormente incubadas por 30 minutos com PBS/BSA 1% para bloqueio de sítios inespecíficos. Após o bloqueio, as células foram incubadas com o anticorpo primário para CXCL12, laminina, fibronectina (todos 1:100) por 1h, seguindo-se da incubação com o anticorpo secundário Ig obtido de cabra conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (GAR-FITC; 1:200). As lâminas foram montadas com PBS/glicerol e observadas em microscópio de fluorescência Nikon Eclipse 50i. Análises quantitativas, através da análise de MFI, foram realizadas através do software Image J.

#### 4.1.7 Citometria de fluxo

A técnica de citometria de fluxo foi utilizada para analisar a expressão de receptores de superfície nas células 2BH4 como também para avaliação das subpopulações de timócitos CD4/CD8 após os ensaios funcionais (Medeiros *et al.*, 2021). As células em suspensão foram distribuídas em placa de 96 poços de fundo U e marcadas com anticorpos específicos conjugados a fluorocromos como descrito na tabela 1 (pág. 41). As células devidamente marcadas foram fixadas em formaldeído 2% e analisadas no aparelho FACSCanto II equipado com o programa de computador Diva (BD bioscience). Para análise dos resultados de citometria de fluxo foi utilizado o software Flowing Software 2.

**Tabela 1** - Lista de anticorpos, fluorocromos e seus respectivos alvos.

Anticorpo	Molécula-alvo
Anti-citoqueratina (CK)/Alexa fluor 488	Citoqueratinas totais
Anti-MHC I/FITC	MHC I
Anti-MHC II/Ficoeritrina (PE)	MHC II
Anti-CD49e/PE	Cadeia $\alpha$ da integrina
	VLA-5 ( <i>very late antigen-5</i> )
Anti-CD49f/PE	Cadeia $\alpha$ da integrina
	VLA-6 ( <i>very late antigen-6</i> )
Anti-NP1/ aloficianina (APC)	Neuropilina-1
Anti-CD4/APC	CD4
Anti-CD8/ <i>Peridinin-Chlorophyll-Protein</i> (PerCP)	CD8

Fonte: próprio autor

#### 4.1.8 Obtenção dos timócitos murinos

Após eutanásia dos camundongos, os timos foram removidos e macerados em placa de 24 poços contendo 1 mL de PBS/SBF 4% para liberação dos timócitos. O sobrenadante foi recolhido e as células foram contadas em câmara de Neubauer sob o método de exclusão por azul de Trypan 0,02%.

#### **4.1.9 Ensaio de adesão célula-célula**

As TECs foram cultivadas em placas de Petri (60 mm x 15 mm), ( $5 \times 10^4$ ) na presença ou não de FD (0,1  $\mu$ M e 1  $\mu$ M) por 24h. Após o tratamento foi realizado o cocultivo com timócitos frescos obtidos de camundongos C57BL/6 em meio R2 na proporção de 50 timócitos para cada TEC. A adesão dos timócitos foi permitida por 4h, e em seguida o meio de cultura foi retirado e realizada a lavagem com PBS a 37°C para retirada de timócitos não aderentes e lavagem com PBS gelado para soltar os timócitos aderidos às TECs. Os timócitos foram então contados através de câmara de Neubauer para quantificação de timócitos aderentes totais. Foi realizada também marcação para citometria de fluxo para determinar as subpopulações de timócitos aderentes conforme descrito no item 4.6

#### **4.1.10 Ensaio de sobrevivência pelo método de exclusão por trypan blue**

As TECs ( $1 \times 10^4$ ) foram cultivadas em placas de 48 poços com meio R10. Após 16 horas de adesão, o sobrenadante foi removido e as TECs foram lavadas com PBS. Em seguida, a cocultura com timócitos frescos ( $10^6$  por poço) foi realizada conjuntamente com o tratamento com R2 ou FD (0,1 ou 1  $\mu$ M) por 72 horas. Após este período, o sobrenadante com timócitos foi coletado e as células viáveis foram contadas pelo método de exclusão do azul de Trypan (Lins *et al.*, 2020).

### **4.2 Seção B – Efeito da friedelina em células epiteliais tímicas murinas induzidas à senescência por estresse oxidativo**

#### **4.2.1 Indução da senescência por estresse oxidativo com D-galactose**

As TECs da linhagem 2BH4 foram tratadas com D-galactose (D-gal) (Sigma, g5388) nas concentrações de 10, 20 ou 40 mg/mL em meio R2 por 48 horas em estufa com CO<sub>2</sub> a 5% e 37 °C, para indução do fenótipo senescente. As TECs mantidas apenas em meio R2 foram consideradas controles não-senescentes.

#### **4.2.2 Tratamentos com friedelina**

Para investigar o efeito da FD foram estabelecidos quatro grupos experimentais. O grupo controle consistiu em TECs cultivadas em meio R2 por 48

horas. No grupo tratado apenas com FD, as TECs foram expostas a uma concentração de 1  $\mu$ M de FD por 48 horas. TECs no terceiro grupo foram tratadas apenas com D-gal para indução da senescência. O quarto grupo recebeu tratamento de FD e D-gal, em que as TECs foram pré-tratadas com 1  $\mu$ M de FD por 1 hora, seguido de um tratamento com D-gal combinado com FD a 1  $\mu$ M por 48 horas.

#### **4.2.3 Ensaio de viabilidade celular**

O método colorimétrico de MTT foi utilizado incialmente para a padronização do modelo de senescência celular induzido por D-gal. As TECs foram plaqueadas ( $7 \times 10^3$  por poço) em placas de 96 poços e colocadas para adesão por até 16 horas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C. Passado esse período, foi realizado tratamento com D-gal nas concentrações de 10, 20 ou 40 mg/mL por 48 horas. Após o tratamento foi adicionado o MTT (5 mg/mL; Sigma-Aldrich) em cada um dos poços para incubação por 3 horas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C. Passado esse tempo, os cristais de formazan foram solubilizados com 150  $\mu$ L por poço de DMSO e após 10 minutos foi avaliada a densidade óptica resultante através de espectrofotometria no comprimento de onda 540 nm. Após o estabelecimento do modelo de senescência por D-gal, foi verificado a viabilidade celular por MTT com os grupos de tratamento descritos no item 4.2.2 e analisadas de acordo com o item 4.1.5 da seção A.

#### **4.2.4 Ensaio de análise morfológica**

Após a indução da senescência como descrito no item 4.2.1, as células foram fixadas com metanol por 10 minutos e coradas com corante Giemsa diluído em água destilada (1:5) por 20 minutos. Os grupos experimentais foram fotografados e fotos representativas foram utilizadas para exemplificar a morfologia celular.

#### **4.2.5 Ensaio de proliferação celular**

Para o ensaio de proliferação, as células foram plaqueadas  $2 \times 10^4$  por poço em placas de 12 poços e realizada a indução do perfil senescente como descrito anteriormente. Após as 48h de tratamento, foi retirado o meio e as células foram soltas das placas por tripsinização, diluídas 1:10 em azul de trypan e levadas para

contagem em câmara de Neubauer.

#### **4.2.6 Imunofluorescência**

O marcador de senescência celular p16 e moléculas da matriz extracelular (MEC) laminina e fibronectina foram detectados através do ensaio de imunofluorescência indireta. As células 2BH4 foram plaqueadas em lâminas tipo Lab-tek (Nunc) ou em lamínulas redondas de vidro, na concentração de  $5 \times 10^3$  por poço seguindo o protocolo de cultura de células descrito no item 4.1.6. Após o tratamento, as células foram fixadas com metanol 100% por 10 minutos em temperatura ambiente, permeabilizadas em saponina 0,5% em PBS 1X por 10 e posteriormente incubadas por 30 minutos com PBS/BSA 1% para bloqueio de sítios inespecíficos. Após bloqueio, as células foram incubadas com anticorpo primário para laminina (1:100), fibronectina (1:100) e p16 (1:100, sigma ZRB1437) overnight, seguindo de incubação com o anticorpo secundário Ig obtido de cabra conjugado ao isocianato de fluoresceína (GAR-FITC; 1:200) por 1h, com posterior adição de DAPI para visualização dos núcleos. As lâminas foram montadas com Glicerol/PBS 90% e observadas em microscópio de fluorescência Nikon Eclipse 50i. Análises qualitativas e quantitativas foram realizadas através do programa de computador Image J.

#### **4.2.7 Ensaio de apoptose/viabilidade por anexina V/PI**

Para determinar a sobrevivência dos timócitos co-cultivados com TECs e tratados ou não com FD, foi realizado o ensaio de apoptose utilizando o kit Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit® (BD biosciences), composto da proteína anexina V conjugada a FITC, e do corante intracitoplasmático iodeto de propídeo (PI: Propidium Iodide), seguida da análise por citômetro de fluxo. Após a indução de senescência por D-gal, como já descrito, as células foram ressuspensas em 400  $\mu$ L de tampão de ligação 1x (Binding Buffer® 1X: 10 mM HEPES, NaOH, pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>). Em seguida, 100  $\mu$ L desta solução foi transferida para tubos de citometria, onde foram acrescentados 5  $\mu$ L de Anexina V, 5  $\mu$ L de PI ou ambos os marcadores. As células foram incubadas por 15 minutos, a temperatura ambiente, protegidas da luz. Por fim, 400  $\mu$ L de Binding Buffer 1 X foi adicionado em cada tubo para análise por citometria no aparelho FACSCanto II,

equipado com o programa de computador Diva (BD Biosciences). Para análise dos resultados foi utilizado o software FlowJo v10.10. Foram consideradas as células duplo positivas, simples positiva para anexina V e simples positivas para PI como células não viáveis e as células não marcadas (duplo negativas) como células viáveis.

#### **4.2.8 Quantificação da expressão de espécies reativas de oxigênio por Dihydrorhodamina 123**

A sonda Dihydrorhodamine 123 (DHR-123) (Sigma), não fluorescente, penetra nas células e é oxidada por ERO, transformando-se em rodamina 123 fluorescente. A intensidade da fluorescência, detectada por citometria de fluxo, é proporcional à quantidade de ERO, permitindo a sua quantificação. Para isso, foram plaqueadas  $2 \times 10^4$  TECs por poço em placas de 12 poços em meio R10 e incubadas por 16 h em estufa de CO<sub>2</sub> à 37°C. Após isso, foi realizado o tratamento com D-gal 10, 20 ou 40 mg/mL em meio R2 por 48h. Após o término do tratamento, o meio foi descartado e as células foram tratadas com 5 µM da sonda DHR-123 diluída em PBS 1X por 30 min a 37°C, protegidas da luz. Então, as células foram soltas com tripsina, lavadas com PBS para remover o excesso da sonda, centrifugadas e ressuspensas em tampão FACS (PBS 1X, BSA 2% e EDTA 1 mM) e transferidas para tubos FACS. As células devidamente marcadas foram analisadas no aparelho FACSCelesta, equipado com o programa de computador Diva (BD bioscience). Para análise dos resultados de citometria de fluxo foi utilizado o software FlowJo v10.10, quantificando a intensidade mediana de fluorescência (MFI).

#### **4.2.9 Ensaio de morfometria nuclear (nuclear morphometry assay (NMA))**

Foram utilizadas imagens de células marcadas com DAPI no formato .TIFF, contendo pelo menos 100 núcleos em cada condição experimental, evitando campos com alta confluência. As imagens foram abertas no software ImageJ 1.54f (NHI, Bethesda, MD, USA; <http://rsbweb.nih.gov/ij/>), que continham o plugin "NII\_Plugin" do NMA. O contorno dos núcleos foi marcado corretamente para avaliar os dados morfométricos, como área, aspecto, área da caixa, razão do raio e arredondamento. Após a obtenção dos dados brutos, foi selecionado um grupo de núcleos do grupo controle, excluindo aqueles em mitose ou com anormalidades

claras. Esses dados foram utilizados para definir os parâmetros da população normal. Em seguida, os dados dos núcleos foram colados na planilha chamada “Normal Nuclei and Settings” do arquivo NMA, utilizando o Excel 365 (Microsoft). Foi escolhido o número de desvios padrão (SD) que melhor definiu a ‘elipse normal’ e, ao utilizar o Excel, as fórmulas nas células em branco da coluna NII foram apagadas. Os dados de todas as condições - tanto do controle quanto de cada tratamento - foram colocados nas colunas denominadas “Treated Nuclei (for setting)” na mesma planilha “Normal Nuclei and Settings”. A partir daí, foi determinado o número de SD que melhor separou as populações de núcleos. Por fim, foram criadas planilhas separadas para cada condição (Sem tratamento (ST), FD 1  $\mu$ M, D-gal 40 mg/mL e D-gal 40 mg/mL + FD 1  $\mu$ M) e os dados dos núcleos analisados foram colados em cada uma. A porcentagem de núcleos e as médias de cada população foram analisadas. A Tabela 2 (pág. 47) descreve os tipos nucleares e suas possíveis implicações biológicas. O protocolo seguiu conforme descrito por Filippi-Chiela *et al.* (2012).

**Tabela 2 - Tipos Nucleares e Suas Possíveis Implicações Biológicas.**

Nome (Símbolo)	Local no gráfico	Morfologia	Significado biológico
Normal (N)	Dentro ou próximo da elipse normal definida por uma população de núcleos normais e regulares	Forma e tamanho normal	Interfase sem dano que afete a morfologia nuclear
Irregular (I)	Área similar ao núcleo N, mas com alto NII	Tamanho normal e alta irregularidade	Catástrofe mitótica ou outro evento de dano nuclear
Pequeno Regular (PR), Small Regular (SR)	Área abaixo da elipse normal e baixo NII	Muito condensado e regular	Apoptose em estágio inicial ou intermediário
Pequeno (P), Small (S)	Área abaixo da elipse normal, mas com NII intermediário.	Pequeno, mas não esférico	Mitose
Pequeno Irregular (PI), Small Irregular (SI)	Área abaixo da elipse normal, mas com alto NII	Condensado pequeno e irregular	Mitose com dano ou fragmentação nucleares
Grande Regular (GR), Large Regular (LR)	Área acima da elipse normal, mas NII similar a N	Grande e regular	Senescência
Grande irregular (GI), Large Irregular (LI)	Área acima da elipse normal, mas NII maior que o N	Dano nuclear significante em grandes núcleos ou grandes células multinucleadas	Catástrofe mitótica ou outro evento de dano nuclear

Descrição dos tipos nucleares identificados pela análise de morfometria nuclear e suas correlações com o estado de senescência celular. Traduzido e adaptado de Filippi-Chiela *et al* (2012).

#### 4.2.10 PCR quantitativo em tempo real (PCRq)

Amostras de RNA total das células em estudo foram extraídas com kit de extração de RNA (Sigma-Aldrich) e submetidas à síntese do DNA complementar (cDNA). A reação de PCRq foi realizada com o kit Power SYBR Green Master Mix

(Applied Biosystems) utilizando o equipamento QuantiStudio5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Para a amplificação do gene p16, foram utilizados os seguintes primers: Forward (F): 5'-GGAGTCCGCTGCAGACAGA-3' e reverse (R): 5'-GAATCGGGTACGACCGAA-3'. O gene ACTB foi utilizado como controle endógeno, sendo amplificado com os primers: Forward (F): 5' CATTGCTGACAGGATGCAGAAGG-3' e Reverse (R): 5' TGCTGGAAGGTGGACAGTGAGG-3'.

#### **4.2.11 Obtenção dos timócitos murinos**

A obtenção dos timócitos foi realizada como descrito no item 4.1.8 da seção A.

#### **4.2.12 Ensaio de adesão de timócitos a células epiteliais tímicas**

Para avaliar se a FD poderia modular a adesão de timócitos às TECs, realizou-se o ensaio de adesão celular como anteriormente padronizado em nosso laboratório (Lins, 2015) com algumas modificações. Foi feito o plaqueamento de  $1 \times 10^5$  de TECs em placas de 6 poços em triplicatas e tratamentos como descrito no tópico 4.2.2. Após as 48h de exposição aos tratamentos, as TECs foram desprendidas das placas utilizando tripsina e contadas no hemocitômetro. Após isso, as células foram novamente plaqueadas em placas de 6 poços ( $1,5 \times 10^5$ ), em triplicata para cada um dos 4 grupos, e postas em cultura em estufa com  $\text{CO}_2$  a 5% e 37 °C por 12 a 16h. Após esse tempo, timócitos obtidos através da extração e maceração do timo de camundongos fêmeas, foram contados, centrifugados e ressuspensos em RPMI aquecido. Foi então feito cocultivo de timócitos e TECs mantendo uma relação de 50 timócitos/TEC (50:1) (Cotta-de-Almeida *et al.*, 2004). Ambas as células foram mantidas em meio RPMI aquecido e a adesão foi permitida por 1 hora. Após esse período, as placas foram inclinadas e lavadas com PBS 1X aquecido para a retirada dos timócitos não-adherentes. As células aderidas foram fixadas em metanol 100% durante 10 minutos, coradas com corante Giemsa por 25 minutos e finalmente lavadas com água destilada para remoção do excesso de corante. Com as células coradas, foi possível realizar a contagem em microscópio óptico invertido em objetiva de 40x. Foram contados 15 campos e em seguida

realizado o cálculo do índice de adesão (IA), segundo a fórmula abaixo (Lannes-Vieira *et al*, 1993):

$$IA = \left( \frac{\text{Número de TECs com timócitos}}{\text{TECs Totais}} \right) \times \left( \frac{\text{Número de timócitos ligados à TECs}}{\text{TECs totais}} \right) \times 100$$

#### **4.2.13 Ensaio de sobrevivência de timócitos em cocultura com células epiteliais tímicas**

Como descrito no ensaio de adesão, as TECs previamente envelhecidas ou não e tratadas ou não com FD, por 48h, foram desprendidas das placas de cultura utilizando tripsina e contadas em hemocitometro. Em seguida, foram plaqueadas  $5 \times 10^4$  células por poço em placas de 12 poços, em triplicata para cada grupo experimental e esperado aderir por 16-18h. No dia seguinte, foi retirado o meio e substituído por meio R10 junto com  $1 \times 10^6$  timócitos por poço em sistema de cocultivo por 24h. Após esse tempo, cada poço foi lavado com o seu próprio meio, que foi recolhido em microtubos. Para recuperar o restante de células, foi colocado mais 1 mL de PBS gelado. Após isso, foi realizada contagem dos timócitos utilizando o corante azul de trypan na diluição 1:1 em câmara de Neubauer. O ensaio foi analisado pela seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Nº de timócitos vivos}}{4} \times 2 \text{ (fator de diluição)} \times 2 \text{ (volume em mL)}$$

#### **4.3 Análises estatísticas**

Para as análises estatísticas dos dados obtidos e confecção dos gráficos foi utilizado o programa de computador GraphPad Prism versão 9.00 (GraphPad Prism Software, Inc.). Os resultados foram representados como média e erro-padrão da média (EPM) e avaliados estatisticamente através do teste *t* não pareado ou o teste one-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de múltipla comparação de Tukey, ambos com um nível de significância selecionado para  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

Assim como estruturado no item 4, o capítulo de Resultados será apresentado em duas partes.

### 5.1 Seção A – Efeito *in vitro* da friedelina sobre células epiteliais tímicas

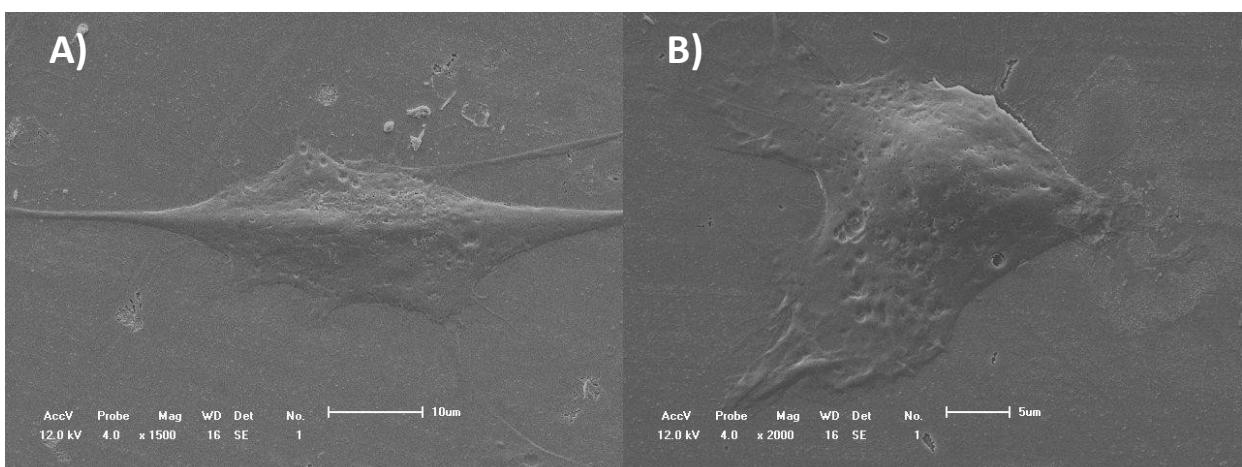
Os resultados contidos na seção A foram submetidos para publicação na revista *Natural Product Research* (Taylor & Francis), conforme anexo A, e encontram-se em processo de finalização da revisão.

#### 5.1.1 Caracterização da linhagem celular de células epiteliais tímicas 2BH4

O primeiro passo foi confirmar que a linhagem de TECs 2BH4 conservava as características necessárias de células epiteliais tímicas. Para isso foi o realizado ensaio de análise morfológica através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análise da expressão de moléculas de superfície através de citometria de fluxo.

Ao microscópio de varredura, foi possível confirmar que as TECs 2BH4 apresentam morfologia típica de epitélio: forma poliédrica, irregular, com prolongamentos membranares discretos, ondulações na membrana e núcleo centralizado (Figura 9, pág 55).

Figura 9 - Morfologia das células 2BH4 por microscopia eletrônica.

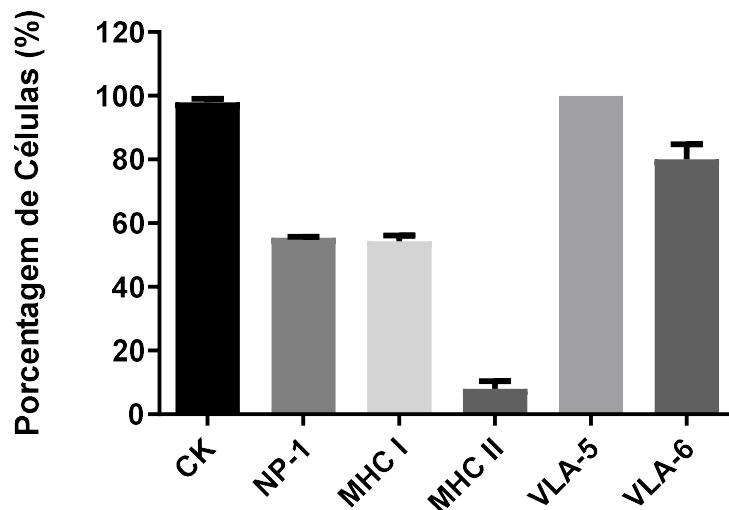


Análise morfológica de células epiteliais tímicas da linhagem 2BH4 através de microscopia eletrônica de varredura. As células apresentaram-se espalhadas ao substrato, com prolongamentos citoplasmáticos e núcleo centralizado. (A) e (B) representam diferentes morfologias típicas da linhagem epitelial.

Para confirmar as características epiteliais da linhagem 2BH4, foram escolhidos receptores de superfície relacionados às funções desempenhadas pelas células epiteliais tímicas: integrina  $\alpha 5\beta 1$  (CD49e/CD29; VLA-5 - *very late antigen 5*), receptor de fibronectina; a integrina  $\alpha 6\beta 1$  (CD49f/CD29; VLA-6 - *very late antigen 6*) receptor de laminina; neuropilina-1 (NP1), receptor transmembranar para semaforina de classe 3 (SEMA-3A); as moléculas de MHC I e II, além da expressão de citoqueratinas totais (SAVINO *et al.*, 1993; GAMEIRO *et al.*, 2010; MENDES-DA-CRUZ *et al.*, 2012).

Foi possível observar que 97,99% das 2BH4 expressaram citoqueratinas, confirmando a característica epitelial dessas células (Figura 10, pág. 56). Além disso, 55,37% das células expressaram NP-1, 54,29% expressaram MHC I, 99,95% foram positivas para VLA-5 e 80% para o VLA-6. Somente 7,99% das células foram positivas para o MHC II (Figura 10, pág. 56).

Figura 10 - Expressão de receptores de superfície em células epiteliais tímicas 2BH4.

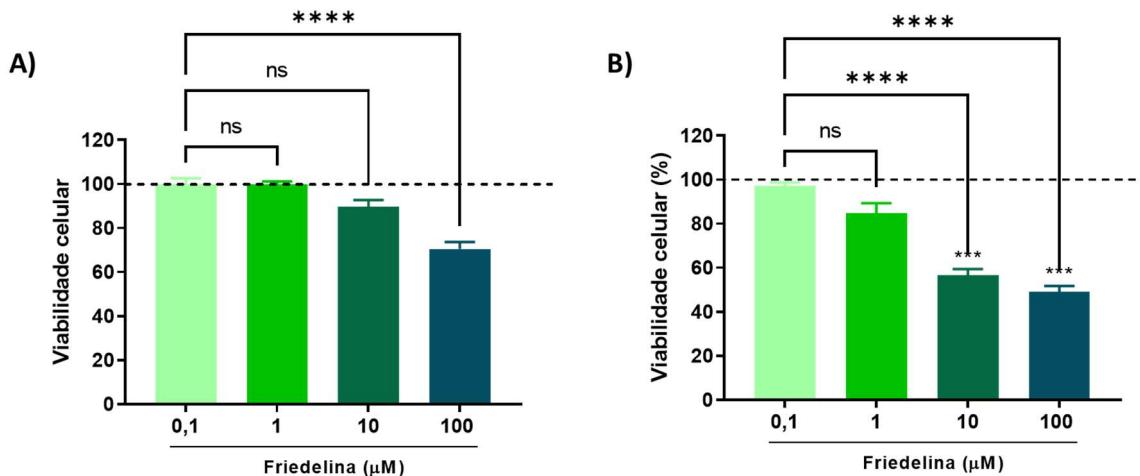


Quantificação da expressão de receptores de superfície em células epiteliais tímicas da linhagem 2BH4. O gráfico mostra a média  $\pm$  erro-padrão da média (EPM) do percentual de células positivas para cada receptor. n=5, de dois experimentos independentes. CK = citoqueratina, NP-1 = neuropilina-1, MHC I e II = Complexo Principal de Histocompatibilidade classe I e II, VLA-5 = Very Late Antigen-5, VLA-6 = Very Late Antigen-6.

