



UNIVERSIDADE FEDERAL
DE ALAGOAS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
BACHARELADO EM FARMÁCIA

BEATRIZ SOUZA SANTOS

**Efeitos da senescência celular induzida com D-galactose em células epiteliais
tímicas de camundongos**

Maceió, AL

2025

BEATRIZ SOUZA SANTOS

**Efeitos da senescência celular induzida com D-galactose em células epiteliais
tímicas de camundongos**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao corpo docente do curso
de Farmácia da Universidade Federal de
Alagoas, como requisito parcial à
obtenção do título de Bacharelado em
Farmácia.

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

Maceió, AL
2025

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

Bibliotecária: Helena Cristina Pimentel do Vale – CRB4 –661

S237e

Santos, Beatriz Souza.

Efeitos da senescência celular induzida com D-galactose em células epiteliais
tímicas de camundongos / Beatriz Souza Santos. - 2025.

48 f : il.

Orientadora: Maria Danielma dos Santos Reis.

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

Bibliografia: f. 45-48.

1. Timo. 2. Senescência. 3. D-galactose. 4. Células epiteliais. 5. Farmacologia.
I. Título.

CDU: 615:612.014.3

Folha de Aprovação

BEATRIZ SOUZA SANTOS

Efeitos da senescência celular induzida com D-galactose em células epiteliais tímicas de camundongos

Trabalho de conclusão de curso submetido
à banca examinadora do curso de
Bacharelado em Farmácia da
Universidade Federal de Alagoas,
realizado sob orientação da Profª Drª
Maria Danielma dos Santos Reis e
aprovaada em 24/01/2025

Documento assinado digitalmente
 **MARIA DANIELMA DOS SANTOS REIS**
Data: 29/01/2025 17:19:13-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Orientadora: Profª Drª Maria Danielma dos Santos Reis
(Universidade Federal de Alagoas)

Composição da banca examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **EURICA ADELIA NOGUEIRA RIBEIRO**
Data: 30/01/2025 09:05:43-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Examinadora Interna- Profª Drª Êurica Adélia Nogueira Ribeiro
(Universidade Federal de Alagoas)

Documento assinado digitalmente
 **LUCAS SOUSA MAGALHAES**
Data: 30/01/2025 09:18:14-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Examinador Externo- Profº Drº Lucas Sousa Magalhães
(Universidade Federal de Alagoas)

Dedico

À minha mãe, Dionéia, que, com esforço e sacrifício, nunca deixou de me apoiar e encorajar. Esta conquista é um reflexo de sua fé em Deus e em mim, bem como do seu amor que sempre me guiou.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por Sua infinita bondade e misericórdia. Foi o Senhor quem guiou meus passos, abriu meus caminhos e me permitiu alcançar e concluir este sonho. Vejo Sua mão em cada detalhe da minha trajetória, especialmente nos momentos de maior angústia, quando acalmou meu coração e renovou minhas forças. Tudo que alcancei é fruto da Sua graça em minha vida.

À minha família, em especial à minha mãe, meu maior exemplo de força, fé e resiliência, dedico minha mais profunda gratidão. Obrigada por sempre acreditar na educação como o maior legado que poderia nos deixar, por cada oração e por todo o suporte emocional que me ofereceu ao longo dessa jornada. A senhora sonhou este sonho comigo, enxugou minhas lágrimas nos momentos difíceis e me incentivou a nunca desistir, lembrando-me sempre de confiar nos planos de Deus para minha vida. Tudo isso só foi possível porque esteve ao meu lado. À minha irmã, que sempre acreditou no meu potencial e celebrou cada vitória como se fosse dela, agradeço por ser meu apoio constante. Ao meu companheiro de vida, sou profundamente grata pela paciência, pelo carinho e pelo incentivo ao longo dessa jornada. Vocês estiveram comigo nos momentos mais desafiadores, e isso fez toda a diferença.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Maria Danielma, expresso minha gratidão especial. Obrigada por me abrir as portas da pesquisa, por confiar em mim e por compartilhar sua sabedoria e paixão pelo conhecimento. A senhora é, sem dúvidas, uma grande inspiração. Quero também agradecer ao grupo de pesquisa como um todo, especialmente ao Felipe, pelos ensinamentos valiosos, e à Vanessa, minha parceira de bancada e amiga, por todo o apoio e pelos momentos compartilhados ao longo desses anos. Ao time do Laboratório de Biologia Celular (LBC), minha eterna gratidão pelo acolhimento, pela troca de conhecimentos e pela ajuda nos momentos desafiadores da pesquisa. Vocês criaram um ambiente de pesquisa rico e leve, e eu me sinto privilegiada por ter aprendido tanto com cada um de vocês.

Aos professores e colegas que fizeram parte da minha jornada acadêmica, agradeço por cada palavra de incentivo. Vocês foram fundamentais não apenas pelo suporte técnico, mas também pela inspiração constante.

Às minhas "Farmamigas", que estiveram comigo desde o primeiro dia de graduação, não tenho palavras para descrever o quanto foram essenciais. Vocês se tornaram minha segunda família e tornaram tudo mais leve e especial. Obrigada por

cada risada, por cada palavra de conforto e por nunca permitirem que eu me sentisse sozinha.

Por fim, às minhas amigas de infância, que sempre estiveram ao meu lado, acreditando no meu potencial e comemorando comigo cada conquista, minha eterna gratidão. Ter vocês em minha vida é um presente, e cada passo que dei contou também com o incentivo de vocês.

RESUMO

O envelhecimento é resultado do acúmulo de danos moleculares e celulares que diminuem a capacidade funcional dos tecidos e afetam a qualidade de vida da população idosa. No sistema imunológico, isso resulta em imunossenescência, com alterações na resposta imune e involução tímica, que prejudica a produção de linfócitos T no timo. A involução do timo resulta de modificações em células epiteliais tímicas (TEC). É proposto que as TEC podem sofrer ação de radicais livres, favorecendo a senescência celular e, conseqüentemente, a degeneração tímica com a idade. Este trabalho teve como objetivo investigar as alterações provocadas pela senescência celular induzida por estresse oxidativo em células epiteliais tímicas de camundongos *in vitro*. Para investigar esses processos, foi utilizada a D-galactose (D-gal), um açúcar redutor que induz estresse oxidativo e promove a senescência celular, em linhagem de TEC murina 2BH4. Os resultados demonstraram que o tratamento com D-gal foi eficaz na indução de senescência, evidenciado por mudanças morfológicas características nas células, aumento significativo na expressão de p16, marcador de senescência e responsável pela parada do ciclo celular, além de uma redução do número de células expostas à D-gal. As células senescentes apresentaram aumento significativo na expressão do gene para a citocina de TNF- α , indicando uma possível participação no Fenótipo Secretor Associado à Senescência (SASP). Quanto à função celular, foi visto alteração na deposição das moléculas de matriz extracelular, fibronectina e laminina, além de alterações significativas na expressão da integrina VLA-5, sugerindo possíveis modificações nas interações celulares com a matriz extracelular, comprometendo a adesão e a migração celular no microambiente tímico. Esses achados sugerem que o estresse oxidativo decorrente do tratamento com a D-gal desempenha um papel importante na senescência dessas células, fornecendo uma base para investigações futuras sobre a involução tímica relacionada à idade.

Palavras chaves: Timo; Senescência; D-galactose

ABSTRACT

Aging is the result of the accumulation of molecular and cellular damage that reduces the functional capacity of tissues and affects the quality of life of the elderly population. In the immune system, this results in immunosenescence, with changes in the immune response and thymic involution, which impair the production of T lymphocytes in the thymus. Thymic involution results from changes in thymic epithelial cells (TEC). The TEC may be susceptible to the effects of free radicals, which favor cellular senescence and, as a result, thymic degeneration as people age. This study aimed to investigate the changes caused by cellular senescence induced by oxidative stress in TEC of mice *in vitro*. To this end, D-galactose (D-gal), a sugar reducer that induces oxidative stress and promotes cellular senescence, was used in a murine TEC cell line 2BH4. The results demonstrated that treatment with D-gal was effective in inducing senescence, as evidenced by characteristic morphological changes in the cells and a significant increase in the expression of p16, a senescence marker responsible for cell cycle arrest, in addition to a reduction in the number of cells exposed to D-gal. Senescent cells significantly increased the expression of the gene for the cytokine TNF- α , reducing a possible participation in the Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP). Regarding cellular function, changes in the composition of the extracellular matrix molecules, fibronectin and laminin, were observed, in addition to significant changes in the expression of the integrin VLA-5, providing possible modifications in cellular interactions with the extracellular matrix, compromising cell adhesion and migration in the thymic microenvironment. These findings suggest that oxidative stress resulting from treatment with D-gal plays an important role in the senescence of these cells, providing a basis for future investigations on age-related thymic involution.

Keywords: Thymus; Senescence; D-galactose

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	9
REVISÃO DA LITERATURA.....	11
1.1 Timo.....	11
1.1.2 Células epiteliais tímicas.....	13
1.1.3 Matriz extracelular e seus receptores no timo.....	15
1.1.4 Citocinas.....	17
1.2 Involução tímica associada a imunosenescência.....	18
1.3 Senescência celular.....	21
1.4 D-galactose.....	24
2 OBJETIVO.....	27
2.1 Objetivo geral.....	27
2.2 Objetivos específicos:.....	27
3 METODOLOGIA.....	28
3.1 Cultivo Celular.....	28
3.2 Indução da senescência celular com D-galactose in vitro.....	28
3.3 Viabilidade celular.....	28
3.4 Proliferação celular.....	29
3.5 Análise Morfológica.....	29
3.6 Avaliação da produção de moléculas de matriz extracelular.....	29
3.7 Avaliação da expressão de receptores celulares.....	30
3.8 Análise da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)..	30
4 RESULTADOS.....	31
4.1 Análise da viabilidade das células epiteliais tímicas após indução da senescência in vitro com a D-galactose.....	31
4.2 Análise quantitativa das células epiteliais tímicas após indução da senescência in vitro com a D-galactose.....	31
4.3 Avaliação da expressão de marcador funcional da atividade celular em células epiteliais tímicas após indução da senescência in vitro com a D-galactose.....	32
4.4 Análise morfológica das células epiteliais tímicas após indução da senescência in vitro com a D-galactose.....	33
4.5 Avaliação da expressão de laminina na matriz extracelular das células epiteliais tímicas após indução da senescência in vitro com a D-galactose.....	35

4.6 Avaliação da expressão de fibronectina na matriz extracelular das células epiteliais tímicas após indução da senescência in vitro com a D-galactose.....	35
4.7 Avaliação da expressão do receptor de matriz extracelular nas células epiteliais tímicas após indução da senescência in vitro com a D-galactose.....	36
4.8 Avaliação da expressão de citocinas nas células epiteliais tímicas após indução da senescência in vitro com a D-galactose.....	37
5 DISCUSSÃO.....	39
6 CONCLUSÃO.....	44
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

INTRODUÇÃO

O timo, um órgão linfóide primário importante para o desenvolvimento do sistema imunológico, sofre redução da sua capacidade estrutural e funcional a medida que o organismo envelhece. Esta involução tímica pode resultar na diminuição da produção de células T e, conseqüentemente, na disfunção imunológica, o que contribui para a diminuição da resposta imunológica em organismos envelhecidos (Reis *et al.*, 2023).

Estudos anteriores mostraram que as alterações no desenvolvimento de linfócitos T durante a involução tímica podem ser resultado de mudanças em células do estroma do tímico, especialmente nas células epiteliais tímicas (TEC) (Reis *et al.*, 2015; Baran-Gale *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2021). Neste sentido, foi observado um acúmulo de TEC senescentes em timos de humanos adultos, acompanhado pela presença de danos no DNA, estresse oxidativo e aumento de mediadores pró-inflamatórios (Budamagunta *et al.*, 2021).

A senescência celular é um mecanismo biológico essencial para a manutenção da integridade genômica das células, sendo causada por diversos fatores de estresse, como radiação ionizante, estresse oxidativo, encurtamento dos telômeros, disfunção mitocondrial e estímulos inflamatórios. Esse processo resulta na interrupção irreversível do ciclo celular, evitando a proliferação de células danificadas e contribuindo para a prevenção de patologias. No entanto, com o avanço da idade, o acúmulo de células senescentes no organismo pode gerar inflamação crônica, associada ao aumento do risco de doenças relacionadas ao envelhecimento (Burton e Krizhanovsky, 2014).

Além disso, as células senescentes secretam citocinas pró-inflamatórias que não apenas mantêm a senescência, mas também alteram o microambiente celular ao afetar células vizinhas (Gorgoulis *et al.*, 2019).

Vários fatores, intrínsecos e extrínsecos, estão envolvidos na indução da senescência celular, entre eles pode-se apontar o açúcar redutor D-galactose. Este composto tem sido amplamente utilizado como modelo experimental para induzir a senescência precoce, uma vez que o acúmulo excessivo dessa substância resulta em estresse oxidativo e disfunção mitocondrial (Cai *et al.*, 2022).

Dessa forma, o estudo dos impactos da senescência celular induzida pela D-galactose nas TEC oferece uma perspectiva importante para entender os mecanismos de senescência e suas conseqüências na função imunológica e

espera-se contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas voltadas para a modulação da resposta imunológica em condições de envelhecimento acelerado e em patologias relacionadas.

REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Timo

O timo é um órgão linfóide primário, localizado na região do mediastino, anteriormente ao coração, e que possui dois lóbulos. É constituído por uma porção periférica denominada córtex e uma porção central denominada medula, as quais contêm timócitos (linfócitos em desenvolvimento), linfócitos B, células epiteliais tímicas (TEC), células neurais, células mesenquimais, células endoteliais, macrófagos, fibroblastos e células dendríticas (Fausto *et al.*, 2004; Reis *et al.*, 2023). Esse órgão é responsável pela diferenciação, maturação, proliferação e seleção dos linfócitos T imunocompetentes, a partir de células progenitoras resultantes da medula óssea. Para isso, é necessária a interação entre os timócitos e as demais células do estroma tímico.

