

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**  
**Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e**  
**Toxicologia)**  
**Área de Fisiopatologia**

**O efeito do tratamento com rapamicina em órgãos linfoides  
de camundongos propensos à senescência acelerada**

**Rafael dos Santos Barros**

**Dissertação para obtenção do Título de Mestre**

**Orientador: Prof. Dr Joilson de Oliveira Martins**

**São Paulo**  
**2023**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**  
**Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e**  
**Toxicologia)**  
**Área de Fisiopatologia**

**O efeito do tratamento com rapamicina em órgãos linfoides  
de camundongos propensos à senescência acelerada**

**Rafael dos Santos Barros**

**Versão original**

**Dissertação para obtenção do Título de Mestre**

**Orientador: Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins**

**São Paulo**  
**2023**

**Rafael dos Santos Barros**

**O efeito do tratamento com rapamicina em órgãos linfoides  
de camundongos propensos à senescência acelerada**

**Comissão Julgadora da Dissertação para obtenção do Título de  
Mestre**

**Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins  
Orientador/presidente**

---

**1º Examinador**

---

**2º Examinador**

---

**3º Examinador**

---

**4º Examinador**

**São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2023.**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:  
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

B277e Barros, Rafael dos Santos  
O efeito do tratamento com rapamicina em órgãos linfoides de camundongos propensos à senescência acelerada / Rafael dos Santos Barros. - São Paulo, 2023.  
75 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas - Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia).  
Orientador: Martins, Joilson de Oliveira

1. Envelhecimento. 2. Senescência. 3. Imunossenescência. 4. Rapamicina. 5. Camundongos.  
I. T. II. Martins, Joilson de Oliveira, orientador.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus e aos meus pais, Roberto e Maria, por todo o amor, incentivo, apoio e compreensão durante essa e outras fases da minha vida.

Aos meus Irmãos, Roberta e Robson. Aos meus sobrinhos que amo tanto, Calleb e Ravi. Aos meus avós e avôs e aos outros membros da minha imensa família. Saudades!

Meus agradecimentos ao meu namorado, melhor amigo, confidente e companheiro, Everton, que me incentiva durante todos os 365 dias e 06 horas. Obrigado por me ajudar a superar os meus desafios, por colocar um sorriso em meu rosto ao acordar e ao dormir. Obrigado também por me amar e sempre estar comigo, seja em dias ensolarados ou tempestuosos.

Aos meus amigos da infância, da escola, do cursinho e da faculdade que em 2021 eu disse um “até logo”.

Meu imenso agradecimento ao meu amigo Luiz que, antes mesmo de iniciar o mestrado, me ajudou de todas as formas possíveis. Obrigado por todo o conhecimento, paciência e compreensão durante esses dois anos. Sem você, esse tralho não aconteceria. Agradeço também a minha *roomie* Kamilla e a Emanuella (manuh) por toda a ajuda durante os experimentos, nos problemas pessoais e de saúde que passei. Obrigado “migos” por proporcionarem uma maior leveza na batalha que é o mestrado.

Ao Dr. Joilson, orientador e professor querido, que me ajudou a ingressar nessa pós-graduação, me aceitou como seu aluno e confiou no meu potencial. Obrigado por todos os ensinamentos repassados, pelas cobranças, pela confiança, pela compreensão e por todas as vitórias que conquistamos nesses dois anos. Agradeço imensamente por ter deixado eu fazer parte da história do seu laboratório de imunoendocrinologia.

Meu agradecimento especial a Silene, querida amiga e técnica responsável do laboratório, por todo o conhecimento, por toda a ajuda, pelas conversas, pelas risadas e pelo amor de pessoa que você é.

A todos os meus amigos do laboratório de patologia, Claudia, Julia Rezende, Reinara e Julia Bagatin, e aos demais amigos do bloco 17, em especial a Isa e Fabiana.

Agradeço ao Dr. Anderson por nos ajudar inúmeras vezes em nossas dúvidas e em nos permitir usar o seu laboratório em nossos longos experimentos. Agradeço também a Josiane, em primeiro lugar por ser uma pessoa incrível; e em segundo, por toda a ajuda durante vários experimentos. Eu sou seu fã.

Agradeço a ajuda da Dra. Eliana Hiromi Akamine e do Dr. Stephen Fernandes de Paula pela grande ajuda na aquisição dos animais no Instituto de Ciências Biomédicas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 33002010079P5.

Agradeço ao apoio da agência FAPESP (2021/00310-6) pelos recursos disponibilizados para a realização desse trabalho.

Dedico esse trabalho aos meus amados pets que tristemente partiram em 2022, Scarlet e Filinha.

“A vida é feita de escolhas. Quando você dá um passo à frente, inevitavelmente alguma coisa fica para trás”.

Caio Fernando Abreu.

## RESUMO

BARROS, R. S. O efeito do tratamento com rapamicina em órgãos linfoides de camundongos propensos à senescência acelerada. 2023. 75p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Envelhecer compreende um fenômeno complexo, natural e irreversível, que submete o organismo a inúmeras alterações nos processos biológicos, fisiológicos, ambientais, psicológicos, comportamentais e sociais. Esse processo é caracterizado por um declínio gradual dos mecanismos homeostáticos do organismo, intimamente relacionados com o estado senescente. A senescência, quando diz respeito ao sistema imunológico, é denominada de imunossenescência, que pode ser definida como uma parada estável do ciclo celular associada a mudanças, com uma resposta que limita a proliferação de células envelhecidas ou danificadas. A autofagia está diretamente relacionada com a manutenção do fenótipo senescente, em que a atividade autofágica exerce um papel essencial e ativo na influência da biossíntese de proteínas e organelas. Essa via é regulada naturalmente pela proteína mTOR e quimicamente pelo fármaco rapamicina. Assim, pretendemos investigar: (1) as alterações no perfil corporal e hematimétrico dos animais ao longo do tratamento com rapamicina; (2) avaliar o perfil de citocinas; (3) observar as modificações histológicas em órgãos linfoides primários e secundário; (4) analisar as populações de células linfoides e mieloides; e (5) avaliar a capacidade proliferativa de linfócitos *in vitro*. Camundongos SAMP-8 e SAMR-1 foram tratados com rapamicina durante dois meses. A mensuração da massa corporal e análises hematológicas foram realizadas antes e durante o tratamento. Amostras de soro, medula óssea, timo e baço foram analisados em ensaios de ELISA, histologia, população e subpopulações de células. Alterações na massa corporal, parâmetros hematológicos e celularidade de células foram nítidas entre os dois modelos utilizados. Diferenças também foram percebidas na detecção de citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , com resultados significantes nas amostras de baço, timo e medula óssea. As citocinas IL-7 e IL-15 apresentaram diferenças de secreção entre os grupos, sendo a primeira maior detectada em camundongos com senescência acelerada tratados com rapamicina. Em nossa análise histológica observamos que os camundongos SAM-P8 apresentaram involução tímica. E nas subpopulações de linfócitos T do baço, células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> estavam, respectivamente, em maior e menor quantidade nos camundongos SAM-P8 tratados com rapamicina. Dessa forma, o camundongo da linhagem SAM-P8 é um excelente modelo para se estudar as alterações da senescência, em que o mesmo apresenta características fisiológicas distintas dos camundongos utilizados como controle (SAM-R1). Além disso, verificamos que a dose de rapamicina empregada não desencadeou alterações que pudessem comprometer a resposta imunológica desses camundongos, bem como na possibilidade de atuar na resposta contra os efeitos complexos do envelhecimento.

**Palavras-chaves:** Envelhecimento, Senescência, Imunossenescência, mTOR, Rapamicina.

## ABSTRACT

BARROS, R. S. The effect of rapamycin treatment on lymphoid organs of senescence accelerated mice prone. 2023. 75p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Aging comprises a complex, natural, and irreversible phenomenon, which subjects the organism to countless alterations in biological, physiological, environmental, psychological, behavioral, and social processes. This process is characterized by a gradual decline in the organism's homeostatic mechanisms, closely related to senescence effects. Senescence, when it concerns the immune system, is called immunosenescence, which can be defined as a stable cell cycle arrest associated with changes and is a response that limits the proliferation of aged or damaged cells. Autophagy is a genetically regulated, conserved cellular process and a metabolic pathway essential for maintaining cellular homeostasis, which plays a constitutive and active role in controlling the biosynthesis of proteins and organelles. This pathway is regulated naturally by mTOR or chemically by the drug rapamycin, having a direct relationship with cellular homeostasis and maintenance of the senescent phenotype. Thus, we intend to investigate: (1) the changes in the body and hematimetic profile of the animals throughout the rapamycin treatment; (2) evaluate the cytokine profile; (3) observe histological changes in primary and secondary lymphoid organs; (4) analyze lymphoid and myeloid cell populations; and (5) evaluate the proliferative capacity of lymphocytes in vitro. SAMP-8 and SAMR-1 mice were treated with rapamycin for two months. Body mass measurement and hematological analyses were performed before and during treatment. Serum, bone marrow, thymus and spleen samples were analyzed in ELISA assays, histology, cell population and subpopulations. Changes in body mass, hematological parameters, and cellularity were clear between the two models used. Differences were also noticed in the detection of cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ , with significant results in the spleen, thymus and bone marrow samples. The cytokines IL-7 and IL-15 showed differences in secretion between groups, the former being higher detected in mice with accelerated senescence treated with rapamycin. In our histological analysis we observed that SAM-P8 mice showed thymic involution. And in the spleen T-lymphocyte subpopulations, TCD4+ and TCD8+ cells were, respectively, in higher and lower quantities in SAM-P8 mice treated with rapamycin. Thus, the SAM-P8 mouse is an excellent model to study the changes of senescence, since it presents physiological characteristics different from the control mice (SAM-R1). Furthermore, we verified that the dose of rapamycin used did not trigger changes that could compromise the immune response of these mice, as well as the possibility of acting in the modulatory response against the complex effects of aging.

**Keywords:** Aging, Senescence, Immunosenescence, mTOR, Rapamycin.



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ETAPAS DOS MECANISMOS AUTOFÁGICOS.....	25
FIGURA 2 - DISPOSIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS E PROTOCOLO DE TRATAMENTO COM RAPA.....	30
FIGURA 3 – AVALIAÇÃO DA EVOLUÇÃO DA MASSA CORPORAL DOS CAMUNDONGOS DAS LINHAGENS SAM-P8 E SAM-R1.....	34
FIGURA 4 - CONCENTRAÇÃO DA CITOCINA IL-1B EM CAMUNDONGOS DAS LINHAGENS SAM-P8 E SAM-R1.....	41
FIGURA 5 - CONCENTRAÇÃO DA CITOCINA IL-6 EM CAMUNDONGOS DAS LINHAGENS SAM-P8 E SAM-R.....	42
FIGURA 6 – CONCENTRAÇÃO DA CITOCINA TNF-A EM CAMUNDONGOS DAS LINHAGENS SAM-P8 E SAM-R1.....	43
FIGURA 7 - CONCENTRAÇÃO DAS CITOCINAS IL-7 E IL-15 EM CAMUNDONGOS DAS LINHAGENS SAM-P8 E SAM-R1.....	43
FIGURA 8 - AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DE ÓRGÃOS LINFOIDES DE CAMUNDONGOS DAS LINHAGENS SAM-P8 E SAM-R1.....	44
FIGURA 9 - ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS ESPLÊNICOS EM CAMUNDONGOS DAS LINHAGENS SAM-P8 E SAM-R1.....	46
FIGURA 10 – ANÁLISE DAS POPULAÇÕES E SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS DO BAÇO DEFINIDAS POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	47
FIGURA 11 – AVALIAÇÃO DAS LINHAGENS MIELOIDES E LINFOIDES DE CAMUNDONGOS SAM-P8 E SAM-R1.....	48

## **LISTA DE TABELAS**

TABELA 1 - AVALIAÇÃO DO ERITROGRAMA DOS CAMUNDONGOS DAS LINHAGENS SAM-P8 E SAM-R1.....	37
TABELA 2 - AVALIAÇÃO DO LEUCOGRAMA DOS CAMUNDONGOS DAS LINHAGENS SAM-P8 E SAM-R1.....	39
TABELA 3 - AVALIAÇÃO DA CELULARIDADE DE ÓRGÃOS LINFOIDES DOS CAMUNDONGOS DAS LINHAGENS SAM-P8 E SAM-R1.....	45

## **LISTA DE QUADROS**

QUADRO 1 - ANTICORPOS CONJUGADOS UTILIZADOS NA IMUNOFENOTIPAGEM DE LINFÓCITOS T E B.....	32
------------------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACK	<i>Ammonium-Chloride-Potassium</i>
AMPK	<i>AMP activated protein kinase</i>
APC	<i>Antigen presenting cell</i>
ATG	<i>Autophagy related gene</i>
BCR	<i>B cell receptor</i>
Beclin-1	<i>(matg6)</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDKI	<i>Cyclin dependent kinase inhibitors</i>
CFSE	<i>Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester</i>
CMA	<i>Chaperone mediated autophagy</i>
Coloração HE	<i>Hematoxilina e eosina</i>
ConA	<i>Concanavalina A</i>
CSF	<i>Colony stimulating factors</i>
DEPTOR	<i>Domain containing mtor-interacting protein</i>
DMSO	<i>Dimetilsulfóxido</i>
DP	<i>Desvio padrão</i>
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GAP	<i>Gtpase activating proteins</i>
HCT	<i>Hematocrit</i>
HE	<i>Coloração de hematoxilina e eosina</i>
HGB	<i>Hemoglobin</i>
HSC	<i>Hematopoietic stem cells</i>
IBGE	<i>Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística</i>
IGF1	<i>Insulin like growth factor 1</i>
IL-1	<i>Interleucina IL-1</i>
IL-6	<i>Interleucina IL-6</i>
LAMP-2	<i>Lisossomal associated membrane protein 2</i>
LPS	<i>Lipopolissacarídeo</i>
MALT	<i>Mucosa associated lymphoid tissue</i>
MAP1LC3B/LC3B	<i>Microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta)</i>
MAPKAP1	<i>Mitogen activated protein kinase associated protein 1</i>
mAtg14L	<i>Proteína atg 14</i>
MCH	<i>Mean corpuscular hemoglobin</i>
MCHC	<i>Mean corpuscular hemoglobina concentration</i>
MCV	<i>Mean corpuscular volume</i>
mLST8	<i>Mammalian lethal with Sec13 protein 8</i>
mTOR	<i>Mammalian Target of rapamycin</i>
mTORC1	<i>Complexo 1 da proteína mtor</i>
mTORC2	<i>Complexo 2 da proteína mtor</i>
Na <sub>2</sub> -EDTA	<i>Ethylenedinitrilotetraacetic acid disodium salt dihydrate</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NK	<i>Células natural killers</i>
NLR	<i>NOD like receptors</i>
OMS	<i>Organização Mundial de Saúde</i>

p150	Subunidade reguladora da Vps34
p16 <sup>INK4a</sup>	Proteína p16 <sup>ink4a</sup>
p21,	Proteína p21
p53,	Proteína p53
PAS	Inglês <i>phagosome Assembly Site</i>
PI3K3/Vps34	<i>Class III phosphatidylinositol-3 kinase</i>
PI3P	<i>Phosphatidylinositol-3- phosphate</i>
PKA	<i>Camp dependent protein kinase</i>
PRAS40	<i>Prolinerich Akt substrate 40 kda</i>
pRb	<i>Retinoblastoma protein</i>
PRR5	<i>Proline rich 5</i>
Raptor	<i>Regulatory-associated protein of Mtor</i>
Ras Rab-7	<i>Ras-related protein Rab-7</i>
RBC	<i>Red blood cells</i>
Rheb	<i>Ras homolog enriched in brain</i>
RICTOR	<i>Rapamycin insensitive companion of mammalian target of rapamycin</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
S6K1	<i>ribosomal protein S6 kinase</i>
SALT	<i>Skin associated lymphoid tissue</i>
SAMP	<i>Senescence accelerated mouse prone</i>
SAMR	<i>Senescence accelerated mouse resistant</i>
SASP	<i>Senescence associated phenotype secretory</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
TCD4 <sup>+</sup>	Linfócito T auxiliar
TCD8 <sup>+</sup>	Linfócito T TCD8 <sup>+</sup>
TCR	<i>T cell receptor</i>
TFEB	<i>Transcription factor EB</i>
TLR	<i>Toll like receptors</i>
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TSC	<i>Tuberous sclerosis complex</i>
ULK1 e ULK2	<i>UNC-51-like kinase1 and 2</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
1.1	ASPECTOS DO ENVELHECIMENTO .....	13
1.2	SENESCÊNCIA CELULAR.....	14
1.3	SISTEMA IMUNOLÓGICO E IMUNOSSENESCÊNCIA .....	17
1.4	AUTOFAGIA .....	22
1.5	RAPAMICINA .....	27
<b>2</b>	<b>OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>28</b>
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	28
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
3.1	MODELO ANIMAL .....	29
3.2	MENSURAÇÃO DA MASSA CORPORAL.....	29
3.3	PROTOCOLO DE ADMINISTRAÇÃO DA RAPAMICINA .....	29
3.4	EUTANÁSIA, COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS .....	30
3.5	AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA.....	31
3.6	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS E DE CITOCINAS.....	31
3.7	ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS TECIDOS.....	31
3.8	OBTENÇÃO DE CÉLULAS DO TIMO E BAÇO.....	31
3.9	CITOMETRIA DE FLUXO .....	32
3.10	AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DOS LINFÓCITOS <i>IN VITRO</i> .....	32
3.11	MIELOGRAMA.....	33
3.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>34</b>
4.1	MENSURAÇÃO DA MASSA CORPORAL.....	34
4.2	AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA.....	34
4.2.1	Série eritrocitária.....	34
4.2.2	Série leucocitária.....	38
4.3	DOSAGEM DE CITOCINAS.....	40
4.4	ANÁLISE HISTOLÓGICA .....	44
4.5	CELULARIDADE DO TIMO, BAÇO E MEDULA ÓSSEA .....	44
4.6	PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS ESPLÊNICOS <i>IN VITRO</i> .....	45
4.7	CITOMETRIA DE FLUXO .....	46
4.8	MIELOGRAMA.....	47
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>56</b>
	<b>APÊNDICES.....</b>	<b>64</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ASPECTOS DO ENVELHECIMENTO

O envelhecimento populacional é um fenômeno que acontece em ritmo acelerado em todos os países do mundo. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o número de pessoas acima de 65 anos no planeta é de 671 milhões, com projeção de 1,6 bilhão para ano de 2050. Em relação à população brasileira, segundo dados do censo demográfico de 2022 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), atualmente no Brasil há mais de 31,23 milhões de pessoas com idade acima de 65 anos (cerca de 14,7% da população total), com aumento percentual de 7,6% em relação a 2012, o que indica que a população do país está mais velha. Conforme estimativas para 2050, os idosos brasileiros serão 34,88 milhões e farão parte de um grupo maior que os indivíduos de até 14 anos (1). Esta nova configuração demográfica promove um novo olhar sobre o envelhecimento da população.

Envelhecer compreende um processo natural, irreversível e progressivo que faz parte do ciclo de vida do ser humano, sendo um fenômeno complexo que submete o organismo a inúmeras alterações nos processos biológicos, fisiológicos, ambientais, psicológicos, comportamentais e sociais (2).

O envelhecimento é caracterizado por um declínio gradual dos mecanismos homeostáticos do organismo que mantêm a estrutura e a função dos tecidos e órgãos. Nos mamíferos, o envelhecimento ocorre de forma heterogênea em múltiplos sistemas, causando uma deterioração progressiva que eventualmente resulta em disfunção tecidual (3,4). Conseqüentemente, a idade é um fator de risco para muitas doenças, tais como doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, câncer, diabetes tipo 2 e entre outras (3).

Há duas fases principais durante o envelhecimento: senescência e senilidade. A primeira é caracterizada pelo envelhecimento saudável, onde pequenas alterações se acumulam ao longo do tempo, sem nenhum mecanismo de doença reconhecido. A segunda fase, chamado também de envelhecimento patológico, há o aparecimento de doenças crônicas e deficiências que prejudicam as funções fisiológicas e comprometem a qualidade de vida do indivíduo (4). Durante essas fases, as marcas do envelhecimento aparecem, as quais podem ser divididas em três categorias: primária, ou as causas dos danos associados ao envelhecimento; antagônica, ou as respostas aos danos; e integrativa, ou as conseqüências das respostas relacionadas ao fenótipo do envelhecimento (4).

Uma das marcas do envelhecimento celular é o acúmulo de agravos, tais como DNA, em organelas e proteínas. Estas se tornam modificadas quimicamente por moléculas reativas, tais como radicais livres, que são geradas durante o metabolismo celular normal e cuja produção aumenta com a idade (5). Um fenômeno comum do envelhecimento é o acúmulo de danos genéticos ao longo da vida, em que a integridade e estabilidade do DNA são continuamente desafiadas por agentes exógenos físicos, químicos e biológico, as quais levam a erros de replicação, mutações pontuais, translocações, encurtamento dos telômeros e o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) (6).

Outros marcadores relacionados ao envelhecimento referem-se às alterações epigenéticas que são uma variedade de alterações nos padrões de metilação do DNA, modificação pós translacional das histonas e remodelação da cromatina que afetam todas as células e tecidos (7). O comprometimento da proteostase (homeostase proteica) e dos sistemas proteolíticos também estão presentes durante o envelhecimento e em algumas doenças relacionadas. (5).

A detecção desregulada de nutrientes torna-se deficiente com a idade. As principais proteínas envolvidas na detecção de nutrientes e regulação metabólica são o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF1, do inglês *insulin like growth factor 1*), a proteína alvo mecanicista da rapamicina em mamíferos (mTOR, do inglês *mammalian Target of rapamycin*) e a proteína quinase ativada por AMP (AMPK, do inglês *AMP activated protein kinase*), por apresentarem estas atividades, essas proteínas são chamadas de sensores de nutrientes (8).

O declínio do potencial regenerativo dos tecidos é uma das características mais claras do envelhecimento. Por exemplo, o esgotamento das células tronco hematopoiéticas (HSC, do inglês *hematopoietic stem cells*), sua capacidade de renovação e diminuição da atividade da hematopoiese tornam-se ineficientes, resultando eventualmente no acúmulo de células senescentes que podem agravar os danos e contribuir para o envelhecimento (4).

