Gabriel Ribeiro Júnior

**Avaliação morfofuncional e expressão gênica de Sirt1 no pulmão de
camundongos jovens e idosos expostos ao particulado da exaustão de
diesel (DEP)**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientador: Profa. Dra. Thais Mauad

Versão Corrigida
A versão original se encontra disponível na FMUSP.

São Paulo
2016

Gabriel Ribeiro Júnior

**Avaliação morfofuncional e expressão gênica de Sirt1 no pulmão de
camundongos jovens e idosos expostos ao particulado da exaustão de
diesel (DEP)**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientador: Profa. Dra. Thais Mauad

Versão Corrigida
A versão original se encontra disponível na FMUSP.

São Paulo
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Ribeiro Júnior, Gabriel

Avaliação morfofuncional e expressão gênica de Sirt1 no pulmão de camundongos jovens e idosos expostos ao particulado da exaustão de diesel (DEP) / Gabriel Ribeiro Júnior. -- São Paulo, 2016.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Thais Mauad.

Descritores: 1.Envelhecimento 2.Pulmão 3.Sirtuínas 4.Sirtuina 1 5.Poluição do ar 6.Emissões de veículos

USP/FM/DBD-395/16

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais, Gabriel e Maria Aparecida, por uma vida inteira de renúncias em favor da realização dos filhos, vocês são meus exemplos de determinação, caráter e amor. Aos meus irmãos, Ângelo e Sheila, pelo apoio, incentivo nos momentos mais difíceis dessa jornada. Aos meus sobrinhos que tanto amo, Raphael e Adele, pelos excelentes momentos de alegria, brincadeira e descontração. Essa obra é inteiramente dedicada a vocês.

A minha orientadora, Profa. Dra. Thais Mauad, por acreditar em mim, pela oportunidade, apoio, paciência, pelos inúmeros ensinamentos, pela excelência e sabedoria que sempre demonstrou ao me orientar durante esses anos.

Aos meus grandes amigos que encontrei nesse percurso, Natália, Luciano e Adair, pela ajuda durante todo o trabalho, mas principalmente, pela amizade, pela companhia, pelos conselhos nos momentos difíceis. Esse trabalho não seria o mesmo sem o apoio de vocês, muito obrigado.

Ao Prof. Dr. Paulo Saldiva por todos os ensinamentos.

A Fátima Stangueti pela amizade.

Ao Luís Amato pela ajuda nas análises do material particulado.

A Profa. Dra. Sandra Farsky e Paula Gabriela pela ajuda com as análises de PCR.

A Profa. Dra. Tania Marcourakis e Stephanie pela ajuda com as análises de espectrofotometria.

A Dra. Susan Ribeiro pela ajuda nas análises do CBA.

A Dra. Mariana Veras pela ajuda com a técnica de estereologia.

A Dra. Fernanda Degobbi pelo auxílio nas análises da mecânica.

Aos amigos do laboratório de histologia, em especial Kely Soares, pela amizade, ensinamentos e prontidão nas montagens das lâminas histológicas.

Aos funcionários do museu do departamento de patologia, Ana, Carlos e Reginaldo pelo auxílio nas lâminas histológicas digitalizadas.

Por fim, agradeço as agências financiadoras, INAIRA/FAPESP, CNPq e CAPES, pelo auxílio financeiro.

EPÍGRAFE

“Quando perguntado sobre qual era a sua maior peça,
a resposta de Charles Chaplin era sempre a mesma: ‘A próxima!’.

Não há impasse se está imbuído de desafio.

Não se anda porque existe um caminho;

por andar é que se abre o caminho”.

Dr. Daisaku Ikeda (*sensei*)

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de Internacional Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marianalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª. ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Gráficos

Lista de Tabelas

Lista de Símbolos

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 Poluição do Ar	23
2.2 Partículas da exaustão de diesel e fontes de emissão.....	27
2.3 Efeitos biológicos das DEPs no sistema respiratório.....	29
2.4 Envelhecimento.....	35
2.5 Sirtuínas	41
3. JUSTIFICATIVA.....	47
4. OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICOS	48
4.1 Objetivo Geral	48
4.2 Objetivos Específicos	48
5. MATERIAIS E MÉTODOS	50
5.1 Grupos Experimentais.....	50
5.2 Desenho Experimental.....	51
5.3 Sistema de gerador do aerossol da queima do combustível diesel	52
5.4 Caracterização da exposição.....	53
5.5 Análise da mecânica respiratória – FlexVent	54
5.6 Coleta do Material Biológico	56
5.6.1 Pulmões.....	56
5.6.2 Sangue/Plasma.....	57
5.6.3 Demais órgãos.....	57
5.7 Análises do Lavado Broncoalveolar (LBA)	57

5.8 Análise do Lavado medular	60
5.9 RT- PCR.....	61
5.10 Análises do estresse oxidativo	63
5.10.1. Atividade de glutathione peroxidase (GPx)	64
5.10.2. Atividade de glutathione reductase (GR)	65
5.10.3. Atividade glutathione S-transferase (GST)	67
5.10.4. Atividade da Cu/ZnSOD	68
5.11 Estereologia.....	70
5.11.1 Amostragem e inclusão	71
5.11.2 Volume Pulmonar (“Reference Space”)	72
5.11.3 Volume (V) e Densidade de Volume (Vv) dos Compartimentos Pulmonares	73
5.11.4 Áreas de superfície total e Densidade de superfície dos alvéolos, vias aéreas e vasos sanguíneos.	74
5.11.5 Estimativa da espessura dos septos alveolares (Arithmetic mean thickness)	76
5.12 Análise de colágeno e fibras elásticas no parênquima pulmonar e nas vias aéreas	76
5.13 Análise Estatística	77
6. RESULTADOS	79
6.1 Análise das propriedades físico-química do combustível diesel	79
6.2 Análise dos parâmetros monitorados em tempo real durante as exposições.....	81
6.3 Análise elementar do material particulado 2,5 (PM _{2,5})	83

6.4	Análise do peso dos animais após as exposições	85
6.5	Análise dos parâmetros funcionais	86
6.6	Análise de células inflamatórias totais no lavado medular, soro e LBA.....	88
6.7	Análise da quantificação das citocinas no soro e LBA	92
6.8	Análise das expressões gênicas das Sirtuínas.....	95
6.9	Análise das atividades enzimáticas das glutations	97
6.10	Análises Morfológicas	99
6.10.1	Análises morfológicas no parênquima	101
6.10.2	Análises morfológicas nas vias aéreas	105
6.10.3	Análises morfológicas nos vasos	110
6.10.4	Análises morfológicas do tecido conjuntivo	113
6.11	Histopatológico.....	115
6.12	Remodelamento tecidual.....	117
6.12.1	Análises de colágeno.....	117
6.12.2	Análises de fibras elásticas.....	119
7.	DISCUSSÃO	121
8.	CONCLUSÃO	126
9.	ANEXO.....	127
	Anexo A:.....	127
	Anexo B: Aprovação do comitê de ética em pesquisa	130
10.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131

Lista de abreviaturas e siglas

SIRT1 – sirtuína 1

DEP – particulado de exaustão de diesel

C57BL/6 – linhagem de camundongos

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

UNFPA – O Fundo de População das Nações Unidas

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

WHO – World Health Organization

HDACS – família classe III das deacetilases de histonas

SIR₂ – silente information regulator 2

RMSP – Região Metropolitana de São Paulo

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

EPA – Environmental Protection Agency

OMS – Organização Mundial de Saúde

DENATRAN / SP – Departamento de trânsito de São Paulo

DEPs – Partículas de exaustão de diesel

ROS – Espécies reativas de oxigênio

ERN – espécies reativas de nitrogênio

O₂⁻ – ânion superóxido

ONOO⁻ - ânion peroxinitrito

OH⁻ - radicais hidroxila

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

SOD – Superóxido dismutase

Cu/Zn SOD (SOD1) – Superóxido dismutase dependente de cobre-zinco

MnSOD (SOD2) – Superóxido dismutase dependente de manganês

EC SOD (SOD3) – Superóxido dismutase extracelular

GSH – glutationa
GSSG – glutationa oxidada
GPX – glutationa peroxidase
GR – glutationa redutase
MPO – mieloperoxidase
NF-kB – do inglês, *fator nuclear Kappa B*
P65Rel/A - constituinte da família de NF-kB
TNF- α – fator de necrose tumoral alfa
IL1 β – interleucina IL1 β
IL6 – interleucina 6
IL10 – interleucina 10
IL8 – interleucina 8
CVF – capacidade vital forçada
FEV1 – volume expiratório no primeiro segundo
EL – elastina
Col 1a1, 3a1, 6a3 – tipos de colágenos.
MMP9- matriz metaloproteinase 9
TIMP1 – inibidor de metaloproteinase 1
HSF1 – proteínas de choque térmico
FOXO – do inglês, *Forkhead box*
JNK – proteína quinase
MCP1 – proteína quimiotática de monócitos
MIP2 – proteína inflamatória de macrófago – 2
CBA – do inglês, Cytometric beads array
ATS – American Thoracic Society
ERS – European Respiratory Society
SO₂ – dióxido de enxofre

CO – monóxido de carbono

O₃ – ozônio

HC – hidrocarboneto

NO_x – óxidos de nitrogênio

NO₂ – óxido nítrico

MP_{2,5} – material particulado 2,5 micras

MP₁₀ – material particulado 10 micras

PTS – partículas totais em suspensão

NMHC – hidrocarbonetos não metano

N – nitrogênio

S – enxofre

Fe – ferro

Cu – cobre

O₂ – oxigênio

Lista de Figuras

Figure 1: Comparativo do material particulado (MP_{10} – $MP_{2,5}$) com demais materiais.....	26
Figure 2: DEP e seus compostos orgânicos e inorgânicos adsorvidos em sua superfície.....	29
Figure 3: Desequilíbrio entre os sistemas pró-oxidantes e antioxidantes.....	32
Figure 4: Representação do desenho experimental.....	51
Figure 5: Desenho esquemático do sistema de exposição e gerador de aerossol da queima do combustível diesel.	53
Figure 6: Reações catalisadas pelas enzimas xantina oxidase (XO) e superóxido dismutase (SOD).....	69
Figure 7: Representação esquemática dos métodos e amostragem do pulmão para o estudo estereológico.....	71
Figure 8: Programa IMAGJ.....	74
Figure 9: Sistema teste de arcos ciclóide	75
Figure 10: Fotomicrografias representativas do tecido pulmonar (coloração H&E).	115

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Representação gráfica dos parâmetros monitorados em tempo real ..	81
Gráfico 2 - Representação gráfica dos parâmetros monitorados NO e NO.	82
Gráfico 3 – Representação gráfica do peso dos animais após as exposições.....	85
Gráfico 4 - Representação gráfica da mecânica respiratória.....	87
Gráfico 5 - Representação gráfica do número de células inflamatórias totais.....	89
Gráfico 6 - Representação gráfica da contagem diferencial no LBA.	90
Gráfico 7 - Representação gráfica da quantificação de IL1b e IL6 no soro e LBA.	92
Gráfico 8 – Representação gráfica da quantificação de IL10 e TNF no soro e LBA.	94
Gráfico 9 - Representação gráfica das expressões genicas das sirtuínas.	96
Gráfico 10 - Representação gráfica das atividades enzimáticas glutationala peroxidase; glutationala redutase; glutationala S-transferase e superóxido dismutase.	98
Gráfico 11 – Representação do volume total pulmonar.	99
Gráfico 12 - Representação gráfica da proporção do volume total pulmonar / peso corpóreo.	100
Gráfico 13 – Representação gráfica dos parâmetros do septo e espaço alveolar.	103
Gráfico 14 - Representação gráfica da estimativa da espessura dos septos alveolares (ATM).	104
Gráfico 15 - Representação gráfica das vias aéreas.....	108
Representação gráfica das vias aéreas.	109
Gráfico 17- Representação gráfica dos vasos.....	112
Gráfico 18 - Representação gráfica do tecido conjuntivo.	114
Gráfico 19 – Representação gráfica da proporção de colágeno.	118
Gráfico 20 – Representação gráfica da proporção de fibras elásticas.	120

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Características dos principais poluentes considerados indicadores da qualidade do ar, principais fontes e efeitos gerais ao meio ambiente em São Paulo.	25
Tabela 2 – Sirtuínas nos mamíferos, localização, interações e funções metabólicas.	42
Tabela 3 - Sequências dos primers avaliados.....	62
Tabela 5 – Propriedades físico-química do óleo diesel.	79
Tabela 6 – Caracterização elementar das amostras de MP _{2,5}	83
Tabela 7 – Concentração qualitativa de enxofre no material particulado.	84
Tabela 8 - Resultados não significativos.	Erro! Indicador não definido.

Lista de Símbolos

> - maior

< - menor

°C – graus celsius

μm – micrômetro

mm - milímetro

mg/Kg – miligrama por quilograma

α – alfa

β – beta

≤ - menor igual

≥ - maior igual

mL – mililitro

mg/m³ – miligrama por metro cúbico

μg/m³ – micrograma por metro cúbico

m³ – metro cúbico

g – grama

rpm – rotações por minuto

μL – microlitros

pg/mL – picograma por mililitro

U/uL – unidade por microlitro

U/ug – unidade por micrograma

mm – milímetros

mm² – milímetro quadrado

v – volume

vv – densidade de volume

ppm – partes por milhão

n – número

nm – nanômetro

cmH₂O – centímetro de água

min - minuto

Ribeiro JG. Avaliação morfofuncional e expressão gênica de Sirt1 no pulmão de camundongos jovens e idosos expostos ao particulado da exaustão de diesel (DEP) [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

A deterioração da qualidade do ar ameaça a qualidade de vida dos habitantes nos grandes centros urbanos. O material particulado é constituído por partículas sólidas, líquidas ou ambas, suspensas no ar. Os idosos são o grupo mais susceptível aos efeitos negativos da poluição atmosférica e essa população vem crescendo exponencialmente no mundo inteiro, afetando quase todos os países do mundo, inclusive o Brasil, atualmente representado por um contingente populacional correspondente a 12% da população. Há fortes evidências científicas que a família das sirtuínas tem grande influência no processo do envelhecimento e longevidade em mamíferos. Alguns estudos apontam uma função protetora de Sirt1 contra danos oxidativos e inflamatórios. O objetivo desse estudo é avaliar o impacto das partículas de exaustão do diesel (DEP) sobre as alterações pulmonares decorrentes do processo do envelhecimento e a possível influência das sirtuínas nesse processo. Camundongos na idade de 02 meses e 15 meses foram expostos às DEPs ou ar filtrado por um período de 30 dias. Os parâmetros funcionais foram mensurados pelo FlexiVent. Após as exposições os pulmões foram coletados e o perfil inflamatório avaliado no lavado broncoalveolar e no soro sanguíneo, por meio das mensurações das citocinas inflamatórias. O estresse oxidativo foi avaliado pela técnica espectrofotometria e as expressões gênicas das sirtuínas foram mensuradas pela técnica de RT-PCR no homogenato do tecido pulmonar. De forma geral, além das diferenças fisiológicas relacionadas com a idade observadas entre os grupos, às exposições as DEPs afetaram o perfil inflamatório e as enzimas antioxidantes nos animais jovens e idosos. Além disso, o grupo idoso apresentou comprometimento no ganho de peso e aumento na deposição de colágeno no tecido pulmonar. As exposições diminuíram os níveis de expressão gênica de Sirt6, enquanto Sirt1 foi diminuída com a idade. Em conjunto, os dados obtidos enfatizam que as exposições ambientais aceleraram as alterações associadas ao envelhecimento pulmonar.

Descritores: Envelhecimento, pulmão, sirtuínas, sirtuína1, poluição do ar, emissões veiculares.

Ribeiro JG: Morphofunctional evaluation and Sirt1 gene expression in the lungs of young and old mice exposed to diesel exhaust particulate (DEP) [Dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina de São Paulo”; 2016.

The deterioration of the air quality is a threat to the habitants' quality of life of the urban areas. The particulate matter is constituted of solid, liquid or both particles suspended in the air. The elderly is the most susceptible group to the harmful effects of the air pollution and this population is growing exponentially all over the world, affecting almost all the countries, including Brazil, representing 12.1% of the population. There are strong scientific evidences that the Sirtuins family has great influence on the aging and longevity process in mammals. Some studies points out a Sirt1 protective function against oxidative and inflammatory damage. This study aims to evaluate the impact of the diesel exhaust particulate (DEP) on the pulmonary changes resulting from the aging process and the possible influence of the sirtuins in this process. Two and fifteen months old mice were exposed to DEP for a period of 30 days. Functional assessment of these animals was measured by FlexiVent. After the exposures period, the lungs were collected and the inflammatory profile was evaluated in the bronchoalveolar lavage fluid and blood serum, by means of the measurements of the inflammatory cytokines. Oxidative stress was evaluated by the spectrophotometric technique and the sirtuin gene expression was measured by the RT-PCR technique in the pulmonary tissue homogenate. Our data showed that, besides the age-related physiological differences observed between groups; exposure to DEPs affected the inflammatory profile and antioxidant enzymes activity in young and old animals. In addition, the elderly group presented compromised in weight gain and increased collagen deposition in lung tissue. The exposures decreased gene expression levels of Sirt6, while Sirt1 was decreased due to age. Taken together, the data obtained emphasize that environmental exposures accelerated changes associated with pulmonary aging.

Descriptors: Aging, lung; sirtuins, sirtuin 1; air pollution; vehicle emissions.

1. INTRODUÇÃO

A poluição atmosférica é definida como uma mistura de partículas e gases que interagem entre si e com a atmosfera. Entende-se por poluentes atmosféricos toda e qualquer forma de matéria ou energia com intensidade e em quantidade, tempo ou características em desacordo com os níveis estabelecidos, e que tornem ou possam tornar o ar impróprio, nocivo ou ofensivo à saúde, danoso aos materiais, à fauna e à flora (CETESB; 2015).