Inicialmente, os timócitos imaturos não expressam o complexo do receptor de células T (TCR) com o CD3 em baixa ou alta densidade, assim como as moléculas acessórias CD4 ou CD8, estando no estágio duplo-negativo (DN). Durante esse estágio, ocorre a recombinação dos genes para TCR, essencial para a especificidade ao reconhecimento de antígenos. Em camundongos, o subconjunto DN é subdividido em quatro estágios consecutivos (DN1, DN2, DN3 e DN4) e em humanos possui três estágios (DN1, DN2, DN3), diferenciando-os pela expressão de marcadores de superfície, pelo rearranjo dos genes do TCR e pela necessidade de citocinas. No último estágio DN, as células imaturas passam a expressar o TCR concomitante com as moléculas CD4 e CD8, passando para o estágio duplo-positivo (DP) (Condes *et al.*, 2022; Savino e Dardenne, 2010).

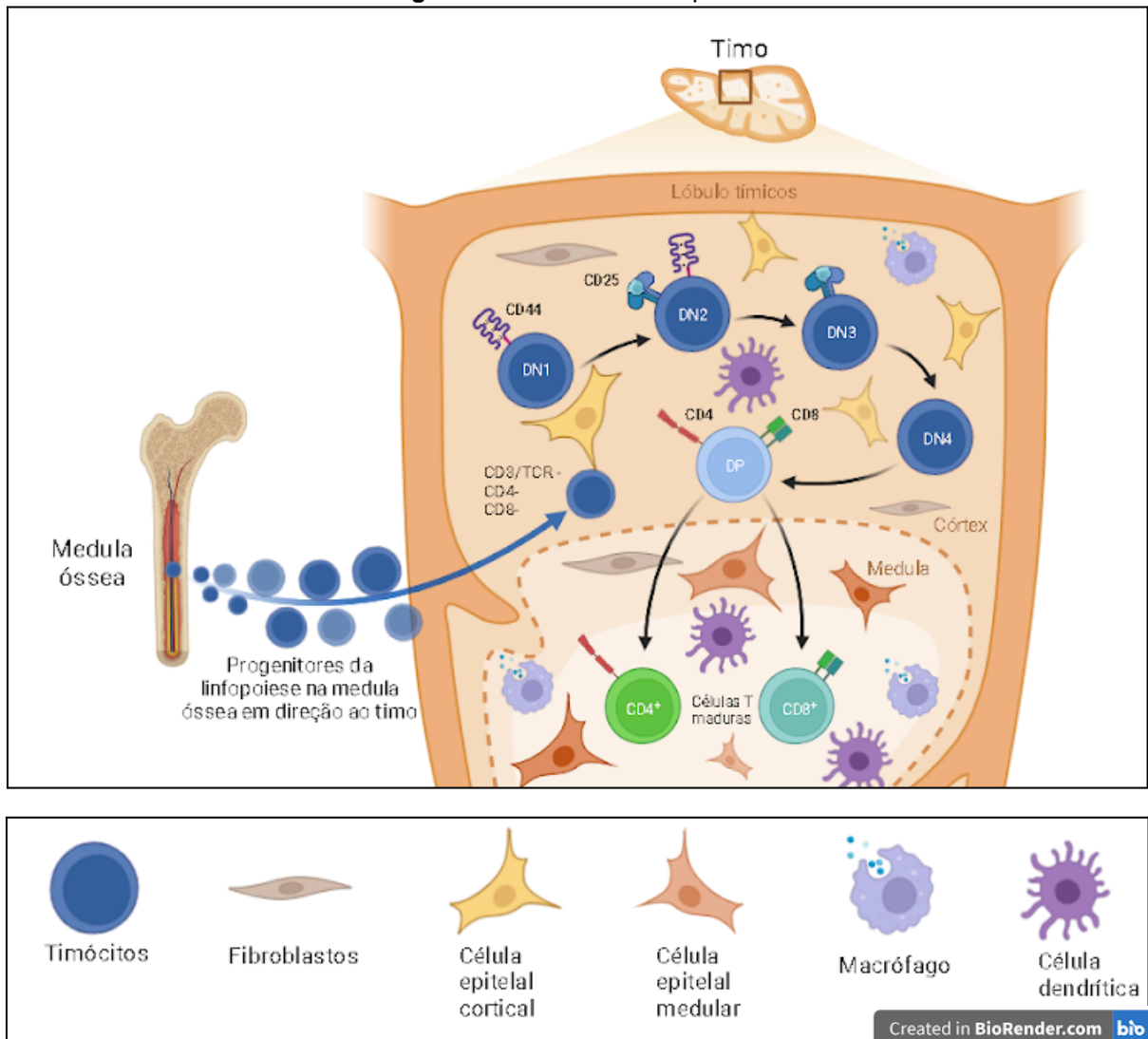
Nesse ponto, iniciam-se os processos de seleção positiva e negativa, os quais dependem do contato com elementos de seleção, como as moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC), expressas por células do microambiente tímico, e o complexo TCR presente nos timócitos. Isso assegura que os timócitos sejam capazes de reconhecer moléculas de MHC próprias e serem tolerantes aos tecidos próprios (Lima *et al.*, 2007; Savino e Dardenne, 2010).

A seleção positiva é mediada pelas células epiteliais tímicas do córtex, onde os timócitos duplo-positivos que se ligam com alta afinidade aos antígenos próprios tornam-se autorreativos, sofrem apoptose e são eliminados. Aqueles que se ligam fracamente aos antígenos próprios se diferenciam em linfócitos T CD4⁺ ou CD8⁺

(Martinez-Ruiz *et al.*, 2021; Mesquita Júnior *et al.*, 2010; Fujimori e Ohigashi, 2024). Aqueles que interagem com o complexo MHC-peptídeo de classe I diminuem a expressão de CD4, mantendo somente a expressão de CD8. Enquanto a ligação ao complexo MHC-peptídeo de classe II diminui a expressão de CD8 e mantém a do CD4 na membrana. Assim, a seleção positiva origina as células do último estágio de diferenciação dos linfócitos, chamadas de timócitos simples-positivos (SP) para CD4 e para CD8, que migram para a medula tímica, onde ocorre a seleção negativa a partir da interação com TEC e células dendríticas (Savino e Dardenne, 2010).

A seleção negativa é essencial para eliminar timócitos que reconhecem de forma exagerada ou equivocada os antígenos próprios, prevenindo o desenvolvimento de doenças autoimunes. Após as seleções, os timócitos se tornam linfócitos T maduros e funcionalmente competentes, diferenciando-se em dois subtipos principais de células unicamente positivas: linfócitos $\text{TCR}^{\text{alto}} \text{CD4}^+ \text{CD8}^-$, também chamados de linfócitos T auxiliares, que coordenam respostas imunológicas, e linfócitos $\text{TCR}^{\text{alto}} \text{CD4}^- \text{CD8}^+$, ou linfócitos T citotóxicos, responsáveis por eliminar células infectadas ou tumorais (Figura 1). Esses linfócitos T maduros deixam o timo e entram na circulação sanguínea, onde exercem suas funções no sistema imunológico adaptativo (Savino e Dardenne, 2010).

Esses eventos dependem de interações no microambiente tímico, destacando a importância das células epiteliais tímicas. Alterações na estrutura ou função dessas células podem impactar significativamente a eficácia da resposta imunológica (Lima *et al.*, 2007). Com o avanço da idade, além do impacto na funcionalidade das células epiteliais tímicas, ocorre a involução tímica, um processo caracterizado pela substituição progressiva do tecido tímico por tecido adiposo. Essas mudanças culminam na redução da variabilidade dos receptores de linfócitos T e na diminuição da liberação de linfócitos T naïve, comprometendo a capacidade do sistema imunológico em responder a novos antígenos (Alves *et al.*, 2019).

Figura 1. Processo de linfopoiese

Processo de desenvolvimento intratímico dos progenitores hematopoiéticos de células T e microambiente tímico de forma simplificada (Fonte: Adaptado de Savino e Dardenne 2010 e Condes et al., 2022).

1.1.2 Células epiteliais tímicas

As TECs são de extrema importância para o processo de maturação dos linfócitos T, pois contribuem para a criação e manutenção do microambiente tímico. Além disso, produzem moléculas da matriz extracelular (MEC) que dão suporte físico ao órgão (Ramarli *et al.*, 1998; Venables *et al.*, 2019). Curiosamente, as TEC não apresentam uma estrutura epitelial convencional, sendo classificadas como epiteliais principalmente por suas características bioquímicas, como a presença de desmossomos e filamentos de queratina (Venables *et al.*, 2019; Aw *et al.*, 2008).

No timo, as TEC são subdivididas em dois tipos funcionalmente distintos. As células epiteliais tímicas corticais (cTEC), que são compactadas com fibras longas

(processos semelhantes aos dendríticos), e ficam localizadas nas bordas externas do órgão. E ao centro do timo estão as células epiteliais tímicas medulares (mTEC), que são de natureza escamosa e mais frouxamente organizadas (Aw *et al.*, 2008).

As cTEC possuem fenótipo definido pela expressão das moléculas de superfície Ly51+ e Aglutinina 1 de *Ulex Europaeus* (UEA-1 -) (Alves *et al.*, 2014). Essas células são responsáveis por mediar os processos iniciais de diferenciação dos timócitos, atraindo células precursoras para o córtex tímico através da produção de quimiocinas como CXCL12 e CCL25 (Martinez-Ruiz *et al.*, 2021). Elas podem ser subdivididas em dois grupos, um que expressa apenas queratina 8 (K8), e outro que expressa queratina 8 e queratina 5 (K5) (Klug *et al.*, 1998). As cTECs também garantem a ligação adequada entre o MHC e os fragmentos de antígenos próprios, durante o processo de seleção positiva.

Já as mTEC possuem o fenótipo Ly51- UEA1+, expressam moléculas do MHC e diferentes citoqueratinas (Alves *et al.*, 2014). Em estudos recentes com camundongos, foram identificados 4 subtipos de mTECs:

- 1) mTEC I: são responsáveis por atrair os timócitos selecionados positivamente para a medula, através de quimiocinas como CCL19 e CCL21, onde ocorre a seleção negativa;
- 2) mTEC II: expressam MHC II em altas quantidades, assim como os antígenos específicos de tecidos (TRA), componentes que são essenciais para a tolerância central, ajudando a eliminar linfócitos T que poderiam atacar o próprio organismo. Os fatores de transcrição regulador autoimune (AIRE) e o fator de dedo de zinco da família Fez 2 (Fezf2) são fundamentais nesse processo, pois regulam a expressão de genes que garantem a autotolerância no sistema imunológico;
- 3) mTEC III: são células que expressam a proteína AIRE (pós-AIRE), caracterizadas pela expressão de citoqueratinas 10, e pela proteína involucrina (IVL);
- 4) mTEC IV: conhecidas como células de tufo tímico, que expressam os genes para o fator de transcrição específico de células de tufo (*Pou2f3*), para a cinesina associada a microtúbulos (*Dclk1*) e para o canal de cátions de potencial transitório subfamília M membro 5 (*Trpm5*). Esses genes estão associados, respectivamente, à diferenciação celular, à sinalização e manutenção do citoesqueleto e à contribuição para a

sinalização intracelular.

Um grupo recentemente descoberto foi o das TEC miméticas, que produzem antígenos específicos de órgãos periféricos, ajudando a regular a resposta imunológica. Elas favorecem o desenvolvimento de linfócitos T reguladores, promovendo a tolerância imunológica e prevenindo reações autoimunes ao ensinar o sistema imunológico a reconhecer os próprios tecidos do corpo (Martinez-Ruiz *et al.*, 2021; Michelson *et al.*, 2022).

Além de participar nos processos de seleção positiva e negativa, as TEC são importantes fontes de fatores de crescimento, hormônios, neurotransmissores, citocinas e moléculas da MEC que exercem papel fundamental na manutenção dos timócitos em desenvolvimento e no processo de migração e consequente maturação dessas células (Ramarli *et al.*, 1998; Savino *et al.*, 2015; Reis *et al.*, 2023; Francelin *et al.*, 2021).

1.1.3 Matriz extracelular e seus receptores no timo

A matriz extracelular (MEC) do timo é uma rede complexa composta por colágeno, fibronectina, laminina e glicosaminoglicanos, que sustenta e regula o desenvolvimento dos timócitos. Componentes como o colágeno I e IV e a fibronectina formam um suporte essencial para a adesão e migração dos timócitos. As interações entre timócitos e a MEC são mediadas por integrinas como $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4), $\alpha_5\beta_1$ (VLA-5) e $\alpha_6\beta_1$ (VLA-6), que promovem a migração e a organização espacial dos timócitos dentro do timo. Ademais, as TEC expressam adesinas importantes para realizar a ligação com os timócitos e, consequentemente, sua maturação em linfócitos T competentes (Pérez *et al.*, 2024).

Dentre as moléculas da MEC no timo, pode-se destacar a laminina. Produzida principalmente pelas células estromais tímicas, essa molécula é crucial para criar gradientes que orientam o desenvolvimento dos timócitos através de interações específicas com integrinas (Pérez *et al.*, 2024). A laminina é uma glicoproteína adesiva presente nas membranas basais que, além de contribuir para a estrutura, estabilidade e características físicas das membranas, possui isoformas que estimulam uma gama de respostas biológicas em vários receptores celulares, possibilitando a migração, a proliferação e a diferenciação celular (Ziobar *et al.*, 1996). No timo, já foram identificadas 18 isoformas de laminina, classificadas de acordo com as cadeias α , β e

y correspondentes e que estão distribuídas heterogeneamente dentro dos lóbulos tímicos (Savino *et al.*, 2015).