## 1.2 SENESCÊNCIA CELULAR

A senescência celular pode ser definida como um estado do ciclo celular associada a diferentes mudanças em resposta limitação da proliferação de células comprometidas ou envelhecidas. Esse processo celular foi primeiramente definido por Hayflick e Moorhead, em 1961, com estudos do ciclo celular em cultura de fibroblastos humanos (9).

Esse processo altera radicalmente o fenótipo das células em resposta a vários tipos de estresse, em que as células apresentam além do ciclo da proliferação celular irreversível, a

instabilidade genômica, o desenvolvimento do fenótipo secretor associado à senescência (SASP, do inglês *senescence associated phenotype secretory*), além de outros marcadores relacionados ao estado senescente. Ambas as características são induzidas em resposta a uma variedade de problemas, estresse e sinais fisiológicos, que podem ter efeitos benéficos ou deletérios sobre o organismo (4).

A indução da parada de crescimento estável é fundamental para impedir a propagação de células disfuncionais. As vias responsáveis por essa parada irreversível envolvem principalmente as proteínas do retinoblastoma (pRb, do inglês *retinoblastoma protein*), p53, p21, p16<sup>INK4a</sup>, as quais desempenham papéis críticos na indução da senescência (10).

A pRb é a proteína que regula a progressão da fase G1 para a fase S do ciclo celular. Essa regulação trabalha em conjunto com o fator transcricional E2F, levando as células a permanecerem no estágio G0/G1. Quando ocorre a fosforilação da Rb, essa é ativada e o complexo com E2F é desfeito, permitindo o avanço do ciclo para a fase S. Todo esse controle da permanência ou avanço no ciclo celular é regulado não somente pelo complexo Rb/E2F, mas também pelas proteínas p53 e p21 (7). A p53 regula um complexo programa transcricional antiproliferativo. A função mais relevante da p53 na senescência é induzir a transcrição dos inibidores de quinase dependente da ciclina (CDKI, do inglês *cyclin dependent kinase inhibitors*), que por sua vez bloqueia a atividade do gene CDK2, resultando na hipofosforilação da Rb (10). A p21 é uma proteína que é capaz de inibir uma gama de CDKs, mas, paradoxalmente, também é necessária para a progressão do ciclo celular. Embora a p21 seja regulada positivamente em resposta a diferentes estímulos indutores de senescência, sua expressão é regulada principalmente pela ativação direta via p53, o que dificulta seu uso como um marcador único de senescência (11). O p16<sup>INK4a</sup> é uma proteína, codificada pelo gene CDKN2A, regulado em múltiplos tecidos durante o envelhecimento, A principal função do p16<sup>INK4a</sup> é a inibição dos complexos da ciclina D e das quinases CDK4 e CDK6, que retarda a divisão celular ao interferir no avanço da fase G1 para a fase S do ciclo celular, além de prevenir a degradação da p53 (4,10,12).

Além das alterações celulares, o envelhecimento também envolve modificações na comunicação intercelular. Outra alteração proeminente refere-se ao nível de inflamação crônica, definido como “*inflammaging*”, o qual é um processo inflamatório do organismo relacionado ao envelhecimento, ou seja, um fenótipo pró-inflamatório que acompanha a senilidade em mamíferos (5). Assim, as mudanças observadas são o aumento das reações inflamatórias que podem resultar de múltiplas causas, tais como o acúmulo de danos pró-inflamatórios aos tecidos, a falha na resposta imunológica, a propensão das células senescentes



a secretarem citocinas inflamatórias e problemas na maquinaria autofágica. As células senescentes produzem uma mistura complexa de fatores solúveis e insolúveis (citocinas, quimiocinas, proteases de matriz extracelular, fatores de crescimento, e outras moléculas de sinalização) que são coletivamente denominados SASP, com a capacidade de sinalizar e influenciar seu ambiente circundante. (4,5,10).

A presença de um fenótipo pró inflamatório em mamíferos idosos é evidenciada pelo aumento da expressão de genes ligados à inflamação e respostas imunes nos tecidos de humanos idosos e roedores, com diferenças específicas dos tecidos na produção de fatores inflamatórios. Há também maior nível de secreção de citocinas no soro, por exemplo as interleucinas (IL) - 1 $\alpha$ , IL-6 e TNF $\alpha$ ; e ativação da sinalização do NF- $\kappa$ B, a qual é o regulador mestre das respostas inflamatórias (13,14).

As citocinas IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , conhecidas respectivamente como IL-1 e IL-18, são importantes iniciadores da cascata inflamatória induzida pelo estresse. O IL-1 $\beta$  está entre os mais importantes marcadores de indução da resposta inflamatória e é produzido por praticamente todas as células nucleadas, principalmente monócitos e macrófagos; enquanto os queratinócitos, células endoteliais, fibroblastos, miócitos, células de *Langerhans* produzem IL-1 $\alpha$ . As atividades biológicas primordiais da IL-1 incluem a estimulação de células CD4<sup>+</sup>; a proliferação e ativação de linfócitos B, neutrófilos, monócitos e macrófagos, aumentando as atividades quimiotáticas e fagocitárias. A IL-1 também estimula hepatócitos a produzirem proteínas de fase aguda de inflamação. Ainda estimula a hematopoiese, tanto por atuar na própria célula primordial quanto por aumentar a liberação de fatores estimuladores de colônias (CSF, do inglês *colony stimulating factors*) (10,11).

A IL-6 é reconhecida como uma interleucina importante no envelhecimento e nas doenças relacionadas à idade, visto que está aumentada em indivíduos idosos e com doenças crônicas. Essa citocina desempenha um papel fundamental na resposta à fase aguda, na transição da imunidade inata para a adquirida, no controle metabólico e na patogênese de muitas doenças crônicas (15). Com ação pleiotrópica, esta interleucina influencia nas respostas imune e nas reações inflamatórias, sendo um dos maiores mediadores da fase aguda da inflamação. Além de também estimular a produção de proteínas da fase aguda da inflamação nos hepatócitos e na atração de eosinófilos para o local de inflamação. A IL-6 pode ser produzida por vários tipos celulares, sendo as células B, T e monócitos as principais células secretoras, sendo IL-1, lipopolissacarídeo (LPS) e fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF, do inglês *tumor necrosis factor*) os principais estímulos para a sua síntese (13).

Outro fator importante na resposta imunológica é a citocina TNF- $\alpha$ , que aumenta com a idade e está associada a doenças relacionadas ao envelhecimento. TNF- $\alpha$  é responsável por uma gama diversificada de eventos de sinalização dentro das células, que pode ser benéfico quando age localmente nos tecidos, mas pode ser altamente prejudicial quando liberado de forma sistêmica. Essa citocina é um mediador inflamatório produzida por macrófagos, sendo que monócitos, neutrófilos, linfócitos T e células *natural killers* (NK), após estimulação por LPS, também o sintetizam durante a inflamação aguda (6,15).

A ativação da via do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B, do inglês, *nuclear factor kappa B*) é também um dos marcadores do envelhecimento e pode ser considerado como o regulador mestre do processo inflamatório, por regular a transcrição de várias moléculas envolvidas na resposta inflamatória, tais como TNF- $\alpha$  e as interleucinas. O processo de envelhecimento aumenta a atividade NF- $\kappa$ B através de um aumento da atividade transcricional (4,5).

### 1.3 SISTEMA IMUNOLÓGICO E IMUNOSSENESCÊNCIA

O sistema imunológico é uma organização de células e moléculas com papéis especializados na defesa contra infecções. Esse sistema integra e contribui com outros sistemas do organismo, como o sistema circulatório, sistema linfático, vários órgãos e tecidos linfoides, e as células hematopoiéticas especializadas que se movimentam entre estes (16).

Existem dois tipos de respostas imunológicas fundamentalmente diferentes: as respostas inatas e adquiridas, e geralmente essas trabalham em conjunto. As respostas inatas em que usam células fagocitárias (neutrófilos, monócitos e macrófagos), células que liberam mediadores inflamatórios (basófilos, mastócitos e eosinófilos) e células NK. Além da resposta celular, a imunidade inata inclui as proteínas do sistema complemento, proteínas de fase aguda e citocinas. Em contraposição à resposta inata, a resposta imune adaptativa depende da ativação de linfócitos B e T, e das moléculas solúveis por eles produzidas. As principais características da resposta adquirida são: especificidade e diversidade de reconhecimento, memória, especialização de resposta, autolimitação e tolerância a componentes do próprio organismo (17,18).

Os linfócitos B são células que secretam imunoglobulinas, anticorpos específicos para antígenos, responsáveis pela eliminação de microrganismos extracelulares. As células T ajudam as células B a produzir anticorpos e também podem erradicar patógenos intracelulares ativando macrófagos e matando células infectadas por vírus (16,19).

O tecido linfoide é um tecido no qual são encontrados linfócitos. Os tecidos linfoides se organizam desde arranjos difusos de células individuais até órgãos encapsulados. Esse tecido

encontra-se distribuído pelo organismo. Os órgãos e tecidos linfoides são classificados em órgãos linfoides primários (ou germinativos) e órgãos secundários (20). Os órgãos linfoides primários são o principal sítio de desenvolvimento de linfócitos, e neles os progenitores linfoides proliferam e amadurecem em células funcionais e que inclui a expressão inicial dos receptores antigênicos (19). Nesses locais, as células que reconhecem auto antígenos são destruídas e as células que reconhecem antígenos estranhos continuam o processo de amadurecimento. Este processo em células funcionais é procedente da geração de seus receptores de linfócitos B e T (respectivamente, BCR e TCR, do inglês *B cell receptor and T cell receptor*) que irão atuar no reconhecimento de antígenos. Em mamíferos, a medula óssea é o tecido linfóide primário onde surgem todos os linfócitos, enquanto os linfócitos T amadurecem no órgão linfóide primário conhecido como timo (21).

A medula óssea é o local de hematopoiese e diferenciação das HSC. Em humanos, os progenitores linfoides representam menos de 10% de todas as células da medula óssea; o restante é composto de 60 a 70% de células da linhagem mieloide, 20 a 30% de células da linhagem eritroide e menos de 10% de outras células, tais como células reticulares e adipócitos (22,23). Em contrapartida, em murinos, a quantidade dessas células progenitoras é diferente, compreendendo 20 a 50% de células da linhagem eritroide, 30 a 50% para a linhagem mieloide e menos de 30% das células são da linhagem linfóide (24,25). Além disso, A celularidade da medula óssea é mais elevada em murinos do que em outras espécies, e não diminui com o avanço da idade, como acontece nos seres humanos, mas a capacidade proliferativa das células tronco hematopoiéticas é reduzida (25).

Dentro da cavidade central de certos ossos está a medula, que pode ser amarela ou vermelha. A medula amarela geralmente apresenta função hematopoiética inativa, mas contém números significativos de adipócitos que atuam na reserva energética (26). A presença medula óssea vermelha é observada apenas no recém-nascido, e com o passar dos anos, a mesma é substituída pela amarela, presente em indivíduos adultos. A medula óssea vermelha está restrita a algumas regiões, como vértebras, costelas, esterno, crista ilíaca, ossos do crânio e nas epífises do fêmur e úmero (23). A medula vermelha se encontra nas cavidades criadas pelas trabéculas (cordões finos de osso semelhantes ao favo de mel), e entre essas cavidades trabeculares são formados os cordões hematopoiéticos, onde a HSC apresenta a propriedade de autorenovação e diferenciação. À medida que as células hematopoiéticas atingem a maturidade, elas deixam os cordões hematopoiéticos, e migram em direção à circulação sistêmica. Enquanto os linfócitos B são produzidos e amadurecem na medula óssea, os linfócitos T e outras células seguem para os seus sítios de maturação (27).

O timo é o sítio de seleção e de maturação dos timócitos, onde apenas as células T que sobrevivem à seleção tímica se tornarão imunologicamente competentes. Cada lobo do timo é encapsulado e é composto de múltiplos lóbulos, que são separados por tecido conjuntivo trabecular. E no interior de cada lóbulo, os timócitos estão organizados no córtex externo e na medula interna, densamente e parcialmente preenchidos, respectivamente. O córtex denso contém a maioria dos timócitos relativamente imaturos em proliferação, enquanto na medula encontram-se as células maduras (21,28,29). Os timócitos, ao passar do córtex para a medula, em desenvolvimento interagem e são apoiados por uma estrutura estromal de células epiteliais, células dendríticas e macrófagos. As células epiteliais que esgotaram sua função de suporte dentro do timo degeneram, formando os corpúsculos de *Hassall* encontrados na medula (17,21,23). Logo depois, os linfócitos recém produzidos deixam os tecidos linfoides primários e migram através do sangue e da linfa para os tecidos linfoides secundários (30).

Os órgãos linfoides secundários podem ser órgãos encapsulados e bem estruturados, como os linfonodos e o baço, mas também podem ser formados por acúmulos não encapsulados de tecido linfoide associado às mucosas disperso pelo organismo, os quais são chamados de tecido linfoide associado às mucosas (MALT, do inglês *mucosa associated lymphoid tissue*) e tecido linfoide associado à pele (SALT, do inglês *skin associated lymphoid tissue*) (15).

Esses dois tecidos linfoides podem ser vistos como as segundas linhas de defesa do corpo após suas barreiras anatômicas e fisiológicas passivas. As populações de células imunológicas do MALT e do SALT estão situadas nos pontos mais comuns de entrada de antígenos, atrás das membranas mucosas do trato respiratório, gastrointestinal e urogenital, e logo abaixo da pele (15,23).

O principal local para a ativação de linfócitos durante a resposta imune adaptativa é o gânglio linfático. O antígeno que passa pelas defesas inatas do corpo e entra nos tecidos é coletado na linfa, depois entra em um linfonodo e interage com linfócitos, células dendríticas e macrófagos dentro do linfonodo. As células dendríticas englobam o antígeno, processam-no e o apresentam às células imunes dentro do nódulo, ativando estas células e iniciando uma resposta primária (23,31).

O baço também faz parte dos órgãos linfoides secundários. Na vida fetal, este órgão auxilia na hematopoiese; e logo após, assume a função de defesa do organismo contra patógenos e antígenos que apresentam disseminação hematogênica. Diferentemente da espécie humana, o baço de camundongos continua a ser um local ativo da hematopoiese ao longo da vida, compreendendo 30% da produção de precursores mieloides, eritroides e de megacariócitos (25).

A camada externa do baço consiste em uma capsula de fibras colagenosas que penetram no parênquima esplênico formando pequenas trabéculas. Estas juntamente com uma rede reticular sustentam uma variedade de células encontradas no interior do baço: a polpa branca e a polpa vermelha (21,32).

Polpa branca compreende as regiões esplênicas que contêm as arteríolas esplênicas com suas bainhas de tecido linfoide superior, os folículos e a zona dos alvéolos. Essa polpa compõe 20% do baço e contém grande concentração de linfócitos. A polpa vermelha é formada por sinusóides (capilares arteriais) e cordões esplênicos contendo retículos ao redor de coleções de eritrócitos, células reticulares, fibroblastos, macrófagos e linfócitos. Nessa polpa predomina eritrócitos, e está envolta da polpa branca e funciona principalmente na filtragem do material particulado do sangue e na eliminação de eritrócitos e leucócitos senescentes ou defeituosos (21,30).

O compartimento linfocitário total no baço é composto por 40% de células B, 50% de células CD4<sup>+</sup>, 10% de células CD8<sup>+</sup> e menos de 5% de células NK. Cerca de um terço de todos os linfócitos circulantes do corpo são encontrados no baço, e mais linfócitos passam através do baço do que em todos os nódulos linfáticos combinados (15,23).

As células imunes também estão propensas aos efeitos senescentes, denominados de imunossenescência (33). Esse conceito foi proposto pela primeira vez por Walford em 1964, definindo-o como um processo natural, com disfunção imunológica e a remodelação dos órgãos linfoides, levando a mudanças nas funções imunes e está associado ao declínio da imunidade inata e adaptativa durante o envelhecimento (34).

O processo de imunossenescência é regulado por muitos fatores, incluindo o próprio envelhecimento, a inflamação crônica, mudanças sistêmicas e no microambiente celular. Há três teorias que explicam esse fenômeno: A autoimunidade, a imunodeficiência e a desregulação (23).

A teoria da autoimunidade, a qual também foi proposta por Walford, concerne que o sistema imunológico tende a perder a eficiência e experimenta disfunção generalizada, evidenciada por reações imunológicas contra antígenos próprios, que podem ser pelo acúmulo de células imunossenescentes em tecidos, e esses processos podem contribuir de forma combinada ou isolada (23,33). A teoria da imunodeficiência compreende a deficiência do sistema imune de desenvolver respostas imunológicas primárias contra novos antígenos, o que resulta em uma alta suscetibilidade a doenças infecciosas e não infecciosas (35). Por fim, a teoria da desregulação é apoiada por uma perturbação no equilíbrio da expressão dos receptores, como os do tipo Toll (TLR, do inglês *Toll like receptors*) e do tipo NOD (NLR, *NOD like*

*receptors*), em que, durante o processo de envelhecimento, contribui para a falta de reconhecimento efetivo de patógenos invasores. Este efeito resulta na ativação desordenada das células imunes, e contribui negativamente para a morbidade e mortalidade em uma idade avançada (36,37).

O envelhecimento está associado a uma maior suscetibilidade a infecções e doenças. Ele também está associado a uma funcionalidade reduzida e na distribuição alterada das células imunes, especialmente os linfócitos T e B (37).

De todas as mudanças associadas à idade no sistema imunológico, a regressão do timo deve ser a mais dramática e reconhecível. Nesse órgão há uma diminuição do espaço epitelial tímico e da celularidade tímica, coletivamente chamada de involução tímica. No processo da involução tímica ocorre a perda do espaço epitelial tímico causada pela redução bruta do tamanho e aumento do espaço perivascular que é progressivamente substituído por gordura. Apesar da redução da área tímica funcional, o timo envelhecido ainda demonstra produção de linfócitos T, embora em taxas decrescentes de linfócitos naïve e acúmulo de células clonais (31).

Alterações nas células T podem ser observadas como uma redução dos receptores de membrana como o CD28 (importante na ativação e sobrevivência linfocitária) e o CD27 (importante na capacidade proliferativa de linfócitos T). Além da diminuição dos níveis intracelulares de cálcio, e alterações nas vias de transdução de sinal NF- $\kappa$ B e da p53. Outra característica é a linfopenia das células T CD4<sup>+</sup> e a fraca resposta imunológica e acúmulo das T CD8<sup>+</sup> (32,38).

As células B são afetadas de forma diferente com a idade, em que são descritas mudanças no compartimento das células B e carência da imunidade humoral. Embora o número total de células B maduras decresça com a idade, existem estudos conflitantes sobre a proporção dessas células no estado naïve e de memória. Na medula óssea, o número de plasmócitos diminui e esta redução da expansão clonal das células resulta em uma baixa afinidade dos anticorpos aos antígenos. Além disso, há uma diminuição nas trocas de classe de células B ativadas e também existe um típico microambiente inflamatório (38).

O impacto do envelhecimento nas células B periféricas é multifacetado porque o número dessas células exportadas da medula óssea já está reduzido, agravando os defeitos imunes. Em camundongos idosos e em humanos, apesar de haver um declínio na produção de linfócitos B, o número desses linfócitos periféricos permanece relativamente constante. Uma razão poderia ser que o pool de células periféricas B já está saturado, de forma semelhante ao que acontece na homeostase das células T, entretanto, outra explicação possível é que os linfócitos B

periféricos refletem uma diminuição da geração desses linfócitos e um aumento na longevidade dessas células. Muitos outros defeitos intrínsecos das células B também foram relatados, incluindo a produção de anticorpos independente da célula T, interações defeituosas das células T e B, redução de moléculas coestimuladoras, defeitos na sinalização do BCR, perturbação no centro germinativo, e comprometimento da imunidade humoral, com produção em baixos títulos, perda da diversidade e afinidade das imunoglobulinas (36,39,40).

#### 1.4 AUTOFAGIA

A autofagia (da palavra grega *αυτό*, que significa “eu” e *φαγία*, que significa “comer”), é um processo celular regulado através do qual as células degradam componentes citoplasmáticos desnecessários ou disfuncionais, tais como proteínas e organelas danificadas. Este fenômeno foi observado inicialmente por Keith R. Porter e Thomas Ashford no Instituto Rockefeller em 1962 (41,42).

O processo autofágico é um mecanismo de degradação catabólico, conservado e rigorosamente regulado pelo qual as células mantêm sua homeostase e degradam proteínas comprometidas ou disfuncionais, bem como organelas danificadas através de maquinaria lisossômica para fornecer material biológico e energia para atender a demanda celular durante a privação de nutrientes, síndrome metabólica ou estresse oxidativo (43).

Diferentes mecanismos para a entrega de componentes intracelulares (proteínas e organelas) a lisossomos para degradação coexistem em quase todas as células e estabelecem a base para caminhos autofágicos distintos (9). As vias autofágicas são utilizadas pelas células e são classificadas em três tipos: microautofagia, autofagia mediada por chaperonas e macroautofagia. Essas diferem nas sequências dos eventos, dos substratos envolvidos e do mecanismo de englobamento dos componentes citoplasmáticos pelos lisossomos (44,45).

A microautofagia, foi originalmente descrita em mamíferos, no entanto, estudos posteriores em leveduras possibilitaram elucidar melhor esse processo, sendo caracterizado como uma via conservada e essencial para a sobrevivência sob condições em que as células se encontram com escassez de nutrientes (46). Esse mecanismo autofágico envolve o sequestro de componentes citoplasmáticos diretamente no lisossomo, com posterior atividade degradativa de hidrolases ácidas (47).

A autofagia mediada por chaperonas (CMA, do inglês *chaperone mediated autophagy*), apenas é observada em células de mamíferos. Esta é altamente seletiva para proteínas citosólicas solúveis, as quais são selecionadas por meio de um mecanismo dependente de chaperona, direcionadas aos lisossomos para serem degradadas, e nesse processo a formação

de vesículas não é necessário (48). A CMA é mediada por chaperonas específicas, que permitem a translocação de determinadas proteínas para o lúmen lisossomal através da membrana, por interação com o receptor de membrana associada ao lisossoma tipo 2A (LAMP-2, do inglês *lysosomal associated membrane protein 2*), resultando no desenrolamento das proteínas e sua degradação (47,48).