Poluentes atmosféricos como o dióxido de enxofre (SO_2); monóxido de carbono (CO); Ozônio (O_3); hidrocarbonetos (HC), Óxidos de Nitrogênio (NO_x) e material particulado (MP) servem como indicadores de qualidade do ar (Brook et al., 2009). O MP que é uma mistura de partículas sólidas, líquidas, ou ambas suspensas no ar, constituído por compostos orgânicos e inorgânicos, amplamente correlacionado á efeitos deletérios na saúde humana (CETESB, 2013; WHO, 2005; Danielsen et al., 2008).

Nos grandes centros urbanos a deterioração da qualidade do ar ocorre principalmente em decorrência das emissões de poluentes de origem veicular. A frota veicular no Estado de São Paulo é composta por 25,7 milhões de unidades. A região Metropolitana de São Paulo detém cerca de 46,1% desse montante e os motores ciclo diesel representam 378 mil veículos (DENATRAN, 2015; CETESB, 2013).

A literatura é vasta no que diz respeito aos grupos mais susceptíveis aos efeitos negativos da poluição atmosférica e ressalta os efeitos prejudiciais aos idosos (Emmerechts et al., 2012; Sacks et al., 2011). Esse grupo etário vem crescendo exponencialmente no mundo inteiro, sendo um fenômeno que afeta quase todos os países do mundo (UNFPA, 2012). O Brasil acompanha essa tendência mundial mudando de forma acelerada, em 2012 esse grupo etário era representado por um montante de 21 milhões de habitantes, e as projeções apontam um crescimento expressivo até 2050 (IBGE, 2013).

Várias modificações morfológicas e fisiológicas permeiam o processo do envelhecimento acarretando em perdas progressivas da capacidade do indivíduo de adaptar-se ao ambiente (Cesari et al., 2013).

Evidências vêm demonstrando a interação da família das sirtuínas no envelhecimento e longevidade nos mamíferos (Blender e Guarente, 2004; Cantó e Auwerx 2009; Morris, 2012). As sirtuínas são proteínas da classe III da família das desacetilases de histonas (HDACs) dependentes de NAD⁺ que receberam essa denominação devido à semelhança com a proteína Sir2 (*silente information regulator 2*) identificada inicialmente em leveduras (*saccharomyces cerevisiae*) por desempenhar um papel fundamental na regulação do envelhecimento e longevidade (Blander e Guarente, 2004; Cantó e Auwerx, 2009).

Ainda não é bem definido o papel das sirtuínas no envelhecimento e longevidade, alguns estudos mostram uma função protetora em resposta a insultos de estresse celular (Brunet et al., 2003; Yamamoto et al., 2013). Essas

proteínas são fortemente influenciadas por mudanças ambientais e estilo de vida (Kelly, 2010).

Portanto, este estudo pretende investigar as exposições ambientais como um possível acelerador do envelhecimento pulmonar e o possível papel das sirtuínas neste contexto.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Poluição do Ar

As últimas décadas são marcadas por avanços voltados para uma melhoria na qualidade do ar nos grandes centros urbanos. Na região Metropolitana de São Paulo (RMSP) os problemas de deterioração da qualidade do ar ocorrem, principalmente, em função das emissões dos poluentes de origem veicular (CESTEB, 2015; Yanagi et al., 2012).

No ano de 2012, sete milhões de pessoas morreram decorrentes das exposições à poluição atmosférica em todo mundo. No estado de São Paulo estima-se um montante de 11 mil mortes/ano sejam decorrentes das exposições de poluentes ambientais, além da redução da expectativa de vida em 1,5 anos (Saldiva et al., 2013). Segundo a World Health Organization (WHO) medidas na tentativa de reduzir os poluentes atmosféricos podem salvar milhões de vidas em todo mundo (WHO, 2015).

As projeções apontam que no ano de 2050, excluindo as doenças crônicas não evitáveis, as complicações cardiorrespiratórias decorrentes das exposições aos poluentes atmosféricos podem tornar-se a principal causa de mortes evitáveis, superando a malária, o consumo de água insalubre e a falta de saneamento básico (Sigman Richard et al., 2012).

Poluentes atmosféricos são definidos como qualquer forma de matéria ou energia com intensidade e em quantidade, concentração, tempo ou características em desacordo com os níveis estabelecidos, e que tornem ou possam tornar o ar impróprio, nocivo ou ofensivo à saúde, inconveniente ao bem-estar público, danoso aos materiais, à fauna e à flora ou prejudicial à segurança, ao uso e gozo das propriedades e às atividades normais da comunidade. De acordo com a sua origem, podem ser classificados como poluentes primários (emitidos diretamente pelas fontes de emissão) ou secundários (formados na atmosfera pelas reações químicas entre poluentes e/ou constituintes naturais na atmosfera) (CONAMA Nº 3 de 28/06/1990).

Os poluentes indicadores de qualidade do ar selecionados por seus efeitos adversos à saúde humana compreendem: partículas inaláveis finas ($MP_{2,5}$); partícula inaláveis (MP_{10}); partículas totais em suspensão (PTS); dióxido de enxofre (SO_2); dióxido de nitrogênio (NO_2); monóxido de carbono (CO) e ozônio (O_3).

Tabela 1– Características dos principais poluentes considerados indicadores da qualidade do ar, principais fontes e efeitos gerais ao meio ambiente em São Paulo.

Poluente	Característica	Principais Fontes	Efeitos Nocivos
MP_{2,5}	Na forma de poeira, neblina, aerossol, fumaça, fuligem, percorre longas distancias.	Indústrias, veículos, aerossol secundário.	Danos à vegetação, solo, água e compromete visibilidade.
MP₁₀	Na forma de poeira, neblina, aerossol, fumaça, fuligem.	Indústrias, veículos, poeira ressuspensa, aerossol secundário.	Danos à vegetação, solo, água e compromete visibilidade.
PTS	Na forma de poeira, neblina, aerossol, fumaça.	Indústrias, veículos, poeira, queima de biomassa, fontes naturais.	Danos à vegetação, solo, água e compromete visibilidade
SO₂	Gás incolor, odor característico, transforma em SO ₃ , passando rapidamente a H ₂ SO ₄ . Principal componente das partículas inaláveis.	Refinaria de petróleo, veículos a diesel, produção de polpa e papel, fertilizantes.	Formação de chuva ácida, corrosão aos materiais e danos à vegetação.
NO₂	Gás marrom avermelhado, forte odor e muito irritante. Formação de ácido nítrico, nitratos, e compostos orgânicos tóxicos.	Veículos, industriais, usinas térmicas que utilizam óleo ou gás, incinerações.	Formação de chuva ácida, danos à vegetação e à colheita.
CO	Gás incolor, inodoro e insípido.	Veículos	
O₃	Gás incolor, inodoro nas concentrações ambientais e o principal componente da névoa fotoquímica.	Produzido fotoquimicamente pela radiação solar.	Vegetação natural, plantações agrícolas; plantas ornamentais.

Legenda: MP_{2,5}-material particulado tamanho $\leq 2,5$ micra; MP₁₀-material particulado tamanho ≤ 10 micra; PTS-partículas totais em suspensão ≤ 50 micra; SO₂ -Dióxido de enxofre; NO₂-óxido nítrico; CO-monóxido de carbono; O₃-ozônio.
Fonte: Adaptado de CETESB, 2014.

O material particulado (MP) é uma mistura de partículas que podem ser sólidas, líquidas ou ambas, suspensas no ar, constituídas por compostos orgânicos e inorgânicos. Podem ser classificadas em frações grossas (MP₁₀) de diâmetro aerodinâmico entre 2,5 a 10 µm provenientes do solo, materiais de construções, estradas de rodagens (fricção dos pneus dos veículos contra o solo); frações finas (MP_{2,5}) partículas de diâmetro menor que 2,5 µm proveniente da combustão incompleta de veículos automotores, indústrias, usinas termoelétricas; e as frações ultrafinas (MP_{0,1}) de diâmetro aerodinâmico menor que 0,1 µm, provenientes da combustão incompleta de combustíveis fósseis. Estas apresentam um tempo de permanência na atmosfera relativamente curto, por se agregarem progressivamente formando partículas maiores (Pope et al., 2000; Brook et al., 2004; Pope e Dockery, 2006; WHO, 2006; Dockery, 2009; CETESB, 2014; EPA, 2015).

FONTE: Environmental Protection Agency (EPA), 2015.

Figure 1: Comparativo do material particulado (MP₁₀ – MP_{2,5}) com outros materiais.

Segundo as recomendações da WHO, os níveis de $PM_{2,5}$ não devem ultrapassar $25 \mu g/m^3$ em 24 horas e a média anual é de $10 \mu g/m^3$. A média em 24 horas nos níveis de PM_{10} não devem ultrapassar $50 \mu g/m^3$ e a média anual é de $20 \mu g/m^3$ (WHO 2006).

No Brasil, o órgão responsável pelo monitoramento dos níveis de PM_{10} , O_3 , CO, NO_2 e SO_2 , PTS na região metropolitana de São Paulo (RMSP), desde o ano de 2000, é a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB). Segundo esta agência, os valores de MP_{10} abaixo de $50 \mu g/m^3$ não oferecem riscos à saúde humana, enquanto que os valores acima de $50 \mu g/m^3$ são capazes de afetar populações mais susceptíveis. Já os valores $\geq 300 \mu g/m^3$ são considerados ruins, trazendo riscos de exacerbações de doenças respiratórias e cardiovasculares e aumento de mortes prematuras em pessoas de grupos de risco. (CETESB, 2014).

2.2 Partículas da exaustão de diesel e fontes de emissão

Dados do Departamento de Trânsito de São Paulo (DENATRAN/SP) maio de 2015) apontam que o total da frota de veículos circulantes no Estado de São Paulo é de 26.113.681 veículos, sendo que 7% são movidos a óleo diesel, categoria representada pelos caminhões, ônibus, micro-ônibus, caminhonetes e vans.

No ano de 2013, a frota veicular na RMSP foi responsável pela emissão de 423 mil toneladas de monóxido de carbono (CO), 72 mil toneladas de hidrocarbonetos não metano (NMHC), 192 mil toneladas de óxidos de nitrogênio (NO_x), 5,4 mil toneladas de material particulado (MP), 15 mil toneladas de dióxido

de enxofre (SO_2) e 1,6 mil toneladas de aldeídos, todos poluentes tóxicos. Os automóveis e as motocicletas foram os maiores emissores de CO e de NMHC. Os caminhões foram os maiores emissores de MP e SO_2 ; além disso, no mesmo ano foi relatado crescimento de 4% da frota veicular em relação ao ano anterior (CETESB 2013; CETESB 2014).

Os motores ciclo diesel emitem 100 vezes mais poluentes quando comparados aos veículos movidos à gasolina. No entanto, os veículos movidos a diesel são de baixo custo e maior eficiência energética quando comparados a outros combustíveis como a gasolina (Riedl e Sanchez 2005).

Com a exaustão do escape dos motores a diesel são emitidos na atmosfera 20.000 componentes químicos diferentes. A combustão do óleo diesel, quando oxidado pelo ar dentro do motor, deveria gerar como produtos finais CO_2 e H_2O . No entanto gera complexas misturas de gases, partículas e produtos da combustão incompleta como monóxido de carbono (CO), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), nitrogênio (N), enxofre (S) e material particulado (MP) (Sydbom et al., 2001; Sehlstedt et al., 2011; ZD Ristovski et al., 2012; Oeder et al., 2015).

A composição do MP produzido pela combustão do óleo diesel é constituída por aglomerados de núcleo de carbono e diversos compostos orgânicos e inorgânicos que se adsorvem nas partículas (figura 2). As partículas provenientes da exaustão do diesel (DEPs) são compostas por nano partículas (<100 nm) e aglomerações finas e ultrafinas (<2500 nm), compostas por um núcleo de carbono elementar (Alander et al., 2004).

De um modo geral, a grande toxicidade das DEPs está relacionada principalmente com metais, enxofre e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (Braun et al., 2003; D'Amato 2010; Happonen et al., 2010).

FONTE: adaptado de Twigg e Phillips, 2009

Figure 2: DEP e seus compostos orgânicos e inorgânicos adsorvidos em sua superfície.

2.3 Efeitos biológicos das DEPs no sistema respiratório

O sistema respiratório é susceptível aos efeitos das DEPs por estar em contato direto com o ar atmosférico. Uma vez inaladas, elas podem depositar-se nas vias aéreas superiores irritando o epitélio nasal. As DEPs alcançam as partes mais distais dos pulmões causam estresse oxidativo, exacerbando a resposta inflamatória *in situ*, saturando o sistema antioxidante e lesionando diretamente o

DNA da célula (Diaz-Sanchez et al., 1997, Houtmeyers et al., 1999; Nikasinovic et al., 2004; Danielsen et al., 2008; D'Amato et al., 2010).

Existem vários mecanismos de defesa pulmonar que dificultam as entradas das DEPs nas regiões mais distais. A primeira barreira é o *clearance nasal*, que tem como função redirecionar as partículas para o meio externo com auxílio dos movimentos ciliares. Além disso, existem movimentos musculares e ciliares na região traqueobrônquica em direção à orofaringe, na tentativa de eliminação por expectoração. As partículas que se depositarem nos brônquios terminais e alvéolos serão fagocitadas pelos macrófagos residentes e como destino final, permanecerão retidas em fagossomas, migrarão para regiões de transporte mucociliar ou em direção ao interstício e circulação linfática (Castro, 2001).

Fatores como frequência das exposições, níveis concentrações ambientais ou deficiência no mecanismo de defesa podem influenciar na deposição, retenção e remoção dessas partículas. A potencial translocação para a corrente sanguínea pode comprometer outros órgãos e sistemas corpóreos (Houtmeyers et al., 1999; Brook, 2008; Anselme et al., 2007; Quan et al., 2010; Wang et al., 2010).

Nightingale et al. (2000) avaliaram indivíduos sem doenças prévias expostos as DEPs, na concentração de 200 mg/m^3 por 2 horas. Houve aumento de monóxido de carbono (CO) exalado, aumento de macrófagos e neutrófilos, e mieloperoxidase (MPO) nas amostras de escarros dos voluntários. Em outro estudo dose controlada, voluntários saudáveis foram expostos a DEPs na dose de $300 \text{ } \mu\text{g/m}^3$ por 3 horas, com aumentos leucócitos e monócitos circulantes e aumento nas proteínas de células da clara (CC16). Os voluntários expostos

apresentaram declínio temporário no pico de fluxo expiratório (PFE) (Xu et al., 2013).

Brugge et al. (2013) evidenciaram aumento dos níveis plasmáticos de IL-6 e IL-1 β em residentes das proximidades de uma rodovia com intenso fluxo de veículos em relação aos residentes de áreas com menor tráfego. Em cultura primária de células epiteliais brônquicas expostas as DEPs, ocorreu aumento nos níveis de fator nuclear kappa B (NFKB), aumento da expressão do gene CYP1A1 envolvido no metabolismo dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) (Bonvallot et al., 2001).

O estudo de Park et al. (2011) mostrou que camundongos submetidos a instilação intratraqueal de PM_{2,5} (dose 2,5 / 5 / 10 mg/kg) tiveram aumento de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, TNF- α e IL-6 nas amostras de lavado broncoalveolar (LBA) e no soro sanguíneo, além do aumento da infiltração de macrófagos nos alvéolos, persistindo por 28 dias após instilação. Foi também observado aumento de linfócitos T, diminuição nas taxas de CD4⁺/ CD8⁺, aumento na expressão de alguns genes relacionados com danos teciduais (MMP15, MMP19) e aumento na expressão dos genes correlacionados com estresse oxidativo (SOD, HSP 1a, HSP8).

Segundo Ristovski et al. (2012), o processo inflamatório e o estresse oxidativo são fenômenos dependentes, o estresse oxidativo por hora atua como precursor do processo inflamatório e a progressão inflamatória estimulam o aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS).

O estresse oxidativo pode ser entendido como um desequilíbrio entre os sistemas pró-oxidantes/antioxidantes em decorrência da presença excessiva de ROS, ocasionando lesões celulares e teciduais. Em condições fisiológicas ocorre um equilíbrio sincrônico entre pró-oxidantes e antioxidantes. No entanto, em condições específicas ocorrem aumento dos agentes pró-oxidantes, ultrapassando a capacidade de resolução do sistema antioxidante, gerando, assim, estresse oxidativo (figura 3) (Betteridge 2000; Adly 2010).

FONTE: Adaptado de Ristovski, 2012.

Figure 3: Desequilíbrio entre os sistemas pró-oxidantes e antioxidantes

Os agentes pró-oxidantes mais conhecidos são as espécies reativas de oxigênio (ROS), embora existam também espécies reativas de nitrogênio (ERN) e enxofre (ERS), que são considerados tóxicos ao funcionamento de qualquer sistema biológico (Halliwell e Gutteridge, 2007). Esses radicais podem atuar diretamente na célula provocando morte, por meio de necrose ou apoptose, interação com lipídeos e proteínas de membrana e danos diretos no DNA (Betteridge, 2000; Rahman et al., 2006; Adly, 2010).

O epitélio das vias aéreas é constantemente exposto a ROS gerados internamente como parte do metabolismo normal, e também aos oxidantes presentes na atmosfera decorrentes das exposições. Em razão disso, o pulmão conta com recursos antioxidantes adicionais. O fluído que recobre todo o epitélio das vias aéreas contém substâncias antioxidantes, como o ácido ascórbico (vitamina C), glutathione, ácido úrico, α -tocoferol (vitamina E) e albumina (Kirkham e Rahman, 2006; Rahman et al., 2006).

O sistema respiratório conta ainda com uma potente classe de enzimas antioxidantes extremamente eficazes na manutenção do estado redox celulares. Uma das principais enzimas é a superóxido dismutase (SOD) encontradas em três isoformas, SOD-cobre-zinco (Cu/ZnSOD ou SOD₁) localizada no citossol; SOD-manganês (MnSOD ou SOD₂) localizada primariamente na mitocôndria e SOD-extracelular (ECSOD ou SOD₃), responsáveis por catalisar a dismutação do radical superóxido em H₂O₂ (Rahman 2006).