Nos timócitos, produz-se a isoforma da laminina-2, denominada merosina, que atua como ligante para a integrina VLA-6. Estudos em camundongos adultos revelaram que a laminina-2 está presente no timo. Foi observado que a população imatura de timócitos, identificada pelo marcador de superfície celular J11d+, adere à laminina-2 (Magner *et al.*, 2000). Um estudo conduzido por Savino e colaboradores em 2003 observou um padrão anormal de desenvolvimento de timócitos em camundongos mutantes do tipo *dy/dy*, que apresentam deficiência de laminina-2. Este trabalho identificou que os camundongos exibiram sintomas de atrofia do timo com redução proporcional no número de timócitos DN e um aumento na apoptose dessas células. Também foi mencionado que a laminina-5, presente nas TECs medulares do timo humano, desempenha um papel na transmissão de sinais que afetam o comportamento dos timócitos. Experimentos conduzidos em camundongos demonstraram que os anticorpos anti-laminina-5 não apenas inibiram a proliferação dos timócitos, mas também sua diferenciação para o fenótipo DN e DP. Esses resultados indicam um papel importante das interações mediadas pela laminina para a progressão dos timócitos, impactando significativamente o desenvolvimento e a maturação dos linfócitos T no timo (Savino *et al.*, 2003).

Juntamente com a laminina, a fibronectina é uma componente vital para as interações entre os timócitos e a matriz extracelular. No timo, são produzidas duas formas dessa glicoproteína, uma delas possui um domínio de ligação específico contendo arginina, glicina e ácido aspártico (domínio RGD), que favorece sua ligação à integrina receptora VLA-5. A outra forma da fibronectina presente no timo é resultante do *splicing* do RNA mensageiro e apresenta um domínio de ligação contendo arginina, glutamato, ácido aspártico e valina (domínio REDV), que se liga à integrina VLA-4. Enquanto a primeira forma está amplamente distribuída pelo parênquima tímico, a segunda é predominantemente na medula do timo (Savino *et al.*, 2003). A migração de timócitos é influenciada pela interação com a fibronectina, onde as integrinas VLA-4 e VLA-5 desempenham papéis críticos, permitindo a adesão e migração dos timócitos, com evidências de uma distribuição diferencial dos sítios de ligação à fibronectina entre o córtex e a medula do timo (Crisa *et al.*, 1996; Savino *et al.*, 2003).

1.1.4 Citocinas

No microambiente tímico, a produção de citocinas constitutivas pelas TECs desempenha um papel crucial na regulação imunológica (Čolić *et al.*, 1991). Estudos que utilizam técnicas de detecção de RNA e bioensaios com culturas primárias de células epiteliais tímicas humanas demonstraram a produção de diversas citocinas como as interleucinas (IL)-1, IL-3, IL-6, o Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (GM-CSF) e o Fator Inibidor de Leucemia (LIF) (Yarilin e Belyakov, 2004).

O fator de necrose tumoral- α (TNF- α), uma citocina pró-inflamatória, desempenha um papel essencial no microambiente tímico. Produzido principalmente pelas TECs e mastócitos, nas zonas medulares e córtico-medulares, ele é secretado de forma constitutiva pelas TECs, mesmo na ausência de estímulos externos, o que reforça sua relevância intrínseca na regulação do timo. Além disso, o contato entre as TECs e os timócitos modula a produção de TNF- α , que promove a sobrevivência e a diferenciação de linfócitos T através da ativação de vias de sinalização, influenciando a expressão de moléculas de superfície essenciais para uma resposta imune (Yarilin e Belyakov, 2004). Cohen-Kaminsky (1991) declarou que, quando as TECs são expostas exclusivamente ao TNF- α por 72 horas, ocorre uma redução na atividade biológica da IL-6; entretanto, ao adicionar estímulos, como o lipopolissacarídeo (LPS) ou IL-1- β , os níveis de IL-6 são elevados. Assim, o TNF- α se destaca como um componente central na homeostase tímica, mediando processos inflamatórios e interações celulares que sustentam as respostas imunes reguladas por este órgão.

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina multifuncional e pleiotrópica, fundamental para a regulação das respostas inflamatórias e imunológicas. Produzida não apenas por TECs, mas também por monócitos, linfócitos T e B, fibroblastos, astrócitos, células endoteliais, epidérmicas e renais. A IL-6 desempenha várias atividades biológicas *in vitro*, incluindo a promoção da maturação de células B em produtoras de imunoglobulinas e colaboração com a IL-3 na proliferação de progenitores hematopoiéticos multipotentes. Além disso, também intensifica respostas de linfócitos T, sendo relevante para a indução da proliferação celular e facilitando a diferenciação de linfócitos T citotóxicos. Sua expressão pode ser aumentada por citocinas inflamatórias como IL-1- β , TNF- α , IFN- γ , TGF- β e agentes bacterianos encontrados em altos níveis em condições de autoimunidade, infecções e lesões teciduais

(Cohen-Kaminsky *et al.*, 1991). A IL-6 influencia os timócitos $CD4^+CD8^-$ e $CD4^-CD8^+$, atuando como importante mediador na promoção da proliferação em um ambiente onde a IL-2 está presente, mas não são capazes de induzir a proliferação em timócitos isolados (Čolić *et al.*, 1991).

Esses achados indicam que as interações entre TECs e citocinas podem ser essenciais para a ativação e proliferação de timócitos, processo vital no timo. Essas descobertas ressaltam a complexidade das interações entre as TECs e as citocinas, que podem ser fundamentais para a compreensão de processos patológicos.

1.2 Involução tímica associada a imunosenescência

O processo de envelhecimento resulta em diversas modificações celulares, principalmente nos componentes do sistema imunológico, o que propicia uma resposta ineficiente a agentes patogênicos. Essa alteração funcional, tanto no sistema imune adaptativo quanto no inato, decorrente do aumento etário, é denominada imunossenescência (Fuentes *et al.*, 2017). A imunossenescência acarreta aumento da vulnerabilidade a infecções e a tumores, redução da eficácia da vacinação e aumento de distúrbios autoimunes. Estas modificações são associadas à disfunção dos linfócitos T como consequência da involução do timo com a idade (Alves *et al.*, 2019).

A involução tímica é um processo contínuo, que se inicia em humanos durante a infância e acelera após a puberdade (Barbouti *et al.*, 2020). A taxa de regressão do timo é de cerca de 3% ao ano até a meia-idade (35-45 anos), diminuindo para 1% ao ano após essa fase (Pérez; Vandenabeele; Tougaard, 2024). Em camundongos, a atrofia tímica começa a partir da 7ª semana de idade. Além disso, pesquisas com camundongos que empregaram microdissecção do tecido do timo inteiro mostraram que o compartimento estromal, especialmente no córtex tímico, sofre mudanças transcricionais significativas no primeiro ano de vida. Em contrapartida, são observadas relativamente poucas alterações em grandes subconjuntos de células T tímicas, o que reforça a hipótese de que as células estromais são as mais impactadas durante o processo de involução (Cepeda e Griffith, 2018).

De acordo com os autores Aw D. *et al.* (2010), a involução tímica poderia ser decorrente dos acúmulos de danos celulares e moleculares, consequentemente afetando as suas funcionalidades. As alterações celulares envolvem diminuição da celularidade, substituição de tecido linfóide por adiposo e defeitos nas TECs (Figura

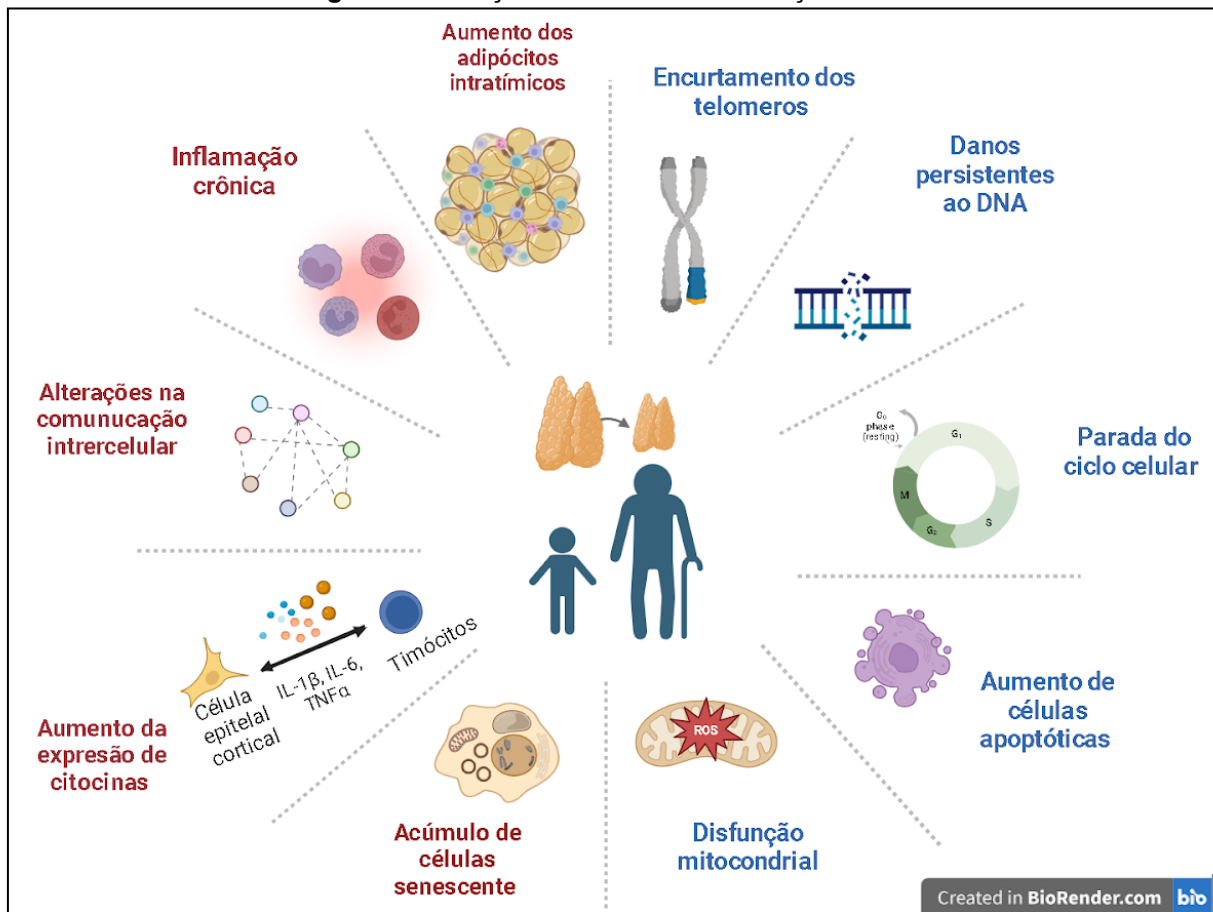
2). Um estudo mostrou que o transplante de células da medula óssea de camundongos jovens para camundongos idosos não restaura a produção dos linfócitos T, enquanto células hematopoiéticas de camundongos idosos geram linfócitos T funcionais quando transplantadas para um timo fetal, sugerindo que a involução do timo é impulsionada principalmente pela degeneração das TECs, e não pelo envelhecimento das células hematopoiéticas (Fujimori e Ohigashi, 2024).

Mesmo com a redução da produção de linfócitos T, timócitos imaturos ainda podem ser detectados em idosos (Pérez; Vandenabeele; Tougaard, 2024). Em outro estudo, Venables *et al.* (2019) relataram que os timócitos permanecem quase inalterados no timo atrofiado, e as mudanças relacionadas à idade afetam principalmente as células do estroma, especialmente as cTEC. De fato, trabalhos apontaram que a atrofia do timo inicia-se na área cortical, sendo associada à resposta dos timócitos à influência dos corticoides, substâncias geralmente manifestadas na fase adulta do organismo. Nesse fenômeno, a região cortical pode dissipar-se completamente, enquanto os remanescentes medulares permanecem, possibilitando que continue ocorrendo a diferenciação dos linfócitos T no timo ao longo da vida do indivíduo adulto, mesmo que em menor proporção. Dessa forma, os linfócitos T amadurecem, desenvolvendo suas propriedades efetoras na região medular e, posteriormente, são liberados para o *pool* linfóide periférico (Lima *et al.*, 2007). Contudo, já foi vista uma diminuição na capacidade de proliferação *in vitro* dos linfócitos T, em resposta a diferentes mitógenos, de indivíduos idosos em comparação com indivíduos jovens (Alves *et al.*, 2019).

Estudos recentes indicaram que a inflamação é um fator importante na involução do timo, sendo ativada por inflamassomas, que respondem ao acúmulo de sinais lipotóxicos. Isto é demonstrado em estudos com camundongos deficientes para os componentes do receptor de proteína 3 contendo domínio de pirina da família NLR (NLRP3) e a proteína associada à apoptose contendo um domínio CARD (ASC) dos inflamassomas, os quais apresentaram resistência à involução do timo e à senescência imunológica (Fujimori e Ohigashi, 2024). Além disso, observou-se que o acúmulo de células senescentes perpetua um ambiente inflamatório, causando a remodelação do tecido e afetando tanto o potencial regenerativo como a função adequada de tecidos e órgãos, resultando em um esgotamento das células progenitoras e tronco, o que promove o envelhecimento e contribui para o surgimento de patologias relacionadas à idade (Barbouti *et al.*, 2020).