### 5.1.2 Viabilidade celular de células 2BH4 após tratamento com friedelina

A viabilidade celular foi obtida por meio do ensaio de viabilidade por MTT. As células foram tratadas ou não com FD nas concentrações de 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M ou 100  $\mu$ M em R2 por 1 ou 24 horas para determinação da concentração utilizada nos demais ensaios (Figura 11, pág. 57). As células tratadas com 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M de friedelina por uma 1 hora mantiveram-se viáveis em relação às células sem tratamento. Contudo, nas culturas tratadas com 100  $\mu$ M de friedelina houve uma redução significativa de cerca de 30% na viabilidade em relação às células sem tratamento. No grupo tratado por 24 horas, o tratamento com 0,1  $\mu$ M não diminuiu a viabilidade celular em relação ao grupo sem tratamento. Porém, no tratamento com as concentrações de 1, 10 e 100  $\mu$ M foi observada uma diminuição significativa na viabilidade das TECs em relação às células sem tratamento, sendo a redução de aproximadamente 15%, 40% e 50%, respectivamente. Diante desses resultados as concentrações 0,1  $\mu$ M e 1  $\mu$ M e a duração de 24h foram escolhidas para os demais ensaios realizados neste trabalho.

Figura 11 - Ensaio de viabilidade celular após tratamento com friedelina.

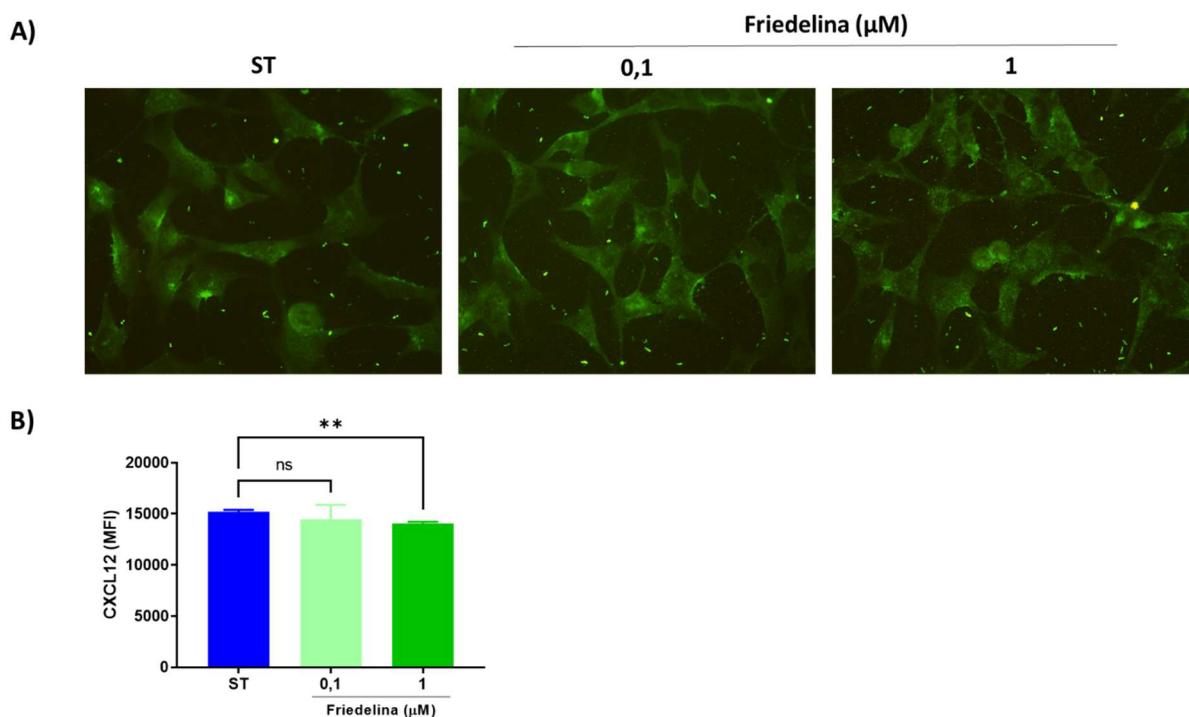


Ensaio de viabilidade celular por MTT. Células epiteliais tímicas da linhagem 2BH4 foram tratadas com friedelina (0,1, 10, ou 100  $\mu$ M) por uma (A) ou 24 horas (B). Os dados representam a porcentagem de células viáveis quando comparado ao grupo sem tratamento (linha pontilhada). O gráfico mostra a média  $\pm$  erro-padrão da média (EPM) da absorbância a 540 nm do formazan. A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey. \* $p\leq 0,05$ , \*\*\* $p\leq 0,001$ .

### 5.1.3 Expressão de CXCL12 em sapós tratamento com friedelina

O primeiro passo foi determinar se o tratamento com FD poderia modular a expressão de CXCL12 no modelo celular deste trabalho. Para isso, após 24 horas de exposição à FD, avaliaou-se a expressão de CXCL12 por imunofluorescência. Como resultado, a FD manteve a produção de CXCL12 inalterada, independentemente da dose utilizada. Essa descoberta foi confirmada por análise qualitativa (Figura 12A, pág. 58) e quantitativa (MFI) (Figura 12B, pág. 58).

Figura 12 - Expressão de CXCL12 em TEC após tratamento com friedelina

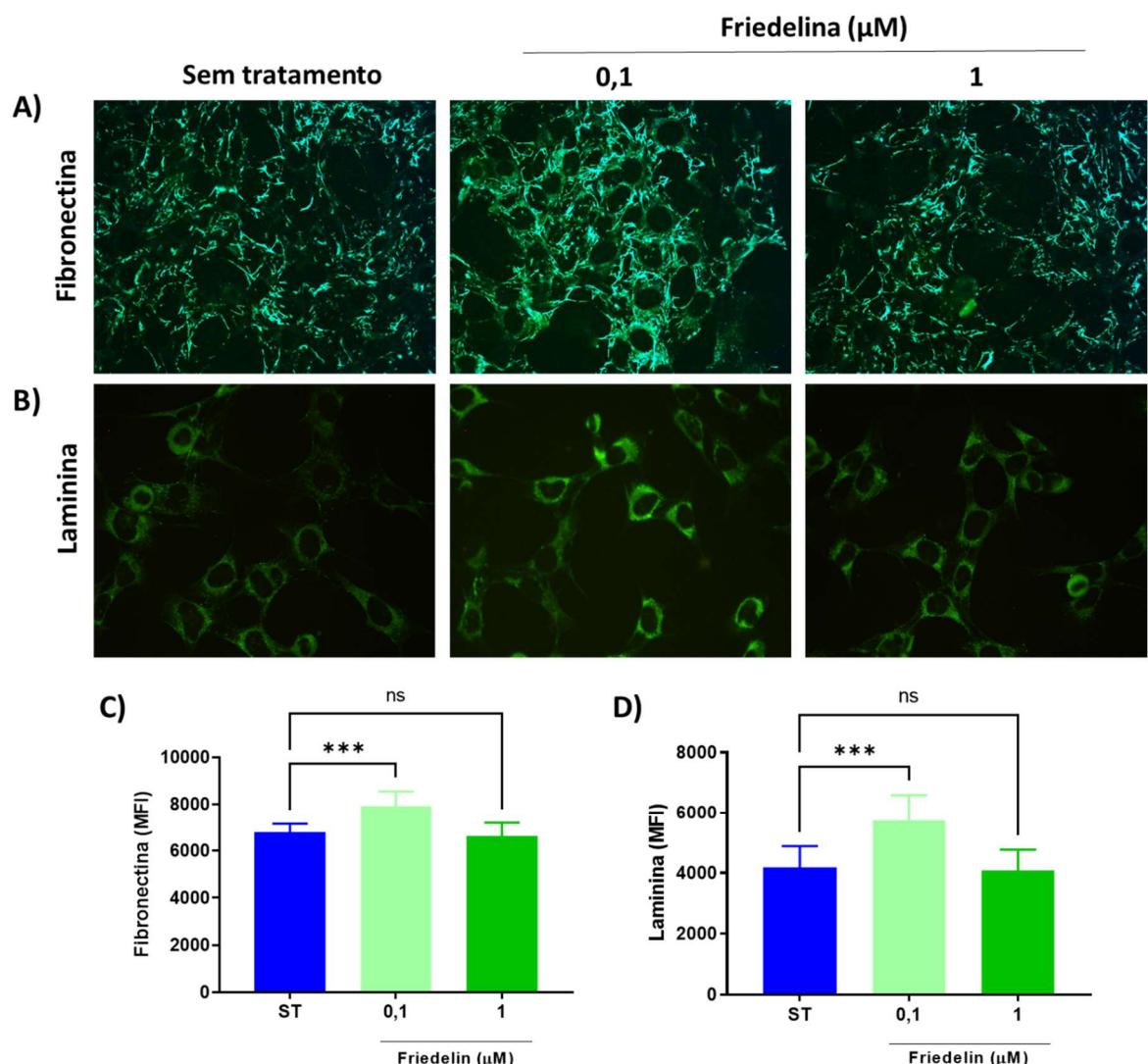


(A) Fotomicrografias mostrando a produção da quimiocina CXCL12, marcada em verde, pelas células 2BH4 após 24 h de tratamento com friedelina nas concentrações de 0,1 ou 1  $\mu\text{M}$ . Aumento: 400 $\times$ . (B) Gráficos de barras mostrando a quantificação da deposição de CXCL12, utilizando o software ImageJ, em intensidade média de fluorescência (IMF). Cada coluna representa a média  $\pm$  SEM obtida a partir de dois experimentos independentes,  $n = 15$  em cada. ST = sem tratamento.

### 5.1.4 Produção de matriz extracelular por TECs tratadas com FD

As células epiteliais tímicas tratadas ou não com FD foram submetidas ao ensaio de imunofluorescência para avaliar a produção de laminina e fibronectina. Foi possível observar por análise qualitativa que a FD aumentou a produção de fibronectina (FN) e laminina (LM), apenas na concentração de 0,1  $\mu$ M. Este incremento foi observado em fotomicrografias de fluorescência (Figura 12A, B, pág. 59) e nos gráficos de quantificação (Figura 13C, D, pág. 59).

Figura 13 - Análise qualitativa e quantitativa da produção de moléculas de matriz pela TEC após tratamento com friedelina.



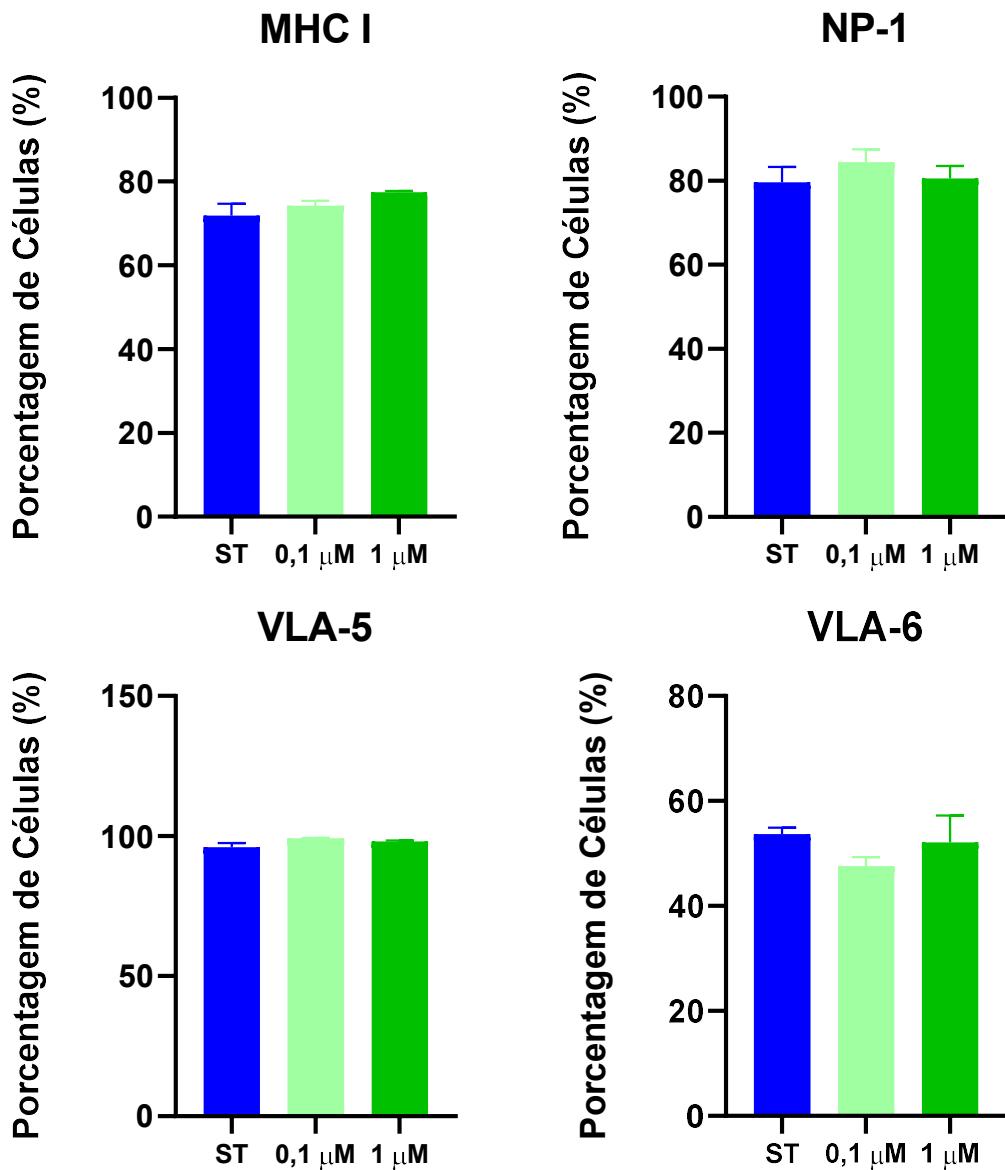
Fotomicrografias mostrando a deposição de fibronectina (A) e laminina (B) em células epiteliais tímicas da linhagem 2BH4 após tratamento com friedelina (0,1 ou 1  $\mu$ M) por 24h,

marcadas em verde. Aumento: 400×. Gráficos de barras demonstrando a análise quantitativa da deposição de fibronectina (C) e laminina (D), utilizando o software ImageJ, em intensidade média de fluorescência (MFI). Cada coluna representa a média ± SEM obtida a partir de dois experimentos independentes, n = 15 em cada grupo, \*\*\*p≤0,001. ST = sem tratamento.

### **5.1.5 Efeito do tratamento *in vitro* com friedelina na expressão de receptores de superfície em células 2BH4**

Para avaliar o efeito da friedelina quanto à expressão de receptores nas células epiteliais tímicas da linhagem 2BH4 foi realizado tratamento com friedelina nas concentrações de 0,1 e 1  $\mu$ M por 24h. Observou-se que tratamento não alterou a expressão dos receptores MHC I, VLA-5, VLA-6 e NP-1, em ambas as concentrações testadas (Figura 14, pág. 61). Não houve marcação para o receptor de MHC II.

Figura 14 - Expressão de receptores nas células epiteliais tímicas após tratamento com friedelina.

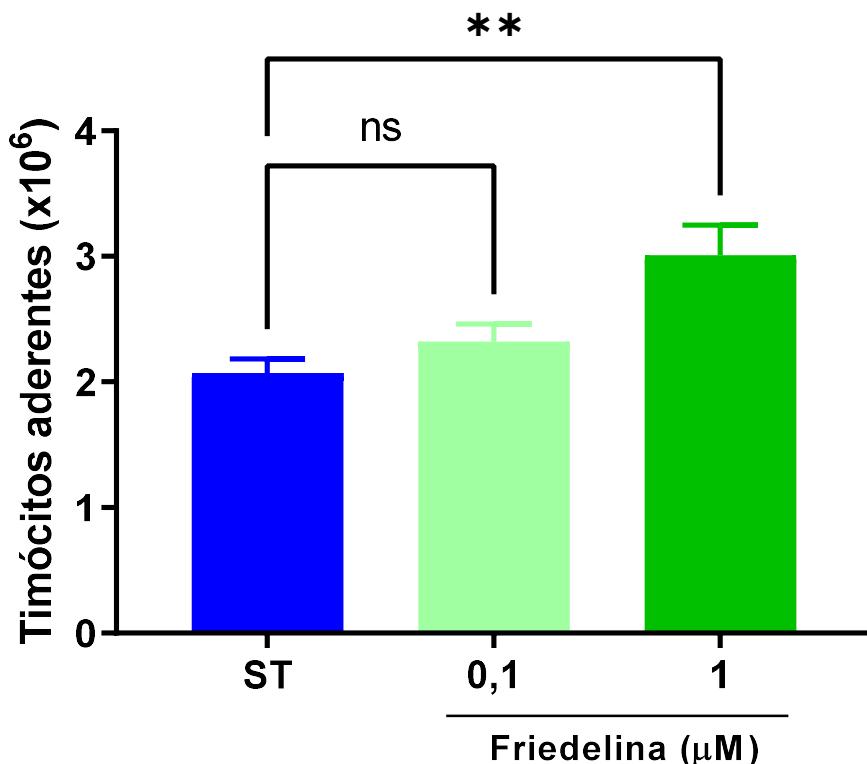


Células epiteliais tímicas da linhagem 2BH4 foram tratadas ou não com friedelina (0,1 ou 1  $\mu$ M) por 24h. Os gráficos mostram a média  $\pm$  erro-padrão da média (EPM) da porcentagem de células positivas para o marcador. NP-1 = neuropilina-1, MHC I = Complexo Principal de Histocompatibilidade classe I, VLA-5 = Very Late Antigen-5, VLA-6 = Very Late Antigen-6.

### 5.1.6 Efeitos do tratamento *in vitro* com friedelina na adesão de timócitos à TEC

Ao avaliar a adesão de timócitos totais às TECs da linhagem 2BH4. Observou-se um aumento significativo no grupo tratado com FD na concentração 1  $\mu$ M em relação ao grupo sem tratamento, visto na figura 15 (pág. 62).

Figura 15 - Adesão de timócitos à TEC após tratamento com friedelina.

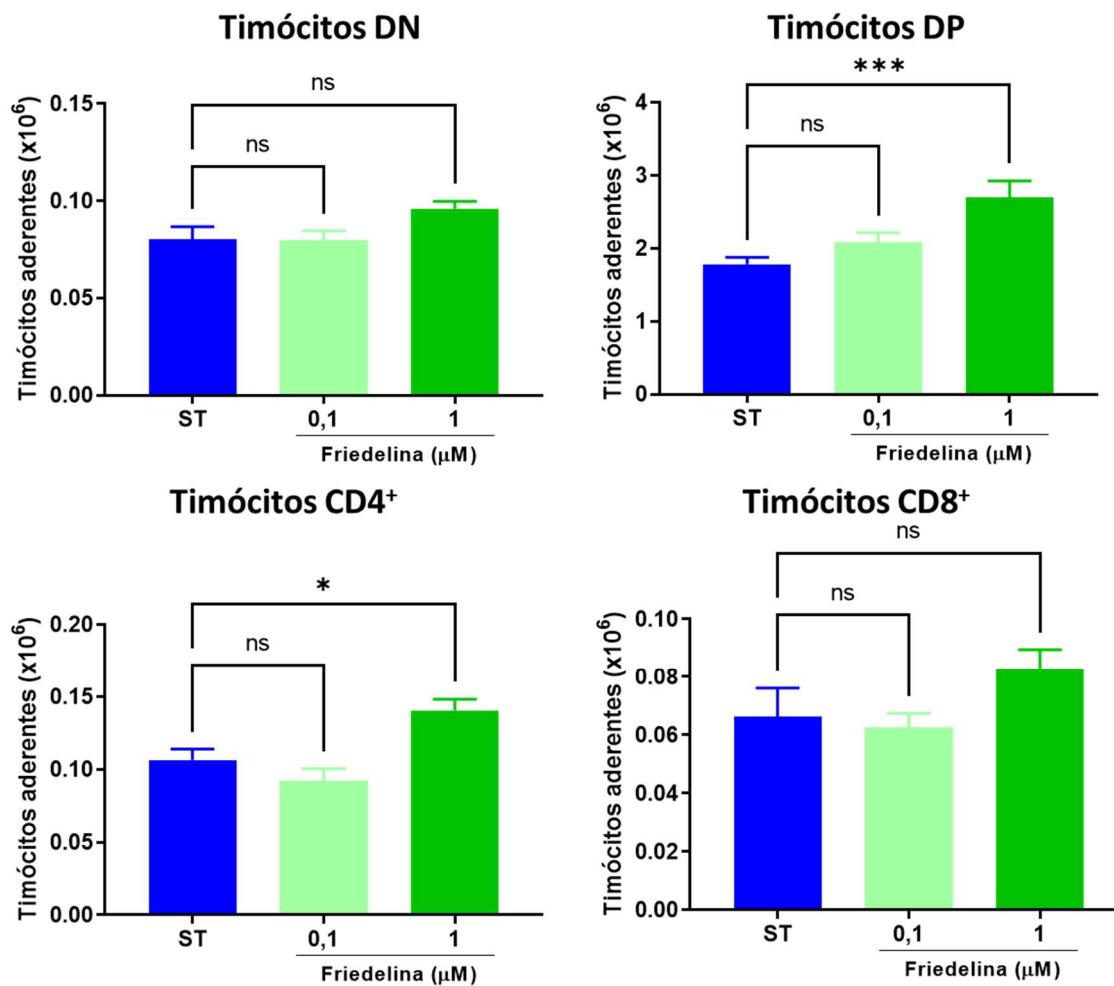


As TECs foram tratadas com friedelina (0,1 ou 1  $\mu$ M) por 24 h. Timócitos frescos foram submetidos à adesão por 1 h. Os timócitos aderidos foram coletados, contados e marcados para citometria. Os timócitos totais foram representados pela contagem das células aderidas. As barras representam a média  $\pm$  SEM, n = 5. A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey. \*\*p $\leq$ 0,01. ST = sem tratamento.

Foi observado também a adesão das subpopulações de timócitos, por meio da expressão das moléculas coreceptoras CD4 e CD8. O tratamento com FD na concentração de 1  $\mu$ M foi capaz de aumentar a adesão de timócitos duplo-positivos e de timócitos CD4 $^{+}$  em relação ao grupo sem tratamento (figura 16, pág. 63). No

entanto, não houve alteração na adesão dos timócitos duplo-negativos e timócitos CD8<sup>+</sup> em relação aos grupos tratados com friedelina e ao grupo sem tratamento.

Figura 16 - Análise da adesão de subpopulações de timócitos às células epiteliais tímicas após tratamento com friedelina.

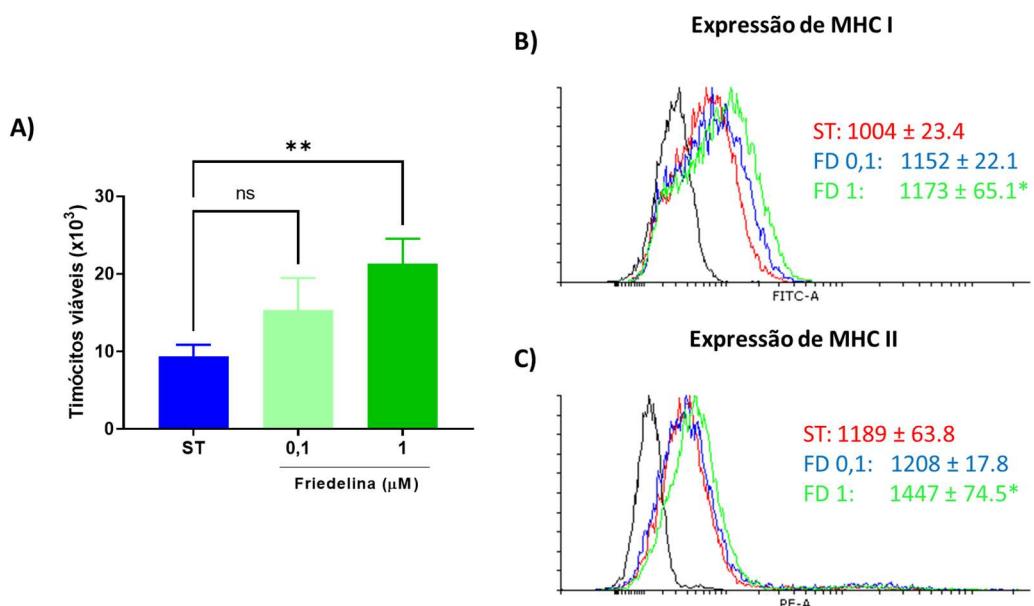


As TECs foram tratadas com friedelina (FD) (0,1 ou 1  $\mu$ M) por 24 h. Timócitos frescos foram submetidos à adesão por 1 h. Os timócitos aderidos foram coletados, contados e marcados para citometria e o número de subpopulações de timócitos foi obtido a partir da análise no citômetro. DN = timócitos duplo-negativos, DP = timócitos duplo-positivos, CD4 e CD8 = timócitos simples-positivos. As barras representam a média  $\pm$  SEM, n = 5. A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey. \*p≤0,05 e \*\*\*p≤0,001. ST = sem tratamento.