A macroautofagia (doravante como autofagia) é o processo autofágico mais estudado, melhor caracterizado e compreendido, principalmente em relação ao metabolismo, morte celular, regulação e controle molecular da autofagia (49). Esse mecanismo é o principal caminho lisossômico para a rotatividade dos componentes citoplasmáticos, exercendo funções fisiológicas importantes na renovação de proteínas e no controle de qualidade e manutenção das organelas, o qual prossegue através de uma série de etapas sequenciais, como o englobamento dos componentes citoplasmáticos formação do fagossomo, formação e maturação do autofagossomo, nucleação, e finalmente, a fusão do lisossomo (48,50). A caracterização molecular detalhada desse processo e o desenvolvimento de métodos para monitorar e manipular a atividade autofágica tanto em sistemas *in vitro* quanto em modelos animais experimentais produziram avanços na compreensão da base molecular, regulatória e das vias de sinalização da autofagia (51).

Os mecanismos moleculares da autofagia foram conservados ao longo do tempo, existindo no genoma de diversos organismos um conjunto de genes denominados de genes relacionados à autofagia (ATG, do inglês *autophagy related gene*) (52). Os genes da autofagia foram descobertos pelo trabalho pioneiro do Professor Yoshinori Ohsumi sobre leveduras. A triagem de mutantes da levedura *Ihe* permitiu identificar o primeiro gene de autofagia APG1, atualmente conhecido como ATG1. Além disso, mais de 30 genes ATG foram caracterizados em diferentes grupos de *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* e *Hansenula polymorpha* *Saccharomyce* (53).

O mecanismo completo de autofagia pode ser dividido em pelo menos cinco processos funcionais definidos como: [1] indução e iniciação da autofagia; [2] nucleação de membrana dupla e formação de um pré-fagossomo; [3] alongamento do fagossomo e sequestro do alvo citoplasmático; [4] expansão, finalização da vesícula, direcionamento, ancoragem e fusão do autofagossomo com os lisossomos; [5] degradação do alvo sequestrado no autolisossomo e reciclagem (46,49,51,54). As proteínas Atgs participam da organização dos complexos funcionais que controlam e regulam este processo desde a indução até a quebra da vesícula. A formação do autofagossomo é facilitada pela formação de uma membrana limitante, caracterizada pela organização de complexos modulatórios e quinase em torno de estruturas de

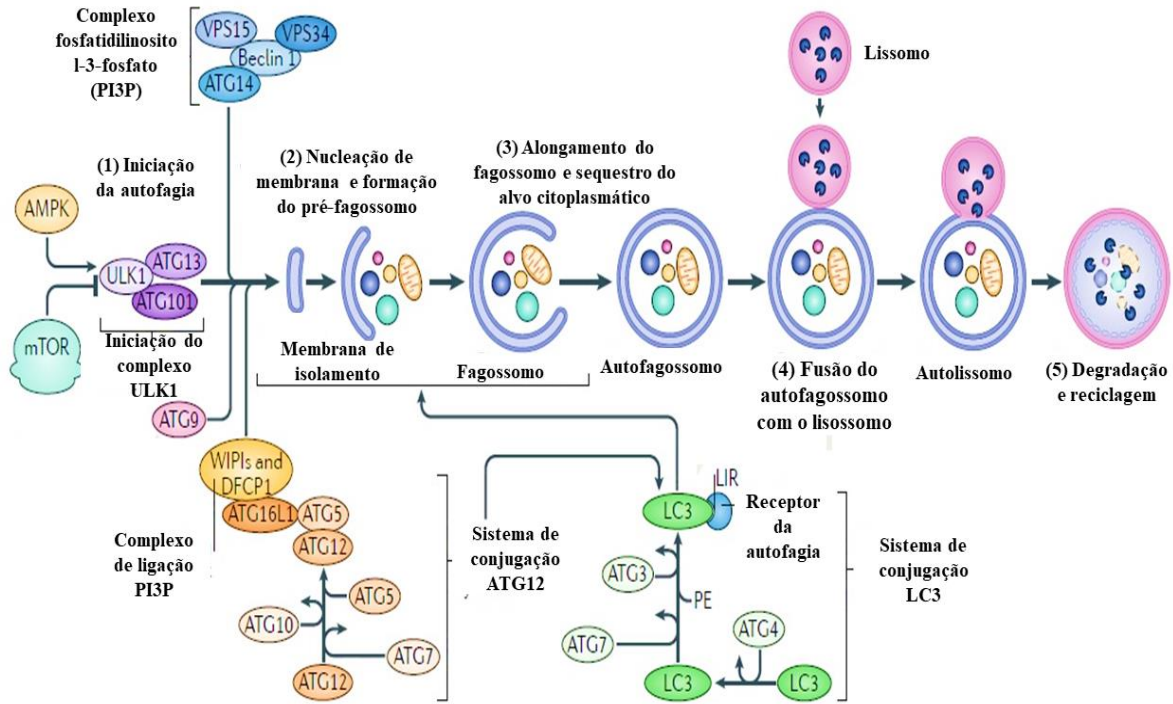


membranas que são derivadas de membranas de organelas, como a do retículo endoplasmático, do aparelho de Golgi e das mitocôndrias (55)

Nas fases de indução e desenvolvimento englobam a formação de estrutura com membrana lipídica dupla, denominada fagossomo. O fagossomo inicia-se com uma estrutura denominada sítio de montagem do fagossomo (PAS, do inglês *phagosome Assembly Site*) (46). Em mamíferos, as proteínas envolvidas nesta etapa inicial são a fosfatidilinositol 3-quinase de classe III (PI3K3 do inglês *class III phosphatidylinositol-3 kinase*), também conhecida como Vps34; a proteína Beclin-1 (mAtg6), p150 (subunidade reguladora da Vps34), mAtg14L, e entre outras (48,56). O complexo formado pelas proteínas Beclin-1, p150, Vps34 e mAtg14L leva à formação de fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P, do inglês *phosphatidylinositol-3-phosphate*), o que resulta no local de nucleação do fagossomo (formação do PAS) (48). A partir do PAS, ocorre reconhecimento dos materiais a incluir no fagossomo e segue-se a fase de alongamento). O complexo de iniciação de quinase 1 e 2 tipos unc-51 (ULK1 e ULK2, do inglês *UNC-51-like kinase1 and 2*) fosforila Beclin1, onde ocorre a ativação do complexo de enzimas chamadas fosfatidilinositol 3-quinases (PIK3, do inglês *phosphatidylinositol-3 kinase*) e faz o recrutamento de proteínas Atg para a expansão da membrana lipídica para a formação do autofagossomo, nos mamíferos a ULK1 é conhecida como mAtg 1 (57).

A expansão da membrana autofágica é mediada pela interação do complexo Atg5, Atg12 e Atg16l, e consequente interação com o autofagossomos (58). A conjugação desse complexo requer a ação da Atg7 que tem ação semelhante à enzima ativadora da ubiquitina do grupo E1 (44). A Atg7 ativa primeiro Atg12, seguido pela conjugação da Atg5 por Atg10 e por último a ligação de Atg16 ao complexo que posteriormente permite a inserção da proteína associada a microtubos de cadeia leve beta III (MAP1LC3B/LC3B, do inglês, *microtubule-associated protein 1 light chain beta III*), comumente chamada LC3B e Atg8, à membrana do fagossomo. A proteína Atg4 atua na clivagem da LC3B, é sintetizada como pro-LC3, gerando a forma ativa LC3-I no citosol (59). Posteriormente, os lipídios são incorporados no LC3-I pela ação de Atg7 e Atg3 a membrana do fagossomo. A ligação de LC3-II ao fagossomo é necessária para o fechamento da vesícula (58). Após a formação do autofagossomo, o complexo Atg5/Atg12/Atg16 é dissociado e o LC3-II é liberado da membrana externa. Este autofagossomo é fundido com lisossomos pela ação das proteínas relacionadas à Ras Rab-7 (Rab7, do inglês *Ras-related protein Rab-7*) e LAMP-2A (55). Finalmente, os substratos são degradados pela ação das enzimas lisossomais no autofagolisossomo e os produtos liberados no citoplasma. A LC3B é a única proteína Atg que se encontra em células eucariontes associados ao autofagossomo maduro e sua quantificação é normalmente utilizada para estimar

a abundância dos mesmos. Após a fusão do autofagossomo, a própria LC3B pode ser degradada pela autofagia indicando que é um substrato autofágico (60) As etapas do mecanismo da autofagia é observado na **Figura 1**.



**Figura 1 - Etapas dos mecanismos autofágicos.**

(1) indução e iniciação da autofagia; (2) nucleação de membrana e formação de um pré-fagossomo; (3) alongamento do fagossomo e sequestro do alvo citoplasmático; (4) finalização da vesícula e fusão do autofagossomo com o lisossomo; (5) degradação do alvo sequestrado no autolisossomo e reciclagem. mTOR: proteína alvo mecanicista da rapamicina em mamíferos. AMPK: proteína quinase ativada por AMP. ULK1: complexo de iniciação de quinase 1 tipo unc-51. ATG: proteína associada à autofagia. PI3P: complexo fosfatidilinositol-3-fosfato. VPS34: fosfatidilinositol-3-fosfato de classe III. LC3: microtubos de cadeia leve.

Fonte: Adaptado de Hansen, M.; Rubinsztein, D.C.; Walker, D.W., 2018.

Diversos estímulos podem induzir ou acelerar o processo autofágico, como uma diminuição dos níveis normais dos nutrientes, fatores de crescimento, estresse celular, acúmulo de proteínas anormais, danos às organelas, infecção por patógenos, entre outros (61). A proteína quinase dependente de cAMP (PKA, do inglês *cAMP dependent protein kinase*), AMPK e a proteína mTOR regulam processo regulatório molecular da autofagia, em que a mTOR é a responsável pela síntese e degradação proteica (37).

A proteína mTOR é uma serina-treonina quinase pertencente à família das proteínas TOR, essa é conservada evolutivamente presente nas células eucarióticas. O nome mTOR é derivado de seu inibidor rapamicina, que foi inicialmente descrita como uma droga antifúngica (62).

A via mTOR é composta por dois complexos distintos: a mTOR1 e mTOR2. O complexo mTORC1 é constituído pela proteína regulatória associada à mTOR (Raptor, do inglês *regulatory-associated protein of mTOR*), alvo da subunidade do complexo rapamicina LST8

(mLST8, do inglês *mammalian lethal with Sec13 protein 8*), a proteína de interferência Tti1 e a proteína de manutenção telomérica Tel2, a proteína que interage com domínio contendo mTOR (DEPTOR, do inglês *domain containing mTOR-interacting protein*) e substrato de Akt rico em prolina de 40 kDa (PRAS40, do inglês *prolinerich Akt substrate 40 kDa*) (63). Esse complexo estimula o crescimento celular, aumenta a síntese e participa na degradação de proteínas, inibe autofagia e pode ser ativado por aminoácidos e fatores de crescimento; enquanto o complexo mTORC2 é formado pelas proteínas: mTOR, mLST8, companheiro insensível de mTOR (RICTOR, do inglês *rapamycin insensitive companion of mammalian target of rapamycin*), proteína 1 associada à proteína quinase ativada por mitógeno 1 (MAPKAP1, do inglês *mitogen activated protein kinase associated protein 1*) e proteína rica em prolina 5 (PRR5, do inglês *Proline Rich 5*). O mTORC2 participa da sobrevivência celular e organização do citoesqueleto (64,65). Os complexos mTORC1 e mTORC2 diferem em sua localização e na regulação, no entanto ambos são induzidos pela carência de nutrientes, redução da concentração de fatores de crescimento e estresse (57).

O complexo mTORC1 é um componente “chave” na autofagia, em que sob condições ricas em nutrientes, participa do crescimento celular e suprime a autofagia, levando a hiperfosforilação da ULK1 e Beclin1, corroborando para inibição da atividade de Vps34 na autofagia (66). Dessa forma, o complexo age como um empecilho na ativação da autofagia, que além de atuar nos principais componentes deste processo, ainda participa da inibição do fator de transcrição EB (TFEB, do inglês *transcription factor EB*), regulando, portanto, a família dos genes ATG para ativação da autofagia. Em uma condição pobre em nutrientes, mTORC1 é inibido e a autofagia é induzida para fornecer fonte de energia para as células. A maioria dos indutores do processo autofágico opera inibindo esse complexo, o que leva à ativação de ULK1 e da cascata de eventos para formação do fagossomo (59,60).

O principal regulador da via de sinalização mTOR é o complexo de esclerose tuberosa (TSC, do inglês *tuberous sclerosis complex*), constituído por TSC1 (hamartina) e TSC2 (tuberina). O TSC contém um domínio ativador GTPases (GAP, do inglês *GTPase activating proteins*), resultando na conversão da pequena GTPase Ras homólogo enriquecido no cérebro (Rheb do inglês, *Ras homolog enriched in brain*) na sua forma inativa (ligada a GDP). Através da inativação da Rheb, o complexo TSC atua inibindo mTORC1 (43). Em condições de nível energético celular normal, o TSC1 é inibido pela proteína Akt e o TSC2 é inibido pela enzima AMPK (quando ATP/AMP é elevada). Essa dupla inibição resulta na manutenção da Rheb, e consequente da mTOR, nas suas formas ativas (64).

## 1.5 RAPAMICINA

O estudo da regulação molecular da autofagia avançou com os estudos da inibição da proteína mTOR a partir das propriedades da rapamicina, também conhecida como sirolimus.

A rapamicina foi inicialmente descoberta como um metabolito antifúngico produzido por *Streptomyces hygroscopicus* a partir de uma amostra de solo da Ilha de Páscoa (também conhecida como Rapa Nui) (62). Em 1997, a rapamicina foi aprovada pela Administração de Alimentos e Medicamentos dos EUA (FDA, do inglês *Food and Drug Administration*) como um medicamento imunossupressor para prevenir a rejeição de órgãos durante transplantes, principalmente transplantes de rim (67). Posteriormente, descobriu-se que além das propriedades imunossupressoras, a rapamicina possuía efeitos antiproliferativos em células de mamíferos. Além disso, já foi demonstrado que a rapamicina era um potente inibidor da ativação da proteína ribossomal S6 quinase beta-1 (S6K1, do inglês *ribosomal protein S6 kinase*), também conhecida como p70S6 (62,67).

O sirolimus forma um complexo de ganho de função com a proteína de ligação ao FKBP de 12 KDa, e este complexo se liga e age especificamente como um inibidor alostérico da mTOR, o que resulta no complexo de rapamicina-FKBP12, que por sua vez, inibe a atividade quinase da proteína mTOR, e conseqüentemente mimetiza a escassez de nutrientes (68). Durante as duas últimas décadas, diversos estudos correlacionam os efeitos da inibição do mTOR por rapamicina para entender os efeitos nos fatores de crescimento, na sensibilidade a nutrientes, metabolismo energético, autofagia, longevidade, atraso do envelhecimento e senescência celular (69).

Dessa forma, uma investigação dos efeitos da rapamicina na regulação do fenótipo imunossenesciente pode contribuir na compreensão da relação entre esses fenômenos que afetam as células do sistema imunológico durante o processo de envelhecimento.

## 2 OBJETIVO GERAL

No presente trabalho, objetivamos investigar a regulação da imunossenescência em órgãos linfoides de camundongos propenso e resistente à senescência acelerada tratados com rapamicina.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Verificar as alterações no perfil corporal e hematimétrico dos animais ao longo do tratamento com rapamicina;
- II. Avaliar o perfil de citocinas;
- III. Observar as modificações histológicas em órgãos linfoides primários (medula óssea e timo) e secundário (baço);
- IV. Analisar as populações de células linfoides e mieloides;
- V. Avaliar a capacidade proliferativa de linfócitos *in vitro*.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MODELO ANIMAL

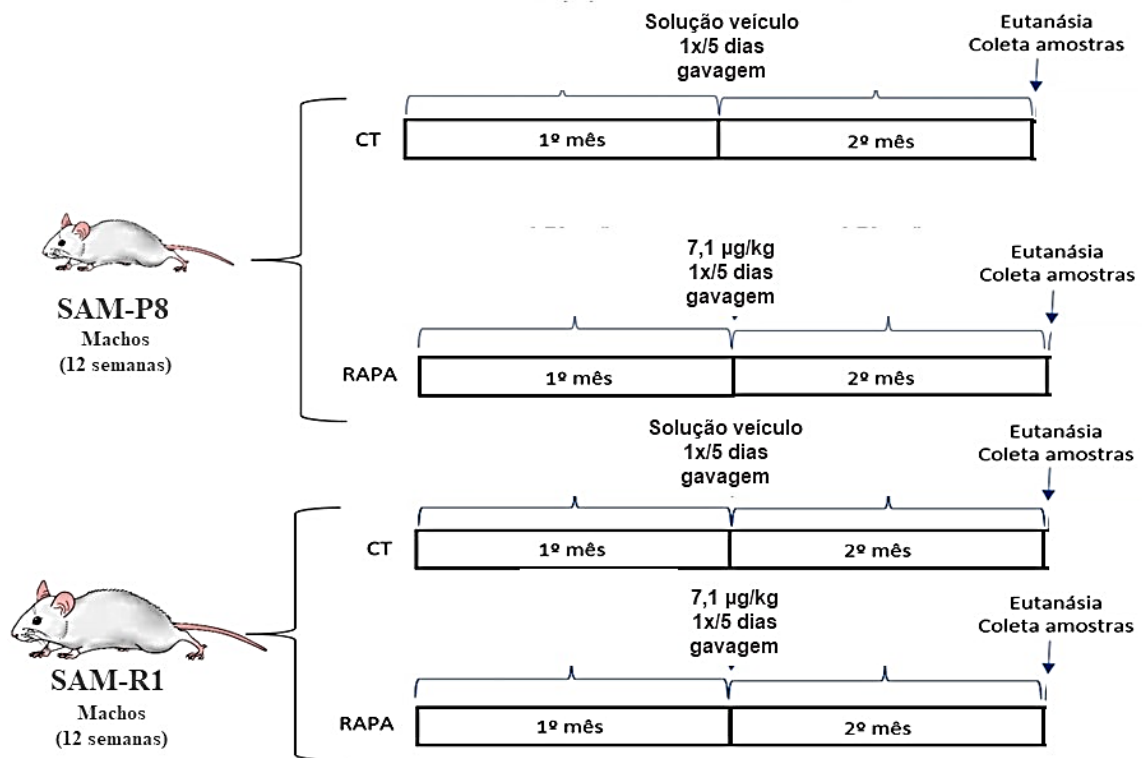
Para condução desse estudo, utilizamos camundongos, machos com 12 semanas de idade, das linhagens de senescência acelerada (SAM-P8, do inglês *Senescence-Accelerated Prone 8 Mouse*) e resistentes à senescência (SAM-R1, do inglês *Senescence-Accelerated Resistant 1 Mouse*). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada, ciclo circadiano claro/escuro de 12 horas, com o acesso a água e alimentação por *ad libitum*. Todos os protocolos seguiram aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP), sob o CEUA nº 632/2021 e da Faculdade de Ciências Biomédicas (ICB/CEUA), sob o número 4116171120/2020.

#### 3.2 MENSURAÇÃO DA MASSA CORPORAL

A variação da massa corpórea dos animais foi acompanhada por meio da balança digital disponibilizada no biotério da FCF, uma vez a cada dez dias, durante os dois meses do estudo. A primeira avaliação ocorreu quando os animais apresentavam 12 semanas de idade (adotada como dia 0) a última ocorrendo no dia anterior a eutanásia e coleta de amostras biológicas (adotada como dia 60), em que os animais estavam com a idade de 20 semanas.

#### 3.3 PROTOCOLO DE ADMINISTRAÇÃO DA RAPAMICINA

Na elaboração do protocolo de administração da rapamicina, adaptamos as metodologias utilizadas nos estudos prévios de Arriola et al. (2016), Xu et al. (2020) e Zhang et al. (2012) (70–72). A Rapamicina (invivoGen, Toulouse, France) foi diluída em 550  $\mu$ l de DMSO (dimetilsulfóxido), seguindo as recomendações do fabricante, e em seguida a concentração da dose a ser administrada foi calculada a partir do peso do animal. Nos animais do grupo tratado, administramos a dose de 7,1  $\mu$ g/kg de rapamicina diluída em 150  $\mu$ L de água filtrada. Os animais do grupo controle receberam, no lugar do fármaco, apenas solução veículo (água filtrada). A administração ocorreu pelo procedimento de gavagem, uma vez a cada 5 dias, durante 2 meses, totalizando treze administrações de rapamicina. Os grupos experimentais estão representados na **Figura 2**.



**Figura 2 - Disposição dos grupos experimentais e protocolo de tratamento com RAPA.**

Os animais SAM-P8 e SAM-R1, machos com 12 semanas de idade, do grupo tratado com rapamicina (RAPA) receberam a administração de 7,1 µg/kg de RAPA diluída em 150 µL de água filtrada pelo método de gavagem, enquanto os animais do grupo controle (CT) receberam apenas solução veículo. O protocolo consistiu na administração de RAPA uma vez a cada 5 dias, ao longo de dois meses. A eutanásia e coleta de amostras biológicas ocorreram no dia posterior à última administração do fármaco.

Fonte: Próprio autor

### 3.4 EUTANÁSIA, COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

No dia posterior a última administração da rapamicina, realizamos o procedimento de eutanásia, onde os animais foram acondicionados em câmaras fechadas com ar saturado (gás isoflurano mergulhado em gaze) e após estarem anestesiados seguiu-se com a técnica de deslocamento cervical. Os ossos femoral e tibial foram removidos e canal medular lavado com 1 ml de tampão RIPA (50 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% Triton X-100, 0,1% SDS suplementado com comprimido contendo inibidor de protease) e armazenados em tubos de 2 ml. O timo e baço foram coletados em tubos de 2 ml, armazenados em nitrogênio líquido e posteriormente foi adicionado 1 ml de tampão RIPA nos tubos contendo os órgãos. Posteriormente, as amostras foram processadas com o auxílio do homogeneizador polytron (polytron® PT 2500, Thomas Scientific, New Jersey, EUA), seguida pelas etapas de centrifugação (2.000 RPM por 5 minutos e 12.000 RPM por 20 minutos) e com a obtenção do sobrenadante do homogenato. As amostras processadas foram armazenadas à -80° C até as análises futuras de quantificação de proteínas e citocinas.