A catalase (CAT) é outra enzima encontrada em peroxissomos e citoplasma que tem como função catalisar a redução do H_2O_2 a H_2O e O_2 , localizada nos pneumócitos alveolares (tipo II) e macrófagos (Day, 2009; Rahman, 2006).

O sistema de glutathione é outro mecanismo fundamental na redução de H_2O_2 . A enzima glutathione (GSH) existe em suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG). A enzima chave no ciclo redox é glutathione peroxidase (GPx), que catalisa o processo e a GSSG produzida pela glutathione redutase (GR) regenerando a GSH. A razão GSH/GSSG é normalmente utilizada para estimar o estado redox nos sistemas biológicos (Vannuchi et al., 1998; Comhair et al., 2005).

Voluntários saudáveis expostos as DEPs à concentração $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$, por 2 horas, apresentaram aumento na resposta de substâncias antioxidantes como GR, urato no LBA, aumento de neutrófilos e mastócitos no tecido pulmonar, aumento de IL-8 e MPO (Behndig et al., 2006). No estudo de Mudway et al. (2004) indivíduos saudáveis, expostos as DEPs na concentração de $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$ por 2 horas, mostraram aumento na glutathione reduzida nos brônquios e nariz. Apresentaram também leve broncoconstrição decorrente das exposições.

Xiao et al. (2003) avaliaram, *in vitro*, a resposta em macrófagos da linhagem RAW 264.7 expostos a extrato orgânicos de DEPs nas concentrações de 10-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Os resultados evidenciaram declínio progressivo na razão GSH/GSSG. Em paralelo, análise proteômica evidenciou aumento em enzimas antioxidantes como (heme oxigenase-1 e catalase) e componentes pró-inflamatórios como (p38, MAPK e NFkB p65 RelA).

Weldy et al. (2013) usando um modelo de camundongos $Gclm^{-/+}$ (knockout para uma subunidade da enzima responsável pela síntese da GSH) investigaram a inflamação pulmonar induzida pelas DEPs. Os camundongos foram expostos a dose de $300 \mu\text{g}/\text{m}^3$ por 6 horas, via inalatória. Houve leve influxo neutrofílico nas amostras do LBA, tendência à diminuição na relação GSH/GSSG nos níveis plasmáticos e diminuição de reatividade vascular.

2.4 Envelhecimento

A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica como idosas pessoas com idade de 60 anos ou mais para países em desenvolvimento, e acima de 65 anos para os países desenvolvidos (OPAS, 2005). No Brasil, de acordo com a Lei n 10.741 – de 1º de outubro de 2003 – DOU de 03/10/2003, é considerada idosa a pessoa que tem a idade igual ou superior a 60 anos.

Esse grupo populacional vem crescendo em grande escala no mundo inteiro com maior longevidade. Nos últimos dez anos, o número de pessoas com 60 anos ou mais no mundo aumentou em 178 milhões. Em 2012, as pessoas com 60 anos ou mais representaram quase 11,5% da nossa população global de 7 bilhões, sendo que as projeções apontam que até 2050, esse montante passará para 22%, havendo mais idosos do que crianças menores de 15 anos. A expectativa de vida em 2010-2015 é de 78 anos nos países desenvolvidos e 68 anos em países em

desenvolvimento, e a projeção para 2050 é de 83 anos em regiões desenvolvidas e 74 anos nas regiões em desenvolvimento (UNFPA, 2012).

O Brasil apresenta um crescimento sistemático e consistente em relação a essa faixa etária. No ano de 2012, a população brasileira era composta por 193.946.886 de habitantes dos quais 21 milhões compunham o grupo etário de idosos com idade ≥ 60 anos (IBEG, 2012). Com toda essa mudança emergem questões sociais extremamente importantes, como as relacionadas com previdência social, sistema de saúde único, cuidados e atenção permanente, exigindo uma série de demandas em termos de políticas públicas de saúde e inserção ativa dos idosos na sociedade.

O envelhecimento é um processo dinâmico, progressivo e multifatorial, no qual há modificações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e psicológicas. Estas mudanças determinam perda progressiva da capacidade de adaptação do indivíduo, ocasionando maior vulnerabilidade e maior incidência de processos patológicos, o que o torna impossível de ser explicado por um único mecanismo isolado envolvendo diferentes vias de ação (Cesari et al., 2012; Thomaz e Papaléo, 2005).

De forma abrangente, algumas alterações sistêmicas relacionadas com o processo do envelhecimento incluem alterações da estrutura óssea (Ojanen et al., 2015), perda de massa e função muscular (Irwin e Rosenberg 2011); diminuição na altura dos discos intervertebrais (Buckwalter e Joseph 1995); aumento da resistência vascular periférica e diminuição do débito cardíaco (Palmieri 1995); alteração de matriz extracelular associadas com colágeno no miocárdio (Horn

2015); alterações do aparelho digestivo relacionadas a mucosa gástrica (Tarnawski et al 2014); alterações estruturais nos rins, como glomérulo esclerose segmentar e focal, atrofia tubular, fibrose intersticial e arteriosclerose (Brown et al., 2000; Glasscock et al., 2012).

O sistema respiratório é acometido pelos declínios decorrentes do envelhecimento influenciado diretamente pelas constantes agressões que sofre por estar em contato direto com meio externo (Ruivo et al., 2009). Apesar disso, o sistema respiratório é capaz de manter a oxigenação e ventilação adequadas durante todo curso da vida. No entanto, com o avançar da idade ocorre limitação progressiva na capacidade de reserva funcional, acarretando em diminuição da resposta ventilatória durante estados que requerem maiores demandas (Sharma e Goodwin 2006).

A caixa torácica, o diafragma e os pulmões funcionam como uma unidade sincrônica; alterações em um desses componentes refletem em prejuízos funcionais (Fernandes e Neto 2002). Os volumes de reserva inspiratório e expiratório se tornam proporcionalmente menores, ocorre aumento na complacência pulmonar (grau de extensão dos pulmões para aumento da pressão transpulmonar) devido à redução na elasticidade pulmonar, diminuição na força de tração da parede torácica, resultando em diminuição do recolhimento expiratório, os quais influenciam no aumento do volume residual (Ruivo et al., 2009).

As alterações da caixa torácica englobam modificações como estreitamento dos espaços dos discos intervertebrais provocando hipercifose torácica, que por sua vez diminui o espaço entre as costelas e aumento do ângulo ântero-posterior

da caixa torácica (peito em barril) além da calcificação das costelas relacionadas com osteoporose, refletindo na diminuição da complacência da caixa torácica comprometendo o bom desempenho mecânico (Janssens et al., 1999; Lowery et al., 2013).

A força da musculatura diafragmática diminui progressivamente, possivelmente decorrente de hipotrofia muscular (sarcopenia) relacionadas com as fibras de contração rápidas responsáveis por gerar picos de tensão, comprometendo a capacidade de geração de força, refletindo em deficiência no aumento de carga ventilatória diante de situações de maiores demandas (Arora e Rochester, 1982; Sharma e Goodwin, 2006; Lalley et al., 2013).

A degeneração homogênea das fibras elásticas ao redor dos ductos alveolares e bronquíolos, e alterações nas ligações cruzadas de colágeno no parênquima pulmonar são descritas no envelhecimento pulmonar. Alargamento dos espaços alveolares e dilatação dos ductos alveolares causam aprisionamento aéreo (Janssens et al, 1999; Meyer, 2005; Sharma e Goodwin 2006; Miller, 2010; Lalley 2013).

O envelhecimento influencia diretamente outros mecanismos biológicos importantes relacionados ao funcionamento do sistema respiratório. Em decorrência da diminuição da força da musculatura motora e o comprometimento da mecânica inspiratória e expiratória, a eficiência do mecanismo da tosse também é comprometida causando alterações no *clearance* das vias aéreas. Além do mais, o reflexo da tosse é menos produtivo e vigoroso nos idosos,

possivelmente devido á ocorrência na supressão da sensação da tosse (Chang e Widdicombe 2007). Outro comprometimento considerável ocorre no sincronismo das células ciliadas ao longo de toda a via aérea superior e inferior, resultando em ineficiência na expectoração (Lowery et al., 2013).

Alterações importantes no sistema imunológico adaptativo e inato são relatadas no envelhecimento. Na ausência de estímulo imunológico ou infeccioso, as células mononucleares de indivíduos idosos produzem quantidades elevadas de citocinas pró-inflamatórias quando comparadas com indivíduos mais jovens, (*Inflamm-aging*) em especial a IL-1 β , IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF- α) (Kovacs et al., 2002; Franceschi et al., 2007). Segundo Lowery et al. (2013) essas alterações nas concentrações de citocinas podem estar correlacionadas com a redução e destruição das fibras elásticas no parênquima pulmonar.

Frente ao exposto acima, os idosos podem ser um grupo vulnerável as exposições aos poluentes atmosféricos e compõem o grupo de risco para seus efeitos deletérios (Kelly et al., 2003; Wang et al., 2010; Sacks et al., 2011; Emmerechts et al., 2012; Saldiva et al., 2013; Slezakova et al., 2014).

Smargiassi et al. (2006) avaliaram idosos na idade de 60 anos moradores próximo a rodovia de intenso fluxo de veículos em Montreal/Canadá mostrando relação positiva entre proximidades de rodovias de intenso fluxo e internações hospitalares por doenças respiratórias.

No estudo longitudinal de Lepeule et al. (2014) foram avaliados 858 homens idosos residentes na área metropolitana de Boston, examinados no intervalo de 3-

5 anos, no período de 1995-2011. Os resultados indicaram que um aumento de 0,5 mg/m³ nas concentrações, a longo prazo, refletiu no declínio de capacidade vital forçada (CVF) e volume expiratório no primeiro segundo (FEV₁) dos idosos expostos.

Em camundongos, os estudos sobre o processo de envelhecimento no sistema respiratório raramente se estendem para além de 12 meses de idade, portanto, a quantidade de informações disponíveis sobre os efeitos do envelhecimento nas estruturas e funções nos pulmões são limitadas (Pinkerton e Green 2004).

Anver e Haines (2004) descrevem diminuição de 30% nas concentrações das glutathionas nos pulmões de camundongos idosos, tornando-os mais vulneráveis aos efeitos tóxicos ambientais.

Mudanças estruturais como aumento do volume pulmonar e o aumento nas fenestrações da parede alveolar, são comumente relacionadas com processo do envelhecimento (Kurozumi et al.,1994; Pinkerton e Green 2004). Esses autores atribuem essas alterações a um hiperinsuflamento com distensão do espaço alveolar, e correlacionam com possíveis rupturas alveolares entre os poros adjacentes.

Huang et al. (2007) descrevem as mudanças estruturais e funcionais no pulmão de camundongos idosos, mostrando diminuição nos níveis de expressão dos genes de elastina (EL) e genes de colágeno (Col1a1, Col3a1 e Col6a3), e alterações nas expressões de matriz metaloproteinase 9 (MMP9). Estes achados se correlacionam com alterações funcionais na complacência pulmonar.

Camundongos na idade de 18 meses, quando expostos as DEPs, nas doses de (300 e 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) apresentaram espessamento dos septos alveolares aumento de células inflamatórias nos espaços alveolares. Houve aumento na expressão gênica de lipocalina 24p3 (marcador de estresse oxidativo), TNF- α , IL-6 e IL-8, e diminuição nos níveis de Mn-SOD em relação ao grupo não exposto (Sunil et al., 2009).

2.5 Sirtuínas

Existem fortes evidências que a família das proteínas das sirtuínas tem influências diretas no processo do envelhecimento e na longevidade em mamíferos (Brunet et al., 2004; Michan e Sinclair 2007; Rahman et al., 2011; Morris, 2013; Finkel T. 2009; Salmnen et al., 2013).

As sirtuínas são proteínas da classe III da família das desacetilases de histonas (HDACs) dependentes de NAD⁺, que receberam essa denominação devido à semelhança com a proteína Sir2 (*silente information regulator 2*) identificada inicialmente em leveduras (*saccharomyces cerevisiae*) por desempenhar um papel fundamental na regulação do envelhecimento e longevidade (Blander e Guarente, 2004; Cantó e Auwerx, 2009).

Em mamíferos existem sete homólogos identificados (Sirt1-7) que se diferenciam em localizações e funções celulares (mostrado na tabela 02) (Haigis e Sinclair 2010).

Tabela 2 – Sirtuínas nos mamíferos, localização, interações e funções metabólicas.

Sirtuínas	Localização	Interações	Biologia	Fenótipo
SIRT1	Núcleo	FOXO, PGC-1 α , NFKB, Ku70	Metabolismo e estresse	Defeitos de desenvolvimento
SIRT2	Citossol	Tubulin, Histona H4, FOXO	Ciclo celular	Desenvolvimento
SIRT3	Mitocôndria	AceCS2, GDH complexo I	Termogênese e produção de ATP	Desenvolvimento
SIRT4	Mitocôndria	GDH, IDE, ANT	Secreção de insulina	Desenvolvimento
SIRT5	Mitocôndria	CPS1	Ciclo da ureia	Desenvolvimento
SIRT6	Núcleo	Histona H3, NF-Kb	Metabolismo e Reparo	Envelhecimento
SIRT7	Nucléolo	Pol I	Transcrição de Rdna	Tamanho reduzido, defeitos cardíacos

Legenda: AceCS2-Acetil-coenzima A sintase 2; ANT-adenina nucleotídeo translocase; CPS1-carbamoil fosfato sintetase 1; Foxo-Forkhead box subgrupo O; GDH-glutamato desidrogenase; IDE-enzima degradante de insulina; NFKB-fator nuclear Kappa B; PGC-1 α - peroxisome proliferador receptor gama 1 alfa; Pol I- DNA polimerase I; Ku70-proteína envolvida durante o reparo de DNA; H4-histonas desacetilases; Tubulin-membro da família da tubulina. FONTE: Adaptado de (Haigis e Sinclair, 2010).

A sirtuína mais estudada e bem descrita na literatura é a Sirt1, sendo a proteína que mais se assemelha a Sir2. Sirt1 se localiza no núcleo celular e está envolvida em várias condições patológicas como: doenças metabólicas (Purushotham et al., 2009); câncer (Lim, 2006); estresse e envelhecimento cardíaco (Alcendor et al., 2007); função protetora neuronal (Araki et al., 2004); sinalização inflamatória (Schug et al., 2010); desenvolvimento (Sakamoto et al., 2004); sobrevivência celular da placenta (Michan et al., 2007); senescência celular (Langley et al., 2002) e envelhecimento (Chen et al., 2005).

As sirtuínas são fortemente influenciadas por mudanças ambientais e estilo de vida. Alguns fatores extrínsecos estão diretamente envolvidos nas expressões dessas proteínas incluindo atividade física, dieta, fumo, álcool, e estresse oxidativo (Kelly, 2010).

A expressão gênica de Sirt1 nos pulmões de humanos mostrou-se diminuída dependente da idade (Andersen et al., 2008; Han et al., 2010; Wu et al., 2012).

Alguns trabalhos investigaram algumas funções de Sirt1 no sistema respiratório de animais. Yao et al. (2012) induziram a expressão de Sirt1 em camundongos com administração via oral de um ativador de Sirt1 (SRT172) e utilizaram um modelo de camundongos *Knockout Sirt1^{-/-}*. Induziram esses animais ao enfisema pulmonar com o modelo de elastase e exposição ao fumo. A expressão de Sirt1 atenuou a senescência celular induzida pelo estresse e um efeito protetor contra o enfisema.

Yao et al. (2013) mostraram a interação de Sirt1 no reestabelecimento do equilíbrio entre inibidores de metaloproteinases (TIMP-1) e metaloproteinases de matriz (MMP-9). Houve um efeito protetor de Sirt1 contra danos oxidativos decorrente das exposições ao fumo.

Camundongos knockout para Sirt1 e camundongos tratados com SRT172 foram expostos ao fumo por 3 dias consecutivos na dose de (300 mg/m³ partículas totais). Houve aumento de peroxidação lipídica nos pulmões dos camundongos expostos ao fumo, porém o aumento foi mais acentuado nos camundongos *Knockout Sirt1^{-/-}* (Yao et al., 2014).

Limin et al. (2010) investigaram a expressão gênica de Sirt1 nos pulmões de camundongos nas idades de 04-18-24 meses e constataram diminuição com a progressão da idade. Em contra partida, Know et al. (2015) avaliaram a expressão proteica de Sirt1 no pulmão de camundongos na idade de 06 ou 24 meses e mostraram aumento nos animais mais velhos. De qualquer forma, Sirt1 mostrou ser influenciada pelo processo do envelhecimento.

Ainda não está totalmente estabelecido na literatura a interação das sirtuínas com o envelhecimento. Alguns estudos apontam que Sirt1 atuaria aumentando a resistência celular contra danos oxidativos ou diretamente regulando os níveis de ROS intracelulares (Brunet et al., 2004; Alcendor et al., 2007; Hasegawa et al., 2008; Finkel T. 2009; Yamamoto et al., 2011; Rahman et al., 2011)

Uma das alternativas é que Sirt1 aumenta a resistência celular diante de condições de estresse regulando as proteínas de choque térmico (HSF1)

expressas em decorrência de estresse oxidativo (Westerheide et al., 2009; Pirkkala et al., 2001).

Michan e Sinclair, 2007 mostraram que a via de sinalização envolvida no aumento na resistência ao estresse e sobrevivência celular ocorre pela interação de Sirt1 com *Forkhead box* (FOXO). Além disso, a interação de Sirt1 com três dos quatro membros dessa família (Foxo1, Foxo3a e Foxo4) tem sido demonstrada. Em resposta ao estresse, Sirt1 interage com Foxo3 induzindo parada no ciclo celular, aumentando a resistência celular contra danos oxidativos por inibir a indução de morte celular (Brunet et al., 2004; Yamamoto e Sadoshima, 2011).