### 5.1.7 Efeitos do tratamento *in vitro* com friedelina na sobrevivência de timócitos em cocultura com TEC e expressão de moléculas de MHC na superfície das células epiteliais tímicas.

A análise da sobrevivência de timócitos cocultivados com TECs foi realizada pelo ensaio de viabilidade celular por azul de trypan, como descrito no item 4.1.10. Foi possível observar um aumento na sobrevivência dos timócitos quando cocultivados com TECs e tratados com FD em ambas as concentrações estudadas, como demonstrado na figura 17<sup>a</sup> (pág. 64).

Figura 17 - A análise da sobrevivência de timócitos em cocultura com células epiteliais tímicas após tratamento *in vitro* com friedelina e expressão de moléculas de MHC na superfície das células epiteliais tímicas.



A) Após 72 horas de cocultivo, os timócitos viáveis foram contados pelo método de exclusão com azul de Trypan (A). As barras representam a média  $\pm$  SEM, n = 4. (B e C) As TECs foram recuperadas dos poços e submetidas à citometria de fluxo. A expressão de MHC I e II na superfície das TECs foi avaliada. Histogramas representativos (B e C) da intensidade de fluorescência mostram a coloração específica (curvas coloridas) e o controle do isotipo de Ig (curva preta). Os números indicam a MFI das células positivas  $\pm$  SEM, n = 4. A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey. \* $p \leq 0,05$  e \*\* $p \leq 0,01$ .

### **5.1.8 Expressão de proteínas de membrana nas TECs após cocultivo com timócitos durante a exposição à friedelina**

Foi realizada a análise da expressão de MHC nas TECs após 72 h de cocultivo com timócitos (na presença ou ausência de FD). Surpreendentemente, as moléculas de MHC (I e II) aumentaram na maior concentração de FD juntamente com os timócitos cocultivados (Figura 17B e 17C, pág. 64). Não houve diferença na porcentagem de células positivas, apenas na quantidade de expressão de MHC (referida como IMF). O tratamento com FD em TECs isoladas não alterou a expressão de MHC, como demonstrado no item 5.1.5.

## 5.2 Seção B – Efeito da Friedelina em Células Epiteliais Tímidas Murinas Induzidas à Senescência por Estresse Oxidativo

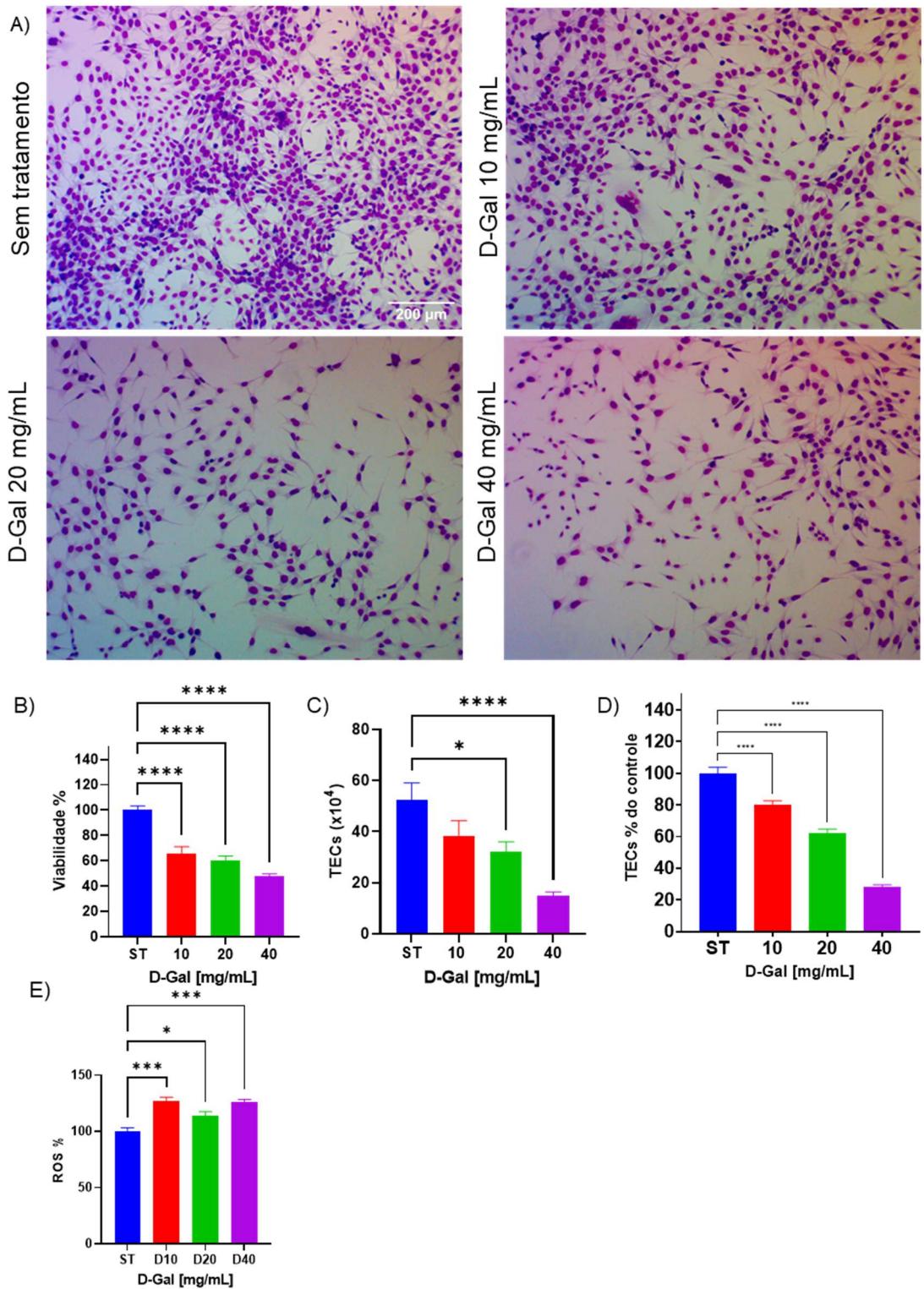
### 5.2.1 Diminuição da proliferação das TECs através do estresse oxidativo.

Para determinar a dose adequada de D-gal para induzir senescência celular nas células epiteliais tímicas (TECs) *in vitro*, foi realizada uma avaliação inicial da morfologia, da viabilidade e da proliferação das TECs após o tratamento com diferentes concentrações de D-gal por 48 horas.

Como ilustrado na Figura 18A (pág. 67), após o tratamento, as células apresentaram uma morfologia mais alongada, com uma menor relação citoplasma/núcleo, e algumas células exibiram um aumento no tamanho nuclear. A viabilidade celular diminuiu de forma dependente da dose (Figura 18B, pág. 67), assim como o número total de células após 48 horas de tratamento (Figura 18C e D, pág. 67), com a maior redução observada na concentração de 40 mg/mL, de 52,3%.

Para detectar o estresse oxidativo no epitélio tímico induzido pela D-gal, as TECs tratadas tiveram os níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) intracelular quantificados por citometria de fluxo, indicando um aumento nos níveis de ERO, especialmente na concentração de 40 mg/mL de D-Gal (Figura 18E, pág. 67).

Figura 18 - Efeitos da D-gal em células epiteliais tímicas.



(A) Imagens representativas da morfologia das TECs após tratamento com D-gal nas concentrações de 10, 20 e 40 mg/mL por 48 horas. Aumento: 100x. Viabilidade celular (B) e contagem total de células (C e D) após 48 horas de tratamento com diferentes concentrações de D-gal. (E) Quantificação da produção de ERO intracelulares em TECs tratadas com D-gal por 48 horas, utilizando citometria de fluxo com a sonda DHR-123. O gráfico mostra a média  $\pm$  EPM. \*  $P \leq 0,05$ , \*\*\*  $P \leq 0,0005$  e \*\*\*\*  $P \leq 0,0001$ .

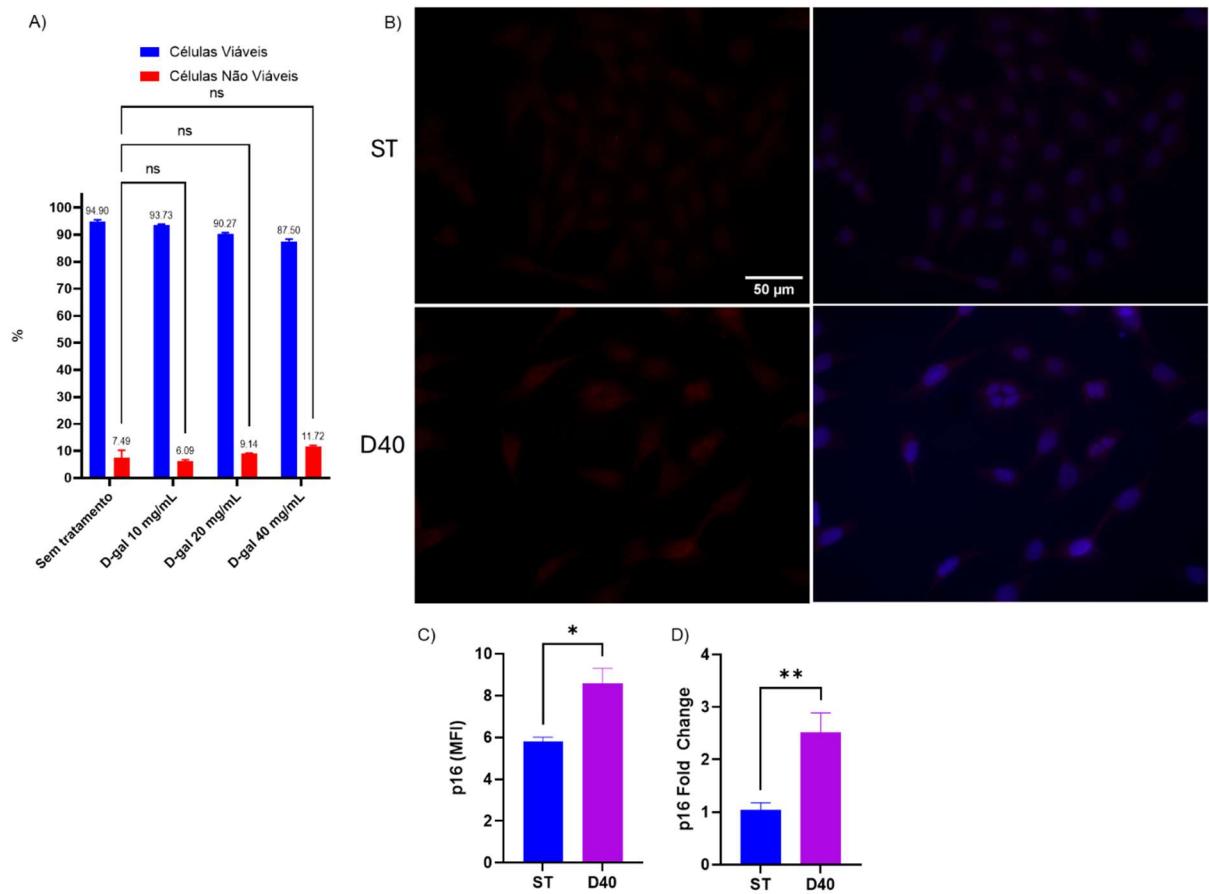
### 5.2.2 D-gal induziu senescência celular nas TECs

Para investigar se a redução na viabilidade estava associada à senescência celular e não à apoptose, foi realizado um ensaio de citometria de fluxo com marcação de Anexina V/PI. Após 48 horas de tratamento, os resultados mostraram que não houve aumento significativo nas TECs marcadas com Anexina V em comparação ao grupo ST (Figura 19A, pág. 69).

Realizou-se ainda uma análise de imunofluorescência para detectar a expressão de p16, indicando um aumento significativo na expressão de p16 nas TECs tratadas com D-gal em comparação com o grupo controle (Figura 19B, pág. 69).

Além disso, a expressão gênica de p16 foi avaliada por PCR quantitativo (qPCR). Os resultados confirmaram que a expressão de p16 foi significativamente maior no grupo tratado com D-gal em relação ao grupo sem tratamento (Figuras 19C e 19D, pág. 69).

Figura 19 - D-gal não induz a morte celular em células epiteliais tímicas.

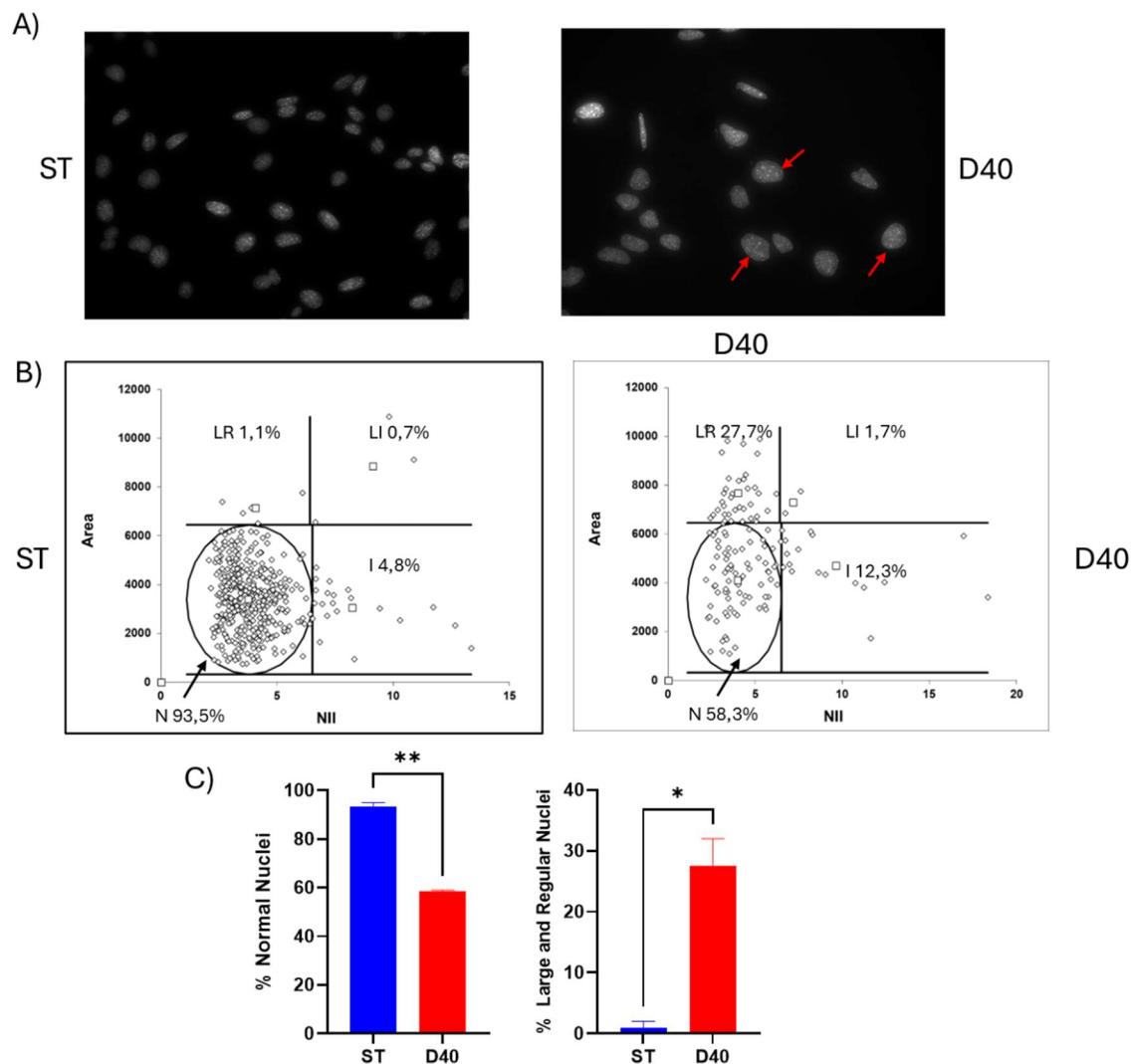


As TECs foram tratadas com 10, 20 ou 40 mg/mL por 48h. A) Ensaio de apoptose por Anexina V/PI. B) fotomicrografias demonstrativas da expressão da proteína p16 por imunofluorescência. Aumento: 400x. C e D) A expressão de p16 por imunofluorescência (MFI) e expressão genica relativa por PCR. O gráfico mostra a média  $\pm$  EPM. \*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$ .

### 5.2.3 Avaliação da Senescência Celular por Morfometria Nuclear

A partir de medições de morfometria nuclear, foi realizada uma análise de componentes principais para filtrar quatro medições que melhor separam núcleos regulares de irregulares. Essas medições incluíram aspecto, área da caixa, razão do raio e arredondamento, que foram combinadas em um único índice de irregularidade nuclear (NII). Observou-se que o tratamento com D-gal na concentração de 40 mg/mL por 48h reduziu a proporção de núcleos de tamanho normal (N) e aumentou a proporção de núcleos grandes e regulares (Large and Regular, LR) em comparação com as TECs não tratadas (Figuras 20 B e 20C, pág. 70).

Figura 20. Efeitos da D-gal na morfometria nuclear das células epiteliais tímicas.



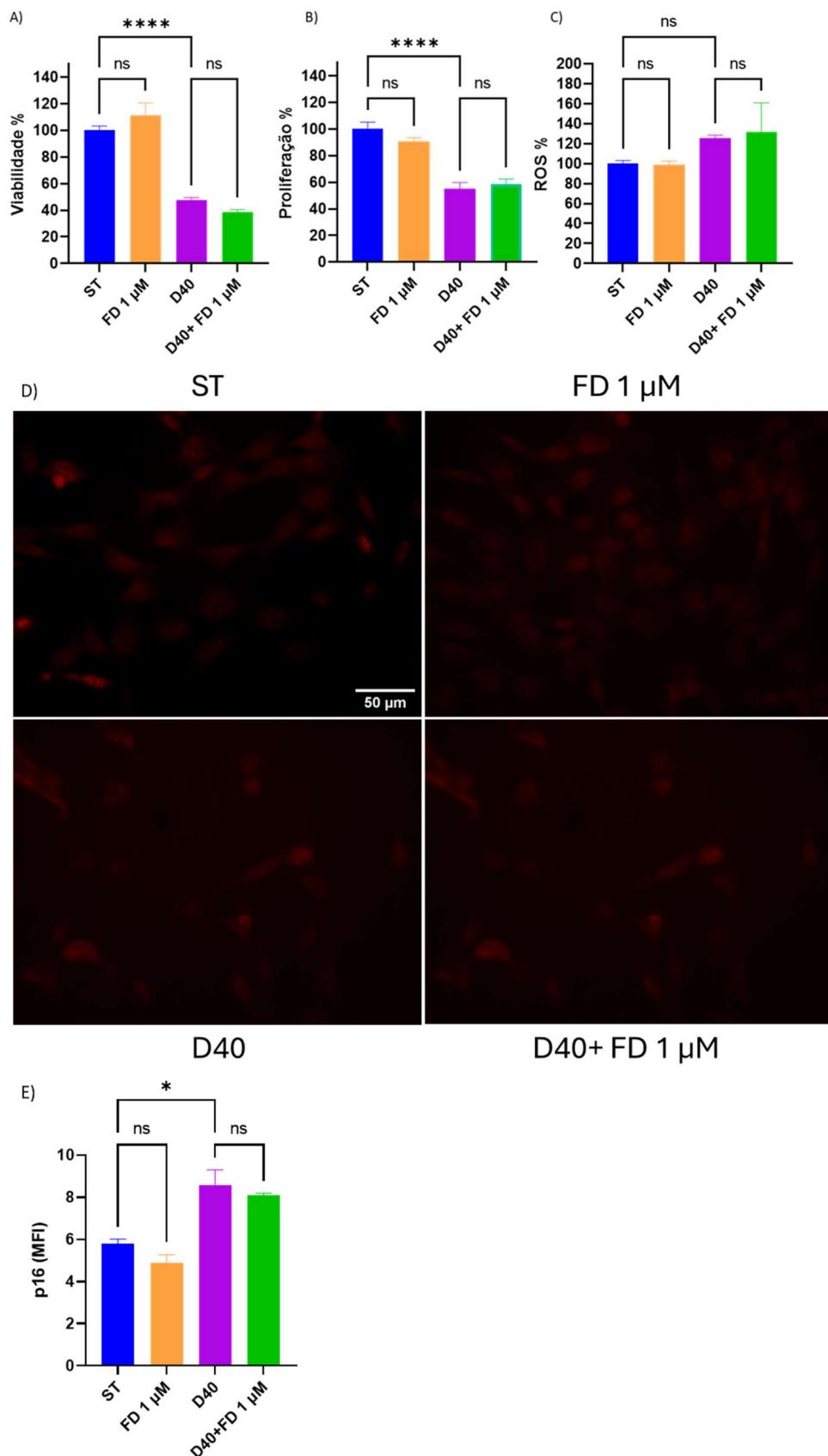
Os núcleos corados com DAPI (fotomicrografias) foram analisados quanto ao tamanho e irregularidade. A) Fotomicrografias representativas de núcleos de células controle (ST) e células tratadas com D-Gal (D40). Aumento 400x. As setas vermelhas mostram os núcleos de tamanho grande e regulares (LR). B) As porcentagens de normal (N), grande e regular (LR), grande e núcleos irregulares (LI) e irregulares (I) são mostrados C) Porcentagem dos núcleos do grupo sem tratamento e grupo D-gal. O gráfico mostra a média  $\pm$  EPM. \*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,05$ .

#### **5.2.4 Efeito da friedelina sobre a senescência induzida em células epiteliais tímicas**

Com o objetivo de avaliar o potencial da FD sobre a senescência celular induzida por estresse oxidativo em TECs, realizou-se experimentos utilizando a concentração de 40 mg/mL de D-gal por 48 horas para induzir a senescência. A FD foi, então, utilizada na concentração de 1  $\mu$ M por 48 horas, com pré-tratamento de 1 hora antes da indução de senescência celular.

Os resultados obtidos indicam que a FD não foi capaz de reverter os efeitos da senescência induzida pela D-galactose. A viabilidade celular e a proliferação das TECs tratadas com FD não diferiram significativamente do grupo senescente (Figura 21A e 21B, pág. 72). Além disso, a FD não reduziu o estresse oxidativo nas células senescentes, conforme evidenciado na figura 21C. Por fim, a expressão do marcador de senescência p16 também não foi alterada pela FD, como demonstrado pelas figuras 21D e 21E (pág. 72).

Figura 21 - O tratamento com friedelina não reverte a senescência induzida por D-gal em células epiteliais timicas.

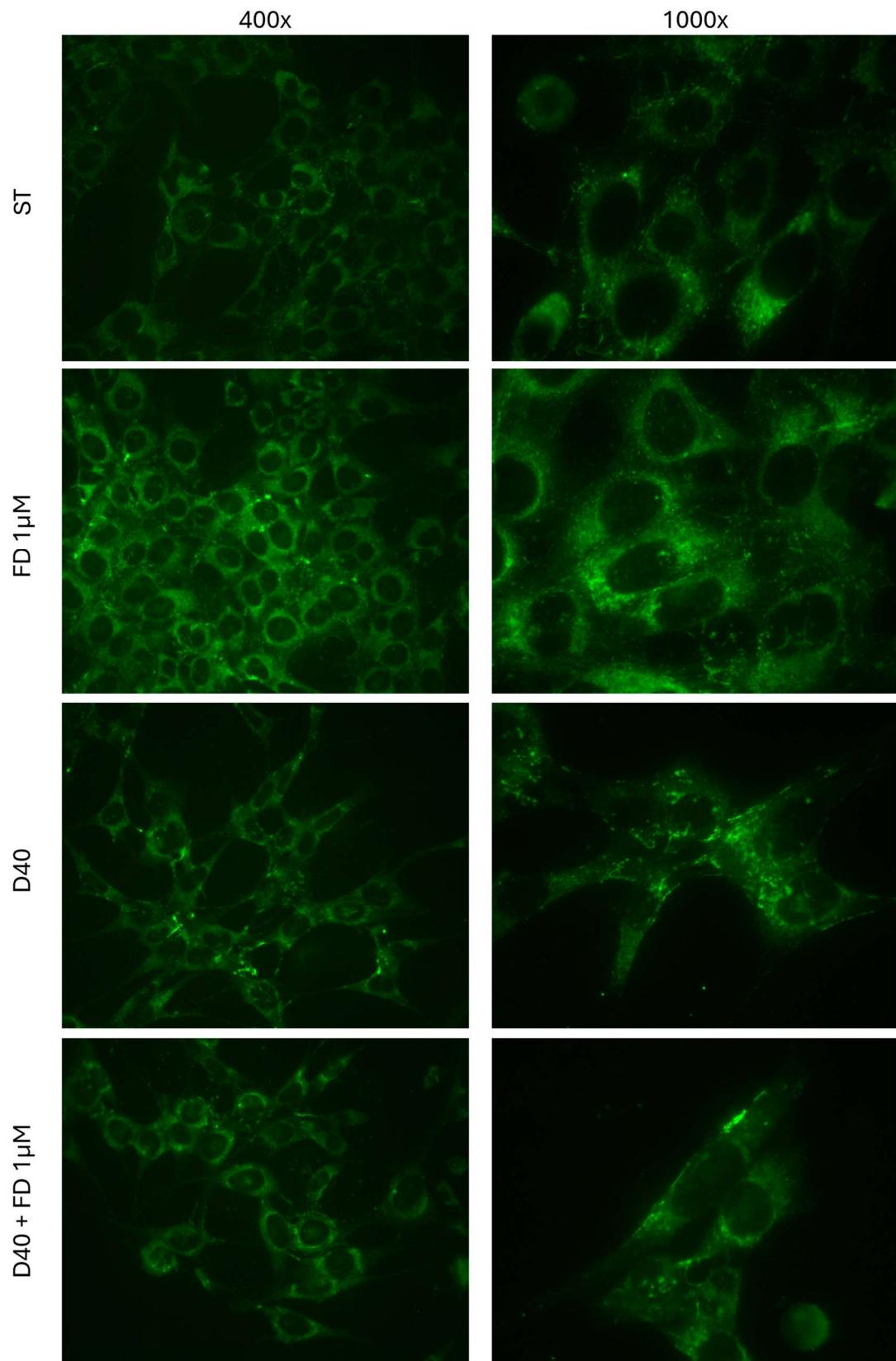


(A-C) Gráficos representando a viabilidade (A), proliferação (B) e níveis de ERO (C) em TECs controle (ST), tratadas com FD 1  $\mu$ M, induzidas à senescência com D-gal (D40) e senescentes tratadas com FD (D40 + FD 1  $\mu$ M). (D-E) Análise da expressão de p16 por imunofluorescência (D) e quantificação da intensidade de fluorescência (E). \*p < 0,05, \*\*\*\*p < 0,0001; ns: não significativo.