### 3.5 AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA

A coleta de sangue total ocorreu em dois momentos distintos, antes de iniciar o tratamento com RAPA e após a eutanásia dos animais, respectivamente por punção caudal e cardíaca. O sangue total coletado foi armazenado em tubo contendo EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*) a 10% e a análise do hemograma foi realizada no analisador hematológico automático BC-2800Vet (Mindray® animal care, China).

### 3.6 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS E DE CITOCINAS

O sangue total coletado dos animais após a eutanásia, como descrito no item 3.5, foi armazenado em tubos (sem EDTA), e posteriormente a amostra foi centrifugada a 3.000 RPM por 10 minutos, obtendo-se o soro de cada amostra, o qual foi congelado à -80° C.

O soro e os homogenatos obtidos segundo o item 3.4 foram descongelados no gelo e quantificadas com o kit *BCA Protein Assay* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Após, seguiu-se com a dosagem das citocinas do padrão SASP (IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ) em amostras de soro, medula óssea, timo e baço; enquanto as citocinas IL-7 e IL-15 foram analisadas em amostras da medula óssea. A dosagem de citocinas foi realizada pelo kit *ELISA Duo-set* (R&D Systems, Minnesota, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A leitura de absorvância foi realizada no espectrofotômetro de microplaca Epoch (Agilent Technologies, CA, EUA).

### 3.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS TECIDOS

Para a análise histológica, amostras da medula óssea, timo e baço foram coletadas e acondicionadas em tubos contendo solução Formol a 10% para serem fixadas. Após 24 horas de fixação, os materiais foram desidratados em etanol 70%, diafanizado em xilol e incluído em blocos de parafina. Depois da inclusão, foram obtidos cortes transversais dos tecidos, com aproximadamente 3  $\mu$ m de espessura, os quais foram posteriormente corados com hematoxilina e eosina (HE). As lâminas histológicas foram analisadas por microscopia óptica.

### 3.8 OBTENÇÃO DE CÉLULAS DO TIMO E BAÇO

Os procedimentos de eutanásia e coleta do timo e baço dos animais foram realizados de maneira asséptica na cabine de fluxo laminar. Para a separação das células, os órgãos foram coletados em tubos de 50 ml e macerados em peneiras com poros de 40  $\mu$ m com ajuda do êmbolo da seringa. O material foi centrifugado, resuspenso em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*), o sobrenadante desprezado, as hemácias foram lisadas com tampão de ACK (*Ammonium-Chloride-Potassium*) (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA), e as



células foram armazenadas em PBS contendo 2% de soro fetal bovino. Posteriormente, seguiu-se com a diluição em líquido de Turk e a contagem celular em câmara de Neubauer.

### 3.9 CITOMETRIA DE FLUXO

Após a obtenção de células do baço, o volume das amostras foi ajustado para a concentração de  $1,5-2,0 \times 10^6$  células/ml e distribuído em placas de 96 poços, para assim seguir com a técnica de imunofenotipagem por citometria de fluxo. Realizamos o protocolo de marcação celular que consistiu na incubação das células com anticorpo (10  $\mu$ L de diferentes combinações de anticorpos por 30 minutos) conjugados com os fluorocromos correspondentes (BD Biosystems, New Jersey, EUA), demonstrado no **Quadro 1**, seguida das etapas de lavagens e centrifugações, finalizando com a fixação celular. Células não marcadas foram utilizadas para controle da autofluorescência. Por fim, os dados referentes às aquisições das células de interesse foram realizados em gráficos *dot plot* dos parâmetros de tamanho celular (*forward scatter*) versus granulosidade (*side scatter*), no aparelho FACSCanto™ II (BD Biosystems, New Jersey, EUA), e a análise dos resultados ocorreu no *software* FlowJo (versão 7.5.5), com as exclusões da aquisição de células mortas e de outras populações celulares (monócitos e granulócitos).

Quadro 1 - Anticorpos conjugados utilizados na imunofenotipagem de linfócitos T e B.

<b>População de Linfócitos</b>	<b>Anticorpo(s) conjugado(s) com fluorocromo(s)</b>
Linfócitos T	anti-CD3 FITC
Linfócitos T CD4 <sup>+</sup>	anti-CD3 FITC e anti-CD4 APCCY 7
Linfócitos T CD8 <sup>+</sup>	anti-CD3 FITC e anti-CD8 PECY 5
Linfócitos T reguladores	anti-CD3 FITC, anti-CD4 APCCY 7, anti-CD25 PB e anti-FoxP3 PE
Linfócitos B	anti-CD19 APC
Células mortas	Anti-Live/Dead BV510

### 3.10 AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DOS LINFÓCITOS *IN VITRO*

A partir das amostras do baço, o volume de células foi ajustado para concentração de  $1 \times 10^7$  células/mL distribuído em placas de 96 poços. A suspensão celular foi distribuída em alíquotas de 500  $\mu$ L em placas de 24 poços com fundo plano. Para se verificar a proliferação de linfócitos, as amostras foram divididas em dois grupos: grupo controle, onde as amostras foram cultivadas somente em meio RPMI completo; e o grupo estimulado com 1  $\mu$ g/mL de Concanavalina A (ConA), também cultivado em meio RPMI completo. As placas foram

incubadas em estufa a 37° C e com 5% de CO<sub>2</sub>, por 72 horas. Após as primeiras 48 horas de cultivo, acrescentamos aos poços 30 ul de resazurina a 10%; e no término das 72 horas, seguiu-se com a análise da absorbância no espectrofotômetro de microplaca Epoch (Agilent Technologies, CA, EUA).

### 3.11 MIELOGRAMA

Os ossos femoral e tibial foram removidos e o canal medular lavado com 3 mL de meio RPMI incompleto. As amostras foram então centrifugadas (1.500 rpm por 5 minutos, a 4 C°) e o sobrenadante descartado. As hemácias foram lisadas com 0,5 mL de tampão ACK por 2 minutos (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) e o conteúdo resuspendido em 1 mL de meio RPMI incompleto. Em seguida, seguiu-se com a diluição em líquido de Turk, com a contagem celular realizada na câmara de Neubauer, com o volume das amostras ajustado para  $4,0 \times 10^4$  células/ml. Posteriormente as lâminas foram preparadas na centrífuga de CytoSpin™ (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA), com o programa de rotação de 600 RPM por 5 minutos. Após a secagem das lâminas, elas foram coradas com o kit solução panóptico rápido (coloração hematológica estabelecida por Romanowsky), e as lâminas foram analisadas por microscopia óptica, com a contagem de 100 células por campo.

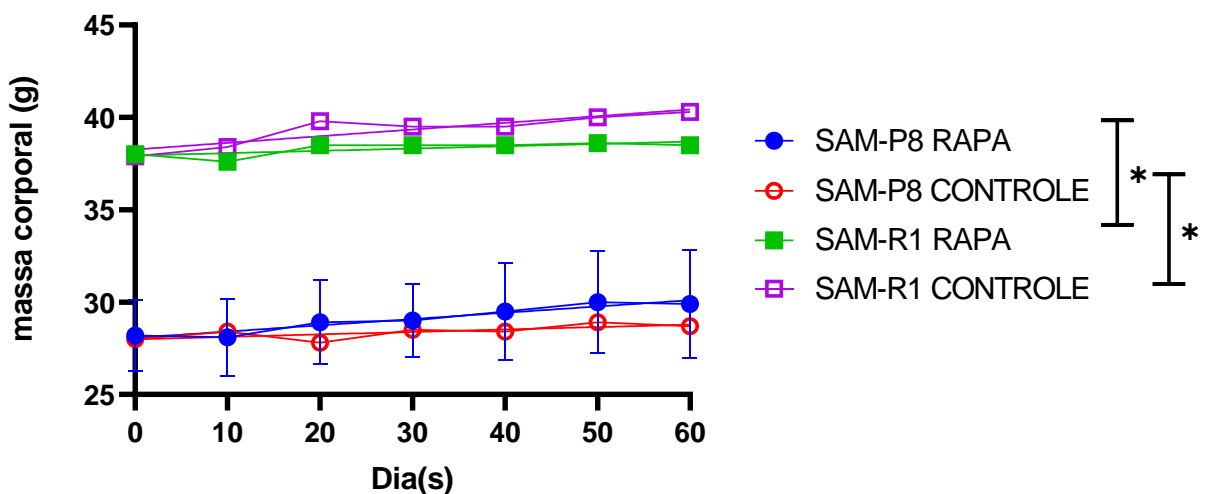
### 3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram processados e avaliados pela análise de variância (ANOVA) e pela correção de Tukey e Bonferroni no software GraphPad Prism 8.0 (La Jolla, CA, EUA). Os dados foram representados como média  $\pm$  erro padrão e os valores de  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) e de  $p < 0,001$  (\*\*\*) foram considerados significativos. Nas tabelas das análises de eritrograma, leucograma e celularidade, demonstrados nos resultados deste trabalho, a representação estatística foi realizada através do uso de letras, interpretando-se da seguinte forma: resultados com letras iguais possuem diferença estatística entre o (s) grupo (s) analisado (s); quando um grupo apresentar duas letras, como por exemplo “a,b”, significa diferença estatística com os grupos que possuem, respectivamente, apenas as letras “a” e “b”. Contudo, os resultados foram analisados da mesma maneira, utilizando-se a análise de variância (ANOVA) seguido pela correção de Tukey e Bonferroni no software GraphPad Prism 8.0 (La Jolla, CA, EUA), também considerando os valores de intervalos de confiança de 95%.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 MENSURAÇÃO DA MASSA CORPORAL

Durante os dois meses do tratamento com rapamicina, a variação da massa corpórea dos animais foi acompanhada uma vez a cada dez dias. A primeira avaliação ocorreu quando os animais apresentavam 12 semanas de idade (dia 0), enquanto a última foi avaliada quando os animais estavam com a idade de 20 semanas (dia 60). Constatamos que é possível observar que tanto os grupos SAM-P8 e SAM-R1 apresentaram aumento de massa, em relação ao início e ao término da análise, e que a variação da massa entre os mesmos grupos das duas linhagens apresentou resultado significativo, como é demonstrado na **Figura 3**. Os resultados de valores médios  $\pm$  SEM dos grupos SAM-P8 RAPA, SAM-P8 CT, SAM-R1 RAPA e SAM-R1 CT foram respectivamente:  $29,09 \pm 0,29$ ;  $28,38 \pm 0,14$ ;  $38,31 \pm 0,14$  e  $39,34 \pm 0,33$ .



**Figura 3 – Avaliação da evolução da massa corporal dos camundongos das linhagens SAM-P8 e SAM-R1.**

A avaliação da massa corpórea dos animais consistiu em intervalos de dez dias, em que a primeira ocorreu quando os animais apresentavam 12 semanas de idade (dia 0), as avaliações consecutivas ocorreram durante o protocolo de administração da rapamicina, enquanto a última foi avaliada quando os animais estavam com a idade de 20 semanas (dia 60), um dia antes da eutanásia. Todos os animais foram mantidos sob as mesmas condições ambientais, com temperatura controlada, ciclo circadiano claro/escuro de 12 horas, com o acesso a água e alimentação por *ad libitum*. n=10 camundongos por grupo. \*p < 0,05.

### 4.2 AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA

#### 4.2.1 Série eritrocitária

O hemograma foi realizado em dois momentos diferentes: um dia antes do início do tratamento e após a eutanásia dos animais.

Os parâmetros analisados foram: contagem total de eritrócitos (RBC, do inglês *red blood cells*), concentração de hemoglobina (HGB, do inglês *hemoglobin*), hematócrito (HCT, do inglês *hematocrit*), volume corpuscular das hemácias (MCV, do inglês *mean corpuscular volume*), hemoglobina corpuscular média (MCH, do inglês *mean corpuscular hemoglobin*), concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC, do inglês *mean corpuscular hemoglobin concentration*) e a amplitude de distribuição eritrocitária (RDW, do inglês *Red Blood Cell Distribution Width*). Os resultados desses parâmetros avaliados são demonstrados na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Avaliação do eritrograma dos camundongos das linhagens SAM-P8 e SAM-R1.

Parâmetro	PRÉ-TRATAMENTO				PÓS-EUTANÁSIA			
	SAM-P8		SAM-R1		SAM-P8		SAM-R1	
	Controle (n= 9)	RAPA (n=12)	Controle (n=9)	RAPA (n=10)	Controle (n=7)	RAPA (n=7)	Controle (n=8)	RAPA (n=8)
<b>RBC</b> (x10 <sup>12</sup> /L)	9,41 ± 0,33	8,85 ± 0,24	12,07 ± 2,37 <sup>(a)</sup>	9,57 ± 0,16	8,50 ± 0,41	8,15 ± 0,37	7,28 ± 0,28 <sup>(a)</sup>	7,56 ± 0,44
<b>HBG</b> (g/dL)	16,64 ± 0,28 <sup>(a)</sup>	15,12 ± 0,39	15,99 ± 0,81 <sup>(b)</sup>	16,48 ± 0,32	13,00 ± 1,15 <sup>(a)</sup>	13,66 ± 0,79	12,33 ± 0,56 <sup>(b)</sup>	12,46 ± 0,70
<b>HCT (%)</b>	50,93 ± 1,24	48,39 ± 1,50	47,36 ± 0,93	46,85 ± 0,80 <sup>(a)</sup>	45,57 ± 1,18	46,79 ± 3,87 <sup>(b)</sup>	40,58 ± 2,42	36,06 ± 2,14 <sup>(a,b)</sup>
<b>MCV (fL)</b>	53,46 ± 0,34	54,68 ± 0,45 <sup>(a)</sup>	48,81 ± 0,27 <sup>(b)</sup>	49,04 ± 0,28	54,19 ± 2,03	57,09 ± 2,38 <sup>(a,c)</sup>	55,95 ± 2,60 <sup>(b,d)</sup>	47,75 ± 0,37 <sup>(c,d)</sup>
<b>MCH (pg)</b>	17,30 ± 0,12 <sup>(a)</sup>	16,99 ± 0,13	17,16 ± 0,25	17,18 ± 0,15	15,30 ± 1,20 <sup>(a)</sup>	16,66 ± 0,19	16,84 ± 0,26	16,46 ± 0,10
<b>MCHC</b> (g/dL)	32,14 ± 0,33	31,26 ± 0,31	35,24 ± 0,36 <sup>(a)</sup>	35,13 ± 0,38	28,43 ± 2,33	29,54 ± 1,07	29,58 ± 2,56 <sup>(a)</sup>	34,60 ± 0,39
<b>RDW (%)</b>	13,42 ± 0,51 <sup>(a)</sup>	12,91 ± 0,47	14,19 ± 0,27	14,54 ± 0,15	15,80 ± 0,65 <sup>(a)</sup>	14,69 ± 0,64	14,01 ± 0,20	14,89 ± 0,27

Resultados expressos em valores médios ± SEM. As análises do hemograma foram realizadas um dia antes do início do protocolo de administração da rapamicina (animais com 12 semanas de idade) e a segunda análise ocorreu após a eutanásia dos camundongos (animais com 20 semanas de idade). Todos os animais foram mantidos sob as mesmas condições ambientais, com temperatura controlada, ciclo circadiano claro/escuro de 12 horas, com o acesso a água e alimentação por *ad libitum* n: números de animais por grupo. A representação estatística foi realizada através do uso de letras, interpretando-se da seguinte forma: resultados com letras iguais possuem diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre o (s) grupo (s) analisado (s), em relação ao mesmo parâmetro avaliado.

Nessa análise, comparamos os resultados gerados com os valores de referência disponibilizados pelo *software* do hematocitometro (apêndice). Assim, observamos a média da população de eritrócitos do grupo SAM-R1 controle pré-tratamento se apresentou elevada em relação ao valor de referência. As duas linhagens analisadas antes do tratamento apresentaram a concentração de HGB também acima ao intervalo de referência. Em relação ao HCT, todos os grupos mostraram resultados acima do esperado. Resultados do MCH do grupo SAM-P8 RAPA pré-tratamento e RDW do grupo SAM-R1 RAPA pós-tratamento também se apresentaram acima do limite de referência.

#### 4.2.2 Série leucocitária

Em relação ao leucograma, analisado a partir do hemograma, avaliamos também em dois momentos diferentes: um dia antes do início do tratamento e após a eutanásia dos animais.

Os parâmetros analisados foram: população total de glóbulos brancos (WBC, do inglês *white blood cells*), linfócitos, monócitos e granulócitos. Os resultados desses parâmetros avaliados são demonstrados na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Avaliação do leucograma dos camundongos das linhagens SAM-P8 e SAM-R1.

Parâmetro	PRÉ-TRATAMENTO				PÓS-EUTANÁSIA			
	SAM-P8		SAM-R1		SAM-P8		SAM-R1	
	Controle (n= 9)	RAPA (n=12)	Controle (n=9)	RAPA (n=10)	Controle (n=7)	RAPA (n=7)	Controle (n=8)	RAPA (n=8)
<b>Leucócitos (x10<sup>9</sup>/L)</b>	6,89 ± 1,39 <sup>(a)</sup>	6,19 ± 1,05	15,5 ± 1,88 <sup>(a,b)</sup>	15,21 ± 0,98 <sup>(c)</sup>	3,03 ± 0,54	1,63 ± 0,19	3,29 ± 0,61 <sup>(b)</sup>	3,71 ± 0,81 <sup>(c)</sup>
<b>Linfócitos (x10<sup>9</sup>/L)</b>	5,24 ± 1,12	4,59 ± 0,86 <sup>(a)</sup>	11,6 ± 1,64 <sup>(b)</sup>	11,27 ± 0,72 <sup>(a,c)</sup>	1,97 ± 0,41	1,26 ± 0,17	2,49 ± 0,40 <sup>(b)</sup>	2,36 ± 0,48 <sup>(c)</sup>
<b>Monócitos (x10<sup>9</sup>/L)</b>	0,20 ± 0,05 <sup>(a)</sup>	0,142 ± 0,03 <sup>(b)</sup>	0,4 ± 0,05 <sup>(a,c)</sup>	0,36 ± 0,03 <sup>(b,d)</sup>	0,13 ± 0,03	0,03 ± 0,02	0,13 ± 0,04 <sup>(c)</sup>	0,10 ± 0,03 <sup>(d)</sup>
<b>Granulócitos (x10<sup>9</sup>/L)</b>	1,54 ± 0,30 <sup>(a)</sup>	1,46 ± 0,17 <sup>(b)</sup>	3,6 ± 0,33 <sup>(a,c)</sup>	3,58 ± 0,34 <sup>(b,d)</sup>	0,93 ± 0,17	0,34 ± 0,05	0,68 ± 0,22 <sup>(c)</sup>	1,46 ± 0,52 <sup>(d)</sup>

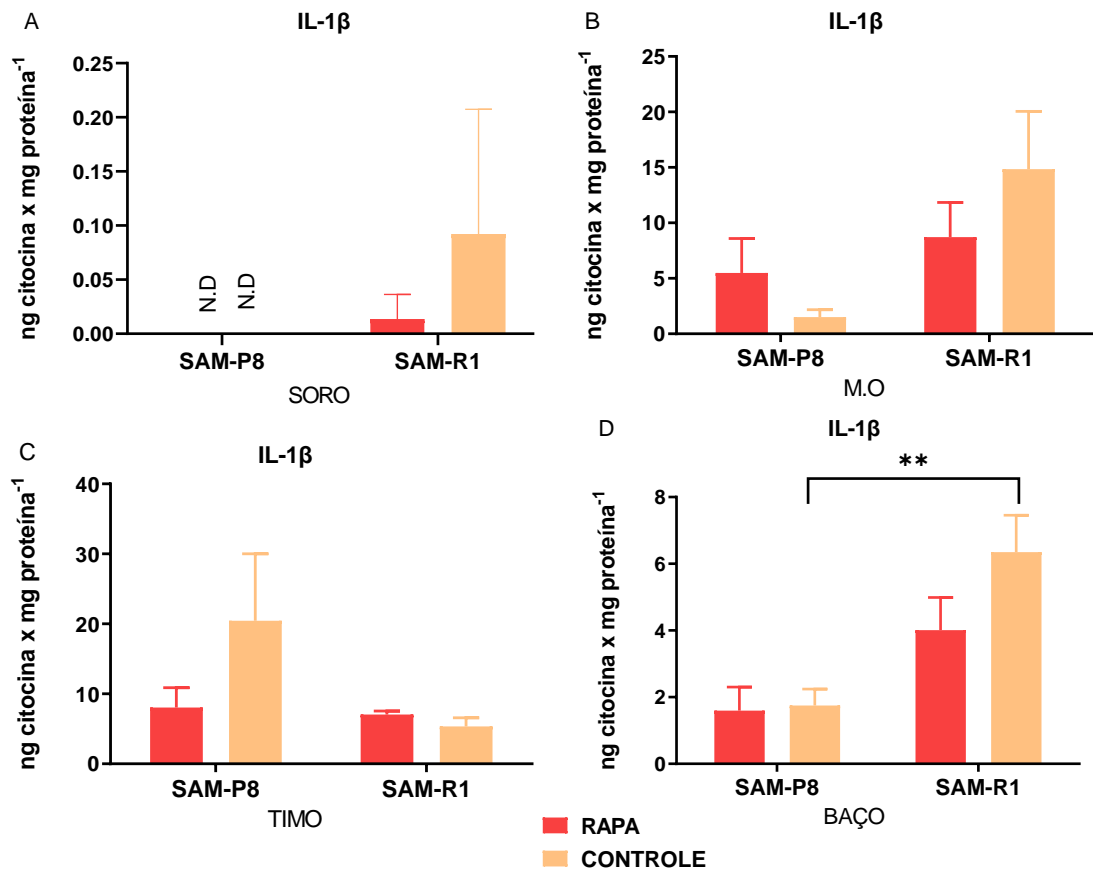
Resultados expressos em valores médios ± SEM. As análises do hemograma foram realizadas um dia antes do início do protocolo de administração da rapamicina (animais com 12 semanas de idade) e a segunda análise ocorreu após a eutanásia dos camundongos (animais com 20 semanas de idade). Todos os animais foram mantidos sob as mesmas condições ambientais, com temperatura controlada, ciclo circadiano claro/escuro de 12 horas, com o acesso a água e alimentação por *ad libitum*. n: números de animais por grupo. A representação estatística foi realizada através do uso de letras, interpretando-se da seguinte forma: resultados com letras iguais possuem diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre o (s) grupo (s) analisado (s), em relação ao mesmo parâmetro avaliado.