O estudo de Alcendor et al. (2007) mostrou aumento na expressão da enzima antioxidante catalase induzida pela via Sirt1- Foxo1 regulando os níveis de ROS.

Em contrapartida, há fortes evidências indicando que um excesso nos níveis de ROS podem controlar diretamente as atividades enzimáticas de Sirt1. Salminen et al. (2013) mostraram que condições que alteram os níveis de ROS, como no envelhecimento ou em doenças relacionadas, podem modular diretamente a atividade e a expressão de Sirt1. Nasrin et al. (2009) mostraram que essa interação ocorre via Sirt1-JNK, que induz a translocação de Sirt1 para o núcleo celular e influencia sua atividade.

Estudos apontam que a Sirt1 inibe o fator de transcrição (NFkB) que induz resposta inflamatória, essa modulação de Sirt1 / NFkB é crucial na promoção da homeostase (Salminen et al., 2008; Salminen et al., 2011; Vallabhapurapu et al., 2009; Helenius et al., 1996; Csiszar et al., 2008).

Yeung et al. (2004) mostraram que Sirt1 inibe a transcrição de NFkB por desacetilação diretamente na subunidade RelA/p65 de NFkB na lisina 310. Wu et al. (2012b) avaliaram o papel de Sirt1 no controle da inflamação e coagulação no pulmão de camundongos Knockout Sirt1 $^{-/-}$ expostos ao MP_{2,5}, via instilação nasal. Os camundongos Sirt1 $^{-/-}$ mostraram aumento de neutrófilo, aumento de acetilação e ativação de NFkB e aumento da formação de fibrina.

Outro estudo investigou a interação de Sirt1/NFkB na sinalização de citocinas pró-inflamatórias em cultura células primária (MonoMac6) e em animais expostos à de fumaça de cigarro. Na exposição das células primárias (MonoMac6) ao extrato de fumaça de cigarro houve diminuição dose-dependente na atividade de Sirt1 após 4 e 24h das exposições, e aumento dependente de NFkB. Nos animais expostos a fumaça de cigarro na dose de (300 TPM mg/m³) por um período agudo (3 dias) e um período sub-crônico (8 semanas), ocorreu aumento no influxo de neutrófilo, MCP-1, fator VII, MIP2 e IL8 no lavado broncoalveolar (Yang et al., 2007).

3. JUSTIFICATIVA

Existe grande interesse em se entender melhor o papel ambiental em um possível aceleração do envelhecimento pulmonar. Neste trabalho, nós hipotetizamos que a poluição altera a expressão gênica das sirtuínas, que poderiam ter consequências no processo de envelhecimento pulmonar.

4. OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar se as alterações decorrentes do processo do envelhecimento no pulmão dos camundongos C57BL/6 são alteradas pela exposição à exaustão do diesel.

4.2 Objetivos Específicos

- » Avaliar as alterações funcionais dos pulmões;
- » Avaliar os parâmetros inflamatórias no sangue e no lavado broncoalveolar;
- » Avaliar as expressões gênicas das sirtuínas (Sirt1,2 e 6) no tecido pulmonar;
- » Avaliar as atividades enzimáticas de (GPx, GR, GST e SOD) no tecido pulmonar;

- » Avaliar as possíveis alterações estruturais pulmonares relacionadas com o volume e áreas de superfície das estruturas pulmonares (parênquima, vasos e vias aéreas);
- » Avaliar as alterações de remodelamento tecidual pulmonar (conteúdo de colágeno e elastina) .

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Grupos Experimentais

Foram utilizados 80 camundongos machos da linhagem C57/BL6; adultos jovens com idade ($\pm$ de 02 meses), equivalentes a um adulto humano jovem de 20 a 30 anos, e camundongos adultos idosos ($\pm$ 15 meses) equivalente a idade de 50 a 69 anos em humanos (Jackson Laboratory, 2015). Os animais foram obtidos junto ao Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e mantidos em condições controladas de temperatura (22 a 25°C) e luminosidade (ciclo 12h claro / 12h escuro) e 70% de umidade relativa. Foram alimentados com água e ração “ad libitum”. Os animais foram mantidos e manipulados de acordo com as normas de “Uso de Animais de Laboratório” do centro de Bioterismo da FMUSP.

5.2 Desenho Experimental

Figure 4: Representação do desenho experimental, grupo jovem (02 meses) e grupo idoso (15 meses). **LBA:** lavado broncoalveolar, **LM:** lavado medular, **Raw:** resistência das vias aéreas, **Gtis:** resistência do tecido pulmonar; **Htis:** elastância do tecido pulmonar, **PSH:** picrossírius Red; **RFO:** resorcina fucsina oxidada, **IL1B:** interleucinas1B, **IL6:** interleucina6, **IL10:** interleucinas 10, **TNF:** fator de necrose tumoral, **GPx:** glutathione peroxidase; **GR:** glutathione redutase, **GST:** glutathione S-transferase, **SOD:** superóxido dismutase.

5.3 Sistema de gerador do aerossol da queima do combustível diesel

Os componentes da exaustão do motor estacionário (BD-2500 CFE, Branco, China) de energia a diesel foram conduzidos por um período de 8 min para um saco (BAG de Teflon com 3m³) adaptado na sala de máquinas do container. Para diluir esses gases armazenados, adicionado ar ambiente por um período de 3 min. Em seguida, os gases e partículas foram direcionados para a câmara de inalação, onde os camundongos jovens e idosos foram acomodados de maneira a procedermos às exposições, via inalação de corpo inteiro, do material oriundo da queima do combustível a diesel. Durante todo o período de exposição (60 minutos), na concentração de 1200ug/m³, que equivale a concentração média diária de 50 µg/m³, por um período de 30 dias, alguns parâmetros foram monitorados em tempo real: concentração de MP_{2,5} temperatura e umidade (DataRam4™, Thermo Fisher Scientific Inc.), emissões de NO e NO₂ (termo Scientific).

Para a exposição dos animais ao Ar Filtrado (AF) uma bomba a vácuo foi responsável por captar o ar externo e direcioná-lo ao sistema de filtração HEPA. Em seguida, o AF foi direcionado à câmara de exposição. Durante a exposição dos camundongos jovens e idosos, a válvula de abertura dos gases e partículas provenientes da queima do combustível em estudo, foi fechada. Após atravessar a câmara, os gases foram conduzidos para fora do equipamento. (Figura 5).

FONTE: Brito et al., 2014.

Figure 5: Desenho esquemático do sistema de exposição e gerador de aerossol da queima do combustível diesel.

5.4 Caracterização da exposição

A análise físico-química do combustível bruto foi realizada pelo Instituto Nacional de Tecnologia. A quantificação química de $PM_{2,5}$ do escape de diesel foi realizada por análise instrumental de ativação de nêutrons (INAA). Utilizou-se o Material de Referência Padrão NIST (SRM 2975 - Matérias Particulares Diesel -

Instituto Nacional de Padrões, Gaithersburg, MD, EUA) para o controlo analítico da qualidade dos resultados. As atividades gama induzidas nas amostras e padrões foram medidas utilizando um espectrômetro de raios gama com um detector de germânio hiper-puro (HPGe) e as concentrações de As, Ba, Br, Cl, Cr, Cu, Fe, K, Mn, Mo, Na, Sb, V e Zn, foram obtidas.

O teor de enxofre nas amostras foi qualitativamente obtido por espectrômetro de fluorescência de raios-X dispersivo de energia (EDX 700-HS, Shimadzu Corporation, Divisão de Instrumentos Analíticos, Kyoto, Japão). A incerteza de concentração foi calculada considerando os erros nas medições da amostra e o material de referência padrão.

5.5 Análise da mecânica respiratória – FlexVent

Foi calculada a impedância do sistema respiratório (**Zrs**) dos animais e utilizado um volume de perturbação de 16 segundos. A ventilação mecânica foi parada somente para a aplicação das perturbações. Para o cálculo da elastância total do sistema respiratório (**Ers**) e da resistência do sistema respiratório (**Rrs**) foi utilizada a equação do movimento do sistema respiratório:

$$Ptr(t) = Ers.V(t) + Rrs.V'(t)$$

onde: **P_{tr}** é a pressão traqueal, **V** é o volume, **V'** é o fluxo e **t** corresponde ao tempo.

Para o cálculo dos dados de oscilação forçada foram feitas correções, considerando as perdas devido à compressibilidade dos gases (Bates et al., 1992). **V_{cyl}** foi corrigido a fim de obter o volume que efetivamente chegou ao animal (**V**) e **P_{cyl}** foi corrigido, nos dando o valor de **P_{ao}**, pressão de abertura das vias aéreas. Através da derivação no tempo de **V**, obteremos o fluxo (**V'**). Para análise das impedâncias obtidas, foi utilizado o modelo de fase constante, descrito por Hantos et al., 1992:

$$Z(f) = R_{aw} + i \cdot 2 \cdot \pi \cdot f \cdot I_{aw} + \frac{G - i \cdot H}{(2 \cdot \pi \cdot f)^\alpha}$$

onde: **R_{aw}** é a resistência de vias aéreas, **I_{aw}** é a inertância, **G** caracteriza a dissipação de energia nos tecidos pulmonares, **H** caracteriza a energia acumulada no tecido do pulmão, **i** é a unidade imaginária, **f** é a frequência e

$$\alpha = \frac{2}{\pi} \cdot \arctan\left(\frac{H}{G}\right)$$

5.6 Coleta do Material Biológico

5.6.1 Pulmões

Após 24 horas do término do protocolo de exposição, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de tiopental sódico (200 mg/kg peso corporal) traqueostomizados e canulados.

Em 10 animais de cada grupo foi realizada a análise da mecânica respiratória (FlexVent). Em seguida, os pulmões foram lavados com 3 x 0,5 ml de PBS e aproximadamente, 1 ml de Lavado bronco alveolar (LBA) foi recuperado. Em seguida, os pulmões foram insuflados com aproximadamente 0,7 ml de solução salina 0,9%, posteriormente foram mantidos em solução fixadora por 24 horas. Posteriormente, esse material foi transferido para álcool 70% para análise histopatológica. O sangue assim como o lavado medular, foram coletados, processados e armazenados em freezer -80°C até o momento das análises.

Os outros 10 animais de cada grupo foram eutanasiados da mesma forma, e, por uma toracotomia mediana, os pulmões foram expostos. Em seguida, os pulmões foram perfundidos com PBS pela via de acesso ventrículo esquerdo. O pulmão direito foi coletado e armazenado em criotubo no freezer -80°C até o momento da análise (espectrofotometria). O pulmão contra lateral foi fracionado em 3 partes iguais e acondicionadas em criotubos, sendo o terço inferior destinado para análises moleculares (RT-PCR), o terço mediano e o superior foram coletados e armazenados em criotubos no freezer -80°C como materiais reservas.

5.6.2 Sangue/Plasma

O sangue foi coletado previamente a coleta do LBA e remoção dos pulmões da cavidade torácica. O acesso foi realizado pela via cava inferior, utilizando seringa de 1ml heparinizada. As amostras de sangue foram centrifugadas a 1000g por 15 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi coletado. Em seguida a amostra foi centrifugada novamente a 1000g por 10 minutos, a 4°C, e o soro coletado. As amostras foram armazenadas a -80°C até o momento das análises correspondentes.

5.6.3 Demais órgãos

Os demais órgãos (coração, rins, fígado, baço, timo, cérebro, testículos e vias aéreas superiores) foram coletados, pesados, fixados e armazenados para possíveis análises futuras.

5.7 Análises do Lavado Broncoalveolar (LBA)

O LBA foi centrifugado (850rpm, durante 10 minutos, a 4°C) e o sobrenadante coletado e acondicionado em novos tubos eppendorf para a dosagem de interleucinas. O pellet foi ressuspenso em 300µl de PBS,

homogenado e utilizado para contagem total do número de células e confecção das lâminas para a análise diferencial. Para a obtenção do número total de células foi utilizada uma câmara de Neubauer, adicionado 20µl da solução ressuspensa do “pellet”, para a obtenção dos resultados no número total de células foi aplicada a fórmula:

$$\text{Contagem total} \times 10^5 \times \text{diluição da amostra}$$

A análise diferencial celular foi realizada com auxílio de uma centrífuga (Cytospin3 - Shandon) para a confecção das lâminas de esfregaços. As lâminas foram acondicionadas num suporte metálico na centrífuga, em seguida colocado na sua interface um papel filtro perfurado, contendo uma área conhecida, por fim, a lâmina foi selada com o funil plástico, com a finalidade de deposição e condução do material biológico (Araújo-Jorge et al., 2000). Em seguida, foram pipetadas e 100µl das amostras nos funis do cilindro plásticos e centrifugadas na velocidade de 450rpm, por 6 minutos. Foram feitas duplicatas de cada amostra e após a secagem das lâminas, segundo orientações do fabricante, foram coradas com o auxílio do *Kit Instante Prov-conjunto* de corantes para coloração diferencial rápida em hematologia (NewProv). Após 24 horas, as lâminas foram montadas com resina para microscopia Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha) e deixadas para secar em temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram digitalizadas com o auxílio do escaner de lâminas digital Panoramic SCAN (3DHistech Ltd. Budapest, Hungary) e as análises foram feitas com a ajuda do software ImageJ

(<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Durante a análise, as células foram diferenciadas em: macrófagos, linfócitos, eosinófilos, neutrófilos, e células epiteliais.

Nas amostras do sobrenadante do LBA e no soro sanguíneo foram avaliadas as dosagens das citocinas, *Mouse IL-1 β Flex Set* (limite de detecção 1,9 pg/mL) *Mouse IL-6 Flex Set* (limite de detecção 1,4 pg/mL) *Mouse IL-10 Flex Set* (limite de detecção 9,6 pg/mL) e *Mouse TNF Flex Set* (limite de detecção 2,8 pg/mL) pelo método de citometria de fluxo em ensaios multiplex (*Cytometric Bead Assay* - CBA - BD Bioscience, CA, USA).

Para cada citocina foram geradas uma curva padrão utilizando a mistura de citocinas padrão fornecida pelo kit. Os padrões liofilizados foram reconstituídos em 4mL de Assay Diluent ("Top Standart"), incubados por 15 min em temperatura ambiente e posteriormente foi realizada uma diluição seriada.

Foram pipetados 50 μ l de cada ponto da curva padrão e também 50 μ l de cada amostra de LBA e de soro. Adicionamos 50 μ l de solução contendo as "beads" de captura de cada citocina e os tubos foram incubados por uma hora em temperatura ambiente. Depois do período de incubação, 50 μ l do reagente de detecção foram adicionados aos tubos e deixados por mais uma hora no escuro em temperatura ambiente.

Após as incubações, foi acrescentado 1ml de tampão de lavagem e centrifugado por 5 min a 200g, o sobrenadante foi desprezado e as amostras foram ressuspensas em 300 μ l de tampão de lavagem para as aquisições em citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (BD Biosciences, CA, USA). Foi realizada a

aquisição de 1200 eventos e a conversão de dados foi realizada utilizando o software FCAP Array (BD Bioscience, CA, USA). A concentração das citocinas em cada sobrenadante foi determinada por interpolação a partir da curva padrão correspondente. A gama de detecção foi 20-5000 pg/mL para cada citocina.

5.8 Análise do Lavado medular

A medula óssea foi coletada do fêmur dos animais por transecção das epífises do osso para permitir a exposição medular. A medula óssea foi perfundida com auxílio PBS, seringa e agulha (25x8mm). O material foi adicionado em tubo eppendorf e centrifugado a 600g por 10 minutos a 4°C.

O “pellet” foi ressuspendido em volume de 1mL de PBS e homogeneizado. Em seguida, quantificamos o número total de células com auxílio da câmara de Neubauer, após diluição de 1:100 em líquido de Turk. O esfregaço das células medulares foi fixado em lâmina e corado com solução corante de May Grunwald-Giemsa rapidamente (40 min) após a coleta, para preservar a morfologia das células. A contagem diferencial foi realizada em microscópio com objetiva de imersão (aumento de 100 vezes).

5.9 RT- PCR

Os fragmentos do pulmão foram coletados para extração de RNA total. Foi utilizado a metodologia do isotiocianato de guanidina (Chomczynski & Sacchi, 1987), empregando o reagente TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração, o RNA total foi quantificado em espectrofotômetro e sua integridade avaliada por meio de gel de agarose desnaturante e pela razão A260/A280.

A síntese do cDNA foi realizada pela incubação de 1,0µg de RNA total tratado com DNase, na presença de 1µL de oligo-dT (0,05µg/µL), 1µL de transcriptase reversa (SuperScript™ III Reverse Transcriptase, Invitrogen) e água-DEPC para um volume final de 20µL, por 10 min a 70 °C, 50 min a 42 °C, e 15 min a 70 °C, no termociclador Applied Biosystems modelo 9700.

A síntese do cDNA foi feita com 1µg do RNA total, previamente tratado com DNase e com 1µL de oligo-dT (0,05µg/L), 1µL de transcriptase reversa (SuperScript™ III Reverse Transcriptase, Invitrogen) e água DNase e RNaseFree totalizando um volume final de 20µL, por 10 min a 70 °C, 50 min a 42 °C, e 15 min a 70 °C, no termociclador Applied Biosystems modelo 9700, e armazenado a – 80°C até o uso.

Após a transcrição reversa foi realizado o PCR em Tempo Real. Resumidamente, os primers específico foram obtidos de sequências depositadas no GenBank, utilizando o programa BLASTN 2.2.1 (Altschul et al., 1997). O 18S foi

amplificado como um controle interno das reações. Os primers sense e antisense foram escolhidos em éxons distintos (mostrado na tabela 3), evitando amplificação de DNA genômico, a concentração de primers foi otimizada.

Tabela 3 - Sequências dos primers avaliados.