A atrofia tímica relacionada à idade impacta de forma significativa as células epiteliais tímicas. Cepeda e Griffith (2018) relataram que, em camundongos a partir dos 3 meses de idade, as mTECs com baixa expressão de MHC II (mTEC^{low}) apresentaram redução na expressão de reguladores do ciclo celular, como a proteína 20 do ciclo de divisão celular (CDC20) e a proteína 6 do ciclo de divisão celular (CDC6), indicando uma diminuição na proliferação celular. Também foi relatado que tanto as cTECs quanto as mTEC^{low} demonstraram alterações na transcrição de genes regulados pelo fator de transcrição E2F3, refletindo a fragilidade do timo em decorrência do envelhecimento. Essas modificações nas células epiteliais são fundamentais para compreender o declínio funcional do timo ao longo dos anos.

Além disso, foram retratadas alterações morfológicas nas TECs durante a involução tímica. A morfologia dos cTECs muda significativamente, apresentando contração em suas projeções, enquanto as mTECs permanecem inalteradas (Cepeda e Griffith, 2018). Essas modificações estruturais, influenciadas pela diminuição da sinalização da via do alvo mamífero da rapamicina (mTOR) com o envelhecimento, podem contribuir para a redução do tamanho do timo, juntamente com um aumento da morte celular e uma diminuição da proliferação nas TECs envelhecidas (Fujimori e Ohigashi, 2024). Outro fenômeno que pode contribuir para a modificação das TECs é o envelhecimento ou senescência celular. Neste sentido, já foi visto acúmulo de TEC senescentes em timos adultos (Budamagunta *et al.*, 2021).

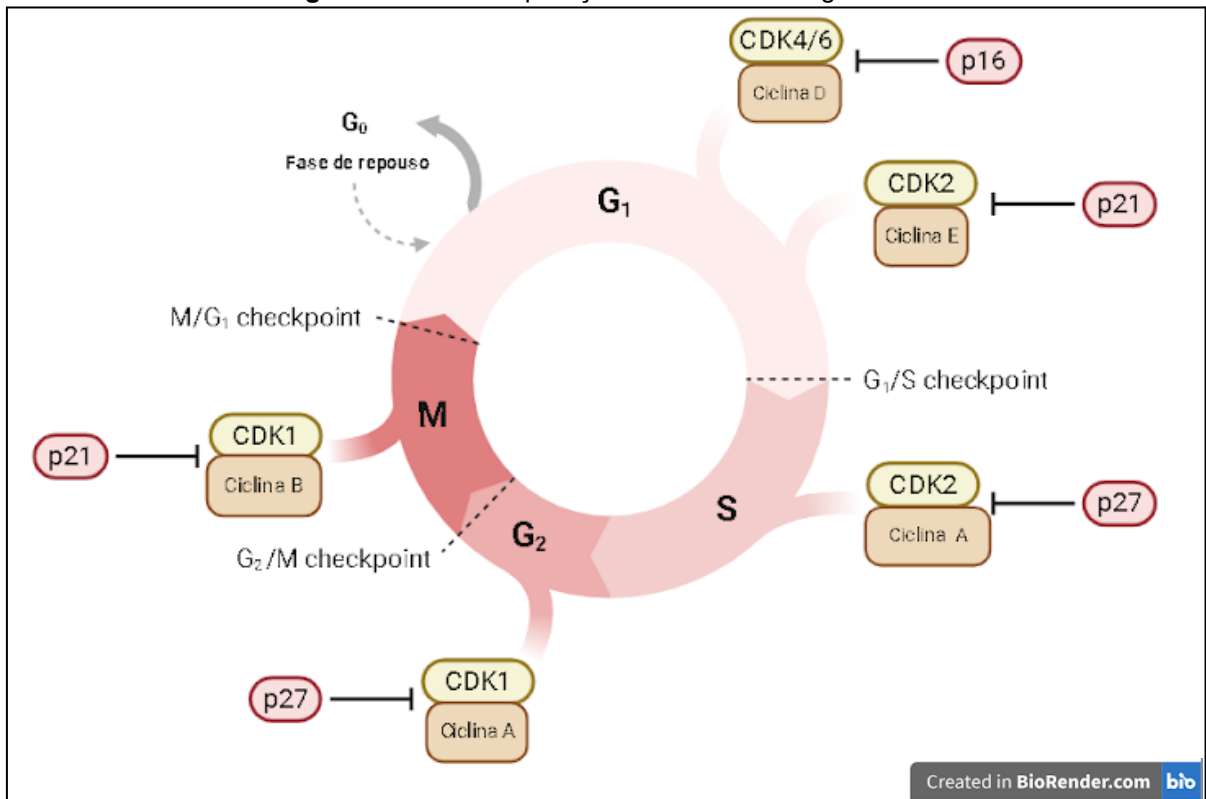
Figura 2. Alterações observadas na involução tímica

1.3 Senescência celular

A senescência celular é um estado induzido por agentes estressores endógenos e exógenos que resulta na interrupção prolongada e irreversível do ciclo celular (Gorgoulis *et al.*, 2019). Esse fenômeno é considerado heterogêneo e complexo, mediado por uma série de estímulos que envolvem a ativação de várias vias de sinalização celular (Barbouti *et al.*, 2019; Muñoz-Espín e Serrano, 2014; Salama *et al.*, 2014). A parada do ciclo celular é um mecanismo crucial para garantir a integridade genômica das células. Esse processo é ativado em resposta a danos persistentes ao DNA. Diversos agentes podem induzir esses danos e interferir na proliferação das células. Alguns desses agentes são: a radiação ionizante, que rompe as cadeias de DNA; o estresse oxidativo resultante da produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS); o encurtamento dos telômeros em células que se

replicam repetidamente; os estímulos inflamatórios do microambiente, como citocinas pró-inflamatórias; e disfunção mitocondrial, que pode aumentar o estresse intracelular. Esses sinais ativam a proteína p53, um importante supressor de tumor, localizada no braço curto do cromossomo 17, codificado pelo gene *TP53* em humanos e *Trp53* em camundongos. A proteína p53 regula a expressão do inibidor de quinases dependentes de ciclinas (CDK) p21 (CDKN1A), que bloqueia os complexos ciclina-CDK, interrompendo a progressão do ciclo celular nas transições entre as fases G1 e S, ou G2 e M. Esse bloqueio inicial permite o reparo do DNA antes que a célula continue o ciclo celular (Figura 3) (Muñoz-Espín e Serrano, 2014; Burton e Krizhanovsky, 2014; Klumb e Cavalcanti Júnior, 2002).

O dano celular persistente ativa uma via independente da p53, nela a proteína p16 (CDKN2A) inibe diretamente as CDKs associadas à ciclina D, prevenindo a fosforilação da proteína do retinoblastoma (Rb). Com isso, a proteína Rb permanece ativa e se liga aos fatores de transcrição E2F, bloqueando a expressão de genes essenciais para a progressão do ciclo celular. Esse mecanismo impede que células com danos avancem no ciclo, contribuindo para a manutenção da integridade genômica e a prevenção de patologias (Figura 3) (Burton e Krizhanovsky, 2014; Gorgoulis *et al.*, 2019). Assim, enquanto as proteínas p53 e p21 são responsáveis pela iniciação da senescência, a p16 desempenha um papel essencial em manter essa parada irreversível do ciclo celular, estabelecendo um loop de feedback positivo dependente de ROS que reforça o estado senescente. (Ben-Porath e Weinberg, 2004; Rayess *et al.*, 2012).

Figura 3. Ciclo de replicação celular e seus reguladores

Demonstração da atividade das proteínas p21 e p16, bloqueando os complexos ciclina-CDK, interrompendo a progressão do ciclo celular nas transições entre as fases G₁ e S, ou G₂ e M. Fonte: adaptado de Muñoz-Espín e Serrano, 2014; Burton e Krizhanovsky, 2014; Klumb e Cavalcanti Júnior, 2002.

Além dos mecanismos que envolvem a ativação das vias p53-p21 e p16-Rb, a disfunção mitocondrial também desempenha um papel crucial na sensibilidade celular. As células senescentes apresentam mitocôndrias disfuncionais, com menor produção de adenosina trifosfato (ATP), maior produção de ROS e alterações na biogênese mitocondrial. O aumento de ROS nas células senescentes contribui para danos celulares e para a ativação de vias inflamatórias, como a via do estimulador de genes de interferon (STING), que desencadeia a produção de citocinas inflamatórias, como IL-6 e IL-8, que são componentes do Fenótipo Secretor Associado à Senescência (FSAS) (Gorgoulis *et al.*, 2019). Salama *et al.* (2014) relataram que as citocinas IL-6 e IL-8 podem intensificar a senescência em células saudáveis vizinhas, mas não induzem os fenótipos senescentes. Por outro lado, a IL-1 β tem a capacidade de induzir senescência em células normais, possibilitando a transmissão da senescência para células através da sinalização parácrina do FSAS.

O FSAS desempenha um papel fundamental na conexão entre senescência, inflamação e envelhecimento do corpo. Esses fatores estão envolvidos em processos

normais, como cicatrização de feridas e modulação da plasticidade tecidual. Porém, no envelhecimento, há um acúmulo de células senescentes que secretam FSAS, promovendo uma inflamação crônica de baixo grau caracterizada pelo aumento de citocinas circulantes e pelo recrutamento de células imunológicas em um fenômeno chamado de "inflammaging", que aumenta o risco de doenças relacionadas ao envelhecimento (Franceschi e Campisi, 2014).

Além da inflamação, o FSAS também induz a remodelação do microambiente tecidual, afetando a homeostase. Isso ocorre através da secreção de componentes da MEC e da modulação do destino de outras células no tecido, resultando em disfunções como a fibrose. O FSAS não só agrava a inflamação crônica sistêmica, mas também esgota os reservatórios de células-tronco e progenitoras, intensificando a degeneração tecidual e a progressão de doenças (Gorgoulis *et al.*, 2019; Birch e Gil, 2020).

1.4 D-galactose

Diversas teorias buscam explicar o envelhecimento, como a teoria do acúmulo de mutações e a glicação de macromoléculas. Entretanto, a teoria do estresse oxidativo é uma das mais aceitas, afirmando que a produção de ROS, como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), pode causar disfunção mitocondrial e danos celulares, resultando em senescência e envelhecimento.

Pesquisas indicam que os oxidantes desempenham um papel essencial nesse processo, e o uso de D-galactose (D-gal) (Figura 4) como modelo de envelhecimento acelerado tem sido amplamente estudado. Um adulto saudável é capaz de metabolizar e excretar 50 g de galactose em até 8 horas, entretanto, o acúmulo exacerbado afeta o metabolismo energético das mitocôndrias e induz a ativação de enzimas como xantina oxidase, lipoxigenase, ciclooxigenase, óxido nítrico sintase e peroxidase, aumentando a produção de ROS, que acarreta estresse oxidativo, danos mitocondriais, inflamação e apoptose. Esses processos induzidos pela D-galactose têm sido associados ao aumento de diversos marcadores de envelhecimento, tais como os produtos finais de glicação avançada (AGEs) e seus receptores (RAGEs), aldose redutase (AR), sorbitol desidrogenase (SDH), redução da atividade da telomerase, encurtamento dos telômeros, precursor da enzima de clivagem de proteína β -amiloide 1 (BACE-1), β -amiloide ($A\beta$), vias relacionadas ao envelhecimento (p16, p21, p53, entre outras) e

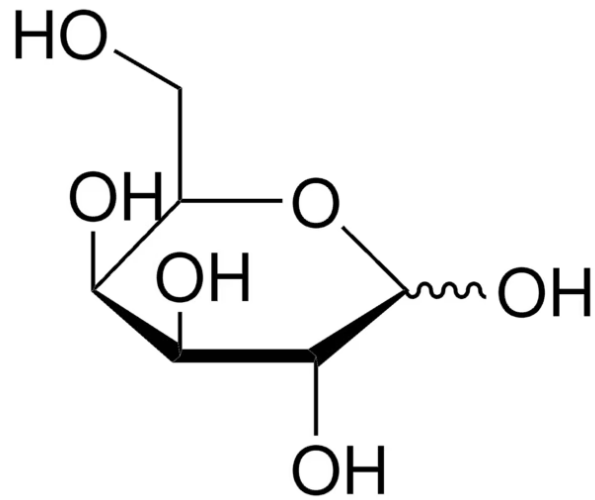
coloração positiva de β -galactosidase associada à senescência (SA- β -gal) (Cai *et al.*, 2022).

A administração sistêmica da D-galactose resulta em fenótipos de envelhecimento observados em vários tecidos e órgãos, incluindo cérebro, coração, pulmão, fígado, rim, sistema reprodutivo, sistema gastrointestinal, entre outros, sugerindo uma ampla influência deste composto sobre processos biológicos associados ao envelhecimento e ao estresse oxidativo. A presença de galactose resulta na redução da atividade da enzima endógena cistationina γ -liase (CSE), responsável pela produção de sulfeto de hidrogênio, e também afeta enzimas antioxidantes como a catalase (CAT), heme oxigenase-1 (HO-1), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) e óxido nítrico sintase (NOS) (Zhang X *et al.*, 2019).

O tratamento com D-galactose também demonstrou aumentar os níveis de marcadores oxidativos, tais como malondialdeído (MDA), hidroperóxidos lipídicos (L-OOH) e dienos conjugados (CD) no tecido cardíaco, enquanto diminui a atividade de enzimas antioxidantes, citadas anteriormente, nos tecidos pulmonares, hepáticos, renais e cerebrais. Assim, esse tratamento é considerado uma representação eficaz do processo natural de envelhecimento, pois intensifica o estresse oxidativo, promove um estado fibrótico e desencadeia inflamação crônica nos tecidos (Cai *et al.*, 2022 e Zhang X *et al.*, 2019).