Assim como na avaliação da série eritrocitária, comparamos os resultados do leucograma com os valores de referência do (apêndice). Notamos que a população de leucócitos da linhagem SAM-R1 antes de se iniciar o tratamento apresentava resultados acima ao intervalo de referência. Nas populações de monócitos e granulócitos, observamos, respectivamente, aumento no grupo SAM-R1 controle e nos dois grupos da mesma linhagem, ambos pré-tratamento.

#### 4.3 DOSAGEM DE CITOCINAS

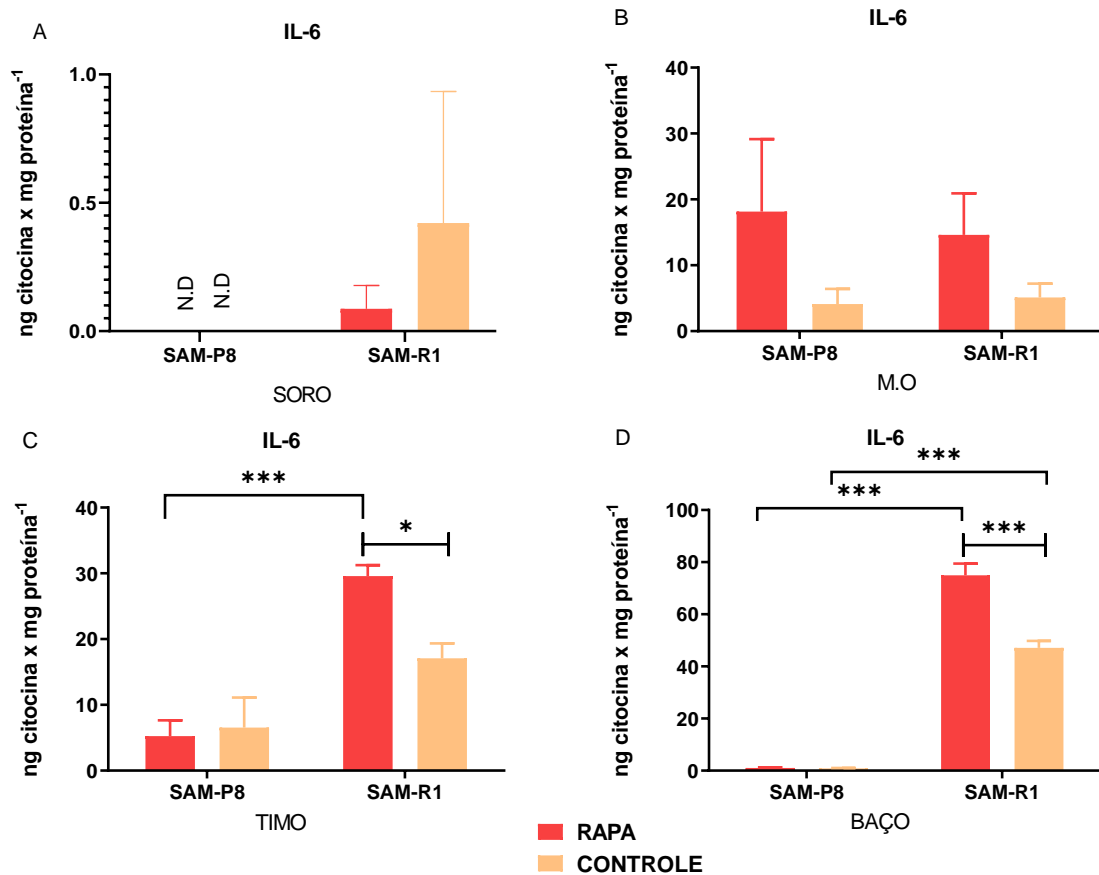
Avaliamos as citocinas relacionadas ao complexo SASP nas amostras de soro e homogenatos dos tecidos processados. Em relação à concentração de IL-1  $\beta$ , observamos diferença na análise do baço entre os grupos SAM-P8 e SAMR-1, ambos os controle (**Figura 4D**). Na avaliação da citocina IL-6, amostras do timo e do baço, notamos que a mesma mostrou valores significantes nos camundongos SAM-R1 do grupo tratado, quando comparado aos demais grupos (**Figura 5 C e Figura 5D**). Em relação aos valores de TNF- $\alpha$ , apenas os resultados da medula óssea apresentaram diferença significativa entre os grupos SAM-P8 e SAM-R1, ambos os controle (**Figura 6**). Ao avaliarmos a concentração das citocinas IL-7 e IL-15, notamos diferença apenas nos camundongos SAM-P8 para a citocina IL-7 (**Figura 7A**).





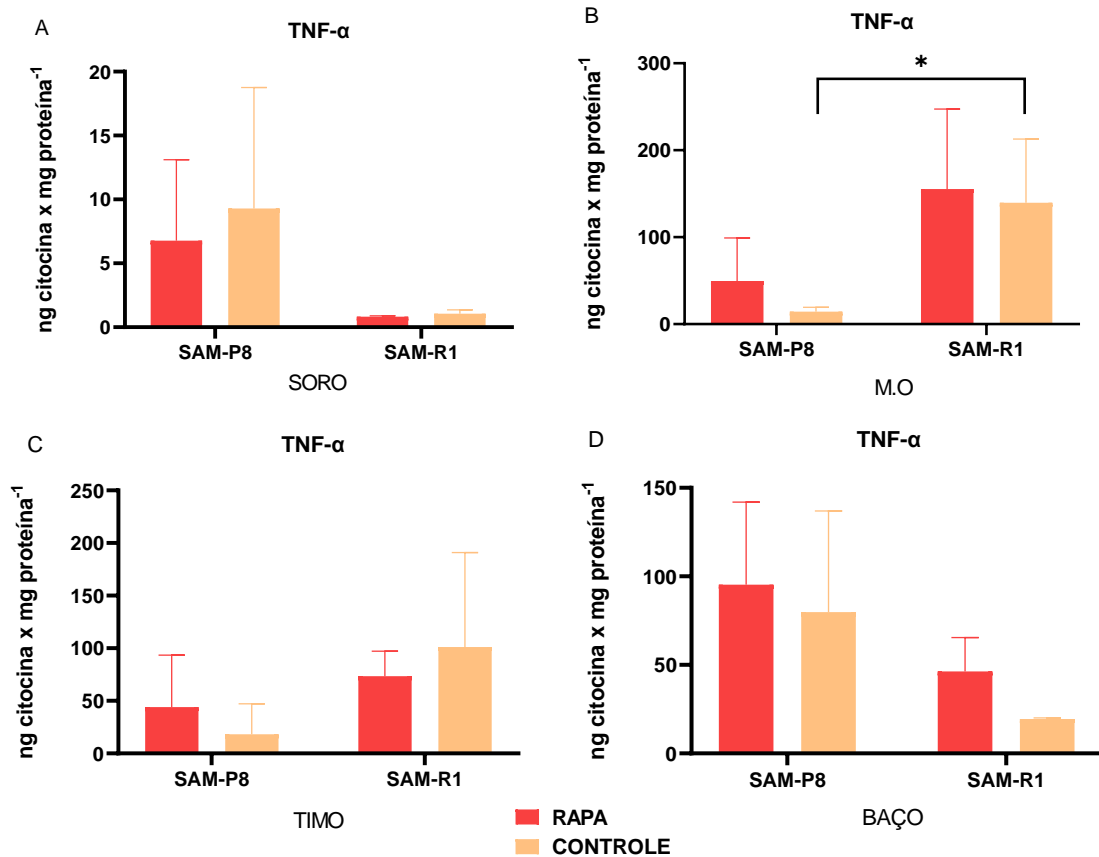
**Figura 4 - Concentração da citocina IL-1 $\beta$  em camundongos das linhagens SAM-P8 e SAM-R1.**

**A:** Concentração de IL-1 $\beta$  no soro, **B:** Concentração de IL-1 $\beta$  no homogenato de medula óssea (M.O), **C:** Concentração de IL-1 $\beta$  no homogenato de timo, **D:** Concentração de IL-1 $\beta$  no homogenato de baço. A dosagem foi realizada nas amostras coletadas de camundongos, com 20 semanas de idade, controles e tratados com rapamicina durante 2 meses. Todos os animais foram mantidos sob as mesmas condições ambientais, com temperatura controlada, ciclo circadiano claro/escuro de 12 horas, com o acesso a água e alimentação por *ad libitum*. N.D: citocina não detectada. n=5 camundongos por grupo. \*\*p < 0,01.



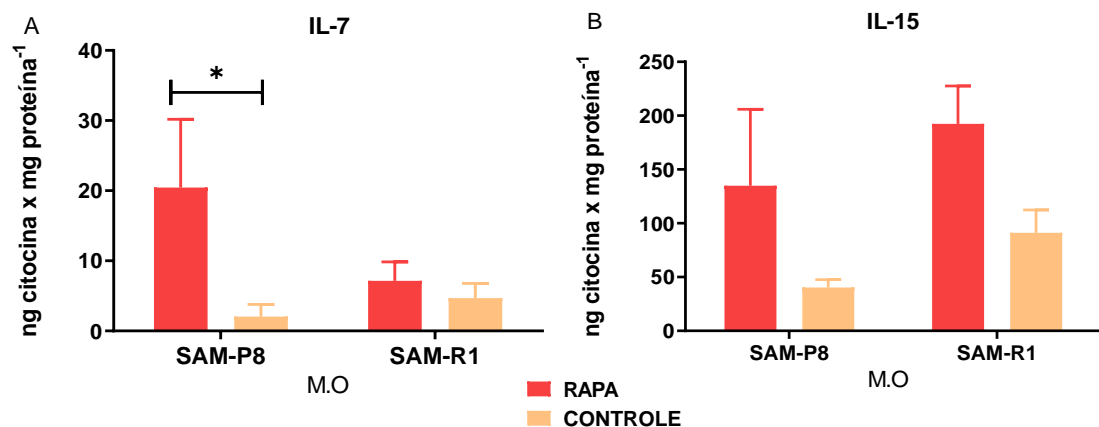
**Figura 5 - Concentração da citocina IL-6 em camundongos das linhagens SAM-P8 e SAM-R.**

A: Concentração de IL-6 no soro, B: Concentração de IL-6 no homogenato de medula óssea (M.O), C: Concentração de IL-6 no homogenato de timo, D: Concentração de IL-6 no homogenato de baço. A dosagem foi realizada nas amostras coletadas de camundongos, com 20 semanas de idade, controle e tratados com rapamicina durante 2 meses. Todos os animais foram mantidos sob as mesmas condições ambientais, com temperatura controlada, ciclo circadiano claro/escuro de 12 horas, com o acesso a água e alimentação por *ad libitum*. N.D: citocina não detectada n=5 camundongos por grupo. \*p < 0,05 e \*\*\*p < 0,001.



**Figura 6 – Concentração da citocina TNF- $\alpha$  em camundongos das linhagens SAM-P8 e SAM-R1.**

A: Concentração de TNF- $\alpha$  no soro, B: Concentração de TNF- $\alpha$  no homogenato de medula óssea (M.O), C: Concentração de TNF- $\alpha$  no homogenato de timo, D: Concentração de TNF- $\alpha$  no homogenato de baço. A dosagem foi realizada nas amostras coletadas de camundongos, com 20 semanas de idade, controle e tratados com rapamicina durante 2 meses. Todos os animais foram mantidos sob as mesmas condições ambientais, com temperatura controlada, ciclo circadiano claro/escuro de 12 horas, com o acesso a água e alimentação por *ad libituen*. n=5 camundongos por grupo. \*p < 0,05.

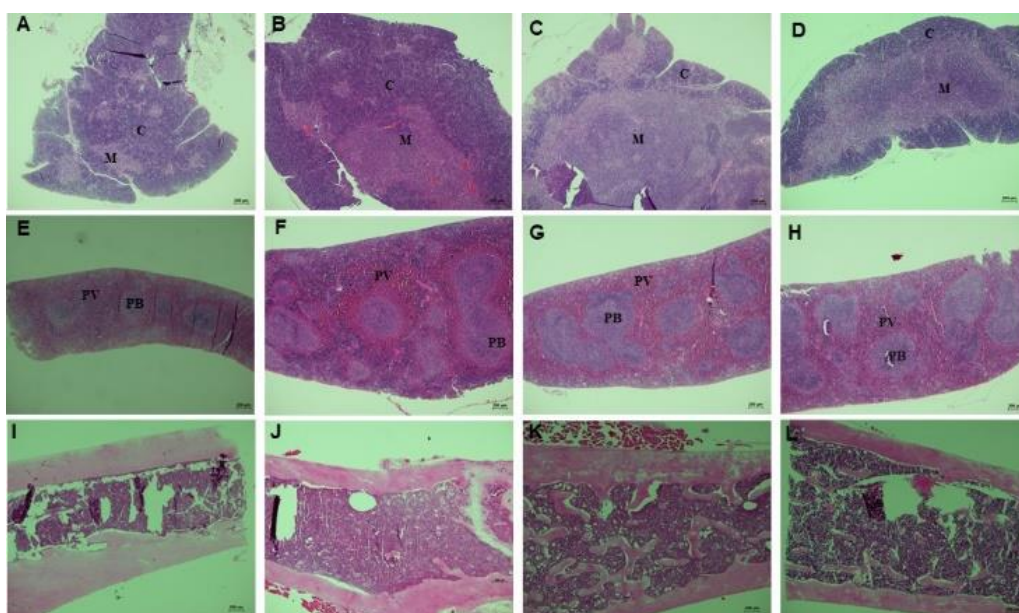


**Figura 7 - Concentração das citocinas IL-7 e IL-15 em camundongos das linhagens SAM-P8 e SAM-R1.**

A: Concentração de IL-7 e IL-15 no soro, B: Concentração de IL-7 e IL-15 no homogenato de medula óssea (M.O), C: Concentração de IL-7 e IL-15 no homogenato de timo, D: Concentração de IL-7 e IL-15 no homogenato de baço. A dosagem foi realizada nas amostras coletadas de camundongos, com 20 semanas de idade, controle e tratados com rapamicina durante 2 meses. Todos os animais foram mantidos sob as mesmas condições ambientais, com temperatura controlada, ciclo circadiano claro/escuro de 12 horas, com o acesso a água e alimentação por *ad libituen*. n=5 camundongos por grupo. \*p < 0,05.

#### 4.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os cortes histológicos corados com HE do timo, baço e medula óssea foram analisados e foi feita a captura das imagens no microscópio óptico. Observamos diferenças na organização das estruturas tímicas entre os camundongos da linhagem SAM-P8 e SAM-R1, em que podemos verificar que nos camundongos com senescência acelerada, a região medular apresenta-se menor quando comparada a zona cortical (**Figura 8A e Figura 8B**). Já nos camundongos SAM-R1, o córtex ocupa uma área menor do que a região medular (**Figura 8C e Figura 8D**). Avaliando-se o tecido esplênico e medular, não observamos diferenças estruturais visíveis, entre os grupos e as linhagens dos camundongos.



**Figura 8 - Avaliação histológica de órgãos linfoides de camundongos das linhagens SAM-P8 e SAM-R1.**

**A:** timo do camundongo SAM-P8 RAPA, **B:** timo do camundongo SAM-P8 controle, **C:** timo do camundongo SAM-R1 RAPA, **D:** timo do camundongo SAM-R1 controle, **E:** baço do camundongo SAM-P8 RAPA, **F:** baço do camundongo SAM-P8 controle, **G:** baço do camundongo SAM-R1 RAPA, **H:** baço do camundongo SAM-R1 controle, **I:** medula óssea do camundongo SAM-P8 RAPA, **J:** medula óssea do camundongo SAM-P8 controle, **K:** medula óssea do camundongo SAM-R1 RAPA, **L:** medula óssea do camundongo SAM-R1 controle. Imagens microscópicas capturas de lâminas histológicas parafinadas, em cortes longitudinais, corados com HE e com aumento de 40x. C: zona cortical. M: zona medular. PB: polpa branca esplênica. PV: polpa vermelha esplênica. A análise foi realizada em amostras coletadas de camundongos, com 20 semanas de idade, controles e tratados com rapamicina durante 2 meses. n=5 camundongos por grupo.

#### 4.5 CELULARIDADE DO TIMO, BAÇO E MEDULA ÓSSEA

Realizamos a contagem de células nucleadas na em câmara de Neubauer, a partir das suspensões celulares da medula óssea, timo e baço. Em nossos achados, constatamos que a celularidade do timo e baço demonstraram resultados significantes entre as duas linhagens de camundongos (**Tabela 3**). Comparando-se somente os grupos SAM-P8, podemos observar maior quantidade de células medulares e esplênicas no grupo tratado com RAPA. Em

contrapartida, as células tímicas apresentam-se em aumentadas no grupo controle. Já nos camundongos SAM-R1, há uma menor quantidade de células medulares e tímicas no grupo controle, e maior celularidade no baço do grupo RAPA.

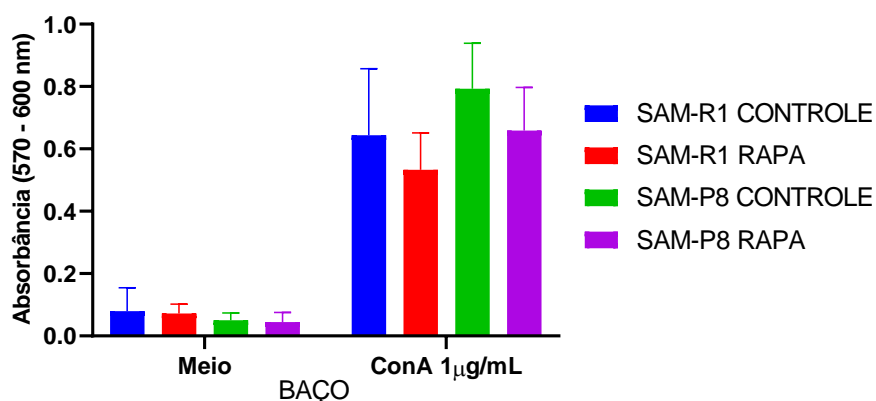
**Tabela 3 - Avaliação da celularidade de órgãos linfoides dos camundongos das linhagens SAM-P8 e SAM-R1.**

Parâmetro	SAM-P8		SAM-R1	
	Controle (n= 4)	RAPA (n=6)	Controle (n=4)	RAPA (n=6)
<b>Medula óssea</b> (x10 <sup>7</sup> /ml)	1,94 ± 0,33	2,52 ± 1,09	1,87 ± 0,6	1,74 ± 0,13
<b>Baço</b> (x10 <sup>7</sup> /ml)	2,62 ± 0,37 <sup>(a)</sup>	3,06 ± 0,32 <sup>(b)</sup>	9,18 ± 0,59 <sup>(a)</sup>	11,15 ± 1,18 <sup>(b)</sup>
<b>Timo</b> (x10 <sup>7</sup> /ml)	1,18 ± 0,21 <sup>(a)</sup>	1,06 ± 0,33 <sup>(b)</sup>	6,02 ± 0,33 <sup>(a)</sup>	4,50 ± 0,69 <sup>(b)</sup>

Resultados expressos em valores médios ± SEM. A celularidade foi determinada em amostras da medula óssea, baço e timo de camundongos com 20 semanas de idade, controles e tratados com rapamicina durante 2 meses. Todos os animais foram mantidos sob as mesmas condições ambientais, com temperatura controlada, ciclo circadiano claro/escuro de 12 horas, com o acesso a água e alimentação por *ad libitum*. n: números de animais por grupo. A representação estatística foi realizada através do uso de letras, interpretando-se da seguinte forma: resultados com letras iguais possuem diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre o (s) grupo (s) analisado (s), em relação ao mesmo parâmetro avaliado.

#### 4.6 PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS ESPLÊNICOS *IN VITRO*

No ensaio de linfoproliferação do baço, realizamos o cultivo dos linfócitos em meio com conA (1 µg/mL), enquanto o grupo controle foi semeado em placa contendo somente o meio de cultivo. Verificamos que ocorreu a estimulação proliferativa da conA nas células linfoides, com ligeiro aumento de proliferação nos grupos controles, em comparação aos camundongos tratados, no entanto, sem diferença estatística (**Figura 9**).