### **5.2.5 Friedelina modula a expressão de moléculas da matriz extracelular de TECs envelhecidas**

Conforme indicado na figura 22 (pág. 74), o grupo controle apresentou uma expressão de laminina predominantemente perinuclear, com difusão em direção às extremidades celulares e formação de pequenas fibras nas junções entre as células. O tratamento com FD intensificou a expressão da laminina, principalmente ao redor do núcleo, mas também de forma difusa no citoplasma. No grupo senescente (D40), a organização da laminina se mostrou alterada, com o surgimento de estruturas fluorescentes em forma de fibras curtas e agregados pontuais. Já no grupo senescente tratado com FD (D40+FD), o perfil foi similar ao grupo senescente, porém com uma aparente redução na quantidade de agregados fluorescentes.

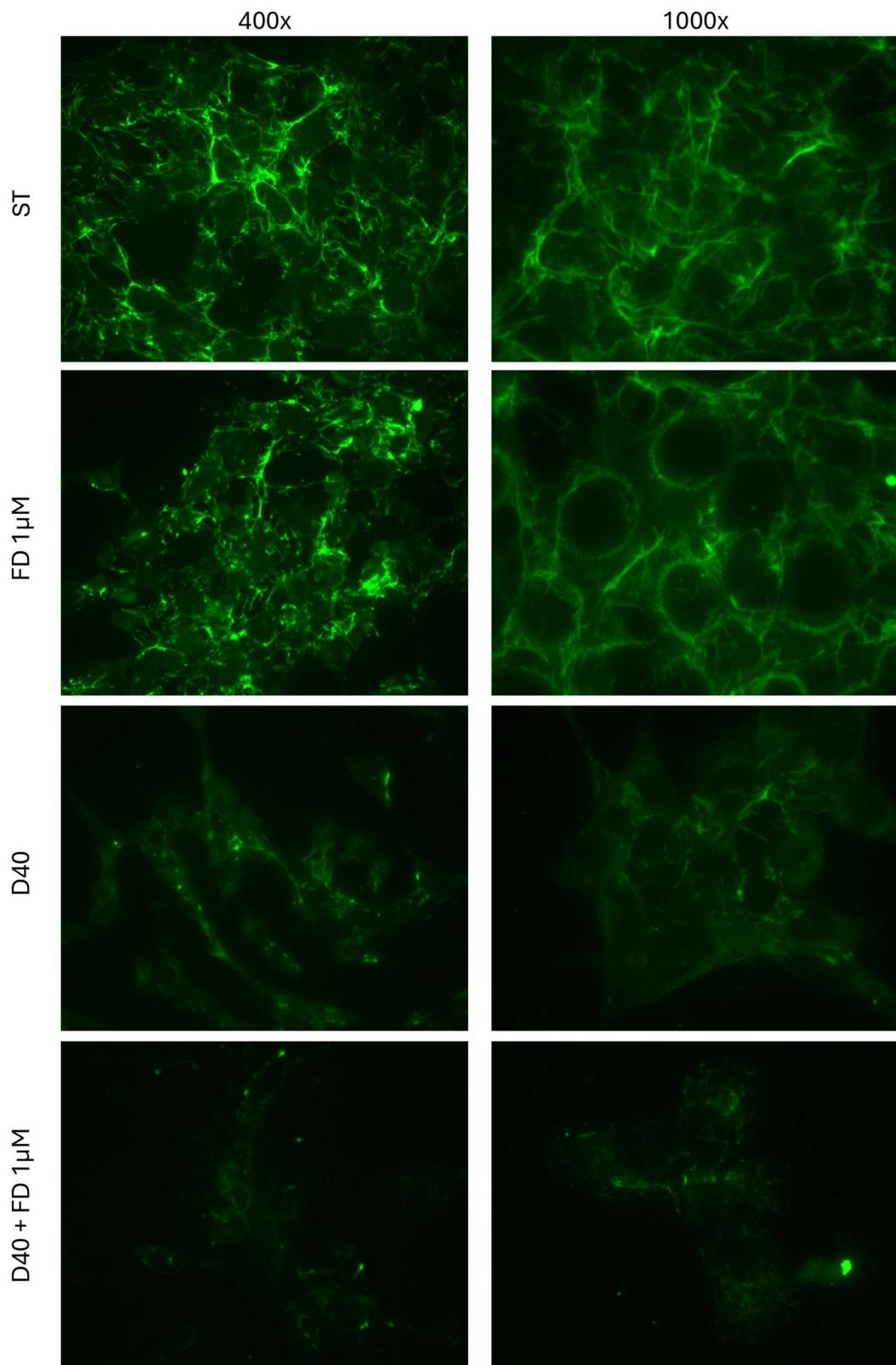
Figura 22 - Efeito da senescência e do tratamento com friedelina na expressão e distribuição de laminina nas células epiteliais tímicas.



A imunofluorescência foi utilizada para detectar laminina em TECs controle (ST), tratadas com FD 1  $\mu$ M, induzidas à senescência (D40) e senescentes tratadas com FD 1  $\mu$ M. Aumentos de 400x e 1000x.

Quanto à análise da fibronectina, como visto na figura 23 (pág. 76), observou-se que o grupo controle apresentou distribuição difusa por toda a célula, com organização em uma complexa rede de fibras. O tratamento com FD 1  $\mu$ M apresentou um padrão similar, com um discreto aumento na região perinuclear. Em contraste, a exposição à D-gal 40 mg/mL não alterou a expressão citoplasmática da fibronectina, mas impactou na sua organização. As fibras se apresentaram mais curtas e menos fluorescentes, além da formação de agregados fluorescentes, sugerindo problemas no transporte da molécula para fora da célula. Nas TECs senescentes tratadas com FD 1  $\mu$ M foi visto um perfil similar ao grupo senescente, com um aumento ainda maior no número de agregados intracelulares e ausência da rede de fibras característica do controle.

Figura 23. Efeito da senescência e do tratamento com friedelina na expressão e distribuição de fibronectina nas TECs.

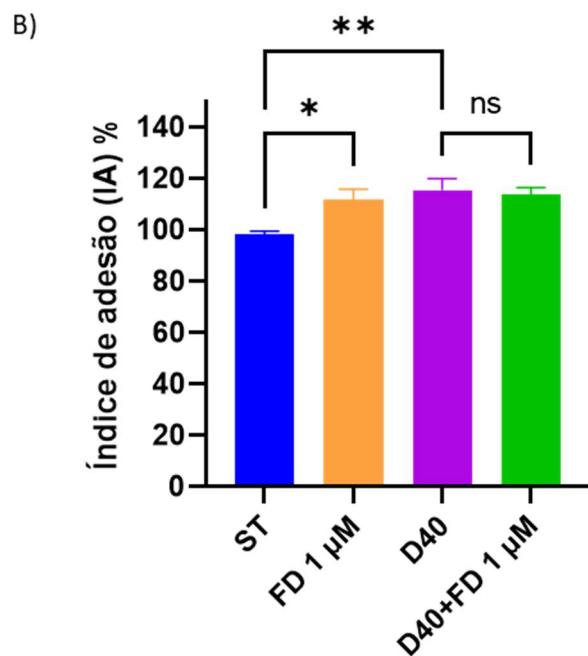
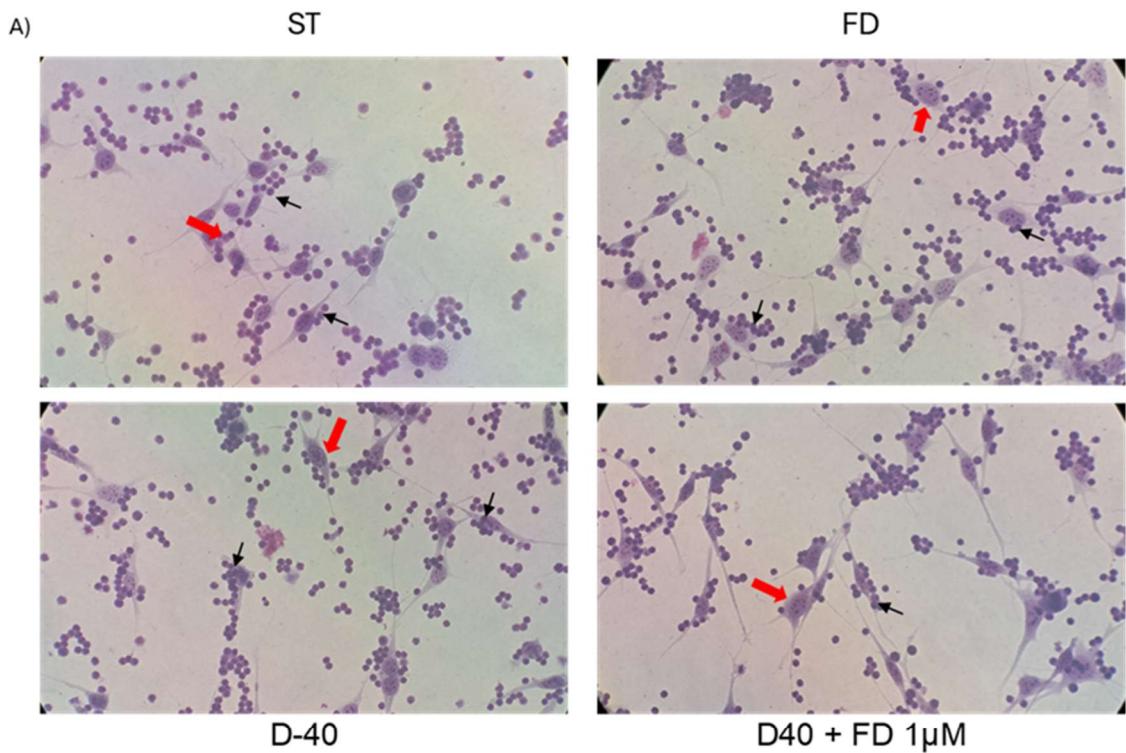


A imunofluorescência foi utilizada para detectar fibronectina em TECs controle (ST), tratadas com FD 1  $\mu$ M, induzidas à senescência (D40) e senescentes tratadas com FD 1  $\mu$ M. Aumentos de 400x e 1000x.

#### **5.2.6 Efeito da friedelina sobre adesão de timócitos em cocultivo com células epiteliais tímicas senescentes**

Após o período de adesão por 1h, realizou-se a contagem aproximada de 200 TECs, associadas ou não a timócitos, demonstrado no painel de imagens na figura 24A (pág. 78). Após a normalização dos dados em relação ao grupo controle, observou-se um aumento significativo na adesão de timócitos tanto no grupo tratado apenas com friedelina quanto nas células senescentes, conforme demonstrado na figura 24B (pág. 78). No entanto, a friedelina não modulou significativamente a adesão de timócitos às TECs envelhecidas.

Figura 24 - Figuras representativas da adesão dos timócitos às células epiteliais tímicas



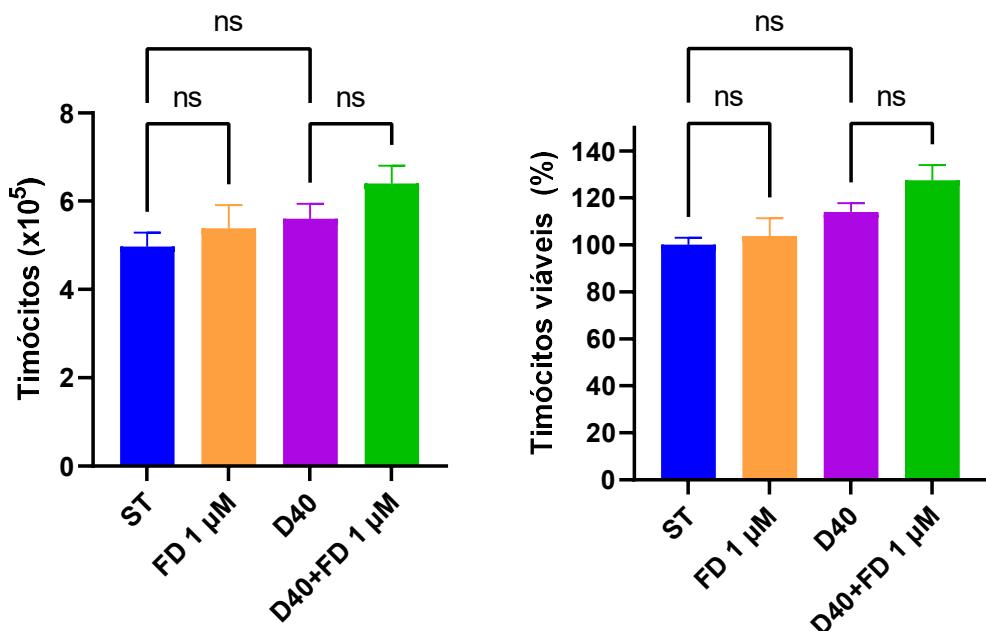
A adesão timócitos-TEC foi realizada em meio de cultivo por 1h. Após o ensaio de adesão as células foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa. As fotos foram capturadas em microscópio óptico em objetiva de 400x com auxílio de câmera de celular acoplada. Setas grossas vermelhas identificam TEC e setas finas pretas identificam timócitos. B) A

adesão de timócitos às células 2BH4 nos grupos controle não senescente (sem tratamento), TECs tratadas com FD 1  $\mu$ M, TECs senescentes D40 e TECs senescentes tratadas com FD 1  $\mu$ M. Resultado da normalização dos ensaios baseado no grupo controle (ST). Os dados foram analisados através do teste ONE-way ANOVA e as diferenças consideradas significativas em relação ao seu respectivo controle quando \* $p\leq 0,05$ . N=2, em triplicata.

### 5.2.7 Friedelina não altera a sobrevivência de timócitos em cocultivo com células epiteliais tímicas senescentes

Na contagem total de timócitos (Figura 25A, pág. 79), não foi observada diferença significativa entre os grupos estudados. Quando os dados foram normalizados em relação ao grupo controle, o perfil foi mantido, não sendo observada modulação por parte do tratamento com FD na sobrevivência dos timócitos em TECs senescentes (Figura 25B, pág. 79). No entanto, embora não significativo, o grupo de TECs senescentes tratadas com friedelina apresentou uma maior quantidade de timócitos viáveis em comparação com o grupo não tratado, 129,3% vs 112,8%, como visto na figura 25B.

Figura 25 - Sobrevivência de timócitos em cocultura com TECs senescentes.



A) Contagem total de timócitos às células 2BH4 nos grupos controle não senescente (sem tratamento), TECs tratadas com FD 1  $\mu$ M, TECs senescentes D40 e TECs senescentes

tratadas com FD 1  $\mu$ M. (B) Dados normalizados em relação ao grupo controle. Os dados foram analisados utilizando o teste ONE-way ANOVA, \* $p\leq 0,05$ . N=2, em triplicata.

## 6 DISCUSSÃO

As TECs são os principais elementos que compõem o microambiente tímico, tendo como função a produção de fatores solúveis e a expressão de ligantes e de receptores que direcionam a migração e consequente a maturação dos linfócitos T (Wang *et al.*, 2020a). Defeitos intrínsecos e extrínsecos nas TECs acarretam falha na função tímica, com prejuízo na geração de linfócitos T imunocompetentes, o que faz das TECs importantes alvos no desenvolvimento de novas terapias que visem o restabelecimento do timo (Lepletier *et al.*, 2015). A involução tímica, um processo caracterizado pela progressiva deterioração da função e da estrutura do timo, órgão essencial para a maturação de linfócitos T, está intrinsecamente associada ao envelhecimento e ao aumento concomitante do estresse oxidativo (Palmer, 2013). As TECs são particularmente afetadas por esse processo, comprometendo a produção de linfócitos T e a resposta imune (Srinivasan *et al.*, 2023).

Nesse contexto, a busca por compostos bioativos capazes de modular a biologia das TECs e mitigar os efeitos deletérios do estresse oxidativo representa uma estratégia promissora para o desenvolvimento de terapias que visem à preservação da função imune e, consequentemente, à promoção da saúde em indivíduos senescentes. Alguns triterpenos vegetais, como os derivados de *Ganoderma lucidum* (GLK) e o ácido betulínico (BetA), têm ação imunomoduladora no timo (Feng *et al.*, 2013; Le Pang *et al.*, 2017). Os triterpenos de GLK restauram a função imunológica, promovendo a proliferação de linfócitos T e aumentando a produção de interleucinas (Feng *et al.*, 2013). O BetA, por sua vez, estimula a regeneração tímica e a resposta imunológica, além de modular citocinas pró-inflamatórias (Le Pang *et al.*, 2017).

A friedelina, um triterpeno pentacíclico amplamente distribuído em diversas fontes vegetais, tem despertado interesse da comunidade científica devido ao seu potencial imunomodulador demonstrado em estudos prévios (Panossian; Wikman, 2008). No entanto, sua influência na biologia do timo e, mais especificamente, nas TECs, permanece pouco elucidada. Diante disso, o presente estudo propôs

investigar os efeitos da friedelina sobre as células epiteliais tímicas *in vitro*, bem como a sua capacidade de modular a senescência celular induzida por estresse oxidativo.

Como ponto de partida, foi realizada a caracterização dos efeitos diretos da friedelina sobre células epiteliais tímicas utilizando a linhagem murina 2BH4. Foi possível observar que as células 2BH4 possuem características morfológicas compatíveis com células epiteliais, estando de acordo com a análise realizada por Amarantes-Mendes (1995) e colaboradores que descreveram as 2BH4 como células variando de forma poligonal para fusiforme, com núcleo redondo pequeno com nucléolos proeminentes. Além disso, as TECs podem se organizar como "paralelepípedos" ou como células mais difusas, conectadas por longos prolongamentos citoplasmáticos (Ropke, 1997). Para confirmar o fenótipo epitelial dessa linhagem foi realizada marcação para citoqueratinas totais, que são moléculas constituintes do citoesqueleto das células epiteliais, pertencendo aos filamentos intermediários (Broekaert, 1990; Villegas *et al.*, 2018). Foi visto que praticamente todas as células 2BH4 (97,99%) expressavam esse marcador (Figura 9, pxx).

Outra característica observada nas células 2BH4 foi a expressão dos receptores de superfície MHC I, MHC II, VLA-5, VLA-6 e NP-1 (figura 9, pxx). As moléculas do MHC são importantes por auxiliar na seleção positiva e negativa dos timócitos, com a apresentação de auto-antígenos para os timócitos e para a regulação da diferenciação dessas células em linfócitos T maduros (Klein *et al.*, 2014). Neste trabalho foi observado que as células 2BH4 expressaram tanto MHC I quanto MHC II, sendo este último em baixos níveis, estando esses dados alinhados a estudos que demonstraram que MHC I é expresso em grande quantidade em TECs de origem murina e humana, enquanto o MHC II é fracamente expresso ou ausente (Eshel *et al.*, 1990; Fernandez *et al.*, 1994; Ropke *et al.*, 1990; Ropke; Elbroend, 1992; Speck-Hernandez *et al.* 2018). Já as integrinas VLA-5 e VLA-6 são heterodímeros compostos por duas cadeias,  $\alpha$  e  $\beta$ , que medeiam as interações entre o ambiente extracelular e o citoesqueleto de actina (Vicente-Manzanares; Choi; Horwitz, 2009). A integrina VLA-5 é o receptor para a molécula de matriz extracelular fibronectina, sendo composta pela cadeia  $\alpha 5$  associada à subunidade

$\beta$ 1. Enquanto a integrina VLA-6 é formada pela cadeia  $\alpha$ 6 que se liga também uma subunidade  $\beta$ 1 formando o receptor de laminina (Humphries *et al.*, 2006). Foi observado neste estudo que mais de 80% das células 2BH4 em cultivo expressam essas integrinas, as quais são importantes para a migração, a adesão e a diferenciação dos timócitos sobre o substrato de matriz extracelular.

Após a caracterização da linhagem de TECs utilizada como modelo nesse estudo, o próximo passo foi verificar a viabilidade dessas células após o tratamento com friedelina. As células tratadas com friedelina nas concentrações de 0,1 e 1  $\mu$ M por até 24 horas mantiveram no mínimo 85% de viabilidade. Até o presente momento não há na literatura dados sobre a citotoxicidade *in vitro* da friedelina em células epiteliais tímicas. Contudo, em estudo realizado por Ferro (2016), foi observado que o tratamento com friedelina nas concentrações de 10, 25, 50 e 100  $\mu$ M no período de 12h não diminuiu a viabilidade de neutrófilos humanos *in vitro*, porém em macrófagos murinos da linhagem J774, o tratamento com friedelina na concentração de 100  $\mu$ M por 24h diminuiu a viabilidade dos macrófagos tratados em cerca de 35% em relação ao controle. Em outro estudo, Susanti e colaboradores (2012) realizaram o tratamento *in vitro* com friedelina em adipócitos da linhagem 3T3-L1 nas concentrações de 10, 50 e 100  $\mu$ M por 48h e observaram que o composto diminuiu a viabilidade dessas células de forma dose-dependente em cerca de 68% na dose de 100  $\mu$ M. Diante dos resultados apresentados neste trabalho com 24h de tratamento, as concentrações 0,1  $\mu$ M e 1  $\mu$ M foram escolhidas para os demais ensaios realizados na primeira parte deste trabalho.

Com isso, o primeiro passo foi determinar se a FD poderia modular a expressão de CXCL12 no modelo celular deste estudo. Foi visto que a FD manteve a produção de CXCL12 inalterada, independentemente da concentração utilizada. Essa quimiocina, também conhecida como Fator-1 Derivado de Células Estromais (do inglês Stromal Cell-derived Factor-1, SDF-1), é secretada e ligada à superfície de TECs corticais (Kadakia *et al.*, 2019), sendo uma das quimiocinas mais cruciais que impulsionam a migração de timócitos (Guo *et al.*, 2013). A produção de CXCL12 por TECs pode ser modulada por outras moléculas, como a prolactina e o hormônio do crescimento, que promovem a sua secreção (Smaniotti *et al.*, 2005; Medeiros *et al.* 2021). Produtos naturais que modulam o eixo CXCL12/CXCR4 têm sido

estudados nos últimos anos, como o ácido pomólico (Kim *et al.* 2016), a naringina (Zhao *et al.* 2018), a saikosaponina A (Wang *et al.* 2020b), e o ácido ursólico (Cao; He 2022), demonstrando suas aplicações para várias patologias ligadas a este importante eixo no organismo.

Sabe-se que, além das quimiocinas, a MEC produzida por células estromais no timo é essencial para as interações célula-célula que governam a maturação dos timócitos (Savino *et al.* 2004). As glicoproteínas fibronectina e laminina são produzidas principalmente pelas TECs como os principais componentes da MEC tímica, com um papel importante na adesão celular, na proliferação e na diferenciação de timócitos (Silva *et al.*, 2020; Savino *et al.*, 2015). O aumento na produção de fibronectina e laminina por TECs tratados com FD indica o efeito terapêutico benéfico deste triterpeno, uma vez que o aumento em laminina melhora a viabilidade e proliferação de TECs (Silva *et al.*, 2022), sendo importante para novas estratégias de tratamento e de transplante ou de rejuvenescimento do timo (Asnaghi *et al.*, 2021). Resultado semelhante foi observado por Carmo (2019), em que o tratamento com friedelina por 24h na concentração de 100  $\mu$ M foi capaz de induzir um aumento na produção de laminina em fibroblastos murinos da linhagem 3T3.

Após verificar a influência da friedelina na produção de laminina e de fibronectina, foi analisado se esse triterpenoide também poderia modificar a expressão dos receptores MHC I, MHC II e NP-1, bem como a expressão das integrinas VLA-5 e VLA-6. Observou-se que o tratamento com a friedelina não modificou a expressão dos receptores estudados. Além disso, não foi possível avaliar a expressão do MHC II, dado alinhado a literatura, onde mostrou que essa molécula é pouco expressa em TECs quando cultivadas *in vitro*, contudo, é possível induzir a sua expressão com interferon- $\gamma$ , não realizado neste estudo (Berrih *et al.*, 1985).

A deposição de matriz extracelular, bem como a expressão dos receptores que reconhecem essas moléculas são essenciais para que as TECs desempenhem normalmente as suas funções, como por exemplo a adesão célula-célula (Savino *et al.*, 2015). Por isso, foi realizado ensaio de adesão através da cocultura de timócitos frescos adicionados às TECs tratadas com friedelina. Desta forma, foi possível

observar que a friedelina aumentou a adesão de timócitos totais, bem como de timócitos DP e CD4<sup>+</sup>, às células epiteliais tímicas *in vitro*. Esses resultados sugerem que a adesão aumentada dos timócitos às TECs pode ser devido à maior deposição de laminina pelas TECs após o tratamento com friedelina, porém sem estar relacionado ao aumento da expressão de VLA-6. Corroborando esses achados, Lins e colaboradores (2016) demonstraram que o tratamento *in vitro* com o hormônio do crescimento (GH), um conhecido imunomodulador, aumentou a produção de laminina pelas TECs humanas e também aumentou a adesão de timócitos humanos a essas células.