No estudo conduzido por Guo e colaboradores (2020), camundongos tratados com D-gal apresentaram os menores índices tímicos, calculados pela razão entre a massa do órgão e a massa corporal do animal, em comparação aos grupos de controle, que exibem os maiores índices. Essa redução está diretamente associada à atrofia tecidual do timo, frequentemente observada em condições de estresse oxidativo. Estes resultados não apenas destacam o impacto negativo da D-gal sobre a estrutura e função do timo, mas também reforçam a validade desse modelo na investigação de processos relacionados ao envelhecimento, senescência celular e disfunção imunológica.

Figura 4. Molécula de D-galactose



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

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Investigar as alterações provocadas pela senescência celular induzida pela D-galactose em células epiteliais tíficas de camundongos *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos:

- 1) Avaliar a viabilidade das TECs após indução da senescência com a D-galactose.
- 2) Avaliar a proliferação das TECs após indução da senescência com a D-galactose.
- 3) Avaliar as alterações morfológicas nas TECs após indução da senescência com a D-galactose.
- 4) Avaliar a organização da matriz extracelular das TECs após indução da senescência com a D-galactose.
- 5) Avaliar a expressão de receptores celulares nas TECs após indução da senescência com a D-galactose.
- 6) Avaliar a expressão gênica das TECs após indução da senescência com a D-galactose.

3 METODOLOGIA

3.1 Cultivo Celular

Para a realização dos experimentos, foi utilizada a linhagem celular de TEC de camundongos 2BH4 (Amarante-Mendes *et al.*, 1995), gentilmente cedida pelo Laboratório de Pesquisas sobre o timo (FIOCRUZ, Rio de Janeiro). As células foram cultivadas com meio de cultura RPMI-1640 Gibco (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF) Gibco (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 1% de L-glutamina (Sigma-Aldrich, MO, EUA) e antibióticos Gibco (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) a 37°C, em atmosfera com 5% de CO₂. As passagens das células foram realizadas com solução de Tripsina-EDTA.

3.2 Indução da senescência celular com D-galactose *in vitro*

Primeiramente, as células foram submetidas à indução do envelhecimento celular *in vitro* com D-galactose (Sigma-Aldrich, peso molecular 180,16 g/mol) nas concentrações de 10, 20 e 40 mg/mL por 48 horas, para determinação da concentração a ser utilizada nos experimentos posteriores. Células mantidas nas mesmas condições foram consideradas controles. O veículo utilizado para a solubilização da D-galactose foi o meio de cultura RPMI a 2% SBF.

3.3 Viabilidade celular

Em placas de 96 poços, foram plaqueadas 7×10^3 das células 2BH4 por poço. Após 24 horas, as células foram induzidas com D-galactose conforme descrito no item 3.2. A viabilidade das TEC foi avaliada 48 horas após o tratamento utilizando o método colorimétrico de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) (23 µL a 0,5 mg/mL) em formazan. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro de microplacas utilizando filtro de 540 nm (Polaris₂ Celer Biotecnologia S.A). Os valores brutos de absorbância foram utilizados para determinação do percentual de viabilidade celular, em que o controle foi considerado 100%.

3.4 Proliferação celular

Utilizando placas de 48 poços, foi realizado o plaqueamento de 7×10^3 das células por poço. Após a indução da senescência, as células foram coletadas por tripsinização e coradas com azul de Tripán (Sigma-Aldrich, MO, USA) para distinguir as células vivas das células mortas, onde as células vivas foram contadas em câmara de Neubauer por meio de microscópio de luz invertido. A porcentagem de proliferação celular foi dada pelo valor obtido na contagem celular dividido pela média do grupo controle.

3.5 Análise Morfológica

Para o desenvolvimento deste ensaio, foram plaqueadas 3×10^4 de células por poço, em placa de 24 poços contendo laminulas redondas. Após indução da senescência, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% e coradas com cristal violeta (Dinâmica, Brasil) a 0,1% em água destilada, para avaliação morfológica ao microscópio de luz. Alternativamente, as células fixadas foram marcadas com faloidina conjugada ao isocianato de fluoresceína (FITC; Sigma-Aldrich – P5282) para avaliação do citoesqueleto de F-actina ao microscópio de fluorescência Nikon Eclipse 50i. Posteriormente, as imagens foram analisadas com o software ImageJ, as células foram quantificadas de acordo com diferentes morfologias, como poligonais, fusiformes e arredondadas.

3.6 Avaliação da produção de moléculas de matriz extracelular

Utilizando o ensaio de imunofluorescência indireta, foi avaliada a produção das moléculas da matriz extracelular, fibronectina e laminina. As culturas foram fixadas, hidratadas e incubadas com solução de PBS/BSA a 1% por 30 minutos para bloqueio de sítios inespecíficos. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpos primários específicos para fibronectina e para laminina (Sigma-Aldrich), seguindo-se incubação com o anticorpo secundário anti-coelho produzido em cabra conjugado ao FITC (FITC-Goat Anti Rabbit; Invitrogen). Após a lavagem com PBS, as lâminas foram montadas e observadas no microscópio de fluorescência Nikon Eclipse 50i. A análise da deposição de fibronectina e laminina foi baseada na avaliação qualitativa da intensidade de fluorescência observada na superfície das células.

3.7 Avaliação da expressão de receptores celulares

As células em suspensão foram marcadas com anticorpo específico conjugado a fluorocromo para a cadeia alfa da integrina VLA-5. As células devidamente marcadas foram analisadas no aparelho FACSCanto II equipado com o programa de computador Diva (BD bioscience), após a aquisição de 10.000 células. A análise da marcação e a confecção dos histogramas foram realizadas com o programa Flowing Software 2.5.1.

3.8 Análise da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Amostras de RNA total das células foram extraídas e submetidas à síntese do DNA complementar (cDNA). A reação de PCRq foi realizada com o kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Wisconsin, EUA) utilizando o equipamento QuantiStudio™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems), seguindo o protocolo especificado pelo fabricante. Os primers específicos para os genes *P16* (Forward (F): GGAGTCCGCTGCAGACAGA, reverse (R): GAATCGGGGTACGACCGAA, *Tnfa* (F: CCGATGGGTTGTACCTTGTC, R: AGATAGCAAATCGGCTGACG), *Il6* (F: AGCCAGAGTCCTTCAGAGAGA, R: GGAAATTGGGGTAGGAAGGA) e *Actb* (β -actina; F: CATTGCTGACAGGATGCAGAAGG, R: TGCTGGAAGGTGGACAGTGAGG), utilizado como gene constitutivo, foram escolhidos através de revisão de literatura e/ou desenhados com auxílio do programa de computador Primer3, disponível na página de internet do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Para análise da expressão relativa, foi utilizado o método de Ct comparativo.

3.9 Análises estatísticas

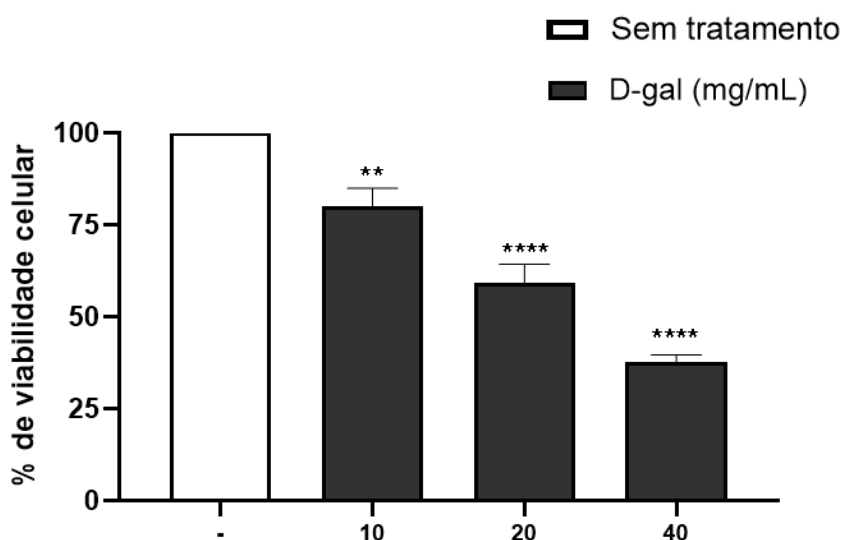
Para as análises estatísticas dos dados obtidos e confecção dos gráficos, foi utilizado o programa de computador GraphPad Prism versão 8.00 (GraphPad Prism Software, Inc.). Os resultados foram representados como média e erro-padrão (EPM) e avaliados estatisticamente através do teste t de Student ou teste ANOVA, com um nível de significância selecionado para $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Análise da viabilidade das células epiteliais tímicas após indução da senescência *in vitro* com a D-galactose

De acordo com o gráfico mostrado na figura 5, a porcentagem de células viáveis foi reduzida de forma significativa nos grupos tratados com D-gal nas concentrações de 10, 20 e 40 mg/mL em comparação com o grupo controle após tratamento *in vitro* com a D-gal por 48 horas.

Figura 5. Percentual de TECs viáveis após tratamento *in vitro* com a D-galactose



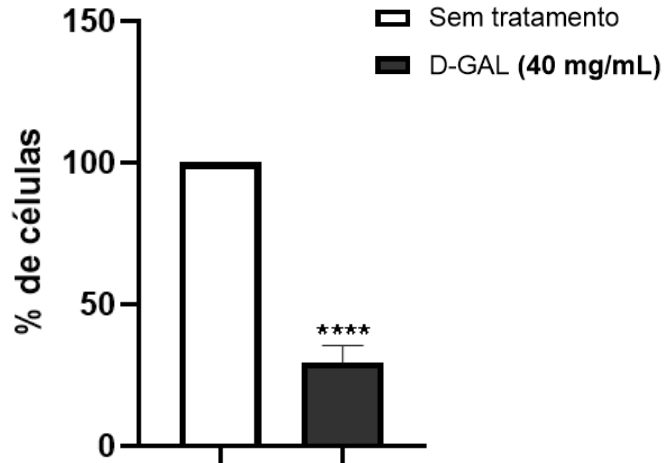
Fonte: elaborado pela autora (2024)

O gráfico mostra a média±EPM da porcentagem de células viáveis após tratamento com D-galactose nas concentrações de 10, 20 e 40 mg/mL durante 48 horas. Os dados obtidos foram avaliados estatisticamente através do teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Turkey. (*) $p < 0,05$ em relação ao controle.

4.2 Análise quantitativa das células epiteliais tímicas após indução da senescência *in vitro* com a D-galactose

Ao quantificar as células após tratamento *in vitro* com a D-gal por 48 horas, foi possível observar uma redução significativa no grupo tratado em comparação com o grupo controle.

Figura 6. Porcentagem de TECs após indução da senescência *in vitro* com a D-galactose



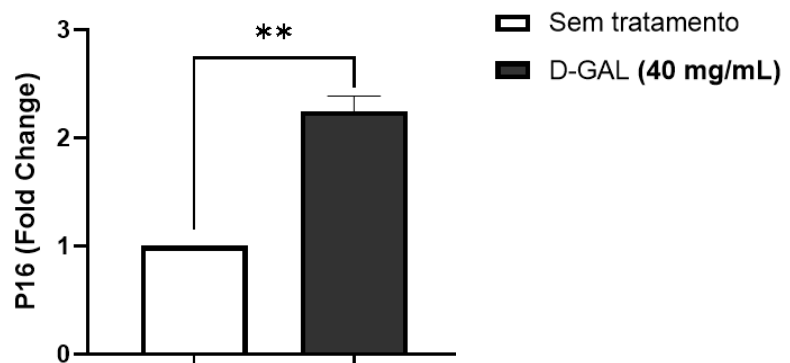
Fonte: elaborado pela autora (2024)

O gráfico mostra a média±EPM da porcentagem de células após o tratamento com a D-galactose na concentração de 40 mg/mL, durante 48 horas. Os dados obtidos foram avaliados estatisticamente através do teste t de Student, (*) $p < 0,05$ em relação ao controle não-tratado.

4.3 Avaliação da expressão de marcador funcional da atividade celular em células epiteliais tímicas após indução da senescência *in vitro* com a D-galactose

O gráfico ilustra a expressão relativa do gene *P16* por PCR em tempo real. Houve um aumento significativo na expressão gênica no grupo tratado, quando comparado com o grupo controle.