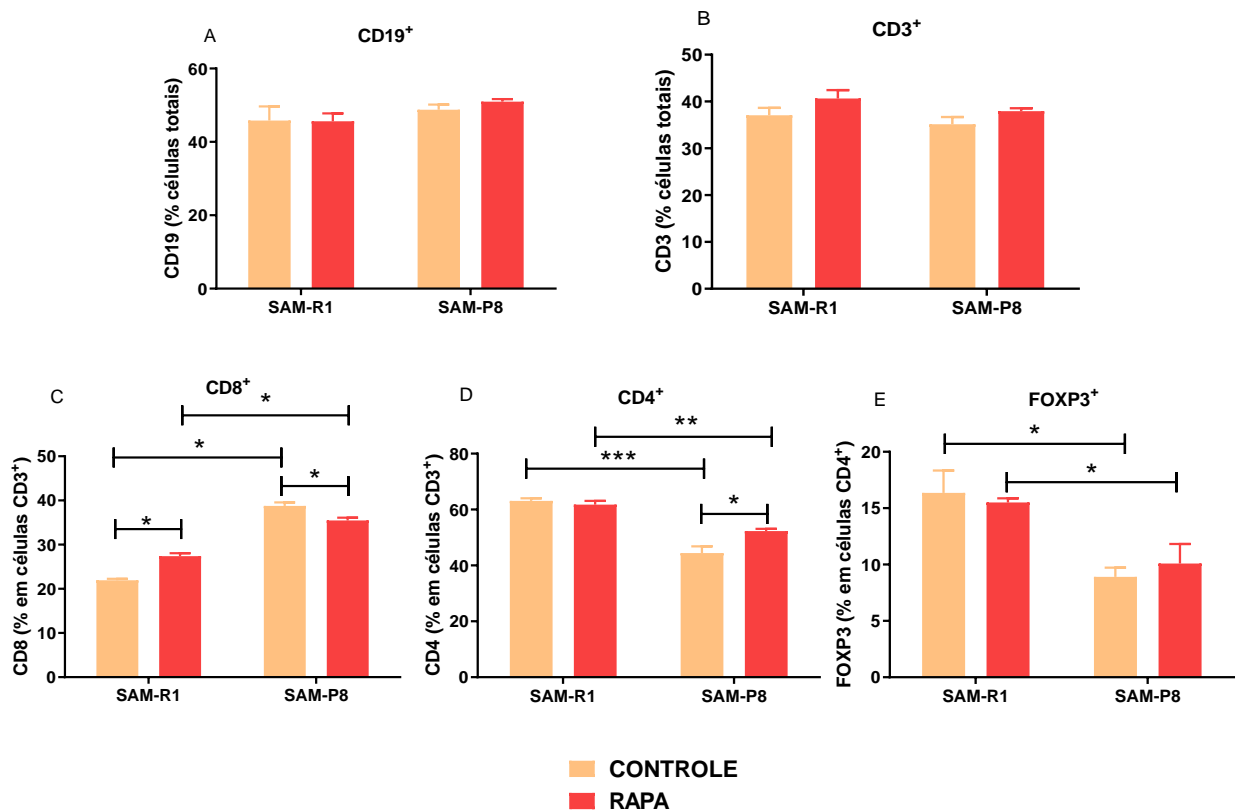


**Figura 9 - Análise da proliferação de linfócitos esplênicos em camundongos das linhagens SAM-P8 e SAM-R1.**

Ensaio de proliferação de linfócitos, em meio de cultivo e meio de cultivo + conA (1 µg/mL), em amostras do baço de camundongos com 20 semanas de idade, controles e tratados com rapamicina durante 2 meses. O resultado de linfoproliferação foi determinada pelo valor da absorbância. Todos os animais foram mantidos sob as mesmas condições ambientais, com temperatura controlada, ciclo circadiano claro/escuro de 12 horas, com o acesso à água e alimentação por *ad libitum*. Grupo RAPA n =6 e grupo controle n=4.

#### 4.7 CITOMETRIA DE FLUXO

A aquisição das populações de linfócitos B (**Figura 10A**) e T (**Figura 10B**) não mostraram diferença entre os camundongos das duas linhagens, e a porcentagem de células adquiridas entre os grupos apresenta pouca variação. Não obstante, verificamos diferenças nas subpopulações de linfócitos T CD8<sup>+</sup> (**Figura 10C**) e CD4<sup>+</sup> (**Figura 10D**), respectivamente, com maior porcentagem de células nos camundongos SAM-P8 e SAM-R1. Resultados significativos também são mostrados entre os grupos, onde podemos observar a maior quantidade de células CD8<sup>+</sup> nos grupos SAM-R1 RAPA e SAM-P8 controle (**Figura 10C**), enquanto a subpopulação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> é menor nesses grupos (**Figura 10D**). Na análise dos linfócitos T reguladores (FOXP3<sup>+</sup>), notamos que a porcentagem de células dos camundongos SAM-R1 é maior em relação ao SAM-P8 (**Figura 10E**).

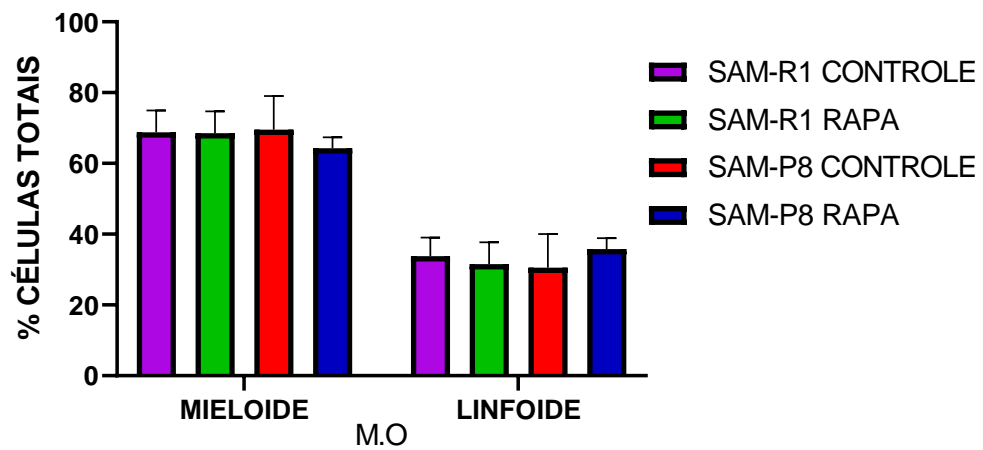


**Figura 10 – Análise das populações e subpopulações de linfócitos do baço definidas por citometria de fluxo.**

As células obtidas do baço foram marcadas com os anticorpos conjugados com fluorocromos e a suspensão celular processada no citômetro de fluxo para a aquisição de eventos. A: população de linfócitos B, B: população de linfócitos T, C: subpopulação de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, D: subpopulação de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, E: subpopulação de linfócitos T reguladores. As amostras foram procedentes de camundongos com 20 semanas de idade, controles e tratados com rapamicina durante 2 meses. As análises do resultado de citometria foi definido pela determinação de *gates* das células de interesse, no FlowJo (versão 7.5.5), e é demonstrado em porcentagem (%) de células. Todos os animais foram mantidos sob as mesmas condições ambientais, com temperatura controlada, ciclo circadiano claro/escuro de 12 horas, com o acesso a água e alimentação por *ad libitum*. Grupo RAPA n = 6 e grupo controle n = 4. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001.

#### 4.8 MIELOGRAMA

A avaliação do mielograma foi realizado com a finalidade de definir a quantidade de células progenitoras dos camundongos do estudo. Verificamos que a porcentagem de células progenitoras mieloides mostrou ser superior à linhagem linfóide, como demonstrado na **Figura 11**. A contagem de células não apresentou diferença estatística entre os grupos analisados.



**Figura 11 – Avaliação das linhagens mieloides e linfoides de camundongos SAM-P8 e SAM-R1.**

Análise do mielograma de camundongos com 20 semanas de idade, controles e tratados com rapamicina durante 2 meses. O resultado é demonstrado em porcentagem (%) de células, a partir da contagem de 100 células por campo. Todos os animais foram mantidos sob as mesmas condições ambientais, com temperatura controlada, ciclo circadiano claro/escuro de 12 horas, com o acesso a água e alimentação por *ad libitum*. n=5 camundongos por grupo.



## 5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, visamos avaliar os possíveis efeitos do tratamento com rapamicina frente ao fenótipo senescente e as alterações decorrentes desse processo em camundongos com a senescência acelerada. Por conta disso, avaliamos como essas alterações se comportaram nos órgãos linfoides desses animais.

O camundongo da linhagem SAM-P8 já é um modelo murinho bem estabelecido para estudos relacionados ao envelhecimento e por apresentar os distúrbios associados à senescência. Esse modelo, originalmente gerado a partir de camundongos AKR/J, foi desenvolvido pelo Dr. Takeda (faculdade de medicina da universidade de Kyoto, Japão), em 1981 (73). O SAM-P8, por apresentar características da senescência acelerada, em comparação com o SAM-R1, é um excelente modelo para o nosso estudo, pois é possível verificar a aceleração acentuada dos efeitos da expressão do fenótipo senescente no processo do envelhecimento em mamíferos. Além disso, essa linhagem exibe uma variedade de fenótipos patológicos que são associados ao estado senescente, como comprometimento da reposta imune, disfunção mitocondrial, acúmulo de dano oxidativo, amiloidose senil, déficits de aprendizagem e de memória, alteração do ciclo circadiano e expectativa de vida reduzida (73,74).

O fármaco utilizado em nosso estudo, a rapamicina, é um inibidor de várias vias de sinalização intracelular, incluindo a atividade do mTOR, em que sua inibição favorece a atividade autofágica. É importante ressaltar que o efeito inibitório da rapamicina varia de acordo com a dose a ser administrada e no contexto que a mesma é utilizada. Primeiro, diferentes doses de rapamicina são necessárias para suprimir mTOR e em diferentes linhagens celulares; em segundo lugar, diferentes doses de rapamicina são necessários para suprimir a fosforilação de diferentes substratos do mTOR; e terceiro, há uma diferença de sensibilidade à rapamicina nos dois complexos mTORC1 e mTORC2 (75,76).

A dose terapêutica típica de rapamicina varia entre 0,5-6,0 mg/kg/dia, dependendo da condição a ser tratada. Em relação a concentração no sangue, níveis superiores a 15 ng/mL são considerados altas doses, enquanto baixas doses são inferiores a essa concentração (77). Os estudos de Jimeno et al., (2008) verificaram que doses nanomolares de rapamicina são suficientes para suprimir a fosforilação de S6K1, no entanto, doses maiores (micromolares) são necessárias para suprimir a fosforilação de S6K1 e de 4EBP1, as duas moléculas de sinalização mais bem caracterizadas do mTORC1 (78). Os efeitos colaterais mais comuns associados à rapamicina em altas doses são distúrbios gastrointestinais, hematológicos e metabólicos, além

da supressão imunológica demasiada (72,77). Devido a isso, o efeito imunossupressor da rapamicina é comumente empregada no manejo clínico que objetiva evitar a rejeição pós-transplante de tecidos e também no tratamento de doenças autoimunes (79–81). Além disso, os efeitos antiproliferativos da rapamicina têm sido estudados como uma estratégia contra neoplasias e em doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer e de Parkinson (75,80,82).

O extenso perfil de efeitos secundários da rapamicina nos seres humanos é um desafio significativo para o uso potencial da rapamicina para doenças relacionadas com a idade (83). Há estudos com baixas doses de rapamicina que correlacionam o aumento da atividade autofágica, a diminuição dos efeitos do envelhecimento e da senescência e com o prolongamento da longevidade de diferentes modelos de organismos, como por exemplo, em nematódeo *Caenorhabditis elegans* (61), na mosca *Drosophila melanogaster* (84), no fungo *Saccharomyces cerevisiae* (85), em peixe *Nothobranchius furzeri* (85) e em camundongos (86–90) (62,68,84,91).

Assim, administramos uma dose baixa (7,1 µg/kg) de rapamicina nos grupos de camundongos tratados, em intervalos de 5 dias e durante dois meses, a fim de se evitar possíveis efeitos negativos decorrentes do fármaco. Nosso protocolo baseou-se nos trabalhos prévios de Arriola et al. (2016), Xu et al. (2020) e Zhang et al. (2012). O primeiro trabalho verificou com a administração de rapamicina em intervalos de 5 dias não interferiu no metabolismo da glicose nos camundongos C57BL/c, diferentemente da administração diária, que causou hiperglicemia e hiperinsulinemia (83). Já Xu et al. (2020) verificaram que camundongos SAM-P8 e SAM-R1, machos com 12 semanas de idade, tratados durante 2 meses com rapamicina apresentaram diminuição do nível do composto malondialdeído e o aumento da atividade da enzima superóxido dismutase, ambos relacionados ao estresse oxidativo. Nesse mesmo trabalho, os autores demonstraram também o aumento da atividade autofágica nos camundongos SAM-P8 (71). Zhang et al. (2012) compararam altas e baixas doses de rapamicina na resposta celular de linfócitos T contra uma inflamação ocular; e concluíram que baixa dose de rapamicina regulou positivamente a resposta imune, contribuindo na proliferação, amplificação e prolongamento da resposta das células T (72).

Em nosso estudo, avaliamos durante dois meses a evolução ou regressão da massa corpórea dos camundongos. Observamos que em todos os grupos, a massa corpórea aumentou ao término do período avaliado e com poucas variações entre os momentos intercalados. Na primeira caracterização desses dois modelos murinos, Takeda et al. (1981) demonstraram que os camundongos SAM-P8 e SAM-R1, com 12 semanas de idade, possuíam em média 25

gramas; e com 20 semanas de idade, tinham 26 e 27 gramas, respectivamente. A distinção da massa entre essas linhagens era mais nítida a partir de 30 semanas de idade. Os nossos resultados mostraram valores superiores aos mencionados, principalmente em relação ao SAM-R1, o qual apresentou já com 12 semanas de idade, em média 38,5 gramas. Dados semelhantes a esses valores de massa também foram descritos por Onishi et al. (2018), em que avaliaram esses camundongos com 8 e 24 semanas de idade (92).

Quando avaliamos o eritrograma dos animais, além de comparar os grupos das duas linhagens, também queríamos evitar possíveis efeitos negativos na eritropoiese decorrentes da rapamicina; implicações que não ocorreram nos grupos tratados. Além disso, a análise da série eritrocitária nos mostra um fato curioso, os camundongos com 12 semanas de idade apresentaram valores de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito acima do intervalo de referência. E quando os camundongos estão com 20 semanas de idade, esses resultados ficam dentro do intervalo de normalidade. Confrontando nossos achados com os resultados de Santos et al. (2016), em que avaliaram o hemograma dos camundongos C57BL/c, BALB/c e *Swiss Webster*, com 12 semanas de idade, observamos que os camundongos SAM-P8 e SAM-R1 apresentam valores superiores aos três índices hematimétricos destacados anteriormente. Assim, sugerimos que nosso modelo animal estudado apresenta também diferença com outros murinos utilizados comumente em pesquisas científicas (93).

Semelhante à série vermelha, os leucócitos dos grupos analisados com 12 semanas de idade apresentaram resultados superiores às três linhagens do trabalho de Santos et al. (2016); e constatamos que os camundongos SAM-R1 possuem o dobro de leucócitos em relação aos SAM-P8, sendo que este último apresenta o número de leucócitos dentro dos valores de referência (93). Sabe-se que uma das propriedades pretendidas da rapamicina é a ação imunossupressora em leucócitos circulantes. Em nossos grupos tratados, com 20 semanas de idade, felizmente, não observamos esses efeitos supressores na população de linfócitos, monócitos e granulócitos, visto que pretendíamos averiguar os efeitos benéficos da rapamicina na atenuação da senescência, sem necessariamente imunossuprimir nosso modelo de estudo.

Outro problema decorrente da senescência refere-se à secreção de citocinas inflamatórias associadas ao envelhecimento que estão intimamente relacionadas ao SASP (94). Essas Citocinas inflamatórias contribuem no estado crônico da inflamação sistêmica, chamado "*inflammaging*", o qual é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de patologias relacionadas à idade (5,95). Dentro desse cenário, em nosso estudo objetivamos também verificar o estado de atividade inflamatória basal dessas citocinas no soro e em diferentes tecidos, sem a necessidade de promover o desafio dos camundongos a certas

infecções ou lesões. Como resultado, observamos a variação da secreção de citocinas entre os grupos e amostras analisadas. A IL-1 $\beta$  e IL-6, por exemplo, foram detectadas inesperadamente em maior concentração nos camundongos SAM-R1 do que nos camundongos senescentes. Em contrapartida, a quantidade de TNF- $\alpha$  nas amostras de soro e baço dos grupos SAM-P8 foi superior, no entanto sem diferença significativa. Nossos achados sugerem que o modelo SAM-P8, mesmo apresentando características senescentes, com 20 semanas de idade o “*inflammaging*” ainda não é notório em certos microambientes teciduais, quando comparamos com o modelo SAM-R1. Trabalhos já demonstraram a associação entre TNF- $\alpha$  e a IL-6 com efeitos biológicos distintos nas populações idosas e com diferente importância clínica durante o processo de envelhecimento (95,96). Enquanto outros estudos mencionam que a atividade das citocinas e de outros marcadores do SASP ainda não são totalmente caracterizados, além de apresentar ações específicas em diferentes microambientes teciduais (96,97).

Outras citocinas avaliadas foram IL-7 e IL-15, as quais mensuramos no microambiente medular. Como resultado observamos que os camundongos SAM-P8 tratados com rapamicina apresentaram níveis aumentados dessas citocinas em comparação aos seus respectivos grupos controles. Essas interleucinas são as principais citocinas produzidas pelas células do estroma medular e desempenham papéis importantes no sistema imunológico, sendo a IL-7 está principalmente envolvida no desenvolvimento e sobrevivência das células T. Enquanto a IL-15, por outro lado, desempenha um papel fundamental na ativação e proliferação de células T e B (98,99). Nesse microambiente, a senescência afeta múltiplas células dentro da linhagem hematopoiética, resultando no desgaste gradual da capacidade de auto renovação e diferenciação, ambas importantes na função imunológica (100). Ikuta et al. (2022) realizaram também a detecção dessas interleucinas em amostras de medula, gânglios linfáticos e timo, e constataram diferentes expressões em cada tecido analisado (99). Assim, compreender o papel que essas citocinas desempenha no envelhecimento pode permitir soluções preventivas e também terapêuticas (100).

O timo é o principal órgão de maturação e desenvolvimento imunocompetência de linfócitos T. Esse órgão também apresenta alterações ao longo do processo do envelhecimento e imunossenescência, havendo uma redução considerável no tamanho de estruturas tímicas, como a diminuição da zona medular, aumento da zona cortical e dos espaços perivasculares. Apesar dessas mudanças, o timo ainda desempenha sua função, embora que reduzida (100). Em nossa análise histológica observamos que os camundongos SAM-P8 apresentaram a involução tímica; além desse dado, a população de células tímicas nesses camundongos foi bem inferior quando comparadas aos dos animais SAM-R1. Resultados que reforçam o fenótipo

senescente desse modelo (73). Por outro lado, não observamos alterações histológicas e diferença na celularidade da medula óssea entre os grupos; e na avaliação do mielograma, a porcentagem de células progenitoras da linhagem mielóide mostrou ser superior à linfóide, como esperado. Estudos de Harrison et al. (1978) demonstraram que a senescência em células da medula óssea de camundongos idosos promove o esgotamento da capacidade de renovação em HSC (101) e também, como já é descrito em vários estudos, durante o processo de envelhecimento, a quantidade de células mielóides supera a de células linfóides, tanto em camundongos como em humanos (102,103). Essa relação de HSCs entre organismos jovens e idosos tem sido caracterizada por várias outras alterações, incluindo modificações genéticas e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (104).

Na investigação histológica do baço não encontramos nenhuma diferença morfológica entre os grupos de camundongos das duas linhagens. Porém, averiguamos certa discrepância no número total de esplenócitos, em que se sobressaem nos camundongos SAM-R1, possivelmente devido ao maior tamanho desse órgão nestes camundongos. Apesar da diferença em quantidade de células, a atividade linfoproliferativa mostrou-se semelhante nas duas linhagens. No que diz respeito a população e subpopulações de células, percebemos a maior porcentagem de linfócitos B em relação aos linfócitos T. Em camundongos adultos, os linfócitos B originam-se na medula óssea e sofrem maturação no baço, com uma população normalmente superior a 40% em comparação a outras células (105,106). Nas subpopulações de linfócitos T, obtivemos resultados interessantes. A quantidade de linfócitos TCD8<sup>+</sup> em camundongos SAM-P8 controle mostrou ser maior do que no grupo tratado com rapamicina; caso que não aconteceu no SAM-R1. De forma contrária, na população de células TCD4<sup>+</sup> e T reguladoras, percebemos o aumento desses linfócitos em camundongos SAM-P8 tratados, enquanto a linhagem SAM-R1 apresentou valores similares entre os grupos.

O aumento da produção de mediadores inflamatórios característicos do envelhecimento contribui para a diminuição da resposta adaptativa e, eventualmente, para a imunossenescência. Células imunes são afetadas por esses efeitos, como no desequilíbrio das subpopulações de linfócitos TCD8<sup>+</sup> e TCD4<sup>+</sup>, em que há o crescente número de células T CD8<sup>+</sup>, assim como também de TCD4<sup>+</sup> e T reguladoras, mesmo que seja modesto (20,90). Neff et al. (2013) demonstraram que a dose de rapamicina administrada em seu trabalho (14 mg/kg) não contribuiu com o aumento de linfócitos TCD4<sup>+</sup> em camundongos C57BL/c com até 22 meses de idade, diferentemente de nossos resultados em camundongos de senescência acelerada. Além disso, no mesmo trabalho, os camundongos de 16 meses apresentaram redução na população

de células TCD8<sup>+</sup> e T reguladoras (90); resultados observados, respectivamente, nos camundongos SAM-P8 e SAM-R1 tratados com rapamicina.

Nossos achados em conjunto ajudam a entender as características fisiológicas próprias dos camundongos SAM-P8 e SAM-R1. No modelo SAM-P8, apesar de observarmos a involução tímica, uma das características nítidas da senescência, outros marcadores não ficaram tão claros, possivelmente pelas análise precoces que definimos avaliar tais propriedades, que se referem quando os animais apresentavam doze e vinte semanas de idade. Apesar dos nossos resultados colaborarem com futuras pesquisas com esses animais, avaliar outras idades torna-se necessário.

Nossas descobertas sobre os efeitos da rapamicina no processo da imunossenescência também foram apresentadas, com dados interessantes relacionados às populações de linfócitos importantes na resposta imune adaptativa e também na secreção de citocinas que colaboram diretamente com a maturação e proliferação dessas células. Assim, estudos futuros são necessários para elucidar as possíveis interações dos efeitos benéficos de baixas doses de rapamicina em modelo animal, bem como as alterações que se sucedem nas vias complexas da proteína mTOR e da autofagia, e como ambas atuam contra os sinais da imunossenescência, da senilidade e do envelhecimento.