Diversos fatores presentes ou produzidos pelas TECs podem influenciar a adesão e a sobrevivência dos timócitos. Dentre esses fatores destaca-se a interação direta com os timócitos mediada por moléculas de adesão célula-célula e pelas moléculas de MHC classe I e II, e a produção de citocinas e de fatores solúveis, como IL-7 e timulina (Savino, 2004; Shitara, 2013; Nitta; Suzuki, 2016). Assim, considerando os resultados anteriormente obtidos em que a friedelina teve ação na biologia das TECs neste estudo, foi analisado os efeitos do composto sobre a sobrevivência de timócitos após cocultura com as células 2BH4 por 72 horas. Similarmente ao ensaio de adesão, a FD (1 µM) aumentou a sobrevivência dos timócitos após 72 h de cocultura. Além disso, analisou-se a expressão de MHC nas TECs após cocultura com timócitos (na presença ou não de FD). Surpreendentemente, a expressão das moléculas de MHC (I e II) aumentaram nas TECs após a cocultura com timócitos na presença de FD a 1 µM. Esses achados são relevantes pois demonstram que a friedelina tem uma ação moduladora positiva nas interações entre timócitos e TECs, o que é fundamental para o controle da função tímica.

O desenvolvimento de células T que ocorre nos compartimentos tímicos depende das interações entre timócitos em maturação e TECs (Ramond *et al.*, 2014). Nessa comunicação tímica, a adesão célula-célula mediada pela MEC e seus receptores é um processo importante durante o qual os timócitos interagem com as TECs e recebem sinais para sua diferenciação (Emre *et al.* 2013). Além disso, as TECs orquestram a proliferação e a sobrevivência dos timócitos em diferenciação (Speck-Hernandez *et al.* 2018). Os resultados deste estudo mostraram que, além

de sua influência direta nas TECs, a FD é capaz de afetar indiretamente os timócitos, promovendo a sua adesão às TECs e um aumento na sua sobrevivência.

Desta forma os resultados obtidos na primeira etapa deste estudo evidenciaram a influência da friedelina na biologia das TECs. O tratamento com friedelina demonstrou ser seguro para as TECs, não comprometendo a sua viabilidade nas concentrações testadas, bem como estimulou a produção de laminina e de fibronectina e, consequentemente, a adesão e a sobrevivência de timócitos às TECs, sugerindo um papel na otimização da interação célula-célula essencial para a maturação dos linfócitos T. No entanto, a friedelina não alterou a expressão de outros receptores indicando a necessidade de estudos adicionais para explorar seus efeitos em outras vias relacionadas à função tímica.

Após demonstrar o impacto da friedelina em TECs sob condições normais, investigou-se o seu potencial na modulação da senescência induzida por estresse oxidativo, utilizando a D-galactose como agente indutor. A senescência celular é um marco do envelhecimento e está associada a diversas patologias relacionadas à idade (Campisi, 2005; López-Otín *et al.*, 2013). No tím, a senescência das células epiteliais tímicas (TECs) contribui para a involução do órgão e com o declínio da função imune (Cepeda; Griffith, 2018).

A D-galactose (D-gal) é um indutor de senescência amplamente utilizado em modelos experimentais, mimetizando o processo de envelhecimento por meio de diferentes mecanismos: aumento do estresse oxidativo, formação de produtos de glicação avançada (AGEs), disfunção mitocondrial e alterações na expressão gênica das células (Zhang *et al.*, 2022; Sha *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2022; Du *et al.*, 2021). Em conjunto, esses mecanismos desencadeiam o fenótipo senescente, caracterizado por parada do ciclo celular, resistência à apoptose e secreção de fatores pró-inflamatórios (SASP) (Coppé *et al.*, 2008), culminando em efeitos deletérios ao organismo.

Os resultados encontrados neste estudo, assim como os de Du *et al.*, (2021), demonstram que a D-galactose efetivamente induz senescência em células tímicas, manifestando-se através de alterações morfológicas, da redução da proliferação e do aumento da expressão de p16INK4a. Adicionalmente, observou-se um aumento

na produção de ERO, corroborando o papel central do estresse oxidativo na senescência induzida por D-galactose, como já demonstrado em outros modelos celulares (Zhao *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2024).

A análise de morfometria nuclear (NMA) não apenas confirmou o estado de senescência, evidenciado pelo aumento na proporção de núcleos grandes e regulares, mas também revelou uma heterogeneidade interessante nos perfis nucleares após a indução da senescência. Essa observação sugere que, mesmo sob o mesmo tratamento, nem todas as células respondem de forma homogênea, com algumas mantendo um perfil nuclear normal e outras exibindo as características nucleares típicas da senescência. Tal heterogeneidade na resposta celular à indução da senescência é consistente com observações prévias em outros contextos. Filippi-Chiela *et al.*, (2022) demonstraram que a vincristina, um agente quimioterápico, induz diferentes níveis de apoptose, catástrofe mitótica e senescência em células de glioblastoma, dependendo do background genético. Da mesma forma, Menegotto *et al.*, (2017) observaram que a indução de senescência por knockdown do receptor do peptídeo liberador de gastrina em células de glioblastoma não resultou em uma resposta uniforme, com algumas células escapando da senescência. Adicionalmente, Grun *et al.*, (2023) relataram que a obesidade induz senescência e disfunção em células-tronco derivadas de tecido adiposo, mas de forma heterogênea, com diferentes subpopulações celulares exibindo respostas distintas ao estresse metabólico. Essa complexidade na resposta celular à senescência ressalta a necessidade de abordagens multifacetadas para a sua compreensão e eventual intervenção terapêutica.

Diante do estabelecimento do modelo de senescência induzida por D-galactose, o próximo passo foi avaliar o efeito da friedelina sobre esse processo. A friedelina, um triterpeno pentacíclico com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, demonstrou potencial para modular diversos processos celulares.

Neste estudo, a friedelina (1  $\mu$ M) não demonstrou capacidade de reverter significativamente os principais marcadores de senescência induzida por D-galactose em TECs, incluindo a viabilidade, a proliferação, os níveis de ERO e a expressão de p16INK4a. Este resultado contrasta com os achados de Yang *et al.*, (2011), que observaram um efeito antissenescência da friedelina e do epifriedelanol

(10 µg/mL por 3 dias) em fibroblastos dérmicos humanos e células endoteliais da veia umbilical humana, com redução na atividade da SA-β-gal e na expressão de p53 e p21, marcadores de senescência celular. Essa discrepância pode ser atribuída a diferenças intrínsecas entre os tipos celulares ou a vias de sinalização específicas ativadas em cada contexto. Os achados deste estudo sugerem que o efeito antissenescência da friedelina pode ser dependente do tipo celular e que concentrações mais elevadas ou combinações com outros compostos podem ser necessárias para observar efeitos significativos em TECs.

A matriz extracelular (MEC) do timo, composta por proteínas como colágeno, fibronectina e laminina, fornece suporte estrutural e sinais cruciais para a função das TECs e o desenvolvimento dos timócitos (Villa-Verde *et al.*, 2002). A interação entre TECs e a MEC é essencial para a integridade do microambiente tímico e a maturação adequada dos linfócitos T (Yang *et al.*, 2009). Estudos *in vitro* demonstram que a laminina pode desempenhar um papel ativo na dinâmica do microambiente tímico, promovendo a adesão de timócitos às células epiteliais tímicas (TECs), a liberação de timócitos por células *nurses* tímicas e a subsequente reconstituição do complexo linfoepitelial (Ocampo *et al.*, 2008). Assim, alterações na MEC podem comprometer o desenvolvimento dos timócitos e contribuir para a involução tímica relacionada à idade (Yang *et al.*, 2009; Jenkinson *et al.*, 2008).

Apesar da friedelina não ter revertido o fenótipo senescente induzido por D-galactose nas TECs, observou-se sua capacidade de modular a expressão e organização de componentes da matriz extracelular (MEC). O tratamento com a friedelina promoveu um aumento na expressão de laminina, tanto em células senescentes quanto em células não senescentes. No entanto, a análise das microfotografias revelou que a D-galactose, embora não pareça aumentar a produção total de laminina, induz uma reorganização de sua distribuição, caracterizada pela formação de agregados focais e pequenas redes, localizados predominantemente nas junções intercelulares das TECs.

Já a fibronectina, outra importante molécula da MEC, apresentou organização e distribuição alteradas nas TECs senescentes, com a formação de agregados fluorescentes e a perda da característica rede de fibras. O tratamento com friedelina não foi capaz de reverter completamente essas alterações, mas

pareceu reduzir a intensidade dos agregados intracelulares, sugerindo um possível efeito na modulação do transporte ou da degradação da fibronectina em células senescentes.

Apesar da escassez de estudos sobre os efeitos específicos da friedelina na produção e na deposição de fibronectina e de laminina no timo e em células epiteliais tímicas, a literatura demonstra que outros triterpenos exercem efeitos moduladores sobre a MEC. O ácido oleanólico reduziu a expressão de fibronectina e de procolágeno I em fibroblastos de queijo (Luo *et al.*, 2023). Similarmente, o ácido ganodérico demonstrou inibir a deposição de MEC e a expressão de fibronectina em um modelo de fibrose renal (Geng *et al.*, 2020). Tais resultados sugerem que os triterpenos, incluindo a friedelina, apresentam potencial terapêutico em doenças associadas à desregulação da MEC, como a fibrose e a osteoartrite, o que justifica a investigação de seus efeitos no contexto da involução tímica.

De acordo com Savino *et al.* (2003), a MEC desempenha um papel fundamental na migração celular, ao estabelecer pontes moleculares entre os timócitos e as células do microambiente tímico. Esse processo facilita a troca de sinais cruciais para ambos os tipos celulares. A adesão dos timócitos ao substrato, um evento essencial na migração, é significativamente influenciada pela presença de componentes da MEC, como a fibronectina e a laminina.

A análise da adesão de timócitos a TECs senescentes revelou que a friedelina aumentou a adesão tanto em células senescentes quanto em células não senescentes, mas essa modulação não foi significativa no grupo de células senescentes tratadas com friedelina. Esse resultado sugere que a friedelina pode influenciar a interação entre TECs e timócitos, mas seu efeito pode ser limitado em condições de senescência induzida por estresse oxidativo.

As TECs são essenciais para criar o microambiente necessário para a maturação dos linfócitos T, que inclui o fornecimento de sinais de sobrevivência e a apresentação de autoantígenos para seleção positiva e negativa (Yue *et al.*, 2019). No entanto, as TECs senescentes podem impactar significativamente a sobrevivência dos timócitos e a função tímica geral. O declínio na sobrevivência e na maturação dos timócitos é particularmente evidente em condições como o

envelhecimento e a síndrome de Down, nas quais o aumento do estresse oxidativo e da inflamação contribui para a involução tímica acelerada e a redução da produção de células T (Marcovecchio *et al.*, 2021; Lorenzo *et al.*, 2013).

Os resultados deste estudo demonstraram que a indução de senescência nas TECs não afetou de maneira significativa a sobrevivência dos timócitos em cocultura. Da mesma forma, o tratamento com friedelina também não apresentou efeito na quantidade de timócitos viáveis no grupo de TECs senescentes tratadas. Essa observação sugere que a senescência das TECs, pelo menos no modelo induzido por D-galactose e nas condições testadas, não tem impacto direto na sobrevivência dos timócitos em curto prazo. No entanto, é importante ressaltar que a interação entre TECs e timócitos é complexa e dinâmica, e o papel da senescência das TECs na sobrevivência e na função dos timócitos pode se manifestar de forma mais evidente em longo prazo ou em condições fisiológicas distintas.

Em contraste com os resultados deste trabalho, estudos têm evidenciado o impacto direto do estresse oxidativo na sobrevivência de timócitos. Singh *et al.*, (2013) e Abu-Rizq *et al.*, (2014) demonstraram que a exposição a agentes oxidantes, como arsênico e tetracloreto de carbono, induz a morte celular em timócitos, ressaltando a vulnerabilidade dessas células. De forma similar, Mello-Coelho *et al.*, (2017) observou aumento da peroxidação lipídica e morte celular em timócitos de camundongos envelhecidos sob estresse oxidativo. Em conjunto, esses achados sugerem que o estresse oxidativo pode afetar diretamente a sobrevivência dos timócitos, independentemente da senescência das TECs. No entanto, a interação entre TECs senescentes e timócitos em um contexto de estresse oxidativo crônico ainda precisa ser mais explorada para elucidar o papel das TECs na modulação da sobrevivência e função dos timócitos durante o processo de envelhecimento.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados aqui apresentados indicam, pela primeira vez, os efeitos biológicos positivos da friedelina sobre as TECs murinas, ressaltando sua relevância como possível imunomodulador tímico. A friedelina aumentou a produção de laminina e promoveu maior adesão de timócitos às TECs. Além disso, durante o cocultivo, observou-se um aumento na expressão de MHC I e II, assim como na sobrevivência dos timócitos, sugerindo um papel promissor da friedelina na modulação do microambiente tímico.

Por fim, este estudo demonstrou que a friedelina, na concentração utilizada, não reverteu o processo de senescência induzido por D-galactose em células epiteliais tímicas (TECs). Contudo, o composto exibiu efeitos positivos na modulação da matriz extracelular (MEC), sugerindo um potencial papel na manutenção da função tímica, mesmo em condições de senescência.

Apesar da ausência de efeitos significativos da friedelina na reversão da senescência induzida por estresse oxidativo, este estudo abre caminho para futuras investigações. É crucial explorar diferentes concentrações, modelos experimentais e combinações com outros compostos bioativos, a fim de elucidar os mecanismos de ação da friedelina e seu potencial terapêutico no combate à involução tímica e ao envelhecimento. Adicionalmente, a avaliação de seus efeitos em modelos *in vivo* será fundamental para a compreensão de sua aplicabilidade clínica.

Este estudo fornece uma base sólida para pesquisas futuras que visem explorar o potencial terapêutico da friedelina no contexto do envelhecimento e da imunidade.

## REFERÊNCIAS

- ABRAMSON, J.; ANDERSON, G. Thymic epithelial cells. *Annual Review of Immunology*, v. 35, n. 1, p. 85-118, 2017.
- ABU-RIZQ, H. A.; MANSOUR, M. H.; AFZAL, M. Curcuma longa attenuates carbon tetrachloride-induced oxidative stress in T-lymphocyte subpopulations. In: ARMSTRONG, D. (Ed.). *Advanced protocols in oxidative stress III. Methods in Molecular Biology*, v. 1208. New York: Humana Press, 2015. p. 197-211. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1441-8\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1441-8_12)
- AGRA, I. K. R. et al. Evaluation of wound healing and antimicrobial properties of aqueous extract from Bowdichia virgilioides stem barks in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 85, p. 945-954, 2013.
- AGRA, L. C. et al. Uvaol attenuates pleuritis and eosinophilic inflammation in ovalbumin-induced allergy in mice. *European Journal of Pharmacology*, v. 780, p. 232-242, 2016.
- AHMED, R. G. Is there a balance between oxidative stress and antioxidant defense system during development? *Med. J. Islamic Academy of Sci.*, v. 15, n. 2, p. 55-63, 2005. Disponível em: <https://ssrn.com/abstract=3017930>. Acesso em: 10 set. 2024.
- ALMEIDA, P. D. O. de et al. Anti-inflammatory activity of triterpenes isolated from Protium paniculatum oil-resins. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2015, p. 1-10, 2015.
- ALVES, T. et al. Friedelin in Maytenus ilicifolia is produced by friedelin synthase isoforms. *Molecules*, v. 23, n. 3, p. 700, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules23030700>
- AMARANTE-MENDES, J. G. P. et al. Cloning of a thymic stromal cell capable of protecting thymocytes from apoptosis. *Cellular Immunology*, v. 161, p. 173-180, 1995.
- AMARANTE-MENDES, J. G. et al. Cloning of a thymic stromal cell capable of protecting thymocytes from apoptosis. *Cellular Immunology*, v. 161, n. 2, p. 173-180, 1 abr. 1995. DOI: 10.1006/cimm.1995.1024.
- ANDERSON, G.; TAKAHAMA, Y. Thymic epithelial cells: working class heroes for T cell development and repertoire selection. *Trends in Immunology*, v. 33, n. 6, p. 256-263, 2012.
- ANTONISAMY, P.; DURAIPANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of friedelin isolated from Azima tetracantha Lam. in mouse and rat models. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 63, n. 8, p. 1070-1077, 2011.

- ARAVINTHAN, A. Cellular senescence: a hitchhiker's guide. *Human Cell*, v. 28, p. 51-64, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13577-015-0110-x>
- ASKIN, D.; YOUNG, S. The thymus gland. *Neonatal Network: The Journal of Neonatal Nursing*, v. 20, n. 8, p. 7-13, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1891/0730-0832.20.8.7>
- AW, D. et al. Architectural changes in the thymus of aging mice. *Aging Cell*, v. 7, n. 2, p. 158-167, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00365.x>
- AZMAN, K. F.; ZAKARIA, R. D-galactose-induced accelerated aging model: an overview. *Biogerontology*, v. 20, n. 6, p. 763-782, dez. 2019. DOI: 10.1007/s10522-019-09837-y.
- BABBAR, M., et al. (2020). Mitophagy and DNA damage signaling in human aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, 186, 111207.
- BAKER, D. J. et al. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*, v. 479, p. 232-236, 2011. DOI: 10.1038/nature10600.
- BARBARIN, A. et al. Insulin-like growth factor-1 restores thymic function in immunodeficient mice. *Blood*, v. 109, n. 8, p. 3831-3838, 2007. DOI: 10.1182/blood-2006-07-035014.
- BARBARIN, A. et al. Insulin-like growth factor-1 restores thymic function in immunodeficient mice. *Blood*, v. 109, n. 8, p. 3831-3838, 2007. DOI: 10.1182/blood-2006-07-035014
- BARBOUTI, A. et al. Implications of oxidative stress and cellular senescence in age-related thymus involution. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2020, p. 1-14, 2020a. DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/7986071>
- BARBOUTI, A. et al. Reactive oxygen species as key regulators of EMT during thymic involution. *Aging Research Reviews*, v. 92, p. 102115, 2020b.
- BAUER, M. E.; FUENTE, M. de L. The role of oxidative and inflammatory stress and persistent viral infections in immunosenescence. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 158, p. 27-37, 2016. DOI: 10.1016/j.mad.2016.01.001.
- BEN-PORATH, I.; WEINBERG, R. A. The signals and pathways activating cellular senescence. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 37, n. 5, p. 961-976, 2005.
- BERRIH, S.; SAVINO, W.; COHEN, S. Extracellular immunofluorescence epithelial matrix of the studies human thymus: sections cultured on frozen. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, v. 33, n. 7, p. 655-664, 1985.
- BISHAYEE, A. et al. Triterpenoids as potential agents for the chemoprevention and therapy of breast cancer. *Frontiers in Bioscience*, v. 16, p. 980-996, 2011.

BISWAS, R. et al. Culture-differentiated CD8+ T cells acquire innate memory-like traits and respond to a pathogen-associated molecule. *Immunology & Cell Biology*, v. 92, n. 4, p. 368-376, 2013. DOI: 10.1038/icb.2013.94. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/icb.2013.94>.

BLOOMGARDEN, Z. T.; NING, X. Diabetes and aging. *Diabetes Care*, v. 36, p. 226-233, 2013.

BOLZÁN, A. D.; BIANCHI, M. S.; BIANCHI, N. O. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in human blood: influence of sex, age and cigarette smoking. *Clinical Biochemistry*, v. 30, n. 6, p. 449-454, 1997.

BORNSTEIN, C. et al. Single-cell mapping of the thymic stroma identifies IL-25-producing tuft epithelial cells. *Nature*, v. 559, n. 7715, p. 622-626, 2018. DOI: 10.1038/s41586-018-0346-1.

BOUDIL, A. et al. IL-7 coordinates proliferation, differentiation and Tcra recombination during thymocyte β-selection. *Nature Immunology*, v. 16, n. 4, p. 397-405, 2015. DOI: 10.1038/ni.3122. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25729925>.

BRAMEY, N. et al. Primary human lung fibroblasts exhibit trigger- but not disease-specific cellular senescence and impair alveolar epithelial cell progenitor function. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2023.07.24.550385>.

BREDENKAMP, N. et al. Foxn1 is a critical regulator of the epithelial microenvironment in thymic involution. *Nature Immunology*, v. 15, n. 9, p. 857-868, 2014. DOI: 10.1038/ni.2950.

BREDENKAMP, N.; NOWELL, C.; BLACKBURN, C. Regeneration of the aged thymus by a single transcription factor. *Development*, v. 141, n. 8, p. 1627-1637, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1242/dev.103614>

BROEKAERT, D. et al. An investigation of cytokeratin expression in skin epithelial cysts and some uncommon types of cystic turnouts using chain-specific antibodies. *Archives of Dermatological Research*, v. 282, p. 383-391, 1990.

BUSS, A. D.; WAIGH, R. D. Antiparasitic drugs. In: WOLFF, M.E. (Ed.). *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*. 5. ed. New York: Wiley-Interscience, 1995. v. 1, p. 1021-1028.

CAI, M. et al. Role of carbon monoxide in oxidative stress-induced senescence in human bronchial epithelium. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2022, p. 1-15, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1155/2022/5199572>.

CAMPINOTI, S. et al. Reconstitution of a functional human thymus by postnatal stromal progenitor cells and natural whole-organ scaffolds. *Nature Communications*, v. 11, n. 1, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20082-7>.

CAMPISI, J. Cellular senescence and aging: exploring the complicated relationship between cancer and aging. *Journal of Clinical Investigation*, v. 115, n. 3, p. 303-306, 2005.

CAMPISI, J. et al. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 20, p. 647-665, 2019.

CAMPISI, J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: Good citizens, bad neighbors. *Cell*, v. 120, n. 4, p. 513-522, 2005.

CAMPISI, J.; D'ADDA DI FAGAGNA, F. Cellular senescence: When bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 8, n. 9, p. 729-740, 2007.

Cao, X.; He, Q. Ursolic acid inhibits proliferation, migration and invasion of human papillary thyroid carcinoma cells via CXCL12/CXCR4/CXCR7 axis through cancer-associated fibroblasts. *Human & Experimental Toxicology*, v. 41, 2022. DOI: 10.1177/09603271221113333.

CARMO, J. D. O. D. S. Tratamento tópico com friedelina acelera a cicatrização de feridas cutâneas em camundongos diabéticos e induz a ativação de fibroblastos in vitro. 2019. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2019.

CASTRO, J. P.; GRUNE, T.; SPECKMANN, B. The two faces of reactive oxygen species (ROS) in adipocyte function and dysfunction. *Biological Chemistry*, v. 397, n. 8, p. 709-724, 2016.

CEPEDA, S.; GRIFFITH, A. V. Thymic stromal cells: Roles in atrophy and age-associated dysfunction of the thymus. *Experimental Gerontology*, v. 105, p. 113-117, 2018.

CHEN, L.; XIAO, S.; MANLEY, N.R. Foxn1 is required to maintain the postnatal thymic microenvironment in a dosage-sensitive manner. *Blood*, v. 113, n. 3, p. 567-574, 2009. DOI: 10.1182/blood-2008-05-156265.

CHEN, Q. et al. REDD1 knockdown ameliorates endothelial cell senescence through repressing TXNIP-mediated oxidative stress. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 221, p. 111962, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mad.2024.111962>.

CHINN, I. et al. Changes in primary lymphoid organs with aging. *Seminars in Immunology*, v. 24, n. 5, p. 309-320, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.smim.2012.04.005>.

CHUNG, H. Y. et al. Molecular inflammation as an underlying mechanism of the aging process and age-related diseases. *Journal of Dental Research*, v. 90, n. 7, p. 830-840, 2011.

CHUNG, H. Y. et al. Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing Research Reviews*, v. 10, p. 36-44, 2011.

CIOFANI, M.; ZUNIGA-PFLUCKER, J. C. The thymus as an inductive site for T lymphopoiesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 23, p. 463-493, 2007.

COPPÉ, J. P. et al. Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. *PLOS Biology*, v. 6, n. 12, e301, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060301>.

CORREIA-MELO, C. et al. Mitochondria are required for pro-ageing features of the senescent phenotype. *The EMBO Journal*, v. 35, n. 7, p. 724-742, 2016.

COSTANTINO, S. et al. Epigenetics in atherosclerosis. *Cardiovascular Research*, v. 107, p. 347-357, 2016.

COTTA-DE-ALMEIDA, C. et al. Impaired migration of NOD mouse thymocytes: a fibronectin receptor-related defect. *Eur J Immunol*. 2004 Jun;34(6):1578-87. doi: 10.1002/eji.200324765. PMID: 15162427.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. *Pure and Applied Chemistry*, v. 77, n. 1, p. 7-24, 2005.

CSABA, G. The immunoendocrine thymus as a pacemaker of lifespan. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, v. 63, n. 2, p. 139-158, 2016. DOI: 10.1556/030.63.2016.2.1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27352969>.

D'ADDA DI FAGAGNA, F. et al. DNA damage signaling in response to oxidative stress and aging: novel therapeutic targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 21, p. 352-367, 2022.

DAVALOS, A. R. et al. Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. *Cancer Metastasis Review*, v. 29, n. 2, p. 273-283, 2010. DOI: 10.1007/s10555-010-9220-9.

DAVIS, K. et al. *Bartonella henselae* masquerading as possible gamma-delta T-cell lymphoma in a pediatric patient with 22q11.2 deletion syndrome. *BMJ Case Reports*, v. 14, n. 11, e245592, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1136/bcr-2021-245592>.