Primers	Forward	Reverse
<i>SIRT1</i>	GCAACAGCATCTTGCCTGAT	GTCCTACTGGTCTCACTT
<i>SIRT2</i>	TGAGCTCAAAGACCCTTCGT	TTTTGGGGTAGCCTGTTGTC
<i>SIRT6</i>	GGGAACCTGAAGGAACCACA	AGCCTGGGCTATAGCAGTGA
<i>18S</i>	GTAACCCGTTGAACCCCA TT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG

Legenda: gene Sirt1; gene Sirt2; gene Sirt6 e gene18S normalizador.

A reação de PCR Real Time foi realizada utilizando-se 50ng de cDNA; 12,5µl de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e 300 a 600nm de cada primers em um volume total de 25µl em um equipamento GeneAmp 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Cada reação de PCR foi realizada em duplicata e repetida no mínimo 2 vezes. Como controle negativo foi realizada amplificação do gene alvo na ausência de cDNA. Os valores obtidos foram expressos em threshold cycle (CT), que é determinado pelo número de ciclos em que o sinal de fluorescência cruza a linha de threshold. A expressão de cada gene alvo foi determinada utilizando-se a

fórmula: $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde: $\Delta CT = CT$ do gene alvo – CT do gene 18S; $\Delta\Delta CT = \Delta CT$ de grupo tratado - ΔCT de grupo controle.

O $2^{-\Delta\Delta CT}$ para amostra controle foi igual ao valor 1 e para as demais amostras, os valores foram representados em número de vezes comparado à amostra controle.

5.10 Análises do estresse oxidativo

As atividades das enzimas glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona redutase (GR), glutathiona S-transferase (GST), atividade da catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) foram determinadas por espectrofotometria em amostras do homogenato do tecido pulmonar (Power Wave x 340, Bio-tek Instruments, software KC 4 v 30).

As amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato pH 7,3 na diluição 1:5, em seguida dosadas as proteínas (Bradford proteinassay - BioRad), cujo princípio consiste na adição de um corante ácido a uma solução de proteínas e subsequente medição da absorbância no comprimento de onda de 595nm. A comparação com uma curva padrão de soro albumina bovina forneceu a concentração de proteínas presente nas amostras, que foram aliquoteadas e armazenadas em freezer -80°C até o momento das análises.

5.10.1. Atividade de glutathiona peroxidase (GPx)

Este método baseia-se na medida indireta da atividade da GPx, por meio de uma reação casada com a glutathiona redutase (GR) (Beutler, 1985). A glutathiona oxidada (GSSG), produzida pela redução por hidroperóxidos pela GPx, é reciclada para gerar seu estado reduzido pela GR e NADPH.

GPx

GR

O substrato utilizado neste ensaio é o terc-butilhidroperóxido. A oxidação de NADPH a NADP⁺ foi acompanhada pelo decaimento da absorbância, a 340nm e à 37°C. Foi adicionado em cada cavidade de uma microplaca, 125µL de tampão fosfato 0,1M pH=7,0 e EDTA 1,0mM; 30µL de amostra (correspondente à 80µg de proteína totais); 5µL de solução de glutathiona reduzida (GSH) 80mM; 0,048U de glutathionaredutase (5µL da solução 0,0096U/µL). Essa mistura foi incubada por 5 minutos a 37°C. Em seguida adicionamos 5µL de solução de terc-butilhidroperóxido 0,46% e 30µL de solução de NADPH 1,20mM. O decréscimo na

absorbância foi monitorado a 340nm por 3 minutos. As amostras foram analisadas em triplicata.

A atividade foi determinada a partir da fórmula:

$$Atividade = \left[\frac{k}{\xi_{NADPH} \cdot b} \times \frac{200\mu L}{30\mu L} \right] / 80\mu g$$

onde: **atividade**: atividade específica da GPx (U/ μ g de proteína); **k**: inclinação da curva de decaimento (min^{-1}); **b**: caminho óptico (0,524 cm); ξ_{NADPH} : $6,22 \times 10^{-3}$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$); **80 μ g** : quantidade de proteínas totais utilizada no ensaio (80 μ g); $\frac{200\mu L}{30\mu L}$: diluição da amostra na cubeta; **30 μ L**: volume de amostra correspondente à 80 μ g de proteína.

5.10.2. Atividade de glutathione redutase (GR)

O método baseia-se na medida direta da atividade da GR, que utiliza o NADPH como co-fator na redução da GSSG em GSH. A oxidação de NADPH a NADP^+ será acompanhada pelo decaimento da absorbância a 340nm e à 37°C.

GR

Foi preparado 10mL de meio reagente com 4mL de tampão fosfato 0,10M pH 7,0 e EDTA 1,0mM; 3mL de EDTA 0,005M; 3mL de água deionizada, 0,02g de glutathiona oxidada (GSSG) e 4mg de NADPH. A cada poço de uma microplaca foram adicionados 20μL (volume de amostra correspondente à 80μg de proteínas totais) e 180μL de meio reacional. O decréscimo dos valores de absorbância foi monitorado a 340nm por 5 min à 37°C. As amostras foram analisadas em triplicata.

A atividade foi então determinada a partir da fórmula:

$$\text{Atividade} = \left[\frac{k}{\xi_{\text{NADPH}} \cdot b} \times \frac{200\mu\text{L}}{20\mu\text{L}} \right] / 80\mu\text{g}$$

onde: **atividade** = atividade específica da GR (U/μg de proteína); **k** = inclinação da curva de decaimento (min⁻¹); **b** = caminho óptico (0,524 cm); $\xi_{\text{NADPH}} = 6,22 \times 10^{-3}$

(μM⁻¹cm⁻¹); **80μg** = quantidade de proteínas totais utilizada no ensaio; $\frac{200\mu\text{L}}{20\mu\text{L}}$ =

diluição da amostra na cubeta; **20μL** = volume de amostra correspondente à 80μg de proteína.

5.10.3. Atividade glutathiona S-transferase (GST)

O método baseia-se na formação de um complexo entre a GSH e o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), catalisada pela GST. O aumento de absorbância foi diretamente proporcional à atividade da GST.

Reação de conjugação do CDNB com a GSH catalisada pela GST.

Foi adicionado em cada cavidade de uma microplaca, 20μL (volume de amostra correspondente à 80μg de proteínas totais), tampão fosfato 0,1M pH=6,5 (160μL); 5μL de solução de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 0,1M; essa mistura foi pré-incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, adicionamos 15μL de glutathiona reduzida (GSH) 0,1M. O aumento na absorbância foi monitorado a 340nm por 5 minutos à 25°C. As amostras foram analisadas em triplicata.

A atividade foi então determinada a partir da fórmula:

$$Atividade = \left[\frac{k}{\xi_{CDNB} \cdot b} \times \frac{200\mu L}{20\mu L} \right] / 80\mu g$$

onde: **atividade** = atividade específica da GST (U/ μ g de proteína); **k**= inclinação da curva (min^{-1}); **b**= caminho óptico (0,524cm); $\xi_{CDNB} = 9,60 \times 10^{-3} \text{ (}\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{)}$; **80 μ g** = quantidade de proteínas totais utilizada no ensaio; $\frac{200\mu\text{L}}{20\mu\text{L}}$ = diluição da amostra na cubeta; **20 μ L** = volume de amostra correspondente à 80 μ g de proteína.

5.10.4. Atividade da Cu/ZnSOD

A enzima Cu/ZnSOD dismuta o $\text{O}_2^{\bullet-}$ na presença de H^+ formando H_2O_2 e H_2O . No ensaio utilizamos o sistema hipoxantina-xantina oxidase como gerador de $\text{O}_2^{\bullet-}$. O ferricitocromo C foi reduzido na presença do $\text{O}_2^{\bullet-}$ e a taxa de redução monitorada por espectrofotometria à 550nm e à 25°C. A Cu/ZnSOD compete pelo $\text{O}_2^{\bullet-}$ diminuindo a taxa de redução do ferricitocromo C (Figura 6). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de SOD que inibe a taxa de redução do ferricitocromo C, sobre condições específicas, em 50% (McCord&Fridovich, 1969; Flohé&Ötting, 1984).

Figure 6: Reações catalisadas pelas enzimas xantina oxidase (XO) e superóxido dismutase (SOD). **(A)** Reação de conversão de hipoxantina em xantina catalisada pela XO; **(B)** reação de conversão de xantina em ácido úrico catalisada pela XO; **(C)** reação de redução do ferricitocromo C oxidado [Cit C(Fe³⁺)] formando ferricitocromo C reduzido [Cit C(Fe²⁺)] e **(D)** reação de dismutação do O₂^{•-} catalisada pela enzima SOD.

Para a remoção de interferentes (como Hb, albumina, NADPH, ácido ascórbico e lipídeos) realizamos uma extração líquido-líquido com uma mistura de solventes contendo etanol/clorofórmio (62,5:37,5 v/v). Adicionamos a um eppendorf 125 µL da amostra de eritrócitos (1:5) e 200 µL da mistura de solventes. Em seguida, centrifugamos a 3000xg por 5 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi retirado e reservado para as análises.

Preparamos um meio reacional composto por 37,5mL de tampão fosfato KH₂PO₄/K₂HPO₄(50mM – pH 7,8) com EDTA 0,1mM; 10mL de hidróxido de sódio (NaOH) 10mM; 6,2mg de ferricitocromo C e 0,68mg de hipoxantina.

Para determinar a taxa de redução do ferricitocromo C na ausência de CuZnSOD, adicionamos à uma cubeta de quartzo, 950 µL de meio reacional, 25µL de tampão fosfato KH₂PO₄/K₂HPO₄(50mM – pH 7,8) e 25µL de uma solução de

xantina oxidase (preparada imediatamente antes da adição à cubeta) na concentração que produza um aumento na absorbância de $0,025\text{min}^{-1}$ ($\sim 0,8$ U/mL). A leitura foi realizada por 3 minutos à 550nm e à 25°C. Para determinar a porcentagem de inibição (%I) na taxa de redução do ferricitocromo C produzida pela presença de CuZnSOD, realizamos a leitura, adicionando à cubeta 950 μ L de meio reacional, 25 μ L de amostra extraída e 25 μ L da solução de xantina oxidase ($\sim 0,8$ U/mL). O branco consiste na leitura da adição de 950 μ L meio reacional e 50 μ L de tampão fosfato $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (50mM – pH 7,8) à cubeta de quartzo.

5.11 Estereologia

A estereologia vem sendo aplicada para a quantificação de estruturas pulmonares desde 1963 (Weibel, 1963). Recentemente, uma ação conjunta da ATS (American Thoracic Society) e da ERS (European Respiratory Society) padronizou os métodos estereológicos para o pulmão. Neste estudo seguimos as recomendações da ATS-ERS (Hsia et al., 2010).

Os seguintes parâmetros foram avaliados: volume pulmonar total, volume total e densidade de volume dos compartimentos pulmonares: parênquima pulmonar (excluindo-se brônquios, vasos, septos inter-lobulares, linfonodos); vias aéreas; vasos sanguíneos; espaços aéreos alveolares; septos alveolares

(pneumócitos e capilares); áreas de superfície total e densidade de superfície dos alvéolos, vias aéreas e vasos sanguíneos.

5.11.1 Amostragem e inclusão

A amostragem do pulmão foi feita de forma sistemática uniforme e randômica. A quantificação dos parâmetros pulmonares a serem avaliados foi conduzida em cortes verticais. Assim para a amostragem, os pulmões inteiros (incluindo as estruturas do hilo) foram incluídos em blocos de ágar (12%). O esquema da amostragem é mostrado na figura 7.

Figure 7: Representação esquemática dos métodos e amostragem do pulmão para o estudo estereológico. **(A)** inclusão do pulmão em Agar; **(B)** cortes verticais seriados; **(C)** sistema teste de pontos para estimativa do volume pelo método de Cavalieri nas fatias de pulmão em Agar; **(D)** inclusão das fatias de Agar me blocos de parafina; **(E)** segundo estágio de amostragem dos pulmões de camundongos.

5.11.2 Volume Pulmonar (“Reference Space”)

O volume pulmonar foi estimado pelo método de Cavalieri. Por este método é possível estimar o volume de um objeto de forma arbitrária, seccionando-o em fatias paralelas equidistantes e multiplicando-se a distância entre os cortes pela somatória das áreas das faces de corte. As áreas das faces de corte ou transectos pode ser obtida facilmente pelo método de contagem de pontos. Para este fim, um sistema teste de pontos (a_p = de área associada ao ponto conhecida) foi sobreposto às fatias de ágar e os pontos incidentes sobre o compartimento de interesse foram contados em todas as fatias. Assim, o volume foi obtido aplicando-se a fórmula:

$$V_{\text{pulmão}} = \sum p_t \times a(p) \times T$$

onde: p_t são os pontos incidentes sobre o pulmão, $a(p) = 7,54\text{mm}^2$ e T é a espessura das fatias produzidas no ágar (neste caso 4mm).

5.11.3 Volume (V) e Densidade de Volume (Vv) dos Compartimentos Pulmonares

O método de contagem de pontos foi utilizado para estimarmos as densidades de volume das estruturas pulmonares de interesse: parênquima pulmonar, vias aéreas, vasos sanguíneos, espaços aéreos alveolares e septos alveolares (pneumócitos e capilares).

Para esta análise os blocos de parafina foram seccionados em cortes de 4µm de espessura e dois pares de cortes consecutivos de cada bloco, distantes 300µm foram coletados em lâminas de vidro histológicas. Os cortes foram corados pelo método hematoxilina-eosina.

A geração e sobreposição dos sistemas teste de pontos bem como as contagens foram realizadas com auxílio do programa IMAGEJ [<http://rsb.info.nih.gov/ij/>] (figura 8). Os pontos incidentes sobre as diferentes estruturas pulmonares e sobre o parênquima pulmonar (como um todo) serão contados em todos os campos e a densidade de volume será obtida pela fórmula:

$$Vv_{comp} = \sum pt_{comp} / \sum pt_{parênquima}$$

onde: $\sum pt_{comp}$ e $\sum pt_{parênquima}$ referem-se à soma de todos os pontos contados em todos os campos analisados de cada pulmão.

A densidade de cada compartimento foi então convertida em volume absoluto (total) multiplicando-se a densidade de volume (V_{vcomp}) pelo volume total do espaço de referência correspondente.

$$V_{comp} = V_{vcomp} \times V_{pulmão \text{ ou } parênquima}$$

Figure 8: Programa IMAGEJ: Exemplo da aplicação do sistema teste de pontos para estimativa das densidades de volume dos compartimentos pulmonares.

5.11.4 Áreas de superfície total e Densidade de superfície dos alvéolos, vias aéreas e vasos sanguíneos.

Quando avaliamos áreas de superfície é importante randomizarmos a orientação, pois esta medida é influenciada pela orientação da estrutura. Da mesma forma e nos mesmos campos que foram utilizados para as medidas de volume utilizamos um sistema teste de linhas para os pulmões (cortes verticais).

Nesta análise as intersecções entre os ciclóides (figura 9) e os limites da estrutura analisada foram contadas. E aplicando-se os dados na fórmula a seguir obtivemos as estimativas de densidade de área das estruturas:

$$Sv_{comp} = 2 \times \sum I_{comp} / \sum pt_{comp} \times l(p)$$

onde: $l(p)$ é o comprimento do cicloide, $\sum I$ é o número total de intersecções entre os segmentos de reta e o compartimento de interesse e $\sum pt$ é o número de pontos no compartimento de interesse.

As áreas de superfície absolutas serão obtidas aplicando-se a fórmula:

$$St_{comp} = Sv_{comp} \times Vt_{pulmão}$$

onde: Sv_{comp} é densidade de volume do compartimento analisado e $Vt_{pulmão}$ é o volume total dos pulmões.

Figure 9: Sistema teste de arcos ciclóides (E) e de linhas (D) para estimativa de áreas de superfície. Os pontos neste sistema teste são representados pelas extremidades dos arcos ou linhas.

5.11.5 Estimativa da espessura dos septos alveolares (Arithmetic mean thickness)

A espessura dos septos alveolares foi derivada a partir da média aritmética (AMT_{septo}) aplicando-se a seguinte fórmula:

$$AMT_{septo} = 2 \times Vt_{septo} / St_{septo}$$

onde: **Vt_{septo}** é o volume total dos septos alveolares e **St_{septo}** é a área de superfície total dos septos alveolares.

5.12 Análise de colágeno e fibras elásticas no parênquima pulmonar e nas vias aéreas

Para a análise de colágeno total, as lâminas foram coradas com Picrosirius red. As lâminas foram desparafinadas e hidratadas em gradiente de álcool (absoluto – 95% - 70%- água). Em seguida, as lâminas foram coradas com Picro-Sirius red por 15 minutos e lavadas em água corrente. Por sua vez, foram contra-coradas com hematoxilina de Carazzi por 5 minutos, e lavadas novamente em água corrente. Finalmente, foram desidratadas em gradiente de álcool (70% - 95% - absoluto), passadas no xilol e montadas com Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha). Nesta coloração as fibras colágenas se coram em vermelho vivo.

Para a análise de fibras elásticas, as lâminas foram coradas com Resorcina Fucsina / oxidada. As lâminas foram desparafinadas e hidratadas em gradiente de álcool (absoluto – 95% - 70% - água). Na sequência, foram oxidadas em solução de oxona 10% por 40 minutos, lavadas com água por 5 minutos e passadas rapidamente por álcool 70% e 96%. Em seguida, foram coradas com resorcina-fucsina por 1 hora em temperatura ambiente e lavadas por mais 5 minutos. As lâminas foram diferenciadas em álcool 70% até ser possível observar apenas as fibras elásticas em roxo escuro. Finalmente, as lâminas foram desidratadas em gradiente de álcool (95% - absoluto), passadas no xilol e montadas com Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Para as análises no parênquima pulmonar e nas vias aéreas, as lâminas foram digitalizadas com auxílio do escaner de lâminas digital Pannoramic SCAN (3DHistech Ltd. Budapest, Hungary) e foram analisadas com a ajuda do software Image-Pro® Plus versão 4.5 para Windows® (Media Cybernetics – Silver Spring MD, USA).