Figura 7. Avaliação da expressão do marcador *P16* nas células epiteliais tímicas



Fonte: elaborado pela autora (2024)

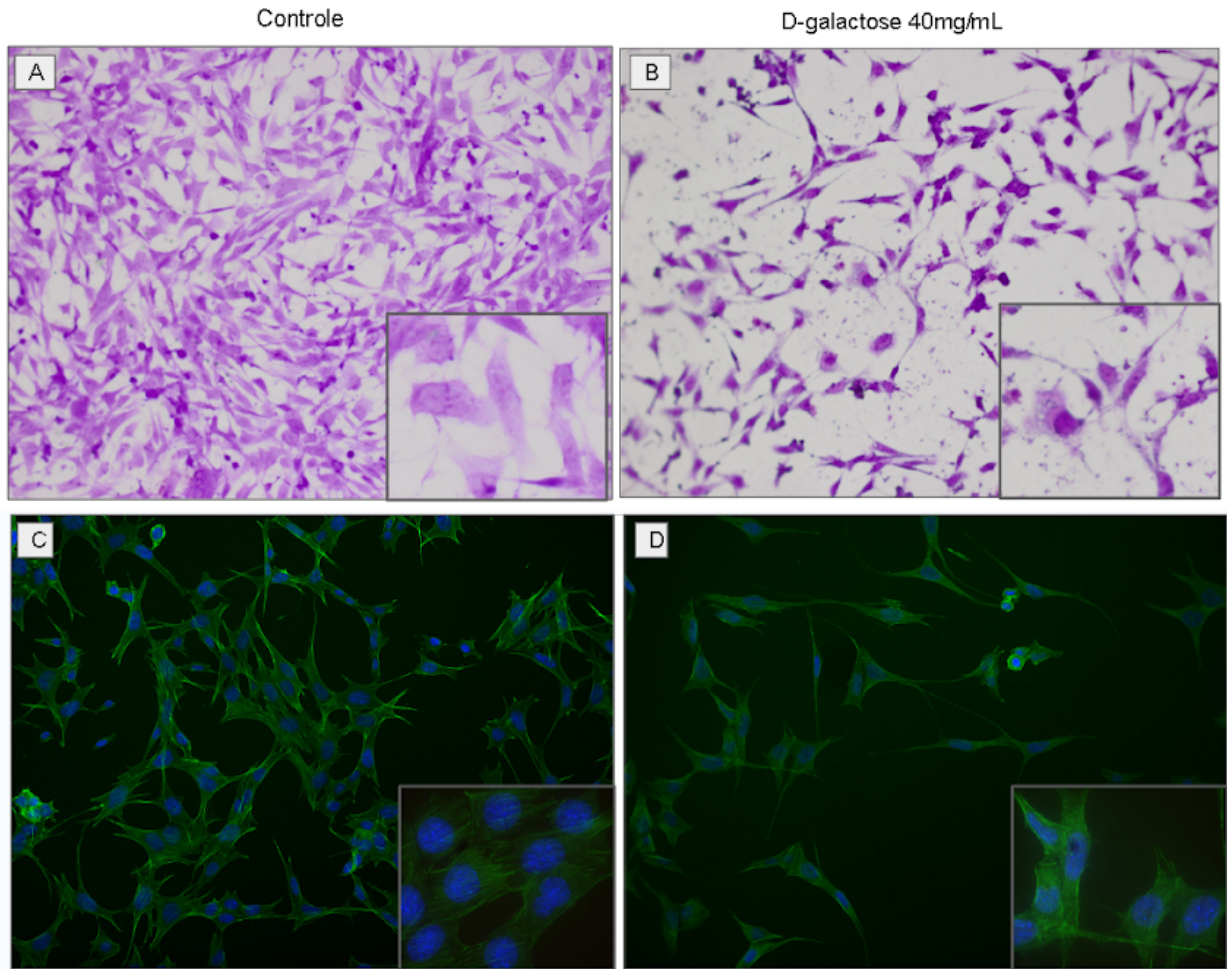
O gráfico apresenta a média±EPM da expressão relativa do gene *P16* através do Ct comparativo. A análise estatística foi feita com teste *t* em comparação entre o grupo controle não tratado e o grupo

tratado com a D-galactose (40 mg/mL por 48 horas). (*) $p < 0,05$ em relação ao controle não-tratado.

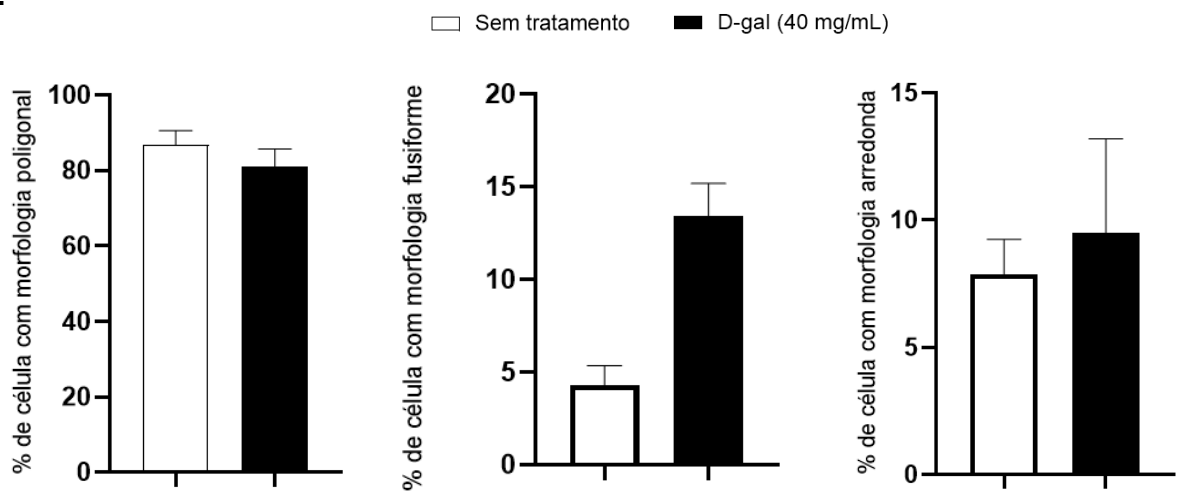
4.4 Análise morfológica das células epiteliais tímicas após indução da senescência in vitro com a D-galactose

Quanto à análise morfológica, as células do grupo controle apresentaram um citoplasma mais abundante e espraio sobre o substrato (Figuras 8.A e 8.C). Já as células tratadas com D-gal evidenciaram uma redução do citoplasma, além da redução do número de células quando comparadas ao grupo controle (Figuras 8.B e 8.D). Os gráficos na figura 8.E mostram a distribuição percentual das células em diferentes morfologias: poligonais, fusiformes e arredondadas. A análise revela a predominância de células poligonais no grupo não-tratado, entre as demais morfologias. No grupo tratado, observou-se um aumento não-significativo na porcentagem de células fusiformes e arredondadas, quando comparados com o grupo controle.

Figura 8. Avaliação da morfologia das células epiteliais tímicas



E



Fonte: elaborado pela autora (2024)

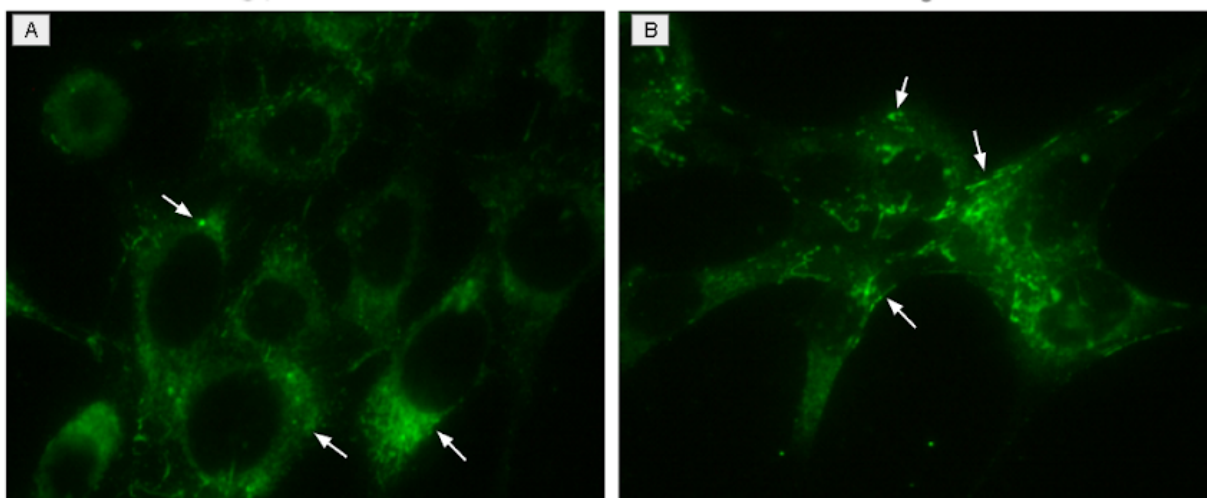
No painel, as figuras A e B mostram células coradas com cristal violeta. Nas figuras C e D, as células são mostradas com coloração verde fluorescente, evidenciando o citoesqueleto de actina marcado com a faloidina, enquanto o núcleo celular é destacado em azul pela coloração com DAPI (Sigma-Aldrich, MO, USA). Na figura E, os gráficos mostram a média $\pm$ EPM da porcentagem de células poligonais, fusiformes e arredondadas, após o tratamento com a D-galactose na concentração de 40 mg/mL,

durante 48 horas. Os dados obtidos foram avaliados estatisticamente através do teste t de Student, (*) $p < 0,05$ em relação ao controle não-tratado. Aumento: 200x.

4.5 Avaliação da expressão de laminina na matriz extracelular das células epiteliais tímicas após indução da senescência in vitro com a D-galactose

Na figura 9.A, as fotomicrografias mostram a deposição de laminina nas células do grupo controle não-tratado, as quais apresentaram uma expressão predominantemente perinuclear, com extensão gradual em direção às extremidades celulares, formando pequenas fibras nas junções entre as células. A figura 9.B, apresenta a deposição da laminina nas células tratadas com D-gal, onde se observa uma desorganização da molécula, caracterizada pelo aparecimento de estruturas fluorescentes em forma de curtas fibras e agregados pontuais.

Figura 9. Deposição da laminina nas células epiteliais tímicas após senescência induzida com D-galactose



Fonte: elaborado pela autora (2024)

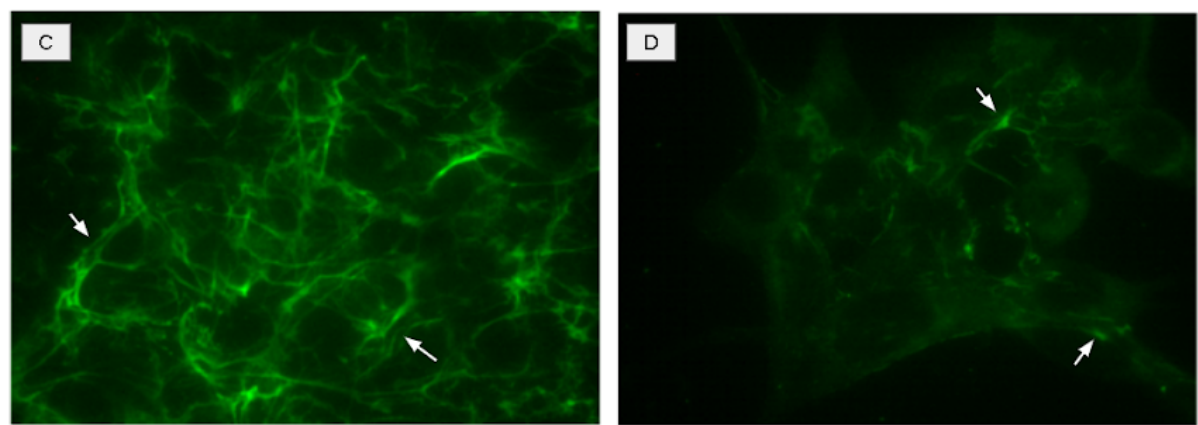
Na figura, as fotomicrografias A e B mostram células com coloração verde fluorescente, evidenciando a laminina. Em (A) são representadas as TECs não-tratadas, grupo controle. Em (B) são representadas as TECs após o tratamento com a D-galactose na concentração de 40 mg/mL, durante 48 horas. As setas brancas destacam áreas de interesse, ressaltando as diferenças na expressão da laminina entre os grupos. As fotomicrografias obtidas foram avaliadas de forma qualitativa. Aumento: 1000x.

4.6 Avaliação da expressão de fibronectina na matriz extracelular das células epiteliais tímicas após indução da senescência in vitro com a D-galactose

Na figura 10.A é mostrada a deposição de fibronectina nas células do grupo controle não-tratado, com distribuição abrangente em toda a célula, organizada em

uma rede complexa de fibras. Apesar de não ter aparente alteração na expressão citoplasmática da fibronectina nas células tratadas com D-gal, sua organização foi afetada, com fibras mais curtas e menos fluorescentes, além da formação de agregados.

Figura 10. Deposição da fibronectina nas células epiteliais tímicas após senescência induzida com D-galactose



Fonte: elaborado pela autora (2024)

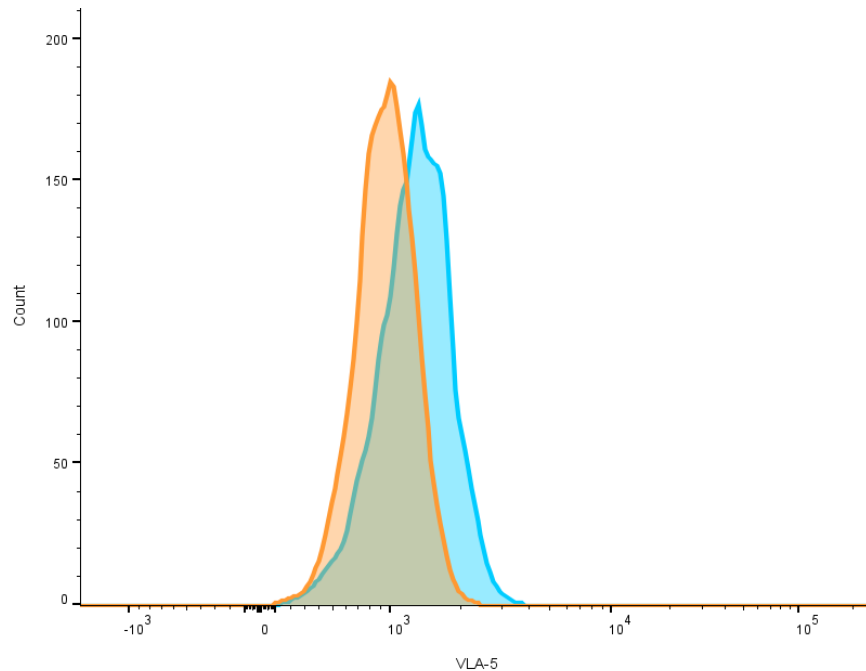
Na figura, as fotomicrografias A e B mostram células com coloração verde fluorescente, evidenciando a fibronectina. Em (A) são representadas as TECs não-tratadas, grupo controle. Em (B) são representadas as TECs após o tratamento com a D-galactose na concentração de 40 mg/mL, durante 48 horas. As setas brancas destacam áreas de interesse, ressaltando as diferenças na deposição da fibronectina entre os grupos. As fotomicrografias obtidas foram avaliadas de forma qualitativa. Aumento: 1000x.