DE ANDRADE, M. R.; ALMEIDA, E. X.; CONSERVA, L. M. Alkyl chromone and other compounds from *Clusia nemorosa*. *Phytochemistry*, v. 47, n. 7, p. 1431-1433, 1998.

DE MELLO-COELHO, V. et al. Age-associated alterations in the levels of cytotoxic lipid molecular species and oxidative stress in the murine thymus are reduced by

growth hormone treatment. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 167, p. 46-55, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mad.2017.06.004>.

FERRO, J. N. Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato hexânico obtido das cascas do caule de *Clusia nemorosa* G. Mey. (Clusiaceae). 2012. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2012.

FERRO, J. N. et al. Leaf extract from *Clusia nemorosa* induces an antinociceptive effect in mice via a mechanism that is adrenergic systems dependent. *Chinese Journal of Natural Medicines*, v. 11, n. 4, p. 385-390, 2013.

FERRO, J. N. Efeito farmacológico da friedelina livre e complexada em hidroxipropil-β-ciclodextrina em modelos de inflamação em roedores. 2016. 141 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2016.

DEURSEN, J. M. Van. The role of senescent cells in aging. *Nature*, v. 509, n. 7501, p. 439-446, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature13193>.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*, v. 2, p. 303-336, 2012.

DOWLING, M.; HODGKIN, P. Why does the thymus involute? A selection-based hypothesis. *Trends in Immunology*, v. 30, n. 7, p. 295-300, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.it.2009.04.006>.

DU, H. et al. miRNA-146a-5p mitigates stress-induced premature senescence of D-galactose-induced primary thymic stromal cells. *Cytokine*, v. 137, p. 155314, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155314>.

DUMONT-LAGACÉ, M.; ST-PIERRE, C.; PERREAUULT, C. Sex hormones have pervasive effects on thymic epithelial cells. *Scientific Reports*, v. 5, n. 12895, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep12895>.

DZUBAK, P. et al. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Natural Product Reports*, v. 29, p. 394-411, 2006.

ERIN C. Z., et al; Overexpression of *Foxn1* attenuates age-associated thymic involution and prevents the expansion of peripheral CD4 memory T cells. *Blood* 2011; 118 (22): 5723–5731. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2011-03-342097>

FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery. *Environmental Health Perspectives*, v. 109, n. March, p. 69–75, 2001.

FAHY, G. M. et al. Reversal of epigenetic aging and immunosenescent trends in humans. *Aging Cell*, v. 18, n. 6, p. e13028, 2019. DOI: 10.1111/acel.13028.

FANG, E. F., et al. (2016). Nuclear DNA damage signalling to mitochondria in ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(5), 308–321.

FENG, L. et al. A combination of alkaloids and triterpenes of *Alstonia scholaris* (Linn.) R. Br. leaves enhances immunomodulatory activity in C57BL/6 mice and induces apoptosis in the A549 cell line. *Molecules*, v. 18, n. 11, p. 13920–13939, 2013.

FIALA, G.; GOMES, A.; SILVA-SANTOS, B. From thymus to periphery: molecular basis of effector  $\gamma\delta$ -T cell differentiation. *Immunological Reviews*, v. 298, n. 1, p. 47–60, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/imr.12918>

FILIPPI-CHIELA, E. C. et al. Vincristine promotes differential levels of apoptosis, mitotic catastrophe, and senescence depending on the genetic background of glioblastoma cells. *Toxicology in Vitro*, v. 85, p. 105472, 2022. DOI: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887233322001709>.

FILIPPI-CHIELA, E.C. et al. Nuclear morphometric analysis (NMA): Screening of senescence, apoptosis, and nuclear irregularities. *PLoS ONE*, v. 7, n. 8, 2012.

FIORINI, E. et al. Cutting edge: thymic crosstalk regulates delta-like 4 expression on cortical epithelial cells. *J Immunol*, v. 181, n. 12, p. 8199-8203, 2008. DOI: 10.4049/jimmunol.181.12.8199.

FRANCESCHI, C. et al. Biomarkers of immunosenescence within an evolutionary perspective: The challenge of heterogeneity and the role of antigenic load. *Experimental Gerontology*, v. 34, n. 8, p. 911–921, 1999.

FRANCESCHI, C. et al. Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 128, p. 92–105, 2007.

FRANCESCHI, C. et al. Inflamm-aging: an evolutionary perspective on immunosenescence. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 908, p. 244-254, 2000.

FRANCESCHI, C. et al. The immunology of exceptional individuals: the lesson of centenarians. *Immunological Reviews*, v. 40, p. 26-48, 1999.

FRANCKAERT, D. et al. Premature thymic involution is independent of structural plasticity of the thymic stroma. *European Journal of Immunology*, v. 45, p. 1535-1547, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1002/eji.201445277>

FULOP, T. et al. Immunosenescence and inflamm-aging as two sides of the same coin: friends or foes? *Frontiers in Immunology*, v. 9, p. 1960, 2018.

GAMBINO, V. et al. Oxidative stress activates a specific p53 transcriptional response that regulates cellular senescence and aging. *Aging Cell*, v. 12, n. 3, p. 435–445, 2013.

GAMEIRO, J.; VERINAUD, L. The thymus microenvironment in regulating thymocyte differentiation. *Cell Adhesion & Migration*, v. 4, n. 3, p. 382–390, 2010.

GEENEN, V. Thymus and type 1 diabetes: An update. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 98, n. 1, p. 26-32, 2014.

GENG, X. Q. et al. Ganoderic acid hinders renal fibrosis via suppressing the TGF- $\beta$ /Smad and MAPK signaling pathways. *Acta Pharmacol Sin.*, v. 41, n. 5, p. 670-677, 2020. DOI: 10.1038/s41401-019-0324-7.

GIL, J.; PETERS, G. Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: All for one or one for all. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 7, n. 9, p. 667–677, 2006.

GIORGIO, M. et al. Hydrogen peroxide: A metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 8, n. 9, p. 722–728, 2007.

GRIFFITH, A. et al. Metabolic damage and premature thymus aging caused by stromal catalase deficiency. *Cell Reports*, v. 12, n. 7, p. 1071-1079, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.008>

GRUN, L. K. et al. Obesity drives adipose-derived stem cells into a senescent and dysfunctional phenotype associated with P38MAPK/NF-KB axis. *Immunity & Ageing*, v. 20, n. 1, p. 51, 2023. DOI: <https://immunityageing.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12979-023-00378-0>. Accessed 29 Aug. 2024.

GUEMOURI, L. et al. Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. *Clinical Chemistry*, v. 37, n. 11, p. 1932-1937, 1991.

GUO, L. et al. Gallic acid ameliorates thymic involution via activating sox2 and nanog. *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 96, n. 3, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1111/sji.13202>

GUO, Z. et al. Transcriptome analysis of murine thymic epithelial cells reveals age-associated changes in microRNA expression. *International Journal of Molecular Medicine*, v. 32, n. 4, p. 835-842, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3892/ijmm.2013.1471>

HAKIM, F. T. et al. Age-associated decline in thymic function. *New England Journal of Medicine*, v. 350, p. 288-290, 2004a.

HAKIM, F. T.; FLOMERFELT, F. A.; GREINER, R. E. Aging, immunity and cancer. *Handbook on Immunosenescence: Basic Understanding and Clinical Applications*, p. 1119–1138, 2004b.

HARLEY, C. B.; FUTCHER, A. B.; GREIDER, C. W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, v. 345, p. 458-460, 1990. DOI: 10.1038/345458a0.

HARMAN, D. Aging: Phenomena and Theories. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 854, p. 1-7, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09886.x>

HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, v. 25, p. 585-621, 1961. DOI: 10.1016/0014-4827(61)90192-6.

HEINZEL, K. et al. Bone marrow-derived hemopoietic precursors commit to the T cell lineage only after arrival in the thymic microenvironment. *The Journal of Immunology*, v. 178, p. 858–868, 2007.

HERBIG, U. et al. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21CIP1, but not p16INK4a. *Molecular Cell*, v. 14, p. 501–513, 2004.

HERNANDEZ-SEGURA, A.; NEHME, J.; DEMARIA, M. Hallmarks of cellular senescence. *Trends in Cell Biology*, v. 28, n. 6, p. 436-453, 2018.

INUMARU, J. et al. Oxidative stress induces epithelial-mesenchymal transition and fibrosis through junction disruption. *Journal of Biological Chemistry*, v. 284, n. 9, p. 5353-5363, 2009.

JENKINSON, W. et al. An epithelial progenitor pool regulates thymus growth. *The Journal of Immunology*, v. 181, n. 9, p. 6101-6108, 2008. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.9.6101>

JU, Z.; CHOUDHURY, A. R.; RUDOLPH, K. L. A dual role of p21 in stem cell aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1100, p. 333–344, 2007. DOI: <http://doi.wiley.com/10.1196/annals.1395.036>

KADOURI, N. et al. Thymic epithelial cell heterogeneity: TEC by TEC. *Nature Reviews Immunology*, 2019.

KAWATA, K. et al. Features of T-cell subset composition in a D-galactose-induced senescence mouse model. *Experimental Animals*, v. 70, n. 3, p. 284-292, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1538/expanim.20-0095>

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

KIM, B.; KIM, J. H.; PARK, B. Pomolic acid inhibits invasion of breast cancer cells through the suppression of CXC chemokine receptor type 4 expression. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 117, n. 6, p. 1296-1307, 2016. DOI: 10.1002/jcb.25412.

KIM, E. J. E., & LEE, S. J. V. Recent progresses on anti-aging compounds and their targets in *Caenorhabditis elegans*. *Translational Medicine of Aging*, 3, 121–124, 2019.

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

KRISHNAMURTHY, J. et al. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *Journal of Clinical Investigation*, v. 114, n. 9, p. 1299–1307, 2004.

KRITSILIS, M. et al. Ageing, cellular senescence and neurodegenerative disease. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 10, p. 2937, 2018.

KUROBE, H. et al. Ccr7-dependent cortex-to-medulla migration of positively selected thymocytes is essential for establishing central tolerance. *Immunity*, v. 24, n. 2, p. 165-177, 2006. DOI: 10.1016/j.jimmuni.2005.12.011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jimmuni.2005.12.011>.

KVELL, K. et al. Wnt4 and lap2alpha as pacemakers of thymic epithelial senescence. *Plos One*, v. 5, n. 5, e10701, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010701>.

LADI, E. et al. Thymic microenvironments for T cell differentiation and selection. *Nature Immunology*, v. 7, n. 4, p. 338–343, 2006.

LAIOS, K. The thymus gland in ancient greek medicine. *Hormones*, v. 17, n. 2, p. 285-286, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42000-018-0026-4>.

LANNES-VIEIRA, J. et al. Extracellular matrix components of the mouse thymic microenvironment. III. Thymic epithelial cells express the VLA6 complex that is involved in laminin-mediated interactions with thymocytes. *International Immunology*, v. 5, n. 11, p. 1421–1430, 1993.

LANNES-VIEIRA, J.; VAN DER MEIDE, P. H.; SAVINO, W. Extracellular matrix components of the mouse thymic microenvironment. *Cellular Immunology*, v. 137, n. 2, p. 329–340, 1991. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/000887499190083N>.

LENNICKE, C. et al. Redox proteomics: Methods for the identification and enrichment of redox-modified proteins and their applications. *Proteomics*, v. 16, n. 2, p. 197-213, 2016. DOI: 10.1002/pmic.201500268.

LE PANG, K. et al. Betulinic acid-induced expression of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase in the immune organs of mice: A possible role of nitric oxide in immunomodulation. *Molecular Medicine Reports*, v. 17, n. 2, p. 3035–3041, 2017.

LE PANSE, R. et al. Thymic remodeling associated with hyperplasia in myasthenia gravis. *Autoimmunity*, v. 43, n. 5-6, p. 401-412, 2010. DOI: 10.3109/08916930903563491.

LEPLETIER, A. et al. Interplay between follistatin, activin A and BMP4 signaling regulates postnatal thymic epithelial progenitor cell differentiation during aging. *SSRN Electronic Journal*, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2139/ssrn.3305565>.

LEPLETIER, A.; CHIDGEY, A. P.; SAVINO, W. Perspectives for improvement of the thymic microenvironment through manipulation of thymic epithelial cells: A mini-review. *Gerontology*, v. 61, n. 6, p. 504–514, 2015. Disponível em: <https://karger.com/GER/article/doi/10.1159/000375160>

LÉVY, V. et al. Growth hormone administration stimulates thymulin production in aged rats. *Endocrinology*, v. 129, n. 3, p. 1105-1113, 1991. DOI: 10.1210/endo-129-3-1105

LI, J. et al. Curcumin protects thymus against D-galactose-induced senescence in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 394, n. 2, p. 411–420, 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s00210-020-01945-8>.

LI, J. et al. Levels of TC17 cells in thymic epithelial cell tumors associated with autoimmune diseases. *Mediastinum*, v. 3, p. 8-8, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.21037/med.2019.02.02>.

LI, L. et al. Thymic microenvironment's impact on immunosenescence. *Immunology Research*, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12026-024-09519-z>.

LI, Y. et al. D-galactose induces mitochondrial dysfunction and oxidative damage in the brain of senescence-accelerated mice. *Neurochemical Research*, v. 40, n. 6, p. 1200-1207, 2015.

LIANG, Z. et al. Age-related thymic involution: Mechanisms and functional impact. *Aging Cell*, v. 21, n. 8, e13671, 2022. DOI: 10.1111/acel.13671.

LINHARES-LACERDA, L. et al. RNA interference-mediated knockdown of CD49e (α5 integrin chain) in human thymic epithelial cells modulates the expression of multiple genes and decreases thymocyte adhesion. *BMC Genomics*, v. 11, suplemento 5, S2, 2010. DOI: 10.1186/1471-2164-11-S5-S2.

LINS, M. P. et al. Growth hormone and insulin-like growth factor-1 modulate thymocyte and thymic epithelial cell interactions. *Journal of Endocrinology*, v. 229, n. 2, p. 123-136, 2016. DOI: 10.1530/JOE-15-0457.

LINS, M. P. et al. Growth hormone in the presence of laminin modulates interaction of human thymic epithelial cells and thymocytes in vitro. *Biological Research*, p. 1–9, 2016.

LISTON, A. et al. Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nature Immunology*, v. 4, n. 4, p. 350-354, 2003.

LIU, C. et al. The role of aging and senescence in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Aging and Disease*, v. 14, p. 23-40, 2023.

LIU, D.; ELLIS, H. The mystery of the thymus gland. *Clinical Anatomy*, v. 29, n. 6, p. 679-684, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1002/ca.22724>. Acesso em: 10 set. 2024.

LIU, D.; HORNSBY, P. J. Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. *Cancer Research*, v. 67, n. 7, p. 3117–3126, 2007.

LIU, D.; XU, Y. p53, oxidative stress, and aging. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 15, n. 6, p. 1669–1678, 2011. Disponível em: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/ars.2010.3644>.

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

LORENZO, L. et al. Defective thymic progenitor development and mature T-cell responses in a mouse model for Down syndrome. *Immunology*, v. 139, n. 4, p. 447-458, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1111/imm.12092>.

LOTZ, M.; CARAMES, B. Autophagy and cartilage homeostasis mechanisms in joint health, aging and osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, v. 7, n. 10, p. 579–587, 2012.

LUO, Y. et al. Oleanolic acid regulates the proliferation and extracellular matrix of keloid fibroblasts by mediating the TGF- $\beta$ 1/SMAD signaling pathway. *Journal of Cosmetic Dermatology*, v. 22, p. 2083-2089, 2023. DOI: 10.1111/jocd.15673.

MAJUMDAR, S.; NANDI, D. Thymic atrophy: experimental studies and therapeutic interventions. *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 87, p. 4–14, 2018.

MARCOVECCHIO, G. et al. Premature senescence and increased oxidative stress in the thymus of Down syndrome patients. *Frontiers in Immunology*, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021>

MATSUMOTO, M. et al. Aire illuminates the feature of medullary thymic epithelial cells in thymic carcinoma. *Cancer Medicine*, 12(8), 9843-9848, 2023. <https://doi.org/10.1002/cam4.5777>

MENDES-DA-CRUZ, D. A. et al. (2012). Semaphorins and neuropilins: new players in the neuroendocrine control of the intrathymic T-cell migration in humans. *Experimental Physiology*, 97(11), 1146–1150.

- MENEGOTTO, P. R. et al. (2017). Gastrin-Releasing Peptide Receptor Knockdown Induces Senescence in Glioblastoma Cells. *Molecular Neurobiology*, 54(2), 888–894. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s12035-016-9696-6>
- MILLER, J. F. (1961). Immunological function of the thymus. *Lancet*, 2(7205), 748–749. doi: 10.1016/s0140-6736(61)90693-6.
- MINAMINO, T., et al. Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction. *Circulation*, 105(13), 1541–1544, 2002. doi: 10.1161/01.cir.0000013836.85741.17.
- MINAMINO, T., et al. A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nature Medicine*, 15(9), 1082–1087, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2014>.
- MIRAGAIA, R. J. et al. Single-cell RNA-sequencing resolves self-antigen expression during mTEC development. *Sci Rep*, v. 8, n. 1, p. 685, 2018. DOI: 10.1038/s41598-017-19100-4.
- MISHRA, B. B., & TIWARI, V. K. Natural products: An evolving role in future drug discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(10), 4769–4807, 2011.
- MORRHAYE, G. et al. Hormonal and metabolic influences on thymic atrophy during aging: implications for immune rejuvenation. *Frontiers in Immunology*, v. 15, p. 335, 2024. DOI: 10.3389/fimmu.2023.01557.
- MULLER, F. L. et al (2007). Trends in oxidative aging theories. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(4), 477–503.
- MUÑOZ-ESPÍN, D., & SERRANO, M. Cellular senescence: From physiology to pathology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(7), 482–496, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3823>.
- NAPOLITANO, L. A. et al. Increased thymic mass and circulating naïve CD4 T cells in HIV-1-infected adults treated with growth hormone. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 118, n. 3, p. 1085–1098, 2008. DOI: 10.1172/JCI32712.
- NICOLAI, S. et al. (2015). DNA repair and aging: The impact of the p53 family. *Aging*, 7(12), 1050–1065.
- NIERO, R., FALONI DE ANDRADE, S., & CECHINEL FILHO, V. (2011). A Review of the Ethnopharmacology, Phytochemistry and Pharmacology of Plants of the *Maytenus* Genus. *Current Pharmaceutical Design*, 17(18), 1851–1871.
- NITTA, T. (2016). Understanding the thymic microenvironment: the cellular and molecular basis of t cell development. *Central Asian Journal of Medical Sciences*, 2(2), 111–126. <https://doi.org/10.24079/cajms.2016.02.002>

- NITTA, T. et al. (2008). Chapter 3 - Thymic Microenvironments for T-Cell Repertoire Formation. Elsevier Inc., v. 99.
- NITTA, T., & Suzuki, H. (2016). Thymic stromal cell subsets for T cell development. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73, 1021-1037.
- OCAMPO, J. S. P. et al. (2008). Laminin-211 controls thymocyte—thymic epithelial cell interactions. *Cellular Immunology*, 254(1), 1–9. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008874908001111>.
- ONDER, L. et al. Alternative NF- $\kappa$ B signaling regulates mTEC differentiation from podoplanin-expressing precursors in the cortico-medullary junction. *Eur J Immunol*, v. 45, n. 8, p. 2218-2231, 2015. DOI: 10.1002/eji.201545677.
- Palmer, D. B. (2013). The effect of age on thymic function. *Frontiers in Immunology*, 4, 316.
- PALMER, D. B. The effect of age on thymic function. *Frontiers in Immunology*, v. 4, p. 316, 2013. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00316. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2013.00316/full>.
- PALMER, S. et al. Thymic involution and rising disease incidence with age. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, v. 115, n. 8, p. 1883-1888, 2018.
- PANOSSIAN, A., & WIKMAN, G. (2008). Pharmacology of Schisandra chinensis Bail.: An overview of Russian research.
- Park, A. (2006). Normal Structure, Function and Histology of the Thymus. Kingdom, 504–514.
- PASSOS, G. A. et al. Aire-dependent peripheral tissue antigen mRNAs in mTEC cells feature networking refractoriness to microRNA interaction. *Molecular Immunology*, v. 65, p. 81-95, 2015.
- PASSOS, G. A. et al. The thymic orchestration involving Aire, miRNAs and cell–cell interactions during the induction of central tolerance. *Molecular Immunology*, v. 68, p. 84-98, 2017.
- PEARSE, G. (2006). Normal structure, function and histology of the thymus. *Toxicologic Pathology*, 34(504-514).
- PENG, X. et al. (2013). Protective effects of triterpenoids from Ganoderma resinaceum on H2O2-induced toxicity in HepG2 cells. *Food Chemistry*, 141(2), 920–926.
- PERON, G., Marzaro, G., & Dall'Acqua, S.. Known Triterpenes and their Derivatives as Scaffolds for the Development of New Therapeutic Agents for Cancer. *Current Medicinal Chemistry*, 25, 1259–1269, 2018.
- PEZZI, N. et al. Aire knockdown in medullary thymic epithelial cells affects Aire protein, deregulates cell adhesion genes and decreases thymocyte interaction.

Molecular Immunology, 77, 157–173, 2016. Disponível em:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161589016301511>.

PIEŃKOWSKA, N. et al. Effect of antioxidants on the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced premature senescence of human fibroblasts. Aging, 12(2), 1910–1927, 2020.  
<https://doi.org/10.18632/aging.102730>

PLOWDEN, J. et al. Innate immunity in aging: impact on macrophage function. Aging Cell, v. 3, p. 161-167, 2004. Disponível em:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15268749>.

PRICE, J. S. et al. (2002). The role of chondrocyte senescence in osteoarthritis. Aging Cell, 1(1), 57-65. doi: 10.1046/j.1474-9728.2002.00008.x.

RAGAZZINI, R. et al. Defining the identity and the niches of epithelial stem cells with highly pleiotropic multilineage potency in the human thymus. Dev Cell, v. 58, n. 22, p. 2428-2446.e9, 2023. DOI: 10.1016/j.devcel.2023.08.017.

RAMOND, C. et al. Two waves of distinct hematopoietic progenitor cells colonize the fetal thymus. Nature Immunology, 15(1), 27–37, 2014.

REIS, L. F. L. et al. The somatotropic axis and the thymus: implications for thymus involution. Neuroimmunomodulation, 30(3), 153-164, 2023.

REIS, M. D. S. Regulação epigenética de FOXN1 no epitélio tímico humano durante a senescência. Tese de doutorado, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2015.

REIS, M. D. S. et al. Decline of FOXN1 gene expression in human thymus correlates with age: possible epigenetic regulation. Immunity & Ageing, 12(1), 18, 2015. Disponível em: <http://www.immunityageing.com/content/12/1/18>.

REIS, M. D. S. et al. Epigenetic regulation of FOXN1 expression during thymic aging. Journal of Immunology, v. 195, n. 4, p. 2005-2015, 2015. DOI: 10.4049/jimmunol.1500392.

REIS, M. D. S. et al. Intrathymic somatotropic circuitry: consequences upon thymus involution. Frontiers in Immunology, v. 14, p. 1108630, 2023. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1108630.

REZZANI, R. et al. Effects of growth hormone on thymus morphology and somatotropic axis. Histology and Histopathology, v. 23, n. 1, p. 87-96, 2008. DOI: 10.14670/HH-23.87

RIBATTI, D.; CRIVELLATO, E.; VACCA, A. Miller's seminal studies on the role of thymus in immunity. Clinical & Experimental Immunology, v. 144, n. 3, p. 371-375, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03060.x>

RODEWALD, H.-R. Thymus Organogenesis. Annual Review of Immunology, v. 26, n. 1, p. 355–388, 2008.

ROPKE, C. Thymic Epithelial Cell Culture. Microscopy research and technique, v. 38, p. 276–286, 1997.

ROPKE, C.; ELBROEND, J. Human Thymic Epithelial Cells in Serum-Free Culture : Nature and Effects on Thymocyte Cell Lines. *Developmental Immunology*, v. 2, n. C, p. 111–121, 1992.

ROSSIELLO, F. et al. The telomeric DNA damage response in aging and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 23, p. 349–365, 2022.

SANDHU, M. et al. Friedelin and Glutinol induce neuroprotection against ethanol induced neurotoxicity in pup's brain through reduction of TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, caspase-3 and PARP-1. *NeuroToxicology*, [s. l.], v. 99, p. 274–281, 2023. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161813X23001419>.

SANDHU, M. et al. Friedelin Attenuates Neuronal Dysfunction and Memory Impairment by Inhibition of the Activated JNK/NF- $\kappa$ B Signalling Pathway in Scopolamine-Induced Mice Model of Neurodegeneration. *Molecules*, [s. l.], v. 27, n. 14, p. 4513, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/14/4513>.

SANTORO, A. et al. Inflammaging and its implications for immunosenescence and brain aging. *Ageing Research Reviews*, v. 65, p. 101210, 2021.

SANTOS, J. C. et al. The AIRE G228W mutation disturbs the interaction of AIRE with its partner molecule SIRT1. *Journal of Autoimmunity*, v. 128, p. 102805, 2022.

SAVINO, W. et al. Laminin-Mediated interactions in Thymocyte Migration and Development. *Frontiers in Immunology*, v. 6, n. November, 2015.

SAVINO, W. et al. Molecular mechanisms governing thymocyte migration : combined role of chemokines and extracellular matrix. *Journal of leukocyte biology*, v. 75, n. June, p. 951–961, 2004.

SAVINO, W. et al. Thymocyte migration: an affair of multiple cellular interactions? *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, [s. l.], v. 36, n. 8, p. 1015–1025, 2003.

SAVINO, W.; VILLA-VERDE, D. M. S.; LANNES-VIEIRA, J. Extracellular matrix proteins in intrathymic T-cell migration and differentiation? *Immunology Today*, v. 14, n. 4, p. 2–5, 1993.