5.13 Análise Estatística

Para as variáveis quantitativas, a homogeneidade das variâncias e a aderência à curva normal foram analisadas pelos testes de Kolmogorov-smirnov. Para distribuição paramétrica aplicamos o teste ANOVA e o pós-teste o Tukey. Para as distribuições não paramétricas utilizamos os testes Kruskal – Wallis e o

pós-teste o Bonferroni. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão ou mediana (intervalo interquartil) de acordo com a distribuição.

Para as variáveis idade e exposição foram aplicados o teste de General Linear Models (GLM) e o nível de significância foi estabelecido como $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Análise das propriedades físico-química do combustível diesel

A tabela 4 descreve as propriedades físico-químico do combustível fornecido pelo Laboratório de combustível e Lubrificantes.

Tabela 4 – Propriedades físico-química do óleo diesel.

Ensaio	Resultado	Método Baseado
Aspecto	Turvo com impurezas	Visual
Cor	Vermelha	Visual
Cor ASTM	Cor ASTM L5,5	ABNT NBR 14483/08
Teor de biodiesel - %	5,42	EM 14078
Determinação de enxofre – mg/kg	352	ASTM D 5453
Massa específica a 20°C – Kg/m ³	847,3	ABNT NBR 7148/01
Ponto de Fulgor, v. fechado - °C (procedimento A)	42,0	ABNT NBR 14598/12
Viscosidade cinemática 40°C – mm ² /s	2,560	ABNT NBR 1044 1/07
Destilação – 50% vol., recuperado - °C	262,5	ABNT NBR 9619/09
Destilação – 85% vol., recuperado - °C	348,7	ABNT NBR 9619/09
Ponto de entupimento de filtro a frio - °C	-1	ABNT NBR 14747/98
Resíduo de carbono Ramsbottom no resíduo dos 10% finais de destilação - % massa	0,012	ASTM D 524
Cinzas - %	0,007	ASTM D 482
Corrosividade ao cobre 3h a 50°C	1 ^a	ABNT NBR 14359/13
Água – mg/kg	5.206	ASTM D 6304
Contaminação total – mg/kg	6,48	EM 12662
Determinação de Água e Sedimentados - %	3	ASTM D 2709/96
Índice de neutralização – mgKOH/g	0,153	ASTM D 974

Lubricidade – um	200	ASTM D 6079
Condutividade elétrica –pS/m	1.249	ASTM D 2624

Resolução ANP nº65 de 09/12/2011-DOU 12/12/2011. Estabelece as especificações do óleo diesel de uso rodoviário, consonante às disposições contidas no Regulamento Técnico ANP nº 08/2011 e às obrigações quanto ao controle da qualidade a serem atendidas pelos diversos agentes econômicos que comercializam o produto em todo o território nacional. Fonte: ANP, 2011.

6.2 Análise dos parâmetros monitorados em tempo real durante as exposições

Gráfico 1 - Representação gráfica dos parâmetros monitorados em tempo real; (A) material particulado $PM_{2,5}$, (B) temperatura e (C) umidade, durante as exposições.

(A) representação gráfica das concentrações de $PM_{2,5}$ e Ar filtrado durante as exposições, (B) representação gráfica da temperatura e (C) representação gráfica da umidade, durante as exposições.

Gráfico 2 - Representação gráfica dos parâmetros monitorados em tempo real, (A) óxido de nítrico (NO) e (B) dióxido de nitrogênio (NO₂).

Em (A) as aferições em tempo real das concentrações de NO durante as exposições ao diesel e ar filtrado, (B) as medições em tempo real de NO₂ durante as exposições.

6.3 Análise elementar do material particulado 2,5 (PM_{2,5})

A tabela 5 descreve a análise química do PM_{2,5} pela técnica de ativação de nêutrons (INAA).

Tabela 5 – Caracterização elementar das amostras de MP_{2,5}.

Elemento	Concentração	Incerteza da Concentração
As (µg g ⁻¹)	0,07123	0,00076
Ba (µg g ⁻¹)	LD=4,2 e LQ=12,7 (a)	-
Br (µg g ⁻¹)	0,6386	0,0042
Cl (µg g ⁻¹)	265,42	9,92
Cr (µg g ⁻¹)	2,342	0,030
Cu (µg g ⁻¹)	113,66	1,48
Fe (µg g ⁻¹)	44,58	1,66
K (µg g ⁻¹)	7,189	0,717
Mn (µg g ⁻¹)	0,6862	0,0412
Mo (µg g ⁻¹)	1,762	0,019
Na (µg g ⁻¹)	25,092	0,874
Sb (µg g ⁻¹)	0,9120	0,0191
V (µg g ⁻¹)	0,0943	0,0136
Zn (µg g ⁻¹)	2197,67	6,23

Legenda: (**As**) arsênio; (**Ba**) bário; (**Br**) bromo; (**Cl**) cloro; (**Cr**) cromo; (**Cu**) cobre; (**Fe**) ferro; (**K**) potássio; (**Mn**) manganês; (**Mo**) molibdênio; (**Na**) sódio; (**Sb**) antimônio; (**V**) vanádio; (**Zn**) zinco. (**a**) LD=limite de detecção; LD=limite de quantificação. Resultado foi calculada considerando erros nas medições das atividades da amostra e padrão.

A tabela 7 descreve o teor de enxofre (%) nas amostras do PM_{2,5}, obtidos pela análise EDX qualitativa.

Tabela 6 – Concentração qualitativa de enxofre no material particulado.

Elemento	Concentração
S (%)	2.7

Legenda: (S) enxofre. Análise EDX qualitativa.

6.4 Análise do peso dos animais após as exposições

O grupo idoso controle apresentou aumento de peso corporal (g) (32,00 (2,50); $p=0,0001$) quando comparado com o grupo jovem controle (25,00 (1,50)).

O grupo idoso exposto evidenciou aumento no peso corporal (g) ((32,00 (2,50); $p=0,0001$) em relação aos animais expostos jovens (23,00 (2,50)). Houve ainda diminuição significativa no grupo idoso exposto (30,00 (0,50); $p=0,028$) quando comparados com os animais idosos controle (32,00 (2,50)) – Gráfico 3. A análise do GLM evidenciou como fator determinante a idade ($p=0,001$) e a exposição ($p=0,001$).

Gráfico 3 – Representação gráfica do peso dos animais após as exposições.

≈ $p < 0,05$ em relação ao grupo controle jovem; ã $p < 0,05$ em relação ao grupo exposto jovem; ¥ $p < 0,05$ em relação ao grupo controle idoso; • outlier.

6.5 Análise dos parâmetros funcionais

A resistência das vias aéreas (cm H₂O/ml/s) - (Raw) não apresentou alterações significativas entre os grupos. – Gráfico – 4 A. Os valores da média e desvio padrão são apresentados na tabela em anexo.

A resistência do tecido pulmonar (cm H₂O/ml/s) - (Gtis) mostrou-se diminuída no grupo idoso controle ($4,46 \pm 0,87$; $p=0,010$) em relação ao grupo jovem exposto ($6,01 \pm 1,28$). Houve ainda diminuição no grupo idoso exposto ($4,64 \pm 1,08$; $p=0,041$) quando comparado ao grupo jovem exposto ($6,01 \pm 1,28$) – Gráfico 4 B. A análise do GLM evidenciou como fator determinante a idade ($p=0,001$).

A elastância do tecido pulmonar (cm H₂O/ml/s) - (Htis) diminuiu no grupo idoso controle ($21,00 (3,84)$; $p=0,019$) quando comparado com o grupo jovem controle ($26,61 (9,49)$) – Gráfico 4 C. A análise do GLM evidenciou como fator determinante a idade ($p=0,001$).

Gráfico 4 - Representação gráfica da mecânica respiratória; (A) resistência das vias aéreas – Raw (cm H₂O/ml/s); (B) resistência do tecido pulmonar – Gtis (cm H₂O/ml/s); elastância do tecido pulmonar Htis (cm H₂O/ml/s).

≈ p<0,05 em relação ao controle jovem; ⚡ p< 0,05 em relação ao grupo exposto jovem; • outlier.

6.6 Análise de células inflamatórias totais no lavado medular, soro e LBA

O número de células inflamatórias totais no lavado medular (LM) (mil/mm³) não apresentou alterações significativas - Gráfico 5 A. Os valores de média e desvio padrão são apresentados na tabela em anexo.

O leucograma (mil/mm³) mostrou-se aumentado no grupo idoso controle (8200,00 (5300); p=0,021) em relação ao grupo jovem controle (4400,00 (1600)). O grupo idoso exposto aumentou (12100,00 (5100); p=0,000) em relação ao grupo jovem exposto (5200,00 (1500)). Houve ainda aumento no grupo idoso exposto (12100,00 (5100); p=0,030) quando comparado com o grupo idoso controle (8200,00 (5300)) – Gráfico 5 B. A análise do GLM evidenciou como fator determinante a idade (p=0,001) e a exposição (p=0,020).

As células inflamatórias totais no lavado broncoalveolar (LBA) (nº de células/ml) mostraram-se aumentadas no grupo jovem exposto ($6,21 \times 10^4 \pm 2,46 \times 10^3$; p=0,0001) em relação ao grupo jovem controle ($3,01 \times 10^4 \pm 4,54 \times 10^3$). O mesmo aumento foi observado no grupo idoso exposto ($8,33 \times 10^4 \pm 3,00 \times 10^4$; p=0,001) quando comparado com o grupo idoso controle ($5,00 \times 10^4 \pm 4,93 \times 10^3$). Houve ainda, aumento no grupo idoso controle ($5,00 \times 10^4 \pm 4,93 \times 10^3$; p=0,044) quando comparado com o grupo jovem controle ($3,01 \times 10^4 \pm 4,54 \times 10^3$) e o grupo idoso exposto mostrou aumento ($8,33 \times 10^4 \pm 3,00 \times 10^4$; p=0,024) em relação ao grupo jovem exposto ($6,21 \times 10^4 \pm 2,46 \times 10^3$) – Gráfico 5 C. A análise do GLM evidenciou como fator determinante a idade (p=0,001) e a exposição (p=0,001).

Gráfico 5 - Representação gráfica do número de células inflamatórias totais; (A) no lavado medular (mil/mm³); (B) leucócitos no sangue (mil/mm³) e (C) no lavado broncoalveolar (nº de células/ ml).

$\approx$ p < 0,05 em relação ao grupo controle jovem; $\tilde{\omega}$ p < 0,05 em relação ao grupo exposto jovem; $\napprox$ p < 0,05 em relação ao controle idoso; • outlier.

Gráfico 6 - Representação gráfica da contagem diferencial no BAL; (A) número total de macrófagos;(B) número total de linfócitos e (C) número total de neutrófilo.

≈ $p < 0,05$ em relação ao grupo controle jovem; ¥ $p < 0,05$ em relação ao controle idoso; ⚡ $p < 0,05$ em relação ao grupo exposto jovem; • outlier.

O número de macrófagos (nº de células/ ml) aumentou significativamente no grupo jovem exposto (2365490,51 (256612); $p=0,003$) quando comparado com o jovem controle (1160439,56 (309175)). O grupo idoso exposto evidenciou aumento (2730000,00 (2126345); $p=0,001$) em relação ao grupo idoso controle (1809782,61 (283025)). Houve ainda aumento no grupo idoso exposto (2730000,00 (2126345); $p=0,009$) quando comparado com o grupo jovem exposto (2365490,51 (256612)) – Gráfico 6 A. A análise do GLM evidenciou como fator determinante a idade ($p=0,001$) e a exposição ($p=0,001$).

O número de linfócitos (nº de células/ ml) e neutrófilos (nº de células/ ml) não apresentaram alterações significativas – Gráfico 6 B e Gráfico 6 C. Os valores de mediana e intervalo interquartil são apresentados na tabela em anexo.

6.7 Análise da quantificação das citocinas no soro e LBA

Não encontramos diferenças significativas nas concentrações de IL-1 β (pg/ml); no soro e no LBA – Gráfico 7A e 7B, e nos níveis de IL6 (pg/ml); no soro e no LBA – Gráfico 7C e 7D. Os valores de mediana e intervalo interquartil são apresentados na tabela em anexo.

Gráfico 7 - Representação gráfica da quantificação de IL1 β (pg/ml); (A) no soro e (B) LBA. Quantificação de IL6 (pg/ml); (C) no soro e (D) no LBA.

• outlier.

Os níveis de IL10 (pg/ml) no soro não apresentaram alterações significativa entre os grupos – Gráfico 8A. Os valores de mediana e intervalo interquartil são apresentados na tabela em anexo.

Quando avaliamos os níveis de IL10 no LBA (pg/ml), encontramos diminuição no grupo idoso controle (0,010 (1,62); $p=0,000$) quando comparado com o grupo jovem controle (15,08 (15,18)). Houve ainda aumento no grupo jovem exposto (14,74 (5,39); $p=0,003$) em relação ao grupo idoso exposto (2,51 (3,04)) – Gráfico 8B. A análise do GLM evidenciou como fator determinante a idade ($p=0,001$).

Observamos também, um aumento sistêmico nos níveis de TNF (pg/ml) no grupo jovem controle (5,46 (9,58); $p=0,005$) em relação ao grupo idoso controle (0,010 (2,58)) – Gráfico 8C. A análise do GLM evidenciou como fator determinante a idade ($p=0,004$).

Os níveis de TNF no LBA (pg/ml) mostraram-se diminuídos no grupo idoso controle (0,00 (0,00); $p=0,012$) com o grupo jovem controle (10,24 (15,19)). Houve ainda diminuição no grupo idoso exposto ((0,00 (0,00); $p=0,049$) em relação ao grupo jovem exposto (13,64 (9,90)) – Gráfico 8D. A análise do GLM evidenciou como fator determinante a idade ($p=0,001$).

Gráfico 8 – Representação gráfica da quantificação de IL10 (pg/ml); (A) no soro e (B) BAL. Quantificação de TNF (pg/ml); (C) no soro e (D) no BAL.

≈ $p < 0,05$ em relação ao grupo controle jovem; ⚡ $p < 0,05$ em relação ao grupo exposto jovem; • outlier.

6.8 Análise das expressões gênicas das Sirtuínas

A expressão gênica de Sirt1 (relativo ao controle) mostrou-se diminuída no grupo idoso exposto (0,25 (0,24); $p=0,017$) quando comparados com o grupo jovem exposto (1,62 (4,61)) – Gráfico 9A. A análise do GLM evidenciou como fator determinante a idade ($p=0,030$).

Nota-se uma tendência a diminuição nos níveis de Sirt2 (relativo ao controle) no grupo jovem exposto (0,21 (0,15); $p=0,060$) quando comparamos com o seu controle ((1,13 (0,51)) – Gráfico 9B.

Houve ainda diminuição nos níveis de Sirt6 (relativo ao controle) no grupo jovem exposto (0,13 (0,26); $p=0,034$) quando comparados com o grupo jovem controle (1,19 (1,18)) – Gráfico 9C. A análise do GLM evidenciou como fator determinante a exposição ($p=0,002$).

Gráfico 9 - Representação gráfica das expressões gênicas das sirtuínas; (A) Sirt1 no tecido pulmonar; (B) Sirt2 no tecido pulmonar e (C) Sirt6 no tecido pulmonar.

≈ p<0,05 em relação ao grupo controle jovem; ¥ p<0,05 em relação ao grupo exposto jovem; • p<0,05 em relação ao grupo controle idoso e • outlier.

6.9 Análise das atividades enzimáticas das glutations

A atividades da glutational peroxidase - GPx (U/ug de proteína) mostrou-se diminuída no grupo idoso controle (1,55 (0,50); $p=0,007$) em relação ao grupo jovem controle (2,39 (0,94)). Houve ainda diminuição no grupo idoso exposto (1,44 (1,01); $p=0,001$) em relação ao grupo jovem exposto (2,14 (0,78)) – Gráfico 10A. A análise do GLM evidenciou como fator determinante a idade ($p=0,001$).

A atividade da glutational redutase - GR (U/ug de proteína) diminuiu no grupo idoso controle ($0,66 \pm 0,31$; $p=0,007$) em relação ao grupo jovem controle ($0,81 \pm 0,20$) – Gráfico 10B. A análise do GLM evidenciou como fator determinante a idade ($p=0,022$).

A atividade enzimática da glutational S-transferase – GST (U/ug de proteína) aumentou no grupo idoso controle ($15,66 \pm 2,33$; $p= 0,002$) em relação ao grupo jovem controle ($9,87 \pm 4,99$). Houve também aumento da atividade no grupo idoso exposto ($15,29 \pm 2,60$; $p= 0,012$) em comparação com o grupo jovem exposto ($10,42 \pm 3,03$) – Gráfico 10C. A análise do GLM evidenciou como fator determinante a idade ($p=0,001$).

A atividade da superóxido dismutase cobre-zinco - Cu/ZnSOD (U/ug de proteína) mostrou-se aumentada no grupo jovem exposto ($3,09 \pm 6,20$; $p= 0,000$) quando comparada com o grupo jovem controle ($1,10 \pm 9,1$); o mesmo aumento foi observado no grupo idoso exposto ($2,78 \pm 3,57$; $p= 0,000$) em relação ao grupo

idoso controle ($1,40 \pm 6,11$) – Gráfico 10D. A análise do GLM evidenciou como fator determinante a exposição ($p=0,001$).

Gráfico 10 - Representação gráfica das atividades (A) glutathiona peroxidase; (B) glutathiona redutase; (C) glutathiona S-transferase e (D) superóxido dismutase.

≈ $p < 0,05$ em relação ao grupo controle idoso; ω $p < 0,05$ em relação ao grupo exposto jovem; ¥ em $p < 0,05$ em relação ao grupo controle idoso; • outlier.

6.10 Análises Morfológicas

O volume total pulmonar (mm^3) mostrou-se aumentado no grupo controle idoso ($987,84 \pm 292,03$; $p=0,053$) quando comparado com o grupo controle jovem ($745,67 \pm 140,48$). Os animais idosos expostos ($1292,03 \pm 197,67$; $p=0,008$) apresentaram aumento no volume total pulmonar em relação ao seu controle ($987,84 \pm 292,03$). Houve ainda aumento no grupo idoso exposto ($1292,03 \pm 197,67$; $p=0,001$) quando comparados com os animais mais jovens expostos ($784,00 \pm 99,71$) – Gráfico 11.