4.7 Avaliação da expressão do receptor de matriz extracelular nas células epiteliais tímicas após indução da senescência in vitro com a D-galactose

O quadro e histograma mostrados na figura 11 mostram a análise feita por citometria de fluxo da expressão de VLA-5 em células epiteliais tímicas murinas após indução da senescência celular. A mediana de fluorescência para o grupo controle foi de 976, enquanto para o grupo tratado foi de 1322. Esses resultados indicam um aumento significativo na expressão de VLA-5 após o tratamento com D-gal.

Figura 11. Avaliação da expressão de receptor de matriz extracelular nas células epiteliais tímicas

	Amostras	Subconjuntos	Contagem	Mediana: PE-A
	Controle	vla-5 +	4493	976
	D-gal 40 mg/mL	vla-5 +	4841	1322



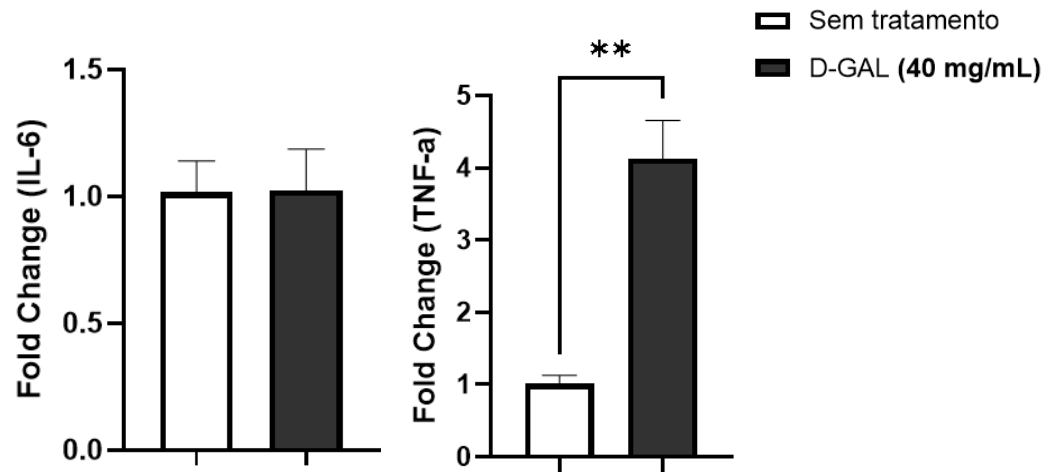
Fonte: elaborado pela autora (2024)

No quadro, os valores de contagem e mediana (PE-A) fornecem informações sobre a quantidade de células analisadas e a intensidade média de fluorescência, respectivamente. O histograma representa a quantificação da expressão de VLA-5. A curva em laranja representa o grupo controle não tratado. Já a curva azul representa o grupo tratado com a D-galactose (40 mg/mL por 48 horas).

4.8 Avaliação da expressão de citocinas nas células epiteliais tímicas após indução da senescência in vitro com a D-galactose

Os gráficos ilustram a expressão relativa dos genes *Tnfa* e *Il6* por PCR quantitativo em tempo real. Os resultados demonstram que há diferença significativa na expressão do *Tnfa* entre os grupos, indicando que o tratamento com a D-galactose influenciou a atividade desse marcador de inflamação. Contudo, não houve diferença significativa na expressão de *Il6* entre os grupos, sugerindo que o tratamento não impactou a expressão deste marcador inflamatório.

Figura 12. Avaliação da expressão do gene para citocinas nas células epiteliais tímica após indução da senescência com D-galactose



Fonte: elaborado pela autora (2024)

Os gráficos apresentam a média±EPM da expressão relativa dos genes *Tnfa* e *Il6* pelo método de Ct comparativo. A análise estatística foi feita com teste *t* em comparação entre o grupo controle não-tratado e o grupo tratado com a D-galactose (40 mg/mL por 48 horas).

5 DISCUSSÃO

Primeiramente, foi avaliada a viabilidade das células 2BH4 expostas a D-galactose (D-gal) utilizando o ensaio de MTT. Neste ensaio, identifica-se a concentração citotóxica de determinado composto, sendo a viabilidade celular indicada pela redução do MTT a formazan, resultado da atividade das enzimas desidrogenases. Tal redução é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e à viabilidade celular. É relevante destacar que as mitocôndrias são a principal fonte dos radicais livres derivados do oxigênio (ROS) intracelulares, mas também são seus alvos. Um aumento excessivo na produção de EROs está ligado ao mecanismo da senescência e à patogênese de diversas doenças (Mota *et al.*, 2004). Como resultado, identificou-se uma redução significativa na viabilidade das células tratadas com D-gal nas concentrações de 10, 20 e 40 mg/mL por 48 horas quando comparado ao grupo controle (Figura 5). Esse resultado está em consonância com estudos anteriores que demonstraram os efeitos deletérios da D-galactose associados à indução do envelhecimento, como aumento do estresse oxidativo e integridade comprometida das funções celulares (Xu *et al.*, 2024; Li *et al.*, 2014). De forma semelhante, nos ensaios de MTT conduzidos por Du *et al.* (2021) em células estromais tímica (TSCs) de camundongos, a D-gal afetou a viabilidade celular de maneira dependente do tempo e da dose, sem induzir apoptose. Os autores concluíram que a D-gal na concentração de 225 mM por 48h, equivalente à concentração e tempo de tratamento utilizado neste estudo, foi adequada para gerar respostas significativas em experimentos subsequentes. Portanto, a D-gal foi eficaz na indução da senescência por estresse oxidativo em TSCs.

No presente estudo, os resultados experimentais obtidos por meio de PCR quantitativo revelaram um aumento significativo na expressão do gene *p16* em células tratadas com D-gal (40 mg/L) (Figura 7). Esse aumento reflete o papel crítico de *p16* na manutenção da senescência celular. Sob condições de estresse oxidativo, como aquelas causadas pelo tratamento com D-gal, a *p16* pode ser ativada por meio da via *p38*-MAPK, indicando que as células podem entrar em um estado de senescência irreversível, fortalecido pela via *p16*/Rb. Ademais, a via *p16*/Rb está implicada em um loop de feedback positivo dependente de ROS, que reforça a parada do ciclo celular em células senescentes (Ben-Porath e Weinberg, 2004). Essa observação está em consonância com os resultados obtidos na contagem celular com azul de Tripán, que

indicaram uma redução significativa no número de células nos grupos tratados com D-gal (Figura 6).

Na análise morfológica por microscopia óptica das 2BH4 expostas à D-gal por 48 horas, utilizando a técnica colorimétrica de cristal violeta e a marcação celular com faloidina, molécula que se liga ao citoesqueleto de actina, as células do grupo controle não-tratado apresentam uma característica alongada ou estrelada, com prolongamentos citoplasmáticos que se estendem para várias direções, formando adesões celulares entre si e estabelecendo conexões intercelulares, o que auxilia na formação da rede tridimensional no timo. O núcleo das TECs apresenta-se em formato oval e localizado centralmente (Figura 8.A e C). Em contrapartida, o grupo tratado por 48 horas com a D-galactose apresentou morfologia irregular, principalmente no citoplasma, no qual observamos uma redução, assim como em seus prolongamentos. Consequentemente, observamos pouca interação entre as células, além de notável redução do número de células por campo analisado (Figura 8. B e D).

Essa observação reforça o que foi destacado no estudo de Venables *et al.* (2019), que retrata a morfologia normal das TECs com presença de desmossomos nas junções citoplasmáticas que resulta em um espaço intercelular estreito e uma membrana plasmática espessada. A membrana plasmática dessas células pode invagina-se no citoplasma, formando pregas que indicam processos endocíticos ativos e podem auxiliar na captação de material extracelular ou moléculas sinalizadoras. Os núcleos dessas células são geralmente alongados, com um ou mais nucléolos, e tendem a ser menos densos do que os núcleos de outras células corticais. Além disso, essas células contêm grandes vesículas arredondadas, que as distinguem de outros tipos celulares presentes no timo. O autor também retrata as mudanças morfológicas marcantes nas cTECs durante a atrofia tímica, na qual essas células apresentam perda significativa de extensões citoplasmáticas devido a alterações em sua forma. Essas modificações ocorrem sem uma redução expressiva no número total de cTECs. Durante a regeneração, as projeções citoplasmáticas podem se alongar novamente, indicando que essas alterações estruturais são, ao menos em parte, reversíveis.

As cTEC possuem baixos níveis da enzima antioxidante catalase e tendem a acumular danos oxidativos de forma acelerada. Assim, a rápida proliferação de linfócitos cria um ciclo tóxico no metabolismo anabólico, elevando a vulnerabilidade das cTEC a subprodutos metabólicos. O acúmulo de danos nas cTEC resulta em atrofia cortical à medida que o envelhecimento avança. Essas modificações

proeminentes nas cTECs ocorrem de forma irregular. Embora o estudo não tenha observado modificações semelhantes nas mTECs, sugere-se que essas células possam influenciar a morfologia das cTECs por meio de fatores de crescimento e sinais morfogênicos. Dessa forma, fica claro que as alterações no tamanho do timo estão mais relacionadas à modificação da morfologia celular do que ao número total de células, destacando a relevância da análise morfológica nesses processos (Venables *et al.*, 2019).

As células marcadas com faloidina, também foram utilizadas para a avaliação da morfologia celular. As imagens foram analisadas com o software ImageJ, permitindo quantificar as porcentagens de células com diferentes morfologias, como poligonais, fusiformes e arredondadas (Figuras 8.C e D). A análise revelou a predominância de células poligonais no grupo não-tratado, entre as demais morfologias. No grupo tratado com a D-gal, observou-se um aumento na porcentagem de células fusiformes e arredondadas, quando comparados com o grupo controle. Entretanto, essas alterações não foram significativas (Figuras 8.E).

Posteriormente, foi realizada a avaliação das proteínas de matriz extracelular (MEC) laminina e fibronectina, por meio do ensaio de imunofluorescência indireta. A laminina tem a função de ligar as células basais do epitélio ao colágeno IV e também desempenha um papel importante na diferenciação, proliferação, adesão e migração celular (Kunz-Schughart *et al.*, 2001). As TECs respondem de forma sensível a alterações na quantidade de laminina, o que pode impactar diretamente seu crescimento e a expressão de moléculas relacionadas à adesão celular. Ademais, estudos em culturas celulares mostraram que as TECs têm a capacidade de sintetizar componentes da matriz extracelular, como laminina, fibronectina e colágeno tipo IV, evidenciando seu papel crucial na organização da MEC no timo (Savino *et al.*, 2003). De forma semelhante, a fibronectina é uma glicoproteína da MEC que desempenha papéis importantes na organização da matriz e na regulação da adesão e migração celular (Souza *et al.*, 2011).

A interação entre a MEC e os receptores na superfície celular é fundamental para a organização do microambiente celular. Quando a composição e a estrutura da MEC são desreguladas, isso está ligado ao desenvolvimento e à progressão de diversas condições fisiológicas e patológicas (Lins, 2022). Como resultado qualitativo, observou-se que, no grupo controle, a laminina nas TECs apresenta uma expressão predominantemente perinuclear, com extensão gradual em direção às extremidades

celulares, formando pequenas fibras nas junções entre as células. No grupo tratado com D-gal a 40 mg/mL por 48 horas, houve uma desorganização da laminina, caracterizada pelo aparecimento de estruturas fluorescentes em forma de curtas fibras e agregados pontuais (Figuras 9.A e B). Quanto à fibronectina, no grupo controle, sua distribuição abrange toda a célula, organizada em uma rede complexa de fibras. Embora a exposição à D-galactose não tenha alterado a expressão citoplasmática da fibronectina, sua organização foi afetada, com fibras mais curtas e menos fluorescentes, além da formação de agregados, sugerindo dificuldades no transporte da molécula para fora da célula (Figura 10 A-B).

A integrina VLA-5 desempenha um papel fundamental na interação com a fibronectina dentro do parênquima tímico, facilitando a adesão e migração dos timócitos por meio do reconhecimento específico do domínio RGD (arginina, glicina e ácido aspártico) presente na fibronectina. Essa interação é essencial para a organização funcional do timo, onde a VLA-5 contribui para a regulação da motilidade celular, refletindo uma distribuição diferenciada dos sítios de ligação no córtex e na medula tímica (Savino *et al.*, 2003; Crisa *et al.*, 1996). Além disso, Savino e colaboradores (2003) relataram experimentos realizando um pré-tratamento das TECs com anticorpos anti-VLA-5 demonstram reduzir a adesão de timócitos, sugerindo que a interação entre a fibronectina e o receptor VLA-5 é essencial para a organização e função do microambiente tímico. Os resultados obtidos com a análise de expressão de VLA-5 em células epiteliais tímicas murinas, utilizando citometria de fluxo, indicam um impacto significativo do tratamento com D-gal na modulação desta integrina. O aumento na expressão de VLA-5 sugere que a D-galactose pode promover alterações na adesão celular, potencialmente através da modulação da interação das células epiteliais com a fibronectina na matriz extracelular (Figura 11).

No contexto do microambiente tímico, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) desempenha um papel significativo na regulação das TECs e na resposta imune. A produção de TNF- α pode amplificar a produção constitutiva de citocinas pelas TECs, contribuindo para um efeito em cascata que é potencializado pela exposição a outras citocinas, como a IL-1- β (Stadnyk, 1994). Esses mecanismos ilustram a complexidade das interações entre o TNF- α e as TECs e sua relevância para a ativação e proliferação de timócitos, aspectos fundamentais do funcionamento adequado do timo e da resposta imune. Os achados experimentais demonstraram que a expressão do gene para TNF-alfa no grupo tratado com a D-galactose é significativamente mais

elevada, quando comparada com o grupo não-tratado (Figura 12). Este aumento na expressão de TNF- α , decorrente do tratamento com a D-gal, pode ser visto como parte de um fenômeno mais amplo relacionado ao Fenótipo Secretor Associado à Senescência (FSAS), no qual a senescência celular resulta na liberação de diversas citocinas e mediadores inflamatórios, contribuindo para a desregulação do microambiente tecidual e, conseqüentemente, impactando a função imunológica (Paramos-de-Carvalho *et al.*, 2021).