SAVINO, W; MENDES-DA-CRUZ, D.A; LEPLETIER, A; DARDENNE, M. Hormonal control of T-cell development in health and disease. *Nat. Rev. Endoc.*, v. 12, p. 77-89, 2016.

SCHMITT, T. M. et al. Maintenance of T Cell Specification and Differentiation Requires Recurrent Notch Receptor – Ligand Interactions. *The journal of experimental medicine*, v. 200, n. 4, p. 469–479, 2004.

SCHOSSERER, M. et al. Senescence: role of p53 in senescence, aging, and cancer. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 33, p. 563-580, 2017.

SCRIBBLE et al. Scribble regulates an EMT polarity pathway through modulation of MAPK-ERK signaling to mediate junction formation. *Journal of Cell Science*, 2008. Disponível em: <https://journals.biologists.com/jcs/article/121/6/960/34055>.

SHA J. Y. et al. The p53/p21/p16 and PI3K/Akt signaling pathways are involved in the ameliorative effects of maltol on D-galactose-induced liver and kidney aging and injury. *Phytother. Res.*, 2021;35:4411–4424. doi: 10.1002/ptr.7142.

SHITARA, S.; HARA, T.; LIANG, B. IL-7 Produced by Thymic Epithelial Cells Plays a Major Role in the Development of Thymocytes and TCR  $\gamma$   $\delta$  + Intraepithelial Lymphocytes. 2020.

SIES, H. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, v. 4, p. 180–183, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>.

SIKORA, E.; ARENDT, T.; BENNETT, M.; NARITA, M. Impact of cellular senescence signature on ageing research. *Ageing Research Reviews*, v. 10, n. 1, p. 146–152, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2010.10.002>.

SINGH M. K. et al. Immunomodulatory role of *Emblica officinalis* in arsenic induced oxidative damage and apoptosis in thymocytes of mice. *BMC Complement Altern Med.*, 2013 Jul 27;13:193. doi: 10.1186/1472-6882-13-193. PMID: 23889914; PMCID: PMC3733846.

SINGH, S. Friedelin: structure, biosynthesis, extraction, and its potential health impact. *Molecules*, 28(23), 7760. 2023. <https://doi.org/10.3390/molecules28237760>  
 SMANIOTTO, S. et al. Growth Hormone Modulates Thymocyte Development in Vivo through a Combined Action of Laminin and CXC Chemokine Ligand 12. *Endocrinology*, v. 146, n. 7, p. 3005–3017, 2005.

SOUZA-MOREIRA, T. et al. Friedelin synthase from *maytenus ilicifolia*: leucine 482 plays an essential role in the production of the most rearranged pentacyclic triterpene. *Scientific Reports*, 6(1). 2016. <https://doi.org/10.1038/srep36858>

STEVENS, F. et al. Histone deacetylase inhibitors induce mitotic slippage. *Oncogene* 27, 1345–1354 (2008). <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210779>

SPECK-HERNANDEZ, C. A. et al. Aire disruption influences the medullary thymic epithelial cell transcriptome and interaction with thymocytes. *Frontiers in Immunology*, v. 9, p. 964, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00964>.

SRINIVASAN, K.; et al. Age-related changes to thymic epithelial cells and the thymic microenvironment affect T-conventional and T-regulatory cell selection and

responses. *Frontiers in Immunology*, v. 14, 2023. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1287206.

SUN, L.; BROWN, R.; AMAGAI, T.; ZHAO, Y.; SU, D. Declining expression of a single epithelial cell-autonomous gene accelerates age-related thymic involution. *Aging Cell*, 9(3), 347-357. 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00559.x>

SUNIL, C. et al. Friedelin exhibits antidiabetic effect in diabetic rats via modulation of glucose metabolism in liver and muscle. *Journal of Ethnopharmacology*, [s. l.], v. 268, p. 113659, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874120335479>.

SUSANTI, D. et al. Friedelin and lanosterol from *Garcinia prainiana* stimulated glucose uptake and adipocytes differentiation in 3T3-L1 adipocytes. *Natural Product Research*, v. 17, n. 4–5, 2012.

TALABER, G. et al. Wnt-4 protects thymic epithelial cells against dexamethasone-induced senescence. *Rejuvenation Research*, 14(3), 241-248. 2011. <https://doi.org/10.1089/rej.2010.1110>

TAN, H.; ZHAO, Z.; LIU, J. Epithelial-mesenchymal transition in age-associated thymic involution: Mechanisms and therapeutic implications. *Ageing Research Reviews*, 73, 101532. 2022.

TAN, J. W. et al. D-galactose-induced immune dysfunction and its relevance to thymic involution. *Biogerontology*, v. 23, n. 2, p. 153-166, 2022.

TANIUCHI, I. CD4 helper and CD8 cytotoxic T cell differentiation. *Annual Review of Immunology*, v. 36, n. 1, p. 579-601, 2018. DOI: 10.1146/annurev-immunol-042617-053411. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053411>.

TAUB, D.; LONGO, D. Insights into thymic aging and regeneration. *Immunological Reviews*, 205(1), 72-93. 2005. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00275.x>

VAIDYA, H.; LEON, A.; BLACKBURN, C. Foxn1 in thymus organogenesis and development. *European Journal of Immunology*, 46(8), 1826-1837. 2016. <https://doi.org/10.1002/eji.201545814>

VENTEVOGEL, M.; SEM POWSKI, G. Thymic rejuvenation and aging. *Current Opinion in Immunology*, 25(4), 516-522. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.co.2013.06.002>

VIANA, S. et al. Insulin-like growth factor-1 modulates extracellular matrix production in thymic epithelial cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 116, n. 6, p. 1234-1243, 2015. DOI: 10.1002/jcb.25084.

VIEIRA, L. F. de A. Influência in vitro do fator-1 de crescimento semelhante a insulina sobre as moléculas envolvidas na diferenciação de linfócitos T. 2017. 85 f.

Tese (Doutorado em Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió. 2017.

VIEIRA, R. et al. Growth hormone and IGF-1 modulate thymocyte development and survival. *Journal of Immunology*, v. 201, n. 8, p. 2000-2012, 2022. DOI: 10.4049/jimmunol.2200452.

VILLA-VERDE, D. et al. Galectin-3 modulates carbohydrate-dependent thymocyte interactions with the thymic microenvironment. *European Journal of Immunology*, 32(5), 1434. 2002. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200205\)32:53.0.co;2-m](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200205)32:53.0.co;2-m)

VILLEGAS, J. A. et al. Cultured human thymic-derived cells display medullary thymic epithelial cell phenotype and functionality. *Frontiers in Immunology*, v. 9, p. 1663, 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01663. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01663>

VICENTE-MANZANARES, M.; CHOI, C. K.; HORWITZ, A. R. Integrins in cell migration – the actin connection. *Journal of Cell Science*, v. 122, n. 2, p. 199-206, 2009. DOI: 10.1242/jcs.018564.

VOGEL, A. et al. The genetic background of autoimmune polyendocrinopathy–candidiasis–ectodermal dystrophy and its autoimmune disease components. *J Mol Med*, v. 80, n. 4, p. 201-211, 2002. DOI: 10.1007/s00109-001-0306-2.

WANG, H. et al. Thymic Epithelial Cells Contribute to Thymopoiesis and T Cell Development. *Frontiers in Immunology*, v. 10, n. January, p. 1–10, 2020a.

WANG, Y. et al. Saikosaponin A inhibits triple-negative breast cancer growth and metastasis through downregulation of CXCR4. *Frontiers in Oncology*, v. 9, p. 1487, 2020b. DOI: 10.3389/fonc.2019.01487.

WANG, Z. et al. Aging, cellular senescence, and cancer: mechanisms of tumor suppression. *Molecular and Cellular Biology*, v. 42, n. 6, p. 1-16, 2022.

WANG, Z. et al. Bone marrow mesenchymal stem cells improve thymus and spleen function of aging rats through affecting p21/pcna and suppressing oxidative stress. *Aging*, 12(12), 11386-11397. 2020. <https://doi.org/10.18632/aging.103186>

WEI, T. et al. Resveratrol ameliorates thymus senescence changes in d-galactose induced mice. *Microbiology and Immunology*, 64(9), 620-629. 2020. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12833>

WEI, Y. H. et al. Oxidative stress-induced mtDNA mutations in aging and human diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1042, p. 182–193, 2005.

WEKERLE, H.; KETELSEN, U. P.; ERNST, M. Thymic nurse cells. Lymphoepithelial cell complexes in murine thymuses: morphological and serological characterization. *J Exp Med.*, v. 4, n. 151, p. 925-44. 1980.

WOLSKA, K. I. et al. Antibacterial activity of oleanolic and ursolic acids and their derivatives. *Central European Journal of Biology*, v. 5, n. 5, 2010.

XU, W. et al. D-galactose-induced brain aging model: mechanisms and therapeutic strategies. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 216, p. 107650, 2020.

XU, X. et al. D-galactose induces senescence of glioblastoma cells through yap-cdk6 pathway. *Aging (Albany NY)*, 12(18), 18501-18521. 2020.  
<https://doi.org/10.18632/aging.103819>

YADAV, V. R. et al. Targeting Inflammatory Pathways by Triterpenoids for Prevention and Treatment of Cancer. *Toxins*, v. 2, p. 2428–2466, 2010.

YAMANO, T. et al. Thymic B cells are licensed to present self antigens for central T cell tolerance induction. *Immunity*, v. 42, n. 6, p. 1048-1061, 2015.

YANG, H. et al. Axin expression in thymic stromal cells contributes to an age-related increase in thymic adiposity and is associated with reduced thymopoiesis independently of ghrelin signaling. *Journal of Leukocyte Biology*, 85(6), 928-938. 2009. <https://doi.org/10.1189/jlb.1008621>

YANG, H. et al. Caloric restriction delays thymic involution by preventing the accumulation of senescent cells in thymic stroma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 25, p. 10705-10710, 2009. DOI: 10.1073/pnas.0902875106.

YANG, H. et al. Epifriedelanol from the Root Bark of *Ulmus davidiana* Inhibits Cellular Senescence in Human Primary Cells. *Planta Medica*, [s. l.], v. 77, n. 05, p. 441–449, 2011. Disponível em: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0030-1250458>

YANG, J. et al. Epithelial-mesenchymal transition in age-associated thymic involution: mechanisms and therapeutic implications. *Ageing Research Reviews*, v. 92, 2023. DOI: 10.1016/j.arr.2023.102115. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S156816372300274X>

YANG, S. et al. Metformin ameliorates thymus degeneration of mice by regulating mitochondrial function. *International Immunopharmacology*, [s. l.], v. 108, p. 108744, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567576922002284>.

YOUN, H. et al. The Nlrp3 inflammasome promotes age-related thymic demise and immunosenescence. *Cell Rep.*, 2012 Jan 26;1(1):56-68. doi: 10.1016/j.celrep.2011.11.005. Epub 2012 Jan 26. PMID: 22832107; PMCID: PMC3883512.

YOUN, J. et al. Perspectives for improvement of the thymic microenvironment through manipulation of thymic epithelial cells: A mini-review. *Immunity & Ageing*, 16(1), 1-10. 2019.

YOUM, Y. et al. Prolongevity hormone fgf21 protects against immune senescence by delaying age-related thymic involution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(4), 1026-1031. 2016. <https://doi.org/10.1073/pnas.1514511113>

YUE, S.; ZHENG, X.; ZHENG, Y. Cell-type-specific role of lamin-b1 in thymus development and its inflammation-driven reduction in thymus aging. *Aging Cell*, 18(4). 2019. <https://doi.org/10.1111/acel.12952>

ZHANG, D. et al. Autophagy inhibits the mesenchymal stem cell aging induced by D-galactose through ros/jnk/p38 signalling. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 47:466-477. 2020. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13207>

ZHAO, K. et al. D-galactose-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in vascular smooth muscle cells: prevention by N-acetylcysteine. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 496, n. 2, p. 151-156, 2010.

ZHANG, H. et al. Lycium barbarum polysaccharides attenuate D-galactose-induced senescence and neuronal apoptosis in the hippocampus of rats through the Keap1-Nrf2 signaling pathway. *Journal of Functional Foods*, v. 93, p. 105091, 2022.

ZHANG, J. et al. Th1 biased progressive autoimmunity in aged aire-deficient mice accelerated thymic epithelial cell senescence. *Aging and Disease*, 10(3), 497. 2019. <https://doi.org/10.14336/ad.2018.0608>

ZHAO, Z. et al. Naringin enhances endothelial progenitor cell (EPC) proliferation and tube formation capacity through the CXCL12/CXCR4/PI3K/Akt signaling pathway. *Chemico-Biological Interactions*, v. 286, p. 45-51, 2018. DOI: 10.1016/j.cbi.2018.03.006.

## ANEXOS

**ANEXO A - Thymic epithelial cell responses to the friedelin triterpene *in vitro***  
– Submetido à revista Natural Product Research em 30/12/23  
Aceito em 20/20/24

**Thymic epithelial cell responses to the friedelin triterpene *in vitro***

<sup>a,b</sup>Felipe Lima Porto\*, <sup>a,b</sup>Marvin Paulo Lins\*, <sup>a,b</sup>Salete Smaniotto, <sup>a,b</sup>Maria Danielma dos Santos Reis

<sup>a</sup>Laboratory of Cell Biology, Institute of Biological and Health Sciences, Federal University of Alagoas, Maceió, Brazil;

<sup>b</sup>Brazilian National Institute of Science and Technology on Neuroimmunomodulation (INCT-NIM), Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

\*These authors contributed equally to this work and share first authorship.

Submitted at 30/12/23

**ORCID**

Felipe Lima Porto <http://orcid.org/0000-0003-2775-5123>

Marvin Paulo Lins ID <https://orcid.org/0000-0003-4247-0345>

Salete Smaniotto ID <https://orcid.org/0000-0003-1527-5894>

Maria Danielma dos Santos Reis ID <https://orcid.org/0000-0003-4119-4019>

Corresponding author:

Marvin Paulo Lins, Ph.D.

Laboratory of Cell Biology, Institute of Biological and Health Sciences

Federal University of Alagoas

Lourival Melo Mota Avenue, s/n, ZIP 57072-970

Maceió, Alagoas, Brazil.

Phone: ++55 82 3214-1704.

E-mail: [marvin.lins@icbs.ufal.br](mailto:marvin.lins@icbs.ufal.br)

### Abstract

Thymic epithelial cells (TECs) dysfunction can lead to disorders in the adaptive immune response, resulting in immunodeficiency or autoimmune diseases. Therefore, the investigation of new drugs with immunomodulatory capacity can contribute to the development of strategies to improve thymic functions. In this context, this study aimed to investigate the *in vitro* effects of the pentacyclic triterpene friedelin on TEC biology. For this, murine 2BH4 cells were treated with 0.1 and 1  $\mu$ M friedelin (FD) for 24 h. After treatment, fibronectin and laminin production was increased (16% and 37% respectively) by TECs, however it did not alter the expression of CXCL12 chemokine. The interaction between TEC and thymocytes was also evaluated, in which a greater adhesion (45%) and survival (228%) of thymocytes to treated-TECs was observed. MHC molecules were up-regulated by FD treatment plus thymocyte coculture. Based on these results, it was possible to attest that FD has an important and promissory role in the physiology of murine TECs.

**Key words:** TEC, thymus, thymocyte, friedelin, immunomodulatory, extracellular matrix.

### 1. Introduction

Thymus is a primary lymphoid organ important for the effectiveness of the adaptive immune system, being responsible for the maturation and differentiation of T lymphocytes. This organ is located in the mediastinum, anterior to the great vessels that supply the heart. Thymus is histologically divided into two regions, cortex and medulla, by which the developing lymphocytes (named thymocytes) migrate while interacting with the components of the thymic microenvironment (diverse stromal cells, soluble factors, and extracellular matrix molecules produced by them) (Abramson and Anderson 2017).

One of the main elements that constitute the thymic stroma are the thymic epithelial cells (TECs). These cells are responsible for producing growth factors necessary for thymocyte differentiation and survival, in addition to presenting important antigens during the positive and negative selections of these cells. Alterations that promote TEC dysfunctions can lead to drastic disorders in the adaptive immune response, resulting in immunodeficiency or autoimmune diseases. Furthermore, factors such as aging, stress, infections, and chronic diseases can also interfere with the function and maintenance of TECs (Wang *et al.* 2020). Therefore, the investigation of new drugs with immunomodulatory capacity can contribute to the development of strategies to improve thymic functions.

Medicinal plants continue to be one of the main sources in the search for molecules for the development of drugs for various disorders, due to the huge and diverse types of metabolites that these plants produce (Chen *et al.* 2016), such as triterpenes. These substances are secondary metabolites found in bark, leaves, fruits and roots of the plants and are described to have a range of biological and

pharmacological activities such as anticancer (Bishayee *et al.* 2011), antioxidant (Peng *et al.* 2013), antiviral (Dzubak *et al.* 2006), antimicrobial (Rungsimakan and Rowan 2014), anti-inflammatory (De Almeida *et al.* 2015) and pro-healing effects (Agra *et al.* 2016).

In the group of pentacyclic triterpenes, friedelin (FD) is mentioned. This triterpene is present in different plant genera, including *Calophyllum* (Mokhtar *et al.* 2024), *Maytenus* (Bicalho *et al.* 2019), *Azima* (Antonisamy *et al.* 2015), *Vismia* (Tamokou *et al.* 2009), *Cannabis* (Slatkin *et al.* 1971), and *Clusia* (Ferreira *et al.* 2015). FD has a molecular structure that is characteristic of terpenes, consisting of six isoprene units in five carbon rings formed by saturated bonds. Furthermore, evaluating the chemical structure of the compound, there are eight CH<sub>3</sub> groups in the backbone of the molecule (Ribeiro *et al.* 2011; Quintans *et al.* 2014). Among the therapeutic and immunomodulatory activities that FD exhibits (neuro-protector (Sandhu *et al.* 2023), anti-tumoral (Joshi *et al.* 2023), anti-inflammatory (Jiang *et al.* 2022; Nunes *et al.* 2021), and anti-diabetic (Sunil *et al.* 2021)), nothing has been described so far about its effects on the thymus, particularly on TECs. Considering that natural products have pharmacological potential, without containing the adverse effects of drugs previously developed, it is interesting to evaluate their immunomodulatory potential. The literature shows that some triterpenes obtained from plant sources may have an immunomodulatory action on the thymus, such as those derived from the extract of *Alstonia scholaris* (Feng *et al.* 2013), which increases thymic index during tumoral development. Also, other natural compounds such as resveratrol (Hou *et al.* 2023) and curcumin (Li *et al.* 2021) have been described as a thymus stimulant, reversing thymic involution. FD has been shown to be safe and non-toxic in the organism (Sandhu *et al.* 2023; Gowtham *et al.* 2023; Toledo *et al.* 2021), which reinforces its application for improving thymic functions. In this context, this study aimed to study the *in vitro* effects of FD on general aspects in the biology of TECs.

## 2. Results and Discussion

### 2.1 2BH4 viability after friedelin treatment

Cells were treated or not with FD (Sigma-Aldrich, catalogue number 855022) at concentrations of 0.1 to 100 µM in RPMI-SBF 2% for one or 24 hours. The result of this experiment was performed to choose the optimal concentrations to be used in the further assays. Cells exposed during one hour to FD concentrations ranging from 0.1 to 10 µM maintained viability compared to untreated cells. Conversely, cultures treated with 100 µM FD exhibited a notable reduction in 30% of cell viability compared to untreated cells (Figure 1A). In the 24-hour-treated group, 0.1 µM treatment did not decrease cell viability, however, the treatment with concentrations of 1 to 100 µM, a significant decrease in the TEC viability was observed, with a reduction of approximately 15%, 40%, and 50%, respectively (Figure 1B).

To date, there are no data in the literature about the FD cytotoxicity on TECs. *In vitro* treatment in 3T3-L1 adipocytes at concentrations of 10, 50, and 100 µM of FD for 48h decreased the viability of these cells in a dose-dependent manner (Susanti *et al.* 2013). On the other hand, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) had 89% of viability after 24 hours at 50 µg/mL of ethanol extract of *Luehea ochrophylla* (which contains FD mostly) (Araújo *et al.* 2019). In view of the results

presented in our study, the concentrations of 0.1  $\mu$ M and 1  $\mu$ M, and the duration of 24 hours were chosen for the next steps of this study.

## 2.2 CXCL12 expression on TEC after friedelin treatment

We wished to determine if FD could modulate the expression of CXCL12 in our cellular model. For that, after 24 hours of exposition to FD, we evaluated CXCL12 expression by fluorescence analysis. As result, FD kept CXCL12 production unchanged, regardless of the dose used. This finding was confirmed by qualitative (Figure 2A) and quantitative (Figure 2B) analysis. This chemokine, also known as Stromal Cell-derived Factor-1 (SDF-1) is secreted and bound to the surface of cortical TECs (Kadakia *et al.* 2019) being one of the most crucial chemokines that drive thymocyte migration (Guo *et al.* 2013). The production of CXCL12 by TECs can be modulated by other molecules, such as prolactin and growth hormone, which promote its secretion (Smaniotti *et al.* 2005; Medeiros *et al.* 2021). Natural products that modulate the CXCL12/CXCR4 axis have been studied in recent years, such as naringin (Zhao *et al.* 2018), saikosaponin A (Wang *et al.* 2020), pomolic acid (Kim *et al.* 2016), and ursolic acid (Cao & He 2022), demonstrating their applications for various pathologies linked to this important axis in the organism.

## 2.3 Friedelin modulates extracellular matrix deposition by TECs

Next, we proceed to test if FD could modulate extracellular matrix proteins (ECM) production by TECs. Interestingly, FD enhanced the production of fibronectin (FN) and laminin (LM), only at 0.1  $\mu$ M concentration (16% and 37% of augment, to FN and LM, respectively). This increment was observed in fluorescence images (Figure 3A,B) and in the graphs of quantification (Figure 3C,D). Besides to the increased amount of FN outside of the cells, it was also observed FN deposition inside of cells, surround the nucleus (Figure 3A, 0.1 M FD group). This modulation of FN by FD could result in other alterations on cellular functionality.

It is known that in addition to chemokines, ECM produced by stromal cells in the thymus are essential for cell-cell interactions that governs the thymocyte maturation (Savino *et al.* 2004). The FN and LM glycoproteins are primarily produced by TECs as the main components of thymic ECM with an important role in cell adhesion, thymocyte proliferation and differentiation (Silva *et al.* 2020; Savino *et al.* 2015). The increase in FN and LM production by TECs treated with FD indicates the beneficial therapeutic effect of this triterpene, since the increase in LM enhances the viability and proliferation of TECs, as well as the gene expression of these cells (Silva *et al.*, 2022), and it is important for new treatment strategies and thymus transplant or rejuvenation (Asnaghi *et al.*, 2021).

As these proteins are relevant players in cell adhesion and survival in thymic microenvironment, we desired to examine these phenomena in the interactions between thymocytes and TECs *in vitro*.

## 2.4 Friedelin improves TEC:thymocyte adhesion and survival in an co-culture system

Since ECM production was increased, we hypothesized that FD could assist thymocyte adhesion to TECs. Thus, after FD treatment, fresh murine thymocytes were added on TEC cultures to adhere for 1 h. It was observed an increase in the number of adhered thymocytes on TEC treated with 1  $\mu$ M of FD (Figure 4A). This effect was especially perceived in CD4 $^+$ CD8 $^+$  and CD4 $^+$ CD8 $^-$  subsets (50% and 32% of increase, respectively) (Figure 4B).

Next, we assessed the influence of FD in the survival of thymocytes co-cultured with TEC. Similarly to the adhesion assay, FD (1  $\mu$ M) increased thymocyte survival in 228% after 72 h of co-culture (Figure 5A).

T-cell development that occurs in thymic compartments is dependent on interactions between maturing thymocytes and TECs. In this thymic crosstalk, the cell-cell adhesion mediated by ECM and their receptors is an important process during which thymocytes interact with TECs and receive signals to their differentiation (Emre *et al.* 2013). Moreover, TECs orchestrate the proliferation and survival of differentiating thymocytes (Speck-Hernandez *et al.* 2018). Our results showed that, in addition to its direct influence on TECs, FD is capable of indirectly affecting thymocytes by promoting their adhesion to TECs and survival.

These functional experiments demonstrate that FD has a positive modulatory ability on thymocyte adhesion and survival. These events are linked, since interactions between maturing thymocytes and TECs depends on relationship involving cell surface molecules, such as integrins, selectins, Notch receptors, and major histocompatibility complex (MHC) proteins (Lee *et al.* 2010).

### 3. Conclusion

The results demonstrated in this study brought new perspectives on the biological role of friedelin on thymic epithelial cells. Furthermore, considering the scarcity of data in the literature on this topic, the proposal is very relevant and unprecedented. Our data presented here allowed us to conclude that friedelin increases fibronectin and laminin production, without altering the expression of CXCL12 in TECs. In addition, FD has influence on TEC/thymocyte interactions by increasing the adhesion of thymocytes to TEC and the survival of these thymocytes when in co-culture. Finally, MHC expression was up-regulated in these cells, showing that FD is a thymic modulator. In order to recognize FD as a possible therapeutic agent in thymus dysfunctions, further experimental investigations are needed.

### Acknowledgments

The authors thank Julianderson Carmo for assistance in the friedelin preparation and dilution, also Juliane Pereira for handling in the cytometer, and Erick Ferreira for image formatting.

### Declaration of interest statement

The authors declare that they have no potential conflict of interests.