## 6 CONCLUSÃO

Concluimos, com este trabalho, que o camundongo da linhagem SAM-P8 apresenta características fisiológicas distintas, em comparação à linhagem SAM-R1, a qual é utilizada como o seu controle. Além do mais, o camundongo com a senescência acelerada é um excelente modelo para se estudar as alterações da imunossenescência, com mudanças típicas características do envelhecimento. Além disso, o tratamento com a baixa dose de rapamicina (7,1 µg/kg, uma vez a cada 5 dias e durante dois meses) empregado pode ter contribuído com os maiores níveis da citocina IL-7 e no aumento da população de linfócitos TCD4<sup>+</sup>, em camundongos SAM-P8. A dose administrada não desencadeou efeitos imunossupressores que pudessem comprometer a resposta imunológica nas duas linhagens de camundongos. Outrossim, não observamos implicações na diminuição das alterações complexas do fenótipo senescente durante o envelhecimento.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Brasileiro de 2022. [citado 13 de janeiro de 2023]; Available at: <https://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2022-07/contingente-de-idosos-residentes-no-brasil-aumenta-398-em-9-anos>
2. Alves JED. Envelhecimento e longevidade [Internet]. 2019 [citado 13 de janeiro de 2023]. Available at: <https://sbgg.org.br/envelhecimento-e-longevidade/>
3. Alle Q, Borgne E Le, Milhavel O, Lemaitre JM. Reprogramming: Emerging strategies to rejuvenate aging cells and tissues. *Int J Mol Sci.* 2021;22(8).
4. McHugh D, Gil J. Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *J Cell Biol.* 2018;217(1):65–77.
5. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell.* 2013;153(6):1194.
6. Wei W, Ji S. Cellular senescence: Molecular mechanisms and pathogenicity. *J Cell Physiol.* 2018;233(12):9121–35.
7. Ben-Porath I, Weinberg RA. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37(5 SPEC. ISS.):961–76.
8. Alers S, Löffler AS, Wesselborg S, Stork B. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the Regulation of Autophagy: Cross Talk, Shortcuts, and Feedbacks. *Mol Cell Biol.* 2012;32(1):2–11.
9. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1961;25(3):585–621.
10. Herranz N, Gil J. Mechanisms and functions of cellular senescence. *J Clin Invest.* 2018;128(4):1238–46.
11. Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol.* 2018;28(6):436–53.
12. Helman A, Klochendler A, Azazmeh N, Gabai Y, Horwitz E, Anzi S, et al. p16 Ink4a-induced senescence of pancreatic beta cells enhances insulin secretion. *Nat Med* [Internet]. 2016;22(4):412–20. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.4054>
13. Antero Salminen, Kai Kaarniranta and AK. Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes. *Aging (Albany NY)* [Internet]. 2012;4(3):166–75. Available at: [www.impactaging.com](http://www.impactaging.com)
14. Pal Yu B, Young Chung H. The inflammatory process in aging. *Rev Clin Gerontol.* 2006;16(3):179–87.
15. López AL, Chiurchiù V, Rea IM, Gibson DS, McGilligan V, Mcnerlan SE, et al. Age and



- Age-Related Diseases: Role of inflammation Triggers and Cytokines. 2018;9:1. Available at: [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)
16. Paludan SR, Pradeu T, Masters SL, Mogensen TH. Constitutive immune mechanisms: mediators of host defence and immune regulation. *Nat Rev Immunol* [Internet]. Available at: <https://doi.org/10.1038/>
  17. Marshall JS, Warrington R, Watson W, Kim HL. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma Clin Immunol* [Internet]. 12 de setembro de 2018 [citado 21 de fevereiro de 2022];14(2):1–10. Available at: <https://aacijournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13223-018-0278-1>
  18. Mesquita Júnior D, Antônio Pereira Araújo J, Tiekoo Takao Catelan T, Wagner Silva de Souza A, de Melo Cruvinel W, Eduardo Coelho Andrade L, et al. ARTIGO DE REVISÃO Sistema Imunitário-Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. *Rev Bras Reum.* 2010;50(5):552–80.
  19. Eter P, Elves JD, Oitt VMR. THE IMMUNE SYSTEM First of Two Parts. Vol. 343. 2000.
  20. Fulop T, Larbi A, Dupuis G, Page A Le, Frost EH, Cohen AA, et al. Immunosenescence and inflamm-aging as two sides of the same coin: Friends or Foes? *Front Immunol.* 2018;8(JAN).
  21. Brodin P, Davis MM. Human immune system variation. *Nat Publ Gr* [Internet]. 2016; Available at: [www.nature.com/nri](http://www.nature.com/nri)
  22. Yuan Y, Fang Y, Zhu L, Gu Y, Li L, Qian J, et al. Deterioration of hematopoietic autophagy is linked to osteoporosis. *Aging Cell.* 2020;19(5):1–17.
  23. Mak TW, Saunders ME. Cells and Tissues of the Immune Response. In: *The Immune Response.* Elsevier; 2006. p. 35–67.
  24. Zhao E, Xu H, Wang L, Kryczek I, Wu K, Hu Y, et al. Bone marrow and the control of immunity. *Cell Mol Immunol* 2011 91 [Internet]. 24 de outubro de 2011 [citado 26 de janeiro de 2023];9(1):11–9. Available at: <https://www.nature.com/articles/cmi201147>
  25. O’Connell KE, Mikkola AM, Stepanek AM, Vernet A, Hall CD, Sun CC, et al. Practical Murine Hematopathology: A Comparative Review and Implications for Research. *Comp Med* [Internet]. 1 de abril de 2015 [citado 26 de janeiro de 2023];65(2):96. Available at: [/pmc/articles/PMC4408895/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/264408895/)
  26. Goldberg EL, Dixit VD. Bone Marrow: An Immunometabolic Refuge during Energy Depletion. *Cell Metab* [Internet]. 2019;30(4):621–3. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.08.022>
  27. Liu X, Quan N. Immune Cell Isolation from Mouse Femur Bone Marrow. *Bio-Protocol.* 2015;5(20).
  28. QueNat P, Naspetti M, Boyd R. Development, organization and function of the thymic medulla in normal, immunodeficient or autoimmune mice. *Semin Immunol.* 1999;11(1):47–55.

29. Effros RB, Cai Z, Linton PJ. CD8 T cells and aging. *Crit Rev Immunol*. 2003;23(1–2):45–64.
30. Fuentes E, Fuentes M, Alarcón M, Palomo I. Immune system dysfunction in the elderly. *An Acad Bras Cienc*. 2017;89(1):285–99.
31. Pawelec G. Age and immunity: What is “immunosenescence”? *Exp Gerontol*. 2018;105(September 2017):4–9.
32. Immunosenescence: emerging challenges for an ageing population.
33. Stervbo U, Meier S, Mälzer JN, Baron U, Bozzetti C, Jürchott K, et al. Effects of aging on human leukocytes (part I): immunophenotyping of innate immune cells.
34. Stervbo U, Bozzetti C, Baron U, Jürchott K, Meier S, Mälzer JN, et al. Effects of aging on human leukocytes (part II): immunophenotyping of adaptive immune B and T cell subsets. *Age (Omaha)*.
35. Almeida L, Lochner M, Berod L, Sparwasser T. Metabolic pathways in T cell activation and lineage differentiation. *Semin Immunol* [Internet]. 2016;28(5):514–24. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2016.10.009>
36. Walford RL. The Immunologic Theory of Aging 1. [citado 3 de março de 2022]; Available at: <http://gerontologist.oxfordjournals.org/>
37. Nacarelli T, Sell C. Targeting metabolism in cellular senescence, a role for intervention. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2017;455:83–92. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2016.08.049>
38. Moura J, Madureira P, Leal EC, Fonseca AC, Carvalho E. Immune aging in diabetes and its implications in wound healing. *Clin Immunol*. 2019;200(January):43–54.
39. Effros RB, Cai Z, Linton PJ. CD8 T cells and aging. *Crit Rev Immunol* [Internet]. 2003 [citado 21 de julho de 2022];23(1–2):45–64. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12906259/>
40. Lian J, Yue Y, Yu W, Zhang Y. Immunosenescence: a key player in cancer development. *J Hematol Oncol* [Internet]. 2020;13(1):1–18. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00986-z>
41. Markaki M, Metaxakis A, Tavernarakis N. The role of autophagy in aging: Molecular mechanisms [Internet]. Vol. 12, *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging* Volume 12. Elsevier Inc.; 2017. 123–138 p. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-812146-7.00002-0>
42. THOMAS P. ASHFORD and KEITH R. PORTER. CYTOPLASMIC COMPONENTS IN HEPATIC CELL LYSOSOMES. *Br J Cell Biol* [Internet]. 1962;198–202. Available at: <http://doi.org/10.1083/jcb.12.1.198>
43. Salimi-Jeda A, Ghabeshi S, Gol Mohammad pour Z, Jazaeri EO, Araiinejad M, Sheikholeslami F, et al. Autophagy Modulation and Cancer Combination Therapy: A Smart Approach in Cancer Therapy. *Cancer Treat Res Commun*. 1 de janeiro de

- 2022;30:100512.
44. do Nascimento da Silva M, Kerllen Martins W. Med. 2020 jul-set. Arq Catarinense Med. 2020;49(3):125–43.
  45. Fîlfan M, Sandu RE, Zăvăleanu AD, Greșiță A, Glăvan DG, Olaru DG, et al. Autophagy in aging and disease. Rom J Morphol Embryol. 2017;58(1):27–31.
  46. Hansen M, Rubinsztein DC, Walker DW. Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. Nat Rev Mol Cell Biol. 2018;19(9):579–93.
  47. Santambrogio L, Cuervo AM. Chasing the elusive mammalian microautophagy. Autophagy. 2011;7(6):652–4.
  48. Ryter SW, Cloonan SM, Choi AMK. Autophagy: A critical regulator of cellular metabolism and homeostasis. Mol Cells. 2013;36(1):7–16.
  49. Loos B, Engelbrecht AM, Lockshin RA, Klionsky DJ, Zakeri Z. The variability of autophagy and cell death susceptibility: Unanswered questions. Autophagy. 2013;9(9):1270–85.
  50. Mariño G, Madeo F, Kroemer G. Autophagy for tissue homeostasis and neuroprotection. Curr Opin Cell Biol. 2011;23(2):198–206.
  51. Masclaux-Daubresse C, Chen Q, Havé M. Regulation of nutrient recycling via autophagy. Curr Opin Plant Biol. 2017;39:8–17.
  52. Morgunova G V, Klebanov AA, Khokhlov AN. Autophagy : The Way to Death and Inhibitors of Autophagy. ResearchGate. 2018;(January):475–81.
  53. Tsukada M, Ohsumi Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of. Vol. 333. European Biochemical Societies; 1993.
  54. Madeo F, Zimmermann A, Maiuri MC, Kroemer G. Essential role for autophagy in life span extension. J Clin Invest. 2015;125(1):85–93.
  55. Martínez-Vicente M, Tallozy Z, Wong E, Tang G, Koga H, Kaushik S, et al. Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease. Nat Rev Neurosci. 2010;13:567–78.
  56. Yan Y, Backer JM. 3rd Focused Meeting on PI3K Signalling and Disease Regulation of class III (Vps34) PI3Ks [Internet]. Available at: <http://portlandpress.com/biochemsoctrans/article-pdf/35/2/239/542317/bst0350239.pdf>
  57. Costas MA, Rubio MF. [Autophagy. A strategy for cell survival]. Medicina (B Aires) [Internet]. 1 de janeiro de 2017 [citado 17 de fevereiro de 2022];77(4):314–20. Available at: <https://europepmc.org/article/med/28825576>
  58. Ramírez-Sagredo A, Aleman L, Villa M, Chávez MN, García L, Lavandero S. Autofagia en el sistema cardiovascular: pasado, presente y futuro. Rev Chil Cardiol [Internet]. 2016 [citado 17 de fevereiro de 2022];35(3):228–41. Available at: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-)

85602016000300004&lng=es&nrm=iso&tlng=es

59. Bernard M, Yang B, Migneault F, Turgeon J, Dieudé M, Olivier MA, et al. Autophagy drives fibroblast senescence through MTORC2 regulation. *Autophagy* [Internet]. 2020;16(11):2004–16. Available at: <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1713640>
60. Lee Y-K, Lee J-A. Role of the mammalian ATG8/LC3 family in autophagy: differential and compensatory roles in the spatiotemporal regulation of autophagy. *BMB Rep* [Internet]. 2016;49(8):424–30. Available at: [www.bmbreports.orghttp://dx.doi.org/10.5483/BMBRep.2016.49.8.081](http://www.bmbreports.orghttp://dx.doi.org/10.5483/BMBRep.2016.49.8.081)
61. Nakamura S, Yoshimori T. Autophagy and longevity. *Mol Cells*. 2018;41(1):65–72.
62. Demidenko ZN, Zubova SG, Bukreeva EI, Pospelov VA, Pospelova T V., Blagosklonny M V. Rapamycin decelerates cellular senescence. *Cell Cycle*. 2009;8(12):1888–95.
63. Kaizuka T, Hara T, Oshiro N, Kikkawa U, Yonezawa K, Takehana K, et al. Tti1 and Tel2 are critical factors in mammalian target of rapamycin complex assembly. *J Biol Chem*. 25 de junho de 2010;285(26):20109–16.
64. Weichhart T. MTOR as Regulator of Lifespan, Aging, and Cellular Senescence: A Mini-Review. *Gerontology*. 2018;64(2):127–34.
65. Andras Perl. mTOR activation is a biomarker and a central pathway to autoimmune disorders, cancer, obesity, and aging. *Physiol Behav*. 2016;176(1):100–106.
66. Kucheryavenko O, Nelson G, von Zglinicki T, Korolchuk VI, Carroll B. The mTORC1-autophagy pathway is a target for senescent cell elimination. *Biogerontology* [Internet]. 2019;20(3):331–5. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10522-019-09802-9>
67. L’Huillier AG, Kumar D. Immunizations in solid organ and hematopoietic stem cell transplant patients: A comprehensive review. *Hum Vaccines Immunother*. 2015;11(12):2852–63.
68. Rubinsztein DC, Mariño G, Kroemer G. Autophagy and aging. *Cell*. 2011;146(5):682–95.
69. Li J, Kim SG, Blenis J. Rapamycin: One drug, many effects. Vol. 19, *Cell Metabolism*. 2014.
70. Arriola Apelo SI, Neuman JC, Baar EL, Syed FA, Cummings NE, Brar HK, et al. Alternative rapamycin treatment regimens mitigate the impact of rapamycin on glucose homeostasis and the immune system. *Aging Cell*. 2016;15(1):28–38.
71. Xu TT, Li H, Dai Z, Lau GK, Li BY, Zhu WL, et al. Spermidine and spermine delay brain aging by inducing autophagy in SAMP8 mice. *Aging (Albany NY)* [Internet]. 15 de abril de 2020 [citado 22 de julho de 2022];12(7):6401–14. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32268299/>
72. Zhang Z, Wu X, Duan J, Hinrichs D, Wegmann K, Zhang GL, et al. Low dose rapamycin exacerbates autoimmune experimental uveitis. *PLoS One*. 4 de maio de 2012;7(5).

73. Takeda T, Hosokawa M, Takeshita S, Irino M, Higuchi K, Matsushita T, et al. A new murine model of accelerated senescence. *Mech Ageing Dev.* 1981;17(2):183–94.
74. Takeda T. Senescence-accelerated mouse (SAM): A biogerontological resource in aging research. *Neurobiol Aging.* 1999;20(2):105–10.
75. Mukhopadhyay S, Frias MA, Chatterjee A, Yellen P, Foster DA. The Enigma of Rapamycin Dosage. *Mol Cancer Ther* [Internet]. 1 de março de 2016 [citado 19 de janeiro de 2023];15(3):347–53. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26916116/>
76. Jimeno A, Rudek MA, Kulesza P, Ma WW, Wheelhouse J, Howard A, et al. Pharmacodynamic-guided modified continuous reassessment method-based, dose-finding study of rapamycin in adult patients with solid tumors. *J Clin Oncol* [Internet]. 2008 [citado 19 de janeiro de 2023];26(25):4172–9. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18757332/>
77. Hagan MJ, Shenkar R, Srinath A, Romanos SG, Stadnik A, Kahn ML, et al. Rapamycin in Cerebral Cavernous Malformations: What Doses to Test in Mice and Humans. *Cite This ACS Pharmacol Transl Sci* [Internet]. 2022 [citado 19 de janeiro de 2023];2022:277. Available at: <https://doi.org/10.1021/acspsci.2c00006>
78. Yang L, Miao L, Liang F, Huang H, Teng X, Li S, et al. The mTORC1 Effectors S6K1 and 4E-BP Play Different Roles in CNS Axon Regeneration. *Nat Commun* [Internet]. 2014 [citado 19 de janeiro de 2023];5:5416. Available at: [/pmc/articles/PMC4228696/](https://www.nature.com/articles/PMC4228696)
79. Vézina C, Kudelski A. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)* [Internet]. 1975 [citado 19 de janeiro de 2023];28(10):721–6. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1102508/>
80. Li J, Kim G, Blenis J. Rapamycin: one drug, many effects An introduction to rapamycin: history and mechanism of action. *Cell Metab.* 2014;19(3).
81. Abraham RT, Wiederrecht GJ. Immunopharmacology of rapamycin. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:483–510.
82. Aso E, Ferrer I. It may be possible to delay the onset of neurodegenerative diseases with an immunosuppressive drug (rapamycin). [http://dx.doi.org/10.1517/147125982013799129](https://dx.doi.org/10.1517/147125982013799129) [Internet]. setembro de 2013 [citado 19 de janeiro de 2023];13(9):1215–9. Available at: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1517/14712598.2013.799129>
83. Arriola Apelo SI, Neuman JC, Baar EL, Syed FA, Cummings NE, Brar HK, et al. Alternative rapamycin treatment regimens mitigate the impact of rapamycin on glucose homeostasis and the immune system. *Aging Cell.* 1 de fevereiro de 2016;15(1):28–38.
84. Bjedov I, Toivonen JM, Kerr F, Slack C, Jacobson J, Foley A, et al. Mechanisms of life span extension by rapamycin in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Cell Metab* [Internet]. 6 de janeiro de 2010 [citado 21 de julho de 2022];11(1):35–46. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20074526/>

85. Folch J, Busquets O, Ettcheto M, Sánchez-López E, Pallàs M, Beas-Zarate C, et al. Experimental Models for Aging and their Potential for Novel Drug Discovery. *Curr Neuropharmacol*. 2017;16(10):1466–83.
86. Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Clinton M, Flurkey K, et al. Heterogeneous Mice. *Nature*. 2009;460(7253):392–5.
87. Zhang Y, Bokov A, Gelfond J, Soto V, Ikeno Y, Hubbard G, et al. Rapamycin extends life and health in C57BL/6 mice. *Journals Gerontol - Ser A Biol Sci Med Sci*. 2014;69 A(2):119–30.
88. Bielas J, Herbst A, Widjaja K, Hui J, Aiken JM, McKenzie D, et al. Long term rapamycin treatment improves mitochondrial DNA quality in aging mice. *Exp Gerontol [Internet]*. 2018;106(January):125–31. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2018.02.021>
89. Wilkinson JE, Burmeister L, Brooks S V., Chan CC, Friedline S, Harrison DE, et al. Rapamycin slows aging in mice. *Aging Cell*. 2012;11(4):675–82.
90. Neff F, Flores-Dominguez D, Ryan DP, Horsch M, Schröder S, Adler T, et al. Rapamycin extends murine lifespan but has limited effects on aging. *J Clin Invest [Internet]*. 2013 [citado 19 de janeiro de 2023];123:20. Available at: <http://www.jci.org>
91. Miller RA, Harrison DE, Astle CM, Fernandez E, Flurkey K, Han M, et al. Rapamycin-mediated lifespan increase in mice is dose and sex dependent and metabolically distinct from dietary restriction. *Aging Cell [Internet]*. 2014 [citado 21 de julho de 2022];13(3):468–77. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24341993/>
92. Onishi S, Ishino M, Kitazawa H, Yoto A, Shimba Y, Mochizuki Y, et al. Green tea extracts ameliorate high-fat diet-induced muscle atrophy in senescence-accelerated mouse prone-8 mice. *PLoS One*. 1 de abril de 2018;13(4).
93. Santos EW, de Oliveira DC, Hastreiter A, da Silva GB, Beltran JS de O, Tsujita M, et al. Hematological and biochemical reference values for C57BL/6, Swiss Webster and BALB/c mice. *Braz j vet res anim sci [Internet]*. 2016 [citado 20 de janeiro de 2023];53(2):138–45. Available at: <http://revistas.usp.br/bjvras/article/view/103850/114101>
94. Kevin Howcroft T, Campisi J, Louis GB, Smith MT, Wise B, Wyss-Coray T, et al. The role of inflammation in age-related disease. *Aging (Albany NY) [Internet]*. 2013 [citado 21 de julho de 2022];5(1):84–93. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23474627/>
95. Blevé A, Motta F, Durante B, Pandolfo C, Selmi C, Sica A. Immunosenescence, Inflammaging, and Frailty: Role of Myeloid Cells in Age-Related Diseases. *Clin Rev Allergy Immunol [Internet]*. 2016 [citado 20 de janeiro de 2023];1:3. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12016-021-08909-7>
96. Olivieri F, Prattichizzo F, Grillari J, Balistreri CR. Cellular Senescence and Inflammaging in Age-Related Diseases. 2018 [citado 20 de janeiro de 2023]; Available at: <https://doi.org/10.1155/2018/9076485>
97. Tonet AC, De O, Nóbrega T. Imunossenescência: a relação entre leucócitos, citocinas e

- doenças crônicas. *Rev Bras Geriatr e Gerontol* [Internet]. agosto de 2008 [citado 20 de janeiro de 2023];11(2):259–73. Available at: <http://www.scielo.br/j/rbgg/a/hYKx9yM6KfDR7ygsFLJPtsR/?lang=pt>
98. Nemoto Y, Kanai T, Takahara M, Oshima S, Nakamura T, Okamoto R, et al. Bone marrow-mesenchymal stem cells are a major source of interleukin-7 and sustain colitis by forming the niche for colitogenic CD4 memory T cells. 2012 [citado 20 de janeiro de 2023]; Available at: <http://dx>.
  99. Ikuta K, Hara T, Abe S, Asahi T, Takami D, Cui G. The Roles of IL-7 and IL-15 in Niches for Lymphocyte Progenitors and Immune Cells in Lymphoid Organs. *Curr Top Microbiol Immunol* [Internet]. 2021 [citado 20 de janeiro de 2023];434:83–101. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34850283/>
  100. Nguyen V, Mendelsohn A, Larrick JW. Interleukin-7 and Immunosenescence. *J Immunol Res* [Internet]. 2017 [citado 20 de janeiro de 2023];2017. Available at: </pmc/articles/PMC5397725/>
  101. Harrison DE, Astle CM, Delaittre JA. Loss of proliferative capacity in immunohemopoietic stem cells caused by serial transplantation rather than aging. *J Exp Med* [Internet]. 1 de maio de 1978 [citado 20 de janeiro de 2023];147(5):1526–31. Available at: <http://rupress.org/jem/article-pdf/147/5/1526/1393213/1526.pdf>
  102. Pang WW, Price EA, Sahoo D, Beerman I, Maloney WJ, Rossi DJ, et al. Human bone marrow hematopoietic stem cells are increased in frequency and myeloid-biased with age. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 13 de dezembro de 2011 [citado 20 de janeiro de 2023];108(50):20012–7. Available at: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1116110108>
  103. Rossi DJ, Bryder D, Zahn JM, Ahlenius H, Sonu R, Wagers AJ, et al. Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 28 de junho de 2005 [citado 20 de janeiro de 2023];102(26):9194–9. Available at: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.0503280102>
  104. Blevé A, Motta F, Durante B, Pandolfo C, Selmi C, Sica A. Immunosenescence, Inflammaging, and Frailty: Role of Myeloid Cells in Age-Related Diseases. *Clin Rev Allergy Immunol* [Internet]. 2022 [citado 20 de janeiro de 2023]; Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35031957/>
  105. Cano RLE, Lopera HDE. Introduction to T and B lymphocytes. 18 de julho de 2013 [citado 20 de janeiro de 2023]; Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459471/>
  106. Loder F, Mutschler B, Ray RJ, Paige CJ, Sideras P, Torres R, et al. B Cell Development in the Spleen Takes Place in Discrete Steps and Is Determined by the Quality of B Cell Receptor-derived Signals. *J Exp Med* [Internet]. 1999 [citado 20 de janeiro de 2023];190(1):75–89. Available at: <http://www.jem.org>

## APÊNDICES

Ficha do aluno, valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (SEM) dos resultados apresentados nesta dissertação e certificado CEUA.