Gráfico 11 – Representação do volume total pulmonar (mm^3).

≈ $p < 0,05$ em relação ao grupo controle jovem; ¥ $p < 0,05$ em relação ao grupo controle idoso; ω em relação ao grupo exposto jovem.

Gráfico 12 - Representação gráfica da proporção do volume total pulmonar (mm^3) pelo peso corpóreo (g).

¥ $p < 0,05$ em relação ao grupo controle idoso.

Quando normalizado pelo peso corporal, o volume total pulmonar (mm^3/g) mostrou-se aumentado no grupo idoso exposto ($42,42 \pm 5,73$; $p=0,004$) quando comparado com o seu controle ($30,59 \pm 9,60$) – Gráfico12. A análise do GLM evidenciou como fator determinante a exposição ($p=0,001$).

6.10.1 Análises morfológicas no parênquima

A densidade de volume do septo (%) mostrou-se aumentada no grupo jovem controle ($0,3152 \pm 0,0280$; $p=0,001$) quando comparado com o grupo idoso controle ($0,2295 \pm 0,04290$). Observamos uma diminuição no grupo idoso exposto ($0,1983 \pm 0,0209$; $p=0,001$) em relação ao grupo jovem exposto ($0,3162 \pm 0,0327$) – Gráfico 13A. A análise do GLM evidenciou como fator determinante a idade ($p=0,001$).

O volume total do septo (mm^3) não apresentou alterações significativas. Gráfico 13B. Os valores de média e desvio padrão são apresentados na tabela 06, anexo.

A densidade de volume do espaço aéreo alveolar (%) mostrou-se diminuída no grupo jovem exposto ($0,4862 \pm 0,4526$; $p=0,002$) quando comparado com o seu controle ($0,5555 \pm 0,0302$). O grupo idoso exposto mostrou diminuição ($0,4062 \pm 0,0377$; $p=0,001$) em relação ao seu controle ($0,4866 \pm 0,0942$). Os animais idosos controle apresentaram diminuição ($0,4866 \pm 0,0394$; $p=0,002$) em relação aos animais jovens controle ($0,5555 \pm 0,0302$). Houve ainda diminuição no grupo idoso exposto ($0,4062 \pm 0,0377$; $p=0,001$) quando comparado com os animais mais jovens expostos ($0,4862 \pm 0,4526$) - Gráfico 13C. A análise do GLM evidenciou como fator determinante a idade ($p=0,001$) e a exposição ($p=0,001$).

O volume total do espaço aéreo alveolar (mm^3) mostrou-se aumentado nos animais idosos expostos ($469,0863 \pm 68,2127$; $p=0,042$) em relação aos animais

jovens expostos ($350,9232 \pm 62,5984$) - Gráfico 13D. A análise do GLM evidenciou como fator determinante a idade ($p=0,001$).

A densidade de superfície do septo (mm^{-1}) mostrou-se aumentada nos animais idosos expostos ($1,2131 \pm 0,0931$; $p=0,004$) quando comparados com os animais jovens expostos ($1,0385 \pm 0,0774$) - Gráfico 13E. A análise do GLM evidenciou como fator determinante a idade ($p=0,001$).

A área de superfície total dos septos alveolares (mm^2) mostrou-se aumentada no grupo idoso exposto ($1,4100 \pm 2,5247$; $p=0,024$) em relação ao seu controle ($1,0746 \pm 3,5934$). Os animais do grupo idoso controle evidenciaram aumento ($1,0746 \pm 3,5934$; $p=0,029$) quando comparados com os animais mais jovens ($738,9911 \pm 1,5964$). Houve ainda aumento no grupo idoso exposto ($1,4100 \pm 2,5247$; $p=0,001$) quando comparados com o grupo jovem exposto ($753,2701 \pm 1,5942$) - Gráfico 13F. A análise do GLM evidenciou como fator determinante a idade ($p=0,035$) e a exposição ($p=0,001$).

A espessura dos septos alveolares (mm) mostrou-se diminuída no grupo controle idoso ($0,3980 \pm 0,1240$; $p=0,001$) quando comparado com os animais jovem controle ($0,5794 \pm 0,0884$). O grupo jovem exposto apresentou aumento na espessura do septo ($0,6150 \pm 0,0991$; $p=0,001$) quando comparados com os animais idosos expostos ($0,3302 \pm 0,0553$) - Gráfico 14. A análise do GLM evidenciou como fator determinante a idade ($p=0,001$).

Gráfico 13 – Representação gráfica (A) densidade de volume do septo (%); (B) volume total do septo (mm^3); (C) densidade de volume do espaço aéreo alveolar (%); (D) volume total do espaço aéreo alveolar (mm^3); (E) densidade de superfície do septo (mm^{-1}) e (F) área de superfície total dos septos alveolares (mm^2).

≈ $p < 0,05$ em relação ao grupo controle jovem; ω $p < 0,05$ em relação ao grupo exposto jovem; ¥ $p < 0,05$ em relação ao grupo controle idoso.

Gráfico 14 - Representação gráfica da estimativa da espessura dos septos alveolares (ATM).

≈ $p < 0,05$ em relação ao grupo controle jovem; ω $p < 0,05$ em relação ao grupo exposto jovem.

6.10.2 Análises morfológicas nas vias aéreas

A densidade de volume das vias aéreas totais (%) mostrou-se aumentada no grupo idoso controle ($0,1233 \pm 0,0390$; $p=0,005$) quando comparado com os animais mais jovens ($0,0611 \pm 0,0262$). Os animais idosos expostos apresentaram maior densidade de volume das vias aéreas ($0,1650 \pm 0,0483$; $p=0,002$) quando comparados com os animais mais jovens expostos ($0,0991 \pm 0,0329$) – Gráfico 15A. A análise do GLM evidenciou como fator determinante a idade ($p=0,001$) e a exposição ($p=0,002$).

O volume total das vias aéreas totais (mm^3) mostrou-se aumentados no grupo idoso controle (109,78 (70,78); $p=0,001$) em relação ao grupo jovem controle (37,74 (32,36)). O grupo exposto idoso mostrou-se aumentado (185,91 (103,29); $p=0,001$) quando comparado com os animais mais jovens expostos (65,78 (40,48)). Houve ainda um aumento significativo nos animais idosos expostos (65,78 (40,48); $p=0,001$) em relação aos animais idosos controle (109,78 (70,78)) - Gráfico 15B. A análise do GLM evidenciou como fator determinante a idade ($p=0,001$) e a exposição ($p=0,001$).

A densidade de volume da parede das vias aéreas (%) mostrou-se aumentada no grupo idoso exposto (0,06 (0,04); $p=0,012$) quando comparado com o grupo jovem exposto (0,03 (0,01)). Houve ainda aumento no grupo idoso exposto (0,06 (0,04); $p=0,010$) quando comparado com o grupo idoso controle

(0,04 (0,03)) - Gráfico 15C. A análise do GLM evidenciou como fator determinante a idade ($p=0,001$) e a exposição ($p=0,001$).

O volume total da parede das vias aéreas (mm^3) mostrou-se com uma tendência de aumentado no grupo idoso controle ($39,97 \pm 20,98$; $p=0,06$) em relação ao grupo jovem controle ($16,61 \pm 8,76$). O grupo idoso exposto apresentou aumento significativo ($78,60 \pm 30,69$; $p=0,0001$) quando comparado com o grupo jovem exposto ($30,85 \pm 9,15$). Houve ainda aumento significativo no grupo idoso exposto ($78,60 \pm 30,69$; $p=0,002$) quando comparado com o grupo idoso controle ($39,97 \pm 20,98$) – Gráfico 15D. A análise do GLM evidenciou como fator determinante a idade ($p=0,001$) e a exposição ($p=0,001$).

A densidade de volume da luz das vias aéreas (%) mostrou-se aumentado no grupo idoso controle ($0,08 \pm 0,03$; $p=0,009$) quando comparado com o grupo jovem controle ($0,03 \pm 0,02$). O grupo idoso exposto mostrou-se aumentado ($0,09 \pm 0,02$; $p=0,001$) em relação ao grupo jovem exposto ($0,05 \pm 0,02$) – Gráfico 15E. A análise do GLM evidenciou como fator determinante a idade ($p=0,001$) e a exposição ($p=0,042$).

O volume total da luz das vias aéreas (mm^3) apresentou-se aumentado no grupo idoso controle ($72,63 \pm 35,96$; $p=0,009$) em relação ao grupo jovem controle ($25,48 \pm 17,41$). O grupo idoso exposto mostrou-se aumentado ($113,14 \pm 36,52$; $p=0,001$) quando comparado com o grupo jovem exposto ($41,93 \pm 25,45$). Houve ainda aumento no grupo idoso exposto ($113,14 \pm 36,52$; $p=0,014$) em relação ao

grupo idoso controle ($72,63 \pm 35,96$) – Gráfico 15F. A análise do GLM evidenciou como fator determinante a idade ($p=0,001$) e a exposição ($p=0,006$).

A densidade de superfície das vias aéreas (mm^{-1}) apresentou-se diminuída no grupo idoso controle ($0,06 \pm 0,01$; $p=0,025$) quando comparado com os animais jovem controle ($0,08 \pm 0,01$). Houve ainda uma tendência à diminuição no grupo idoso exposto ($0,05 \pm 0,00$; $p=0,051$) em relação aos animais mais jovens expostos ($0,07 \pm 0,01$) – Gráfico 16A. A análise do GLM evidenciou como fator determinante a idade ($p=0,001$).

A área de superfície total das vias aéreas (mm^2) não apresentou alterações significativas. Os valores de média e desvio padrão são apresentados tabela 06, anexo – Gráfico 16B.

Gráfico 15 - Representação gráfica das vias aéreas; (A) densidade de volume vias aéreas totais (%); (B) volume total das vias aéreas totais (mm³); (C) densidade de volume da parede (%); (D) volume total da parede (mm³); (E) densidade de volume da luz (%); (F) volume total da luz (mm³).

$\approx$ p < 0,05 em relação ao grupo controle jovem; $\tilde{\omega}$ p < 0,05 em relação ao grupo exposto jovem; $\yen$ p < 0,05 em relação ao grupo controle idoso; • outlier.

Gráfico 16 – Representação gráfica das vias aéreas; (A) densidade de superfície das vias aéreas (mm^{-1}) e (B) área de superfície total das vias aéreas (mm^2).

≈ $p < 0,05$ em relação ao grupo controle jovem; ÷ $p < 0,05$ em relação ao grupo exposto jovem.

6.10.3 Análises morfológicas nos vasos

A densidade de volume dos vasos (%) mostrou-se aumentado no grupo idoso controle (0,1041(0,0562); $p=0,001$) quando comparado com o grupo jovem controle (0,3750(0,0187)). Os animais idosos expostos mostraram aumento (0,1333(0,0635); $p=0,019$) com relação ao seu controle (0,1041(0,0562)). Houve ainda aumento entre os animais idosos expostos (0,1333(0,0635); $p=0,001$) quando comparados com os animais jovens expostos (0,0520(0,0343)) - Gráfico 17A. A análise do GLM evidenciou como fator determinante a idade ($p=0,001$) e a exposição ($p=0,006$).

O volume total dos vasos (mm^3) mostrou-se aumentado no grupo idoso controle ($91,1038 \pm 29,8774$; $p=0,007$) quando comparado com o grupo jovem controle ($32,8595 \pm 16,7291$). Os animais idosos expostos mostraram aumento ($171,7164 \pm 62,1287$; $p=0,001$) com relação ao seu controle ($91,1038 \pm 29,8774$). Houve ainda aumento entre os animais idosos expostos ($171,7164 \pm 62,1287$; $p=0,001$) quando comparados com os animais jovens expostos ($42,9531 \pm 13,8014$) – Gráfico 17B. A análise do GLM evidenciou como fator determinante a idade ($p=0,001$) e a exposição ($p=0,001$) e ainda interação entre os dois fatores ($p=0,005$).

A densidade de superfície dos vasos (mm^{-1}) mostrou uma tendência à diminuição no grupo jovem exposto ($0,2085 \pm 0,7313$; $p=0,064$) quando comparado com seu controle ($0,2987 \pm 0,0977$). Houve também tendência à diminuição entre o grupo jovem controle ($0,2987 \pm 0,0977$; $p=0,056$) e idoso

controle ($0,2064 \pm 0,0802$) – Gráfico 17C. A análise do GLM evidenciou como fator determinante a idade ($p=0,006$) e a exposição ($p=0,007$).

A área de superfície total dos vasos (mm^2) não apresentou alterações significativas. Os valores de mediana e intervalo interquartil são apresentados na tabela 06, anexo – Gráfico 17D.

Gráfico 17- Representação gráfica dos vasos; (A) densidade de volume dos vasos (%); (B) volume total dos vasos (mm^3); (C) densidade de superfície dos vasos (mm^{-1}) e (D) área de superfície total dos vasos (mm^2).

≈ $p < 0,05$ em relação ao grupo controle jovem; ÷ $p < 0,05$ em relação ao grupo exposto jovem; ¥ $p < 0,05$ em relação ao grupo controle idoso e ● outlier.

6.10.4 Análises morfológicas do tecido conjuntivo

A densidade de volume do tecido conjuntivo (%) mostrou-se aumentada nos animais idosos controle ($0,5458 \pm 0,0212$; $p=0,017$) quando comparado com os animais jovens controle ($0,0203 \pm 0,0111$). O grupo exposto idoso ($0,0850 \pm 0,0328$; $p=0,033$) apresentou aumento em relação ao seu controle ($0,0545 \pm 0,0212$). Houve ainda aumento no grupo exposto idoso ($0,0850 \pm 0,0328$; $p=0,001$) quando comparado com os animais mais jovens expostos ($0,0383 \pm 0,0229$) – Gráfico 18A. A análise do GLM evidenciou como fator determinante a idade ($p=0,001$) e a exposição ($p=0,003$).

O volume total de tecido conjuntivo (mm^3) mostrou-se aumentado nos animais idosos expostos ($101,3546 \pm 49,6094$; $p=0,001$) em relação ao seu controle ($56,8713 \pm 19,2163$). Houve ainda aumento no grupo idoso exposto ($101,3546 \pm 49,6095$; $p=0,001$) quando comparado com os animais mais jovens expostos ($28,9543 \pm 21,4060$) – Gráfico 18B. A análise do GLM evidenciou como fator determinante a idade ($p=0,001$) e a exposição ($p=0,001$) e interação dos fatores ($p=0,045$).

Gráfico 18 - Representação gráfica do tecido conjuntivo; (A) densidade de volume do tecido conjuntivo (%) e (B) volume total de tecido conjuntivo (mm³).

≈ p<0,05 em relação ao grupo controle jovem; Û p<0,05 em relação ao grupo exposto jovem e ¥ p<0,05 em relação ao grupo controle idoso.

6.11 Histopatológico

Figure 10: Fotomicrografias representativas do tecido pulmonar (coloração H&E). A e B: grupo jovem controle em 10X e 20X respectivamente; C e D: grupo jovem exposto em 10x e 20X respectivamente; E e F: grupo idoso controle 10X e 20X respectivamente; G e H: grupo idoso exposto 10X e 20X respectivamente.

O grupo jovem controle (Figura 10 A-B) apresentou-se sem alterações significativas de células inflamatórias ou alterações estruturais nos compartimentos pulmonares. O grupo jovem exposto (Figura 10 C-D) mostrou-se com infiltrado inflamatório difuso pelo parênquima pulmonar com focos perivasculares e moderada alteração estrutural no epitélio das vias aéreas.

No grupo idoso controle (Figura 10 E-F) nota-se um acentuado alargamento dos espaços alveolares principalmente nas regiões mais distais do pulmão e diminuição na espessura dos septos alveolares. O grupo idoso exposto (Figura 10 G-H) cursa com espessamento do epitélio das vias aéreas, células inflamatórias difusas pelo parênquima pulmonar, moderado infiltrado inflamatório perivascular e peribrônquico.

6.12 Remodelamento tecidual

6.12.1 Análises de colágeno

A proporção da densidade de colágeno por área de tecido no parênquima pulmonar (%) mostrou-se aumentada no grupo idoso exposto (3,32 (1,18); $p=0,008$) quando comparado ao seu controle (1,78 (1,85)) – Gráfico 19A.

A proporção da densidade de colágeno nas vias aéreas (%) mostrou-se aumentada no grupo idoso controle (18,7427(2,0776); $p=0,001$) quando comparado com os animais jovem controle (10,8801(4,9904)). O grupo idoso exposto apresentou aumento (29,2211(4,1423); $p=0,001$) em relação ao seu controle idoso (18,7427(2,0776)). Entre os grupos expostos os animais idosos evidenciaram aumento (29,2211(4,1423); $p=0,001$) quando comparados com os animais mais jovens (10,8051(3,0020)) – Gráfico 19B. A análise do GLM evidenciou como fator determinante a idade ($p=0,001$) e a exposição ($p=0,001$) e a interação dos fatores ($p=0,001$).

Gráfico 19 – Representação gráfica da proporção de colágeno; (A) proporção de colágeno por área de tecido no parênquima pulmonar (%) e (B) proporção de colágeno por área de tecido nas vias aéreas (%).

≈ $p < 0,05$ em relação ao grupo controle jovem; ⚡ $p < 0,05$ em relação ao grupo exposto jovem e ¥ $p < 0,05$ em relação ao grupo controle idoso.

6.12.2 Análises de fibras elásticas

A proporção da densidade de fibras elásticas por área de tecido no parênquima pulmonar (%) mostrou-se diminuída no grupo controle idoso ($4,47 \pm 0,13$; $p=0,006$) quando comparados aos animais jovens controle ($6,50 \pm 1,20$). Os animais do grupo idoso exposto evidenciaram diminuição ($4,29 \pm 5,13$; $p=0,001$) em relação ao grupo jovem exposto ($6,94 \pm 3,89$) – Gráfico 20A. A análise do GLM evidenciou como fator determinante a idade ($p=0,001$).

A proporção da densidade de fibras elásticas nas vias aéreas (%) diminuiu no grupo idoso controle ($4,6576(1,8093)$; $p=0,002$) quando comparado com o grupo jovem controle ($9,9408(3,6398)$). Os animais idosos expostos mostraram diminuição ($10,4102(5,9195)$; $p=0,049$) em relação aos animais mais jovens expostos ($10,4102(5,9195)$) – Gráfico 20B. A análise do GLM evidenciou como fator determinante a idade ($p=0,001$).

Gráfico 20 – Representação gráfica da proporção de fibras elásticas; (A) proporção de fibras elásticas por área de tecido no parênquima pulmonar (%) e (B) proporção de fibras elásticas por área de tecido nas vias aéreas (%).

≈ $p < 0,05$ em relação ao grupo controle jovem; ⚡ $p < 0,05$ em relação ao grupo exposto jovem e ● outlier.

7. DISCUSSÃO

O presente estudo caracterizou extensivamente as alterações pulmonares relacionadas com o processo do envelhecimento em camundongos e a influência de 30 dias de exposição à exaustão do diesel. Nosso estudo mostrou que em comparação com camundongos mais jovens, os animais idosos apresentaram redução na resistência e elastância pulmonar, com diminuição nos níveis de IL-10 e TNF no BAL e TNF no sangue. Os animais idosos apresentaram mudanças estruturais caracterizadas por um aumento no volume total pulmonar e seus compartimentos, diminuição no espessamento do septo e aumento da deposição de colágeno, associado com uma diminuição nas fibras elásticas nas vias aéreas e nos alvéolos. Além disso, a atividade das enzimas antioxidantes GPx e GR foram diminuídas, com aumento nos níveis de GST quando comparados aos animais mais jovens. Por fim, os níveis de mRNA de Sirt1 foram diminuídos nesses animais.

As exposições a exaustão do diesel cursaram com o aumento no número de macrófagos no BAL e aumento nos níveis de SOD em ambos os grupos, jovens e idosos. Entretanto, as mudanças estruturais decorrentes das exposições ocorreram exclusivamente nos animais idosos, que apresentaram maior aumento no volume total pulmonar e seus compartimentos, aumento na deposição de colágeno no septo alveolar e vias aéreas. Houve um efeito da idade nos níveis de Sirt1, com diminuição no grupo idosos expostos, quando comparados com os

animais jovens. Os níveis de Sirt6 foram diminuídos após as exposições em ambos os grupos.

Nossos dados mostram que as exposições à exaustão do diesel aceleram as alterações estruturais. Além disso, as sirtuínas respondem de forma diferente à exposição à poluição, com diminuição na expressão genica de Sirt6.

Funcionalmente, os animais idosos mostraram diminuição da resistência e elastância do tecido pulmonar, associado com um aumento na deposição de colágeno e diminuição de fibras elásticas nas vias aéreas e parênquima pulmonar. Nossos achados corroboram com o estudo de Kurozumi et al (1994) que descrevem um aumento na complacência e degeneração progressiva das fibras elásticas durante o processo do envelhecimento em camundongos. Nossa investigação estereológica mostrou que os animais idosos apresentaram aumento do volume total alveolar e aumento na área de superfície alveolar, ao passo que, a espessura dos septos alveolares diminuiu. Esses achados indicam uma hiperinsuflação alveolar e distensão de septo, provavelmente por causa da perda de matriz extracelular, comprometendo o recolhimento elástico e elasticidade pulmonar nesses animais idosos.

Quando expostos à exaustão do diesel, os animais idosos aumentaram ainda mais, o volume total pulmonar e seus compartimentos com maior deposição de colágeno. A interação entre exposição a poluição do ar e remodelamento tecidual é bem estabelecida em modelos epidemiológicos e experimentais. Pinkerton et al. (2000) reportaram remodelamento tecidual, principalmente em vias aéreas, em

humanos expostos à poluição do ar. Além disso, Byeong et al. (2016) mostrou que camundongos expostos por período prolongados as DEPs desenvolveram fibrose pulmonar, dose-dependente. No entanto, no nosso estudo, essas mudanças estruturais não foram acompanhadas por mudanças funcionais.

Em seres humanos, acredita-se que o envelhecimento esteja associado com uma inflamação crônica de baixo grau, conduzida por macrófagos e várias alterações de citocinas/quimiocinas no sangue (Franceschi et al., 2016). No nosso modelo, não encontramos aumento nos níveis de IL-1, IL-6 e TNF- α no sangue ou no BAL, mas uma diminuição em IL-10 associada com aumento no número de macrófagos no BAL, exacerbado pela exposição do diesel nos animais idosos. Nossos achados são consistentes com um estudo prévio em camundongos idosos infectados com *Streptococcus pneumoniae*, que mostraram aumento de neutrófilo, diminuição nos níveis de IL-10, mas nenhum aumento nos níveis de TNF α , IL-6 ou IL-1 (Williams et al., 2015). Os autores desse estudo sugeriram que a resposta inflamatória aumentada em camundongos idosos está associada com a redução nos níveis de IL-10, em vez de, uma resposta aumentada de citocinas pró-inflamatórias.

A superóxido dismutase (SOD) compõem a primeira linha de enzimas do sistema antioxidantes contra espécies reativas de oxigênio (ROS); Cu-Zn-SOD tem como função reduzir $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 (Zelko et al., 2002). A glutathione peroxidase (GPx) tem a função de reduzir H_2O_2 em H_2O (Kinnula et al., 1995; Comhair et al., 2005) e a glutathione redutase (GR) é responsável pela conversão da glutathione

oxidada (GSSG) em glutathiona (GSH), mantendo assim, a integridade do ciclo redox (Halliwell et al., 1989; Day, 2009). A glutathiona S-transferase (GST) é responsável pela desintoxicação de xenobióticos eletrofílicos, tais como carcinogênicos químicos, poluentes ambientais e agentes antitumorais por inativação de metabólitos secundários formados durante estresse oxidativo (Hayes et al., 2005).

No nosso estudo, os animais idosos mostraram uma diminuição na atividade enzimática de GPx e GR, enquanto que, os níveis de GST foram aumentados. De acordo com prévios estudos, a redução de GPX ocorre em ratos idosos entre 12 e 24 meses (Gündüz et al., 2004), em camundongos a partir de 9 meses (Stohs et al., 1984) e em humanos após 65 anos de idade (Espinoza et al., 2008). Vyskolilová et al. (2013) mostraram aumento nas atividades de GST no fígado de ratos com o avançar da idade e sugeriram que esse aumento poderia ser um mecanismo compensatório contra o aumento da formação de produtos do estresse oxidativo decorrentes do processo de envelhecimento. A exposição as DEPs foram associadas com o aumento nos níveis de CuZn-SOD, mas não alterou as atividades de GPx, GR e GST. A diminuição basal de GR e GPx nos animais idosos, podem estar relacionadas com o acentuado aumento de macrófagos no BAL após as exposições ao diesel.

Nossos achados confirmam que a expressão genica de Sirt1 diminui com a idade. Sirt1 está envolvida em vários processos celulares relacionados com o envelhecimento, tolerância ao estresse e inflamação (Michan e Sinclair, 2007). Um

dos possíveis mecanismos é a modulação de ROS, via de sinalização Sirt1/FOXO, estimulando a transcrição da família *Forkhead Transcription Factors* (FOXO), que por sua vez, estimula a expressão de antioxidantes como a catalase e SOD (Alcendor et al., 2007; Hsu et al., 2010). Além disso, Sirt1 é também um potente inibidor da inflamação, via de sinalização NFkB, mantendo o homeostase celular (Yeung et al., 2004). Wu et al. (2012) mostraram que camundongos Sirt1 knockout são mais suscetíveis à coagulação e inflamação induzidas pelo material particulado.

No nosso estudo, houve uma tendência de diminuição da expressão genica de Sirt1 nos animais idosos após as exposições ao diesel, e a expressão genica de Sirt6 diminuiu em ambos os grupos com as exposições. Sirt6 tem importante função no reparo de DNA, função na telomerase, estabilidade genômica e senescência celular (Tennen e Chua, 2011). Recentes estudos têm demonstrado que o estresse oxidativo pode modular, via miRNA34a/P13Ka, a diminuição na expressão genica de Sirt1 e Sirt6 (Baker et al., 2016). Além disso, camundongos Sirt6 knockout tem senescência acelerada e a deficiência de Sirt6 leva a um aumento nos níveis de ROS e maior vulnerabilidade a estresse oxidativo em células mesenquimais (Pan et al., 2016).

8.CONCLUSÃO

As exposições as DEPs aceleraram a inflamação macrofágica no pulmão dos camundongos idosos e as mudanças de remodelamento ligadas ao envelhecimento, associadas com o desequilíbrio do estresse oxidativo e a diminuição da expressão gênica de Sirt6. As características do envelhecimento pulmonar, tais como, diminuição da reserva de antioxidantes, menor expressão de IL-10 e diminuição nos níveis de Sirt1, provavelmente predispõe a uma resposta exacerbada após as exposições ao diesel.

9. ANEXO

Anexo A: Resultados não significativos.

Tabela 7 – Média, desvio padrão, mediana e intervalo interquartil dos grupos jovem controle, jovem exposto, idoso controle e idosos exposto.

Variáveis	CJC	CJD	CIC	CID
Resistência das vias aéreas (RAW)	0,25 ± 0,05	0,22 ± 0,08	0,22 ± 0,03	0,29 ± 0,08
Células inflamatórias totais (LM)	1697,70 ± 605,862	1860,80 ± 366,571	1808,01 ± 781,861	1978,01 ± 346,211
Número de linfócitos	0,07500 (0,141)	0,8111 (0,725)	0,8571 (0,990)	0,00001 (0,027)
Número de neutrófilos	0,00 (20344)	6889,53 (22130)	54000,00 (116272)	0,01 (001)
IL-1β no soro	0,0100 (0,0000)	0,100 (0,0000)	0,100 (0,0000)	0,100 (0,000)
IL-1 β no BAL	3,8922 ± 11,6466	1,0410 ± 3,2603	0,7233 ± 0,8551	0,4701 ± 0,9138
IL-6 no soro	1,4601 (1,910)	0,0100 (2,0750)	1,4000 (1,6600)	0,0100 (1,4700)
IL-6 no BAL	0,1000 (2,6950)	2,040 (1,5150)	1,1000 (1,4500)	0,0100 (1,4500)
IL-10 no soro	0,0100 (4,16)	2,3600 (6,95)	0,0100 (0,00)	0,0100 (2,88)
Vt septo	210,33 ± 36,35	225,28 ± 19,76	203,15 ± 62,23	228,80 ± 32,44
Área de superfície total dos vasos	198,65 ± 64,48	151,60 ± 66,19	196,70 ± 71,13	184,22 ± 73,05

Legenda

(CJC) camundongos adultos jovens controle; (CJD) camundongos adultos jovens diesel; (CIC) camundongos adultos idosos controle; (CID) camundongos adultos idosos diesel. (LM) – lavado medular. (IL-1 β) – interleucina1 β ; (IL-6) – interleucinas6; (IL-10) – interleucinas10; (Vt) – volume total do septo e (St) – área de superfície total dos vasos.

Anexo B: Aprovação do comitê de ética em pesquisa

A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 27/11/2013, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **481/13** intitulado: **“AVALIAÇÃO MORFOFUNCIONAL E EXPRESSÃO GÊNICA DE SIRT1 NO PULMÃO DE CAMUNDONGOS JOVENS E IDOSOS EXPOSTOS AO PARTICULADO DA EXAUSTÃO DE DIESEL (DEP).”** que utilizará **80** animais da espécie **camundongos C57/BL6**, apresentado pelo **Programa de FISIOPATOLOGIA EXPERIMENTAL**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Profa.Dra. Thais Mauad

Pesquisador (a) Executante: Gabriel Ribeiro Júnior

CEP-FMUSP, 29 de Novembro de 2013.

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adly AM. Oxidative Stress and Disease: An Updated Review. *Research Journal of immunology*. 2010; 3(2):129-45.

Alander TJ, Leskinen AP, Raunemaa TM, Rantanen L. Characterization of diesel particles: effects of fuel reformulation, exhaust aftertreatment, and engine operation on particle carbon composition and volatility. *Environ Sci Technol*. 2004; 38(9):2707-14.

Alcendor RR, Gao S, Zhai P, Zablocki D, Holle E, Yu X, Tian B, Wagner T, Vatner SF, Sadoshima J. Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circ Res*. 2007;100:1512-21.

Amara N, Bachoual R, Desmard M, Golda S, Guichard C, Lanone S, Aubier M, Ogier-Denis E, Boczkowski J. Diesel exhaust particles induce matrix metalloprotease-1 in human lung epithelial cells via a NADP(H) oxidase/NOX4 redox-dependent mechanism. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007; 293(1): 170-81.

Andersen ZL, Wahlin P, Raaschou-Nielsen O, Ketzel M, Scheike T, Loft S. Size distribution and total number concentration of ultrafine and accumulation mode particles and hospital admissions in children and the elderly in Copenhagen, Denmark. *Occup Environ Med*. 2008; 65(7):458-66.

Anselme F, Lorient S, Henry JP, Dionnet F, Napoleoni JG, Thuillez C, Morin JP. Inhalation of diluted diesel engine emission impacts heart rate variability and arrhythmia occurrence in a rat model of chronic ischemic heart failure. *Arch Toxicol*. 2007; 81(4):299-307.

Anver MR, Haines DCH. Ch 21. *Gerontology*. In: Hedrich Hans. The Laboratory Mouse. Edited by Series editors: Gillian Bullock & Peter Petruz. Elsevier. 2004.p.322-343.

Araki T, Sasaki Y, Milbrandt J. Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration. *Science*. 2004; 305:1010-13.

Arora NS, Rochester DF. Effect of body weight and muscularity on human diaphragm muscle mass, thickness, and area. *Journal of Applied Physiology*. 1982; 1(52):64-70.

Baker JR, Vuppusetty C, Colley T, Papaionnou AI, Fenwick P, Donnelly L, Ito K, Barnes PJ. Oxidative stress dependent microRNA-34a activation via P13K α reduces the expression of sirtuin-1 and sirtuin-6 in epithelial cells. *Sci Rep* 2016; 21(6): 35871.

Behndig AF, Mudway IS, Brown JL, Stenfors N, Helleday R, Duggan ST, Wilson SJ, Boman C, Cassee FR, Frew AJ, Kelly FJ, Sandstro T, Blomberg A. Airway antioxidant and inflammatory responses to diesel exhaust exposure in healthy humans. *Eur Respir J*. 2006; 27:359–365.

Betteridge DJ. What Is Oxidative Stress?. *Metabolism*. 2000; 49(2): 3-8.

Bonvallot V, Squiban AB, Baulig A, Brulant S, Boland S, Muzeau F, Barouki R, Marano F. Organic Compounds from Diesel Exhaust Particles Elicit a Proinflammatory Response in Human Airway Epithelial Cells and Induce Cytochrome p450 1A1 Expression.. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2001; 25: 515–521.

Buckwalter JA. Spine update: Aging and Degeneration of the Human Intervertebral Disc. *Spine*. 1995; 20(11): 1307-1314.

Blander G, Guarente L. The Sir2 family of Protein Deacetylases. *Annu Rev Biochem*. 2004; (73):417-435.

Braga ALF, Zanobetti A, Schwartz J. Do respiratory epidemics confound the association between air pollution and daily deaths?. *Eur Respir J*. 2000; 6: 723-728.

Brasil Leis. Estatuto do Idoso. Lei nº 10.741 de 1 de outubro de 2003- Diário Oficial da União de 03/10/2003. Acesso em: 25-09-2013. Disponível em: <http://www010.dataprev.gov.br/sislex/paginas/42/2003/10741.htm>.

Brasil Presidência da República. Ministério do Meio Ambiente. CONAMA. Resolução CONAMA 03/1990, de 28 de junho de 1990. Dispõe sobre padrões de qualidade do ar, previstos no PRONAR. Brasília (DF) 1990 22 ago., Seção 1:15937- 15939.

Braun S, Appel LG, Schmal M. A poluição gerada por máquinas de combustão interna movidas a diesel – A questão dos particulados. Estratégias atuais para a redução e controle das emissões e tendências futuras. *Quim Nova*. 2003; 3(27):472-482.

Brenner D, Blaser H, Mak TW. Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nature Reviews/Immunology*. 2015;15: 362-374.

Brito JM. Avaliação da exposição aguda às partículas urbanas concentradas e da exaustão de motores diesel e biodiesel sobre o perfil inflamatório pulmonar e sistêmico de camundongos [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2014.

Brook RD, Franklin B, Cascio W, Hong Y, Howard G, Lipsett M et al. Air pollution and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association. *Circulation*. 2004; 109: 2655-71.

Brook, R.D. Cardiovascular effects of air pollution. *Clinical Science*. 2008; 115: 175-187.

Brooks CL, Gu W. How does SIRT1 affect metabolism, senescence and cancer. *Nature Reviews | Cancer*. 2009; 9:123-08.

Brown WW, Abrass IB and Oreopoulos DG. Introduction: aging and the kidney. *Advances in renal replacement therapy*. 2000; 7:1-3.

Brugge D, Lane KJ, Stewart A, Tai AK, Woodin M. Highway proximity associations with blood markers of inflammation: evidence for a role for IL-1 β . *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*. 2013; 76: 201–05.

Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY, Hu LS, Cheng HL, Jedrychowski MP, Gygi SP, Sinclair DA, Frederick WA, Greenberg ME. Stress-Dependent Regulation of FOXO Transcription Factors by the SIRT1 Deacetylase. *Science*. 2004; 303(26): 2011-15.

Byeong GK, Pureun HL, Shin HL