### References

- Abramson J, Anderson G. 2017. Thymic epithelial cells. *Annu Rev Immunol.* 26(35):85-118.
- Agra LC, Lins MP, da Silva Marques P, Smaniotti S, Bandeira de Melo C, Lagente V, Barreto E. 2016. Uvaol attenuates pleuritis and eosinophilic inflammation in ovalbumin-induced allergy in mice. *Eur J Pharmacol.* 780:232-242.
- Amarante-Mendes JG, Chammas R, Abrahamsohn P, Patel PC, Potworowski EF, Macedo MS. 1995. Cloning of a thymic stromal cell capable of protecting thymocytes from apoptosis. *Cell Immunol.* 161(2):173-80.
- Antonisamy P, Duraipandiyan V, Aravinthan A, Al-Dhabi NA, Ignacimuthu S, Choi KC, Kim JH. 2015. Protective effects of friedelin isolated from *Azima tetracantha*

Lam. against ethanol-induced gastric ulcer in rats and possible underlying mechanisms. *Eur J Pharmacol.* 750:167-75.

Araújo CRR, de Melo Silva T, Dos Santos MG, Ottoni MHF, de Souza Fagundes EM, de Sousa Fontoura H, de Melo GEBA, de Carvalho Alcântara AF. 2019. Anti-inflammatory and cytotoxic activities of the extracts, fractions, and chemical constituents isolated from *Luehea ochrophylla* Mart. *BMC Complement Altern Med.* 19(1):284.

Asnaghi MA, Barthlott T, Gullotta F, Strusi V, Amovilli A, Hafen K, Srivastava G, Oertle P, Toni R, Wendt D, Holländer GA, Martin I. 2021. Thymus Extracellular Matrix-Derived Scaffolds Support Graft-Resident Thymopoiesis and Long-Term *In vitro* Culture of Adult Thymic Epithelial Cells. *Adv Funct Mater.* 31(20):2010747.

Bicalho KU, Santoni MM, Arendt P, Zanelli CF, Furlan M, Goossens A, Pollier J. 2019. CYP712K4 Catalyzes the C-29 Oxidation of Friedelin in the *Maytenus ilicifolia* Quinone Methide Triterpenoid Biosynthesis Pathway. *Plant Cell Physiol.* 60(11):2510-2522.

Bishayee A, Ahmed S, Brankov N, Perloff M. 2011. Triterpenoids as potential agents for the chemoprevention and therapy of breast cancer. *Front Biosci (Landmark Ed).* 16:980-996.

Cao X, He Q. 2022. Ursolic acid inhibits proliferation, migration and invasion of human papillary thyroid carcinoma cells via CXCL12/CXCR4/CXCR7 axis through cancer-associated fibroblasts. *Hum Exp Toxicol.* 41:9603271221111333.

Chen SL, Yu H, Luo HM, Wu Q, Li CF, Steinmetz A. 2016. Conservation and sustainable use of medicinal plants: problems, progress, and prospects. *Chin Med.* 11:37.

de Almeida PD, Boleti AP, Rüdiger AL, Lourenço GA, da Veiga Junior VF, Lima ES. 2015. Anti-inflammatory activity of triterpenes isolated from *Protium paniculatum* oil-resins. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015:293768.

Dzubak P, Hajdúch M, Vydra D, Hustová A, Kvasnica M, Biedermann D, Marková L, Urban M, Sarek J. 2006. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Nat Prod Rep.* 23(3):394-411.

Emre Y, Irla M, Dunand-Sauthier I, Ballet R, Meguenani M, Jemelin S, Vesin C, Reith W, Imhof BA. 2013. Thymic epithelial cell expansion through matricellular protein CYR61 boosts progenitor homing and T-cell output. *Nat Commun.* 4:2842.

Feng L, Chen Y, Yuan L, Liu X, Gu JF, Zhang MH, Wang Y. 2013. A combination of alkaloids and triterpenes of *Alstonia scholaris* (Linn.) R. Br. leaves enhances immunomodulatory activity in C57BL/6 mice and induces apoptosis in the A549 cell line. *Molecules.* 18(11):13920-13939.

Ferreira RO, da Silva TM, de Carvalho MG. 2015. New Polyprenylated Phloroglucinol and Other Compounds Isolated from the Fruits of *Clusia nemorosa* (Clusiaceae). *Molecules.* 20(8):14326-33.

- Gowtham HG, Ahmed F, Anandan S, Shivakumara CS, Bilagi A, Pradeep S, Shivamallu C, Shati AA, Alfaifi MY, Elbehairi SEI, Achar RR, Silina E, Stupin V, Murali M, Kollur SP. 2023. In Silico Computational Studies of Bioactive Secondary Metabolites from *Wedelia trilobata* against Anti-Apoptotic B-Cell Lymphoma-2 (Bcl-2) Protein Associated with Cancer Cell Survival and Resistance. *Molecules*. 28(4):1588.
- Guo XK, Liu YF, Zhou Y, Sun XY, Qian XP, Zhang Y, Zhang J. 2013. The expression of netrin-1 in the thymus and its effects on thymocyte adhesion and migration. *Clin Dev Immunol*. 462152.
- Hou Y, Li S, Zhu H, Qiao M, Sun X, Li G. 2023. Development of the Thymus and Kidney and Effects of Resveratrol on Their Aging in a Short-Lived Fish. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 78(9):1550-1557.
- Jiang H, Lin X, Liang W, Li Y, Yu X. 2022. Friedelin Alleviates the Pathogenesis of Collagenase-Induced Tendinopathy in Mice by Promoting the Selective Autophagic Degradation of p65. *Nutrients*. 14(8):1673.
- Joshi BP, Bhandare VV, Vankawala M, Patel P, Patel R, Vyas B, Krishnamurty R. 2023. Friedelin, a novel inhibitor of CYP17A1 in prostate cancer from *Cassia tora*. *J Biomol Struct Dyn*. 41(19):9695-9720.
- Kadakia T, Tai X, Kruhlak M, Wisniewski J, Hwang IY, Roy S, Guinter TI, Alag A, Kehrl JH, Zhuang Y, Singer A. 2019. E-protein-regulated expression of CXCR4 adheres preselection thymocytes to the thymic cortex. *J Exp Med*. 216(8):1749-1761.
- Kim B, Kim JH, Park B. 2016. Pomolic Acid Inhibits Invasion of Breast Cancer Cells Through the Suppression of CXC Chemokine Receptor Type 4 Expression. *J Cell Biochem*. 117(6):1296-307.
- Lee DK, Hakim FT, Gress RE. 2010. The thymus and the immune system: layered levels of control. *J Thorac Oncol*. 5(10 Suppl 4):S273-276.
- Li JH, Wei TT, Guo L, Cao JH, Feng YK, Guo SN, Liu GH, Ding Y, Chai YR. 2021. Curcumin protects thymus against D-galactose-induced senescence in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 394(2):411-420.
- Lins MP, Medeiros NC, Carmo J, Porto FL, Dos Santos Reis MD, Smaniotto S. 2020. The responsiveness of thymic stromal cells to semaphorin-3a. *Immunol Invest*. 1-16.
- Medeiros NVC, Porto FL, DE Menezes CA, Santos Reis MDD, Smaniotto S, Lins MP. 2021. CXCL12-driven thymocyte migration is increased by thymic epithelial cells treated with prolactin *in vitro*. *J Biosci*. 46(4):103.
- Mokhtar N, Karunakaran T, Santhanam R, Abu Bakar MH, Jong VYM. 2024. Phenolics and triterpenoids from stem bark of *Calophyllum lanigerum* var. *austrococciaceum* (Whitmore) P. F. Stevens and their cytotoxic activities. *Nat Prod Res*. 38(5):873-878.

- Nunes R, Broering MF, De Faveri R, Goldoni FC, Mariano LNB, Mafessoli PCM, Delle Monache F, Cechinel Filho V, Niero R, Santin JR, Quintão NLM. 2021. Effect of the metanolic extract from the leaves of *Garcinia humilis* Vahl (Clusiaceae) on acute inflammation. *Inflammopharmacology*. 29(2):423-438.
- Quintans JSS, Costa EV, Tavares JF, Souza TT, Araújo SS, Estevam CS, Barison A, Cabral AGS, Silva M, Sefarini MR, Quintans-Júnior LJ. 2014. Phytochemical study and antinociceptive effect of the hexanic extract of leaves from *Combretum duarteanum* and friedelin, a triterpene isolated from the hexanic extract, in orofacial nociceptive protocols. *Rev Bras Farmacogn*. 24(1):60-66.
- Rungsimakan S, Rowan MG. 2014. Terpenoids, flavonoids and caffeic acid derivatives from *Salvia viridis* L. cvar. Blue Jeans. *Phytochemistry*. 108:177-188.
- Sandhu M, Irfan HM, Arshad L, Ullah A, Shah SA, Ali H. 2023. Friedelin and Glutinol induce neuroprotection against ethanol induced neurotoxicity in pup's brain through reduction of TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, caspase-3 and PARP-1. *Neurotoxicology*. 99:274-281.
- Savino W, Mendes-da-Cruz DA, Golbert DC, Riederer I, Cotta-de-Almeida V. 2015. Laminin-mediated interactions in thymocyte migration and development. *Front Immunol*. 6:579.
- Savino W, Mendes-Da-Cruz DA, Smaniotti S, Silva-Monteiro E, Villa-Verde DM. 2004. Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix. *J Leukoc Biol*. 75(6):951-961.
- Silva CS, Pinto RD, Amorim S, Pires RA, Correia-Neves M, Reis RL, Alves NL, Martins A, Neves NM. 2020. Fibronectin-functionalized fibrous meshes as a substrate to support cultures of thymic epithelial cells. *Biomacromolecules*. 21(12):4771-4780.
- Silva CS, Cerqueira MT, Reis RL, Martins A, Neves NM. 2022. Laminin-2 immobilized on a 3D fibrous structure impacts cortical thymic epithelial cells behaviour and their interaction with thymocytes. *Int J Biol Macromol*. 222(Pt B):3168-3177.
- Slatkin DJ, Doorenbos NJ, Harris LS, Masoud AN, Quimby MW, Schiff PL Jr. 1971. Chemical constituents of *Cannabis sativa* L. root. *J Pharm Sci*. 60(12):1891-2.
- Smaniotti S, de Mello-Coelho V, Villa-Verde DM, Pléau JM, Postel-Vinay MC, Dardenne M, Savino W. 2005. Growth hormone modulates thymocyte development in vivo through a combined action of laminin and CXC chemokine ligand 12. *Endocrinology*. 146(7):3005-3017.
- Speck-Hernandez CA, Assis AF, Felicio RF, Cotrim-Sousa L, Pezzi N, Lopes GS, Bombonato-Prado KF, Giulietti S, Passos GA. 2018. Aire disruption influences the medullary thymic epithelial cell transcriptome and interaction with thymocytes. *Front Immunol*. 9:964.
- Sunil C, Irudayaraj SS, Duraipandian V, Alrashood ST, Alharbi SA, Ignacimuthu S. 2021. Friedelin exhibits antidiabetic effect in diabetic rats via modulation of glucose metabolism in liver and muscle. *J Ethnopharmacol*. 268:113659.

Susanti D, Amioudine MZ, Rezali MF, Taher M. 2013. Friedelin and lanosterol from *Garcinia prainiana* stimulated glucose uptake and adipocytes differentiation in 3T3-L1 adipocytes. *Nat Prod Res.* 27(4-5):417-424.

Tamokou Jde D, Tala MF, Wabo HK, Kuiate JR, Tane P. 2009. Antimicrobial activities of methanol extract and compounds from stem bark of *Vismia rubescens*. *J Ethnopharmacol.* 124(3):571-5.

Wang HX, Pan W, Zheng L, Zhong XP, Tan L, Liang Z, He J, Feng P, Zhao Y, Qiu YR. 2020. Thymic epithelial cells contribute to thymopoiesis and t cell development. *Front Immunol.* 10:3099.

Wang Y, Zhao L, Han X, Wang Y, Mi J, Wang C, Sun D, Fu Y, Zhao X, Guo H, Wang Q. 2020. Saikosaponin A Inhibits Triple-Negative Breast Cancer Growth and Metastasis Through Downregulation of CXCR4. *Front Oncol.* 9:1487.

Zhao Z, Ma X, Ma J, Sun X, Li F, Lv J. 2018. Naringin enhances endothelial progenitor cell (EPC) proliferation and tube formation capacity through the CXCL12/CXCR4/PI3K/Akt signaling pathway. *Chem Biol Interact.* 286:45-51.

## Figures

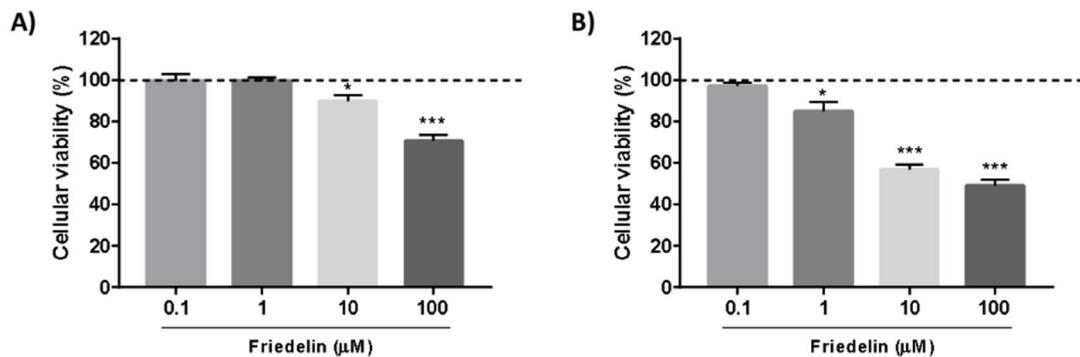


Figure 1

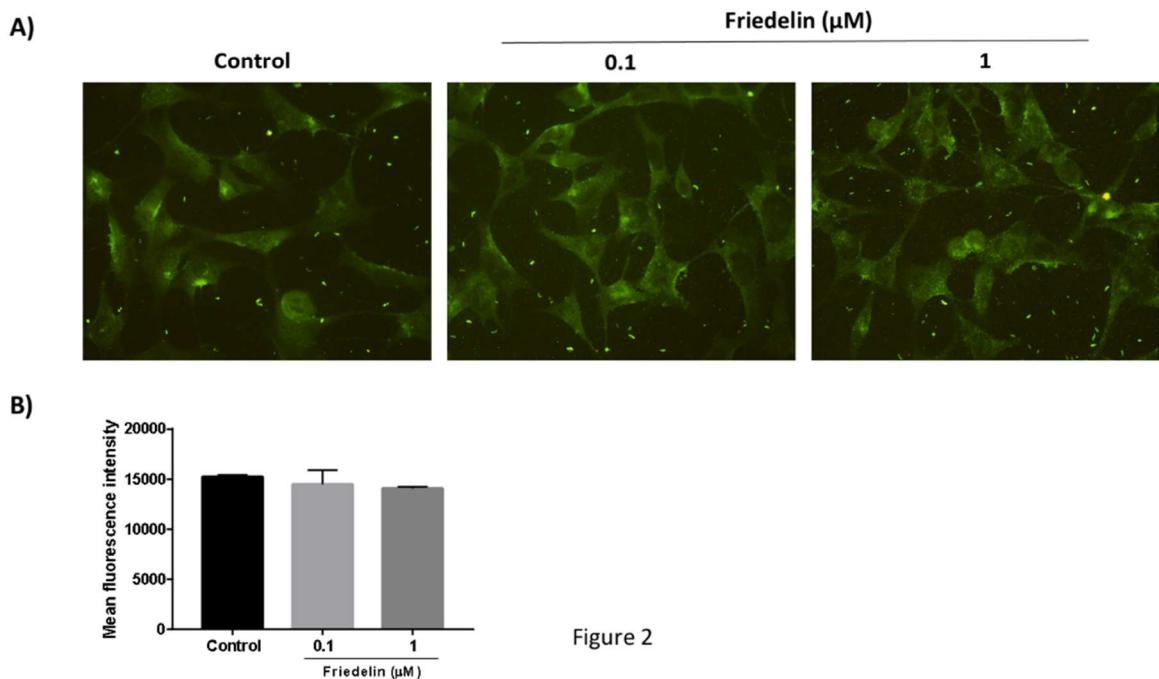


Figure 2

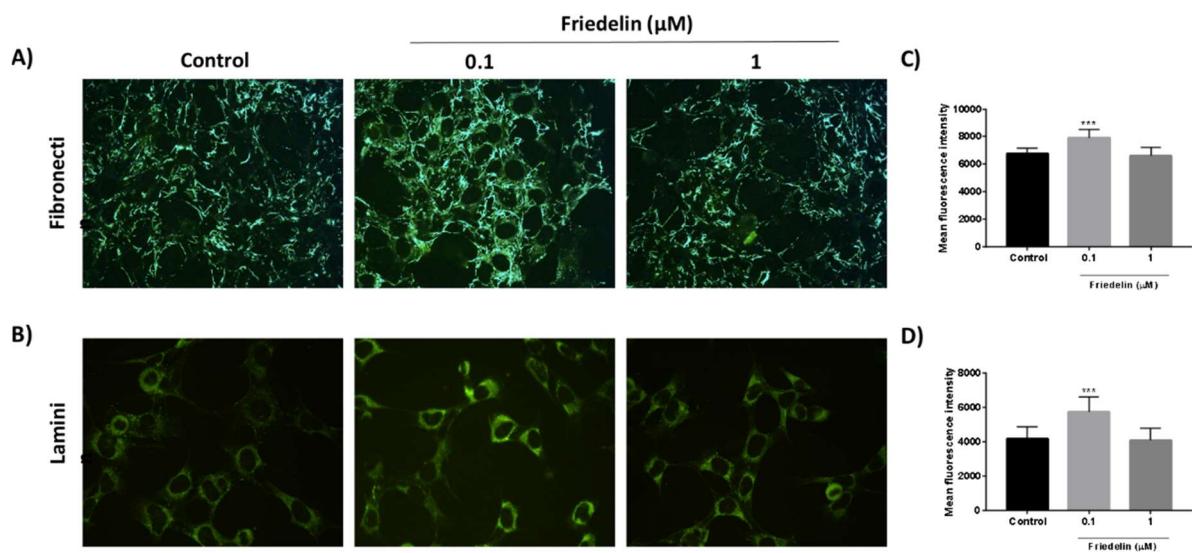


Figure 3

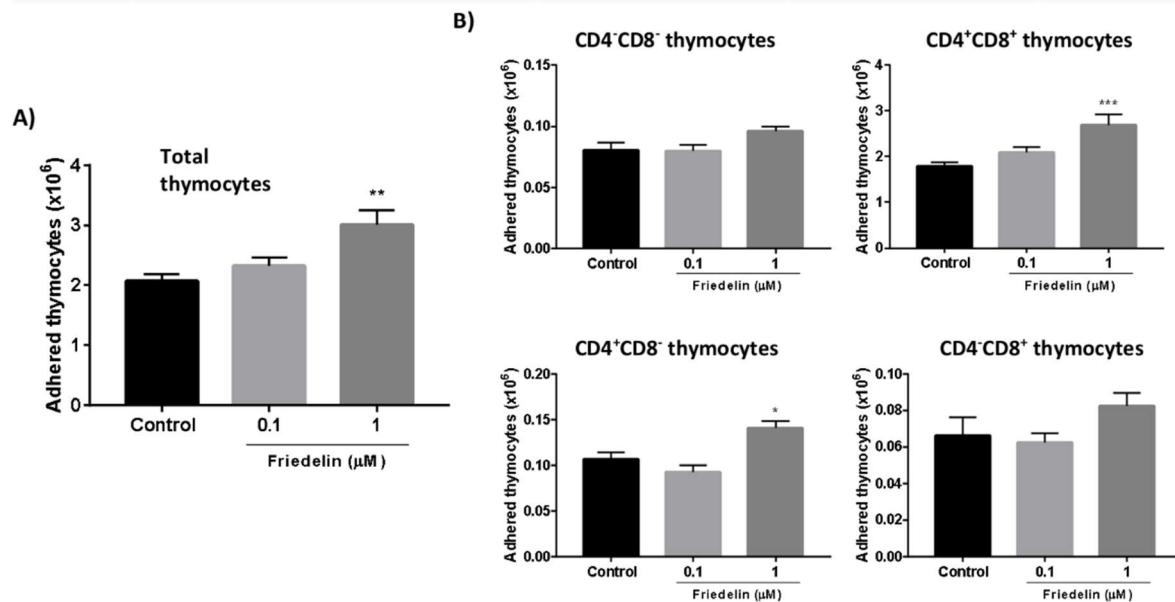


Figure 4

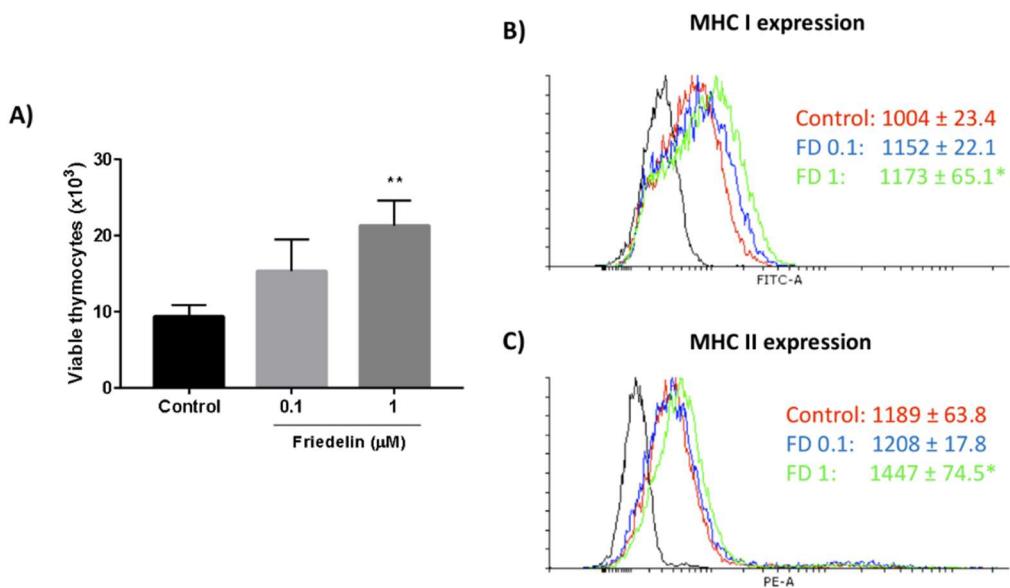
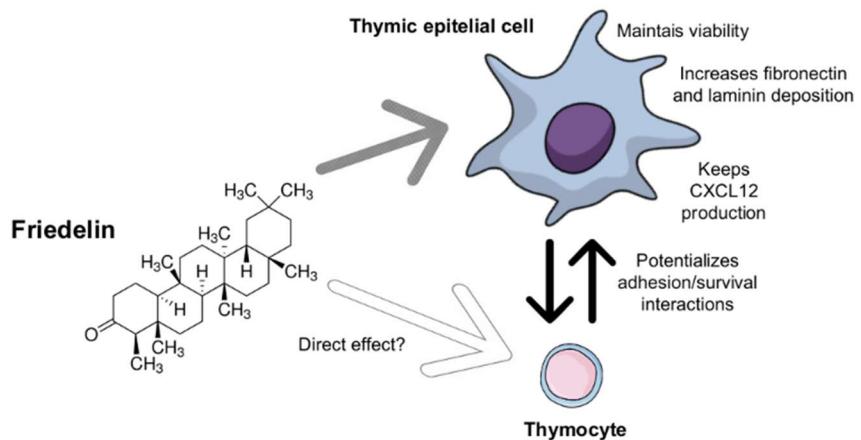


Figure 5

## Graphical abstract



**ANEXO B - CERTIFICADOS DE APROVAÇÃO PARA O USO DE ANIMAIS EM  
EXPERIMENTAÇÃO (CEUA/UFAL)**



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

**CERTIFICADO**

\* 3<sup>a</sup> Via

Certificamos que a proposta intitulada *"Avaliação do papel funcional de hormônios hipofisários e fatores de crescimento sobre células do sistema imune"*, registrada com o nº 47/2016, sob a responsabilidade da pesquisadora **Profa. Dra. Maria Danielma dos Santos Reis**, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), **para fins de pesquisa científica**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas (CEUA/UFAL), em reunião de 18 de outubro de 2021.

Vigência da autorização	23.09.2016 a 23.09.2022
Espécie/linhagem/raça	Carcaça de Camundongo heterogênico Swiss Carcaça de Camundongo isogênico C57BL/6
Nº de animais	174 – Swiss 100 - C57Bl6
Peso/idade	-
Sexo	-
Origem/Local de manutenção	Biotério Central da Ufal / Biotério do Laboratório de Biologia Celular do Núcleo de Pesquisas Multidisciplinares da Ufal
Colaboradores	Salete Smanioto, Felipe Lima Porto, Maria Clara Pitanga Flor, Clarice Agudo de Menezes, Jeniffer Estevão dos Santos, Návylla Candeia de Medeiros, Marvin Paulo Lins, Cicero Fagner Messias de Lima e Karen Steponavicius Piedade Cruz

Maceió, 18 de outubro de 2021.

Documento assinado digitalmente  
Elvan Nascimento dos Santos Filho  
Data: 18/10/2021 12:17:03-0300  
Verifique em <https://verificador.itd.br>

Elvan Nascimento dos Santos Filho  
Coordenador da CEUA  
SIAPE 1756479

Revogada 2<sup>a</sup> via do parecer emitido em 01/09/2020 e aprovada na reunião da Comissão de Ética no Uso de Animais em 26/08/2020.



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

**CERTIFICADO**

\* 4<sup>a</sup> Via

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

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

Maceió, 18 de outubro de 2021.

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

Elvan Nascimento dos Santos Filho  
 Coordenador da CEUA  
 SIAPE 1756479

Revogada 3<sup>a</sup> via do parecer emitido em 02/09/2020 e aprovada na reunião da Comissão de Ética no Uso de Animais em 26/08/2020.



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

PARECER

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

Maceió, 09 de agosto de 2023.

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** TOBYAS MAIA DE ALBUQUERQUE MARIZ  
Data: 09/08/2023 21:12:15-0300  
Verifique em <https://validar.ti.gov.br>

---

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