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina multifuncional fundamental na resposta imune e inflamação, produzida por diversas células, incluindo as TECs. A IL-6 desempenha um papel crucial na manutenção da homeostase e na funcionalidade do timo. A produção desta citocina no timo está relacionada à promoção da sobrevivência das TECs e à ativação dos linfócitos T maduros. A IL-6 também está envolvida em processos de estresse e regeneração no timo, apoiando a resposta adaptativa em situações de inflamação. Dessa forma, esta citocina não apenas contribui para a imunidade, mas também é essencial para a funcionalidade do timo e das TECs (Cohen-Kaminsky *et al.*, 1991). Como resultado, observou-se que a D-gal não induziu alterações significativas na expressão do gene da *IL6* quando comparado com o grupo controle (Figura 12). Isso pode sugerir que as condições experimentais, como o tempo de exposição ou a concentração dos estímulos, não foram suficientes para alterar os níveis de IL-6, ou que uma via de sinalização que envolve essa citocina não foi ativada de forma relevante nas TECs após o tratamento.

6 CONCLUSÃO

Os resultados indicam que o tratamento com D-galactose (40 mg/mL por 48 horas) foi eficaz na indução de senescência em células epiteliais tímicas, evidenciado por mudanças morfológicas características, redução significativa da viabilidade e proliferação, e aumento significativo do marcador de senescência p16. Neste modelo, as TEC senescentes apresentaram alterações na produção de laminina, fibronectina, do receptor VLA-5 e na expressão do gene para a citocina TNF- α . Este conjunto de dados fortalece a hipótese de que o estresse oxidativo desempenha um papel crítico na senescência das células epiteliais tímicas, fornecendo uma base para investigações futuras sobre a involução tímica relacionada à idade.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, A. S.; BUENO, V. Immunosenescence: participation of T lymphocytes and myeloid-derived suppressor cells in aging-related immune response changes. **Einstein (Sao Paulo, Brazil)**, v. 17, n. 2, p. eRB4733, 2019. Doi:10.31744/einstein_journal/2019RB4733
- ALVES, N. L. *et al.* Serial progression of cortical and medullary thymic epithelial microenvironments: HIGHLIGHTS. **European journal of immunology**, v. 44, n. 1, p. 16–22, 2014.
- AMARANTE-MENDES, J. G. P. *et al.* Cloning of a thymic stromal cell capable of protecting thymocytes from apoptosis. **Cellular immunology**, v. 161, n. 2, p. 173–180, 1995. Doi:10.1006/cimm.1995.1024.
- AW, D. *et al.* Architectural changes in the thymus of aging mice. **Aging cell**, v. 7, n. 2, p. 158–167, 2008. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2007.00365.x.
- AW, D.; SILVA, A.B; PALMER, D.B. *O efeito da idade no fenótipo e na função dos timócitos em desenvolvimento* . **Journal of Comparative Pathology**, 142 Suppl 1, S45–S59, 2010. Doi:10.1016/j.jcpa .2009.10.004.
- BARBOUTI, A. *et al.* In situ evidence of cellular senescence in Thymic Epithelial Cells (TECs) during human thymic involution. **Mechanisms of ageing and development**, v. 177, p. 88–90, 2019. DOI: 10.1016/j.mad.2018.02.005.
- BARBOUTI, A. *et al.* Implications of oxidative stress and cellular senescence in age-related thymus involution. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2020, p. 7986071, 2020. Doi:10.1155/2020/7986071
- BEN-PORATH, I.; WEINBERG, R. A. When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence. **The journal of clinical investigation**, v. 113, n. 1, p. 8–13, 2004. Doi:10.1172/JCI20663
- BIRCH, J.; GIL, J. Senescence and the SASP: many therapeutic avenues. **Genes & development**, v. 34, n. 23–24, p. 1565–1576, 2020. Doi:10.1101/gad.343129.120
- BUDAMAGUNTA, V.; FOSTER, T. C.; ZHOU, D. Cellular senescence in lymphoid organs and immunosenescence. **Aging**, v. 13, n. 15, p. 19920–19941, 2021.
- BURTON, D. G. A.; KRIZHANOVSKY, V. (2014). Consequências fisiológicas e patológicas da senescência celular. **Ciências da Vida Celular e Molecular**, 71, página(s). Doi: 10.1007/s00018-014-1691-3
- CAI, N.; WU, Y.; HUANG, Y. Induction of accelerated aging in a mouse model. **Cells (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 9, p. 1418, 2022. Doi:10.3390/cells11091418
- 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. Doi:10.1016/j.exger.2017.12.022

COLIĆ, M. *et al.* Rat thymic epithelial cells in culture constitutively secrete IL-1 and IL-6. **International immunology**, v. 3, n. 11, p. 1165–1174, 1991. Doi: 10.1093/intimm/3.11.1165

CORDES, M. *et al.* Single-cell immune profiling reveals thymus-seeding populations, T cell commitment, and multilineage development in the human thymus. **Science immunology**, v. 7, n. 77, p. eade0182, 2022. Doi:10.1126/sciimmunol.ade0182.

COHEN-KAMINSKY, S *et al.* “Synergistic Induction of Interleukin-6 Production and Gene Expression in Human Thymic Epithelial Cells by LPS and Cytokines.” *Cellular immunology* 138.1 (1991): 79–93. novembro de 1991 , páginas 79-93. Doi:10.1016/0008-8749(91)90134-w .

CRISA, L. *et al.* Cell adhesion and migration are regulated at distinct stages of thymic T cell development: the roles of fibronectin, VLA4, and VLA5. **The journal of experimental medicine**, v. 184, n. 1, p. 215–228, 1996. DOI: 10.1084/jem.184.1.215

CRISA, L.; CIRULLI, V.; SALOMON, D. R. Integrin-mediated Regulation of Thymocyte Migration. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 184, n. 1, p. 215-228, 1996. DOI: 10.1084/jem.184.1.215.

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

FAUSTO, C. S. C. DO V. *et al.* Timo: caracterização ultra-sonográfica. **Radiologia brasileira**, v. 37, n. 3, p. 207–210, 2004. Doi:10.1590/s0100-39842004000300013.

FRANCELIN, C. *et al.* Neurotransmitters modulate intrathymic T-cell development. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 9, 2021. Doi: 10.3389/fcell.2021.668067.

FRANCESCHI, C.; CAMPISI, J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. **The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences**, v. 69, n. Suppl 1, p. S4–S9, 2014. Doi:10.3389/fcell.2021.668067.

FUENTES, E. *et al.* Immune system dysfunction in the elderly. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 89, n. 1, p. 285–299, 2017. Doi:10.1590/0001-3765201720160487.

FUJIMORI, S.; OHIGASHI, I. O papel do epitélio tímico no desenvolvimento do timo e na involução tímica relacionada à idade. **The Journal of Medical Investigation** , v. 71, n. 1.2, p. 29–39, 2024.

GORGOLIS, V. *et al.* Cellular senescence: Defining a path forward. **Cell**, v. 179, n. 4, p. 813–827, 2019. Doi:10.1016/j.cell.2019.10.005.

GUO, H., KUANG, Z., ZHANG, J., ZHAO, X., PU, P. E YAN, J. O efeito preventivo dos polifenóis de *Apocynum venetum* no estresse oxidativo induzido por D-galactose em

camundongos. [s.l.] **Medicina Experimental e Terapêutica**, 2025. Doi:10.3892/etm

KLUMB, C. E.; CAVALCANTI JÚNIOR, G. B. Avaliação dos métodos de detecção das alterações do gene e proteína P53 nas neoplasias linfóides. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 24, n. 2, 2002. Doi: <https://doi.org/10.1590/S1516-84842002000200008>.

KUNZ-SCHUGHART, L. A. *et al.* A heterologous 3-D coculture model of breast tumor cells and fibroblasts to study tumor-associated fibroblast differentiation. **Experimental cell research**, v. 266, n. 1, p. 74–86, 2001. DOI:10.1006/excr.2001.5210.

LI, Y.-N. *et al.* Saponins from *Aralia taibaiensis* attenuate D-galactose-induced aging in rats by activating FOXO3a and Nrf2 pathways. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2014, p. 320513, 2014. Doi:10.1155/2014/320513.

LINS, M. P. Thymic extracellular matrix in the thymopoiesis: Just a supporting?. **Biotech (Basel (Switzerland))**, v. 11, n. 3, p. 27, 2022.

LIMA, F. A e CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S. O papel do timo no desenvolvimento do sistema imune. **Pediatria (São Paulo)**, v. 29, n. 1, p. 33-42, 2007.

MAGNER, W. J. *et al.* Aberrant development of thymocytes in mice lacking laminin-2. **Journal of immunology research**, v. 7, n. 2–4, p. 179–193, 2000. Doi:10.1155/2000/90943.

MARTINEZ-RUÍZ, G. U.; MORALES-SÁNCHEZ, A.; BHANDoola, A. Transcriptional and epigenetic regulation in thymic epithelial cells. **Immunological reviews**, v. 305, n. 1, p. 43–58, 2022. Doi:10.1111/imr.13034.

MICHELSON, D. A. *et al.* Thymic epithelial cells co-opt lineage-defining transcription factors to eliminate autoreactive T cells. **Cell**, v. 185, n. 14, p. 2542–2558.e18, 2022. Doi:10.1016/j.cell.2022.05.018

MESQUITA JÚNIOR, D. *et al.* Sistema imunitário - parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista brasileira de reumatologia**, v. 50, n. 5, p. 552–580, 2010.

MOTA, M. P. *et al.* Teorias biológicas do envelhecimento. **Revista Portuguesa de Ciências do Desporto/Portuguese Journal of Sport Sciences**, v. 2004, n. 1, p. 81–110, 2004. Doi:10.5628/rpcd.04.01.81

MUÑOZ-ESPÍN, D.; SERRANO, M. Cellular senescence: from physiology to pathology. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 15, n. 7, p. 482–496, 2014. Ol: 10.1038/nrm3823.

PARAMOS-DE-CARVALHO, D.; JACINTO, A.; SAÚDE, L. The right time for senescence. **eLife**, v. 10, 2021. Doi:10.7554/eLife.72449.

PÉREZ, Mario Ruiz; VANDENABEELE, Peter; TOUGAARD, Peter. The thymus road to a T cell: migration, selection, and atrophy. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 15, 2024. Doi:10.3389/fimmu.2024.1443910.

RAYESS, H.; WANG, M. B.; SRIVATSAN, E. S. Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. **International journal of cancer**, v. 130, n. 8, p. 1715–1725, 2012. Doi:10.1002/ijc.27316

REIS, M. D. DOS S. *et al.* Intrathymic somatotropic circuitry: consequences upon thymus involution. **Frontiers in immunology**, v. 14, 2023. DOI:10.3389/fimmu.2023.

RAMARLI, D. *et al.* Thymocyte contact or monoclonal antibody-mediated clustering of 3beta1 or 6beta4 integrins activate interleukin-6 (IL-6) transcription factors (NF-kappaB and NF-IL6) and IL-6 production in human thymic epithelial cells. **Blood**, 92(10), 3745–3755. (1998).

SALAMA, R. *et al.* Cellular senescence and its effector programs. **Genes & development**, v. 28, n. 2, p. 99–114, 2014. DOI: 10.1101/gad.235184.113.

SAVINO, W. *et al.* Thymocyte migration: an affair of multiple cellular interactions? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 8, p. 1015–1025, 2003. Doi:, 2010.1590/S0100-879X2003000800007.

SAVINO, W. *et al.* Laminin-mediated interactions in thymocyte migration and development. **Frontiers in immunology**, v. 6, p. 579, 2015. Doi: 10.3389/fimmu.2015.00579

SOUZA, R. S. DE; PINHAL, M. A. D. S. Interações em processos fisiológicos: a importância da dinâmica entre matriz extracelular e proteoglicanos. **Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde**, v. 36, n. 1, 2011. DOI: 10.7322/abcs.v36i1.75.

STADNYK, A. W. Cytokine production by epithelial cells 1. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 8, n. 13, p. 1041–1047, 1994. Doi:10.1096/fasebj.8.13.7926369.

VENABLES, T. *et al.* Dynamic changes in epithelial cell morphology control thymic organ size during atrophy and regeneration. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 4402, 2019. Doi: 10.1038/s41467-019-11879-2.

XU, W. *et al.* L-Theanine delays d-galactose-induced senescence by regulating the cell cycle and inhibiting apoptosis in rat intestinal cells. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 104, n. 4, p. 2073–2084, 2024. Doi:10.1002/jsfa.13096.

YARILIN, A. A.; BELYAKOV, I. M. Cytokines in the thymus: production and biological effects. **Current medicinal chemistry**, v. 11, n. 4, p. 447–464, 2004. Doi:10.2174/0929867043455972

ZHANG, X. *et al.* Ameliorative effect of supercritical fluid extract of Chrysanthemum indicum Linnén against D-galactose induced brain and liver injury in senescent mice via suppression of oxidative stress, inflammation and apoptosis. **Journal of ethnopharmacology**, v. 234, p. 44–56, 2019.

ZIOBER, B. L.; LIN, C. S.; KRAMER, R. H. Laminin-binding integrins in tumor progression and metastasis. **Seminars in cancer biology**, v. 7, n. 3, p. 119–128, 1996. DOI: 10.1006/scbi.1996.0017