23/01/2023 10:02

about:blank

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
FICHA DO ALUNO

---

9142 - 10952620/1 - Rafael dos Santos Barros

Email: rafaelstbarros@usp.br  
Data de Nascimento: 23/04/1995  
Cédula de Identidade: RG - 7263922 - PA  
Local de Nascimento: Estado do Pará  
Nacionalidade: Brasileira  
Graduação: Bacharelado em Biomedicina - Universidade do Estado do Pará - Pará - Brasil - 2018

---

Curso: Mestrado  
Programa: Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)  
Área: Fisiopatologia  
Data de Matrícula: 07/04/2021  
Início da Contagem de Prazo: 07/04/2021  
Data Limite para o Depósito: 09/10/2023  
Orientador: Prof(a). Dr(a). Joilson de Oliveira Martins - 07/04/2021 até o presente. Email: martinsj@usp.br  
Proficiência em Línguas: Inglês, 07/04/2021  
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 25/05/2022  
Data do Depósito do Trabalho:  
Título do Trabalho:  
Data Máxima para Aprovação da Banca:  
Data de Aprovação da Banca:  
Data Máxima para Defesa:  
Data da Defesa:  
Resultado da Defesa:  
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 07/04/2021

---

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 7493 em vigor a partir de 29/03/2018).

Última ocorrência: Matrícula Regular em 11/07/2022

Impresso em: 23/01/2023 10:01:11

about:blank

1/3

23/01/2023 10:02

about:blank

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**  
**FICHA DO ALUNO**

9142 - 10952620/1 - Rafael dos Santos Barros

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
BMB5700-16/2	Seminários Gerais de Fisiologia e Biofísica (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	08/04/2021	22/07/2021	30	2	85	A	N	Concluída
IBI5011-4/6	Introdução à Computação para Bioinformática (Curso Interunidades: Bioinformática - Universidade de São Paulo)	12/04/2021	31/07/2021	120	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
ICB5774-1/2	O Significado de Modelos e Teorias em Ciências Biológicas (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	10/05/2021	18/07/2021	60	4	100	A	N	Concluída
VNP5733-6/3	Preparação Pedagógica - Nutrição e Produção Animal (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo)	21/05/2021	02/07/2021	60	4	100	B	N	Concluída
FBC5793-14/6	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia I	12/08/2021	24/11/2021	15	1	100	A	N	Concluída
MPT5804-1/5	Bases Fisiopatológicas no Envelhecimento II (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	01/09/2021	12/10/2021	90	6	100	A	N	Concluída
FBC5722-5/4	Controle Hormonal da Resposta Inflamatória	13/09/2021	03/10/2021	60	4	100	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à disciplina FBC0519 - Imunodiagnóstico do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, ministrada aos alunos da Graduação do Curso de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. (1)	01/02/2022	30/06/2022	-	3	100	A	-	-
FBC5757-9/1	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia II	28/03/2022	10/07/2022	15	1	90	A	N	Concluída
IBI5731-1/1	Ferramentas de Bioinformática para Análise de Estruturas de Proteínas (Curso Interunidades: Bioinformática - Universidade de São Paulo)	31/10/2022	11/12/2022	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
<b>Disciplinas:</b>	0	25	25
<b>Estágios:</b>			
<b>Total:</b>	0	25	25

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

**Observações:**

1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588/05, alterada pelas Portarias GR-4391/09 e GR-4601/09 - PAE e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 07/12/2022

**Conceito a partir de 02/01/1997:**

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula Regular em 11/07/2022

about:blank

2/3

Tabela 4 - Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (SEM) referentes à Figura 3 - avaliação da evolução da massa corporal dos camundongos das linhagens SAM-P8 e SAM-R1.

		Massa corpórea (g)												
SAM-P8 RAPA	Dia/animal	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Média	DP	SEM
	0	29	29	28	27	28	26	31	31	28	25	28,2	1,93	0,61
	10	29	29	28	27	28	25	31	31	28	26	28,2	1,93	0,61
	20	29	30	29	28	29	26	33	31	29	25	28,9	2,28	0,72
	30	29	30	29	28	30	27	31	32	29	25	29	2,00	0,63
	40	29	30	30	28	30	27	34	33	29	25	29,5	2,64	0,83
	50	30	30	30	29	31	27	34	34	30	27	30,2	2,39	0,76
	60	30	30	29	28	31	28	35	34	29	25	29,9	2,92	0,92
		Massa corpórea (g)												
SAM-P8 CONTROLE	Dia/animal	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Média	DP	SEM
	0	27	26	27	27	29	32	31	30	28	23	28	2,62	0,83
	10	27	27	27	29	31	30	30	29	29	25	28,4	1,84	0,58
	20	27	26	23	28	30	31	31	29	28	25	27,8	2,62	0,83
	30	27	26	25	28	32	29	33	30	29	26	28,5	2,64	0,83
	40	28	26	25	29	31	30	30	31	28	26	28,4	2,17	0,69
	50	28	28	25	29	31	30	31	31	30	26	28,9	2,13	0,67
	60	28	26	29	29	28	32	31	30	28	26	28,7	1,95	0,62
		Massa corpórea (g)												
SAM-R1 RAPA	Dia/animal	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Média	DP	SEM
	0	40	37	36	37	37	39	38	38	42	36	38	1,89	0,60
	10	40	38	36	37	37	38	37	38	40	35	37,6	1,58	0,50
	20	41	38	39	38	37	38	38	40	40	36	38,5	1,51	0,48
	30	41	37	38	38	37	40	38	40	41	35	38,5	1,96	0,62
	40	40	39	39	39	38	39	38	39	40	34	38,5	1,72	0,54
	50	40	38	38	39	38	39	39	40	40	35	38,6	1,51	0,48
	60	40	37	38	39	38	38	39	41	40	35	38,5	1,72	0,54
		Massa corpórea (g)												
SAM-R1 CONTROLE	Dia/animal	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Média	DP	SEM
	0	39	38	34	34	38	39	39	39	40	39	37,9	2,13	0,67
	10	33	40	38	35	38	39	40	40	41	40	38,4	2,55	0,81
	20	41	40	36	35	39	40	41	41	43	42	39,8	2,53	0,80
	30	41	40	36	35	39	40	40	41	42	41	39,5	2,27	0,72
	40	41	40	36	35	39	40	40	41	42	41	39,5	2,27	0,72
	50	42	40	35	36	40	41	41	42	42	41	40	2,49	0,79
	60	41	40	36	36	42	42	42	42	41	41	40,3	2,36	0,75

Tabela 5 - Valores de referência do analisador BC-2800Vet (Mindray).

Parâmetro	Valor de referência
RBC ( $\times 10^{12}/L$ )	6.36-9.42 $\times 10^{12}/L$
HBG (g/dL)	11.0-14.3 g/dL
HCT (%)	34.6-44.6 %
MCV (fL)	48.2-58.3 fL
MCH (pg)	15.8-19.0 pg
MCHC (g/dL)	30.2-35.3 g/dL
RDW (%)	13.0-17.0 %
Leucócitos ( $\times 10^9/L$ )	0.8-6.8 $\times 10^{12}/L$
Linfócitos ( $\times 10^9/L$ )	0.7-5.7 $\times 10^9/L$
Monócitos ( $\times 10^9/L$ )	0.0-0.3 $\times 10^9/L$
Granulócitos ( $\times 10^9/L$ )	0.1- 1.8 $\times 10^9/L$

Tabela 6 - Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (SEM) referentes às Figura 4 - Concentração da citocina IL-1 $\beta$  em camundongos das linhagens SAM-P8 e SAM-R1.

		ng citocina x mg proteína <sup>-1</sup>							
amostra/animal		1	2	3	4	5	Média	DP	SEM
SAM-P8 RAPA	Soro	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Medula óssea	17,27	4,98	4,65	0,52	0,00	5,48	6,97	3,12
	Baço	0,00	3,57	0,00	1,96	2,46	1,60	1,57	0,70
	Timo	6,39	10,66	6,13	17,13	0,00	8,06	6,33	2,83
SAM-P8 CT	Soro	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Medula óssea	3,91	1,68	1,16	0,73	0,07	1,51	1,46	0,66
	Baço	3,02	2,53	1,74	1,30	0,18	1,75	1,10	0,49
	Timo	17,28	0,00	41,29	43,76	0,00	20,47	21,35	9,55
SAM-R1 RAPA	Soro	0,00	0,00	0,00	0,05	0,01	0,01	0,02	0,01
	Medula óssea	17,42	14,25	7,20	4,13	0,63	8,73	6,98	3,12
	Baço	7,50	4,66	3,01	2,97	1,92	4,01	2,19	0,98
	Timo	8,33	7,80	6,92	6,70	5,53	7,06	1,08	0,48
SAM-R1 CT	Soro	0,09	0,09	0,28	0,00	0,00	0,09	0,12	0,05
	Medula óssea	32,34	17,61	14,54	8,65	1,06	14,84	11,65	5,21
	Baço	8,08	7,60	7,59	6,41	2,06	6,35	2,47	1,11
	Timo	6,34	2,20	7,16	2,64	8,41	5,35	2,78	1,24

Tabela 7 - Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (SEM) referentes às Figura 5 - Concentração da citocina IL-6 em camundongos das linhagens SAM-P8 e SAM-R1.

		ng citocina x mg proteína <sup>-1</sup>							
	amostra/animal	1	2	3	4	5	Média	DP	SEM
SAM-P8 RAPA	Soro	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Medula óssea	3,58	10,16	0,00	16,21	60,73	18,13	24,61	11,00
	Baço	1,88	1,25	0,84	0,59	0,50	1,01	0,56	0,25
	Timo	12,89	8,87	2,11	1,26	1,16	5,26	5,34	2,39
SAM-P8 CT	Soro	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Medula óssea	3,14	12,95	1,36	3,12	0,00	4,12	5,11	2,29
	Baço	1,37	0,88	0,85	0,77	0,56	0,89	0,30	0,13
	Timo	24,75	2,84	2,27	1,49	1,39	6,55	10,19	4,56
SAM-R1 RAPA	Soro	0,00	0,12	0,21	0,10	0,00	0,09	0,09	0,04
	Medula óssea	13,21	4,43	3,39	3,17	1,45	5,13	4,64	2,08
	Baço	83,88	82,03	80,35	67,46	60,88	74,92	10,16	4,55
	Timo	33,33	32,98	29,26	28,10	24,23	29,58	3,76	1,68
SAM-R1 CT	Soro	0,04	0,00	1,27	0,34	0,46	0,42	0,51	0,23
	Medula óssea	38,96	14,20	8,69	6,28	4,97	14,62	14,06	6,29
	Baço	53,95	50,39	49,28	42,78	39,41	47,16	5,92	2,65
	Timo	24,27	18,51	18,11	13,41	11,15	17,09	5,08	2,27

Tabela 8 - Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (SEM) referentes às Figura 6 - Concentração da citocina TNF- $\alpha$  em camundongos das linhagens SAM-P8 e SAM-R1.

		ng citocina x mg proteína <sup>-1</sup>							
	amostra/animal	1	2	3	4	5	Média	DP	SEM
SAM-P8 RAPA	Soro	0,00	13,42	10,57	9,89	0,00	6,78	6,33	2,83
	Medula óssea	133,6	52,3	33,6	17,0	11,3	49,56	49,59	22,18
	Baço	167,5	102,2	92,5	73,5	41,0	95,35	46,63	20,86
	Timo	47,91	10,94	7,29	25,95	127,88	44,00	49,54	22,16
SAM-P8 CT	Soro	0,00	14,63	21,86	9,94	0,00	9,28	9,48	4,24
	Medula óssea	20,2	18,5	12,9	12,6	7,4	14,33	5,13	2,29
	Baço	149,8	124,2	65,7	51,5	7,8	79,81	57,14	25,55
	Timo	0,0	13,5	69,1	8,8	0,0	18,28	28,98	12,96
SAM-R1 RAPA	Soro	0,91	0,79	0,84	0,86	0,74	0,83	0,06	0,03
	Medula óssea	0,0	193,0	147,5	202,8	233,4	155,32	92,13	41,20
	Baço	44,4	31,1	38,0	38,9	79,4	46,36	19,08	8,53
	Timo	66,96	79,88	110,78	60,65	49,33	73,52	23,57	10,54
SAM-R1 CT	Soro	0,88	1,16	0,75	0,98	1,54	1,06	0,30	0,14
	Medula óssea	237,6	197,5	96,5	94,2	71,8	139,52	73,30	32,78
	Baço	20,1	20,0	19,4	19,0	18,7	19,44	0,60	0,27
	Timo	126,5	37,6	53,5	40,7	248,0	101,24	89,69	40,11

Tabela 9 - Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (SEM) referentes às Figura 7 - Concentração da citocina IL-7 em camundongos das linhagens SAM-P8 e SAM-R1.

Grupo/animal	ng citocina x mg proteína <sup>-1</sup>					Média	DP	SEM
	1	2	3	4	5			
SAM-P8 RAPA	1,76	4,11	55,07	14,45	26,90	20,46	21,75	9,73
SAM-P8 CT	8,95	0,55	0,00	0,67	0,00	2,03	3,88	1,73
SAM-R1 RAPA	2,23	0,00	10,15	8,65	14,79	7,16	6,02	2,69
SAM-R1 CT	0,00	3,86	5,45	1,70	12,34	4,67	4,76	2,13

Tabelas 10 - Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (SEM) referentes às Figura 7 - Concentração da citocina IL-15 em camundongos das linhagens SAM-P8 e SAM-R1.

Grupo/animal	ng citocina x mg proteína <sup>-1</sup>					Média	DP	SEM
	1	2	3	4	5			
SAM-P8 RAPA	26,4	76,6	98,7	415,2	57,5	134,88	158,95	71,09
SAM-P8 CT	66,19	25,09	29,80	39,40	41,60	40,42	15,93	7,12
SAM-R1 RAPA	316,2	212,1	169,9	107,4	155,9	192,31	78,71	35,20
SAM-R1 CT	68,85	135,26	149,07	52,80	50,00	91,20	47,34	21,17

Tabela 11 - Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (SEM) referentes à Figura 9 - Análise da proliferação de linfócitos esplênicos em camundongos das linhagens SAM-P8 e SAM-R1.

		Absorbância (570 - 600 nm)								
		Meio								
Grupo/animal		1	2	3	4	5	6	Média	DP	SEM
SAM-P8 RAPA		0,05	0,02	0,02	0,03	0,10	0,05	0,04	0,03	0,01
SAM-P8 CT		0,07	0,03	0,03	0,07			0,05	0,02	0,01
SAM-R1 RAPA		0,05	0,08	0,07	0,05	0,05	0,13	0,07	0,03	0,01
SAM-R1 CT		0,00	0,04	0,18	0,09			0,08	0,07	0,04
		ConA 1µg/mL								
Grupo/animal		1	2	3	4	5	6	Média	DP	SEM
SAM-P8 RAPA		0,84	0,56	0,53	0,66	0,81	0,55	0,66	0,14	0,06
SAM-P8 CT		0,76	0,61	0,96	0,84			0,79	0,15	0,07
SAM-R1 RAPA		0,41	0,54	0,48	0,52	0,50	0,76	0,53	0,12	0,05
SAM-R1 CT		0,40	0,60	0,92	0,66			0,64	0,21	0,11



Tabela 12 - Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (SEM) referentes à Figura 10 – Análise das populações e subpopulações de linfócitos do baço definidas por citometria de fluxo.

CD19 <sup>+</sup> (% células totais)									
Grupo/animal	1	2	3	4	5	6	Média	DP	SEM
SAM-P8 RAPA	51,7	51,5	51,9	48	52,8	50	50,98	1,72	0,70
SAM-P8 CT	47,8	47,1	47,2	53			48,78	2,83	1,42
SAM-R1 RAPA	52,6	48,8	49,1	42,3	39,4	41,6	45,63	5,23	2,14
SAM-R1 CT	35	46,1	49,6	52,6			45,83	7,69	3,84
CD3 <sup>+</sup> (% células totais)									
Grupo/animal	1	2	3	4	5	6	Média	DP	SEM
SAM-P8 RAPA	36,6	36,3	37,9	40,2	37,2	39,4	37,93	1,57	0,64
SAM-P8 CT	36,9	32,9	38,6	32,1			35,13	3,13	1,56
SAM-R1 RAPA	35,7	37,9	36,6	43,6	46,3	43,7	40,63	4,44	1,81
SAM-R1 CT	38,2	40,4	36,7	33			37,08	3,11	1,56
CD8 <sup>+</sup> (% em células CD3 <sup>+</sup> )									
Grupo/animal	1	2	3	4	5	6	Média	DP	SEM
SAM-P8 RAPA	35	38	35,9	35,6	34,9	33,5	35,48	1,49	0,61
SAM-P8 CT	38,5	37,7	37,8	41,1			38,78	1,59	0,80
SAM-R1 RAPA	26,8	26,2	29,3	26,6	26	29,5	27,40	1,58	0,64
SAM-R1 CT	22,3	22,6	21,8	21,1			21,95	0,66	0,33
CD4 <sup>+</sup> (% em células CD3 <sup>+</sup> )									
Grupo/animal	1	2	3	4	5	6	Média	DP	SEM
SAM-P8 RAPA	48,6	51,4	54,5	52,3	52,8	54	52,27	2,12	0,87
SAM-P8 CT	39,9	50,6	41,3	45,8			44,40	4,84	2,42
SAM-R1 RAPA	61,6	63,7	61	64,5	63,9	55,9	61,77	3,19	1,30
SAM-R1 CT	61,6	61,5	65,7	63,5			63,08	1,98	0,99
FOXP3 <sup>+</sup> (% em células CD4 <sup>+</sup> )									
Grupo/animal	1	2	3	4	5	6	Média	DP	SEM
SAM-P8 RAPA	7,99	8,34	8,06	8,34	18,7	9,16	10,10	4,23	1,73
SAM-P8 CT	7,78	8,58	7,99	11,3			8,91	1,63	0,81
SAM-R1 RAPA	15,3	14,8	15,6	14,4	15,9	17	15,50	0,91	0,37
SAM-R1 CT	11	19,9	15,7	18,8			16,35	3,99	1,99

Tabela 13 - Valores individuais, média, desvio padrão (DP) e erro padrão da média (SEM) referentes à Figura 11 – Avaliação das linhagens mieloides e linfoides de camundongos SAM-P8 e SAM-R1.

% de Células em 100 células por campo								
Mieloide								
Grupo/animal	1	2	3	4	5	Média	DP	SEM
SAM-P8 RAPA	67	66	60	64	58	63,00	3,87	1,73
SAM-P8 CT	80	75	60	63	61	67,80	9,09	4,07
SAM-R1 RAPA	70	75	60	69	64	67,60	5,77	2,58
SAM-R1 CT	72	60	74	69	63	67,60	5,94	2,66
Linfoide								
Grupo/animal	1	2	3	4	5	Média	DP	SEM
SAM-P8 RAPA	33	34	40	36	42	37,00	3,87	1,73
SAM-P8 CT	20	25	40	37	39	32,20	9,09	4,07
SAM-R1 RAPA	30	25	40	31	36	32,40	5,77	2,58
SAM-R1 CT	28	40	36	31	37	34,40	4,83	2,16



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
 Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

CEUA/FCF 068.2021 – CEUA 632

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação do impacto da autofagia na regulação do fenótipo senescente de linfócitos em modelo animal tratado com rapamicina**”, registrada com o nº **632**, sob a responsabilidade do pesquisador Rafael dos Santos Barros, sob a orientação do Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins – que envolve produção ou manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto Federal nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e das normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP), em reunião de **05 de novembro de 2021**.

Finalidade	<b>Pesquisa Científica</b>
Vigência da autorização	<b>03/01/2022 a 31/12/2025</b>
Espécie/Linhagem	<b>Camundongo SAM-P8</b>
Número de animais	<b>48</b>
Sexo	<b>Macho</b>
Peso/Idade	<b>25-30 gramas / 12-14 semanas</b>
Espécie/Linhagem	<b>Camundongo SAM-R1</b>
Número de animais	<b>48</b>
Sexo	<b>Macho</b>
Peso/Idade	<b>25-30 gramas / 12-14 semanas</b>
Origem	<b>Biotério FCF/IQ</b>

Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento do projeto de pesquisa, o respectivo **relatório final**.

**Ressaltamos que, após o período de término do projeto de pesquisa, nenhum ensaio poderá ser realizado.**

São Paulo, 05 de novembro de 2021

  
**Prof. Dra. Irene Satiko Kikuchi**  
 Coordenadora CEUA/FCF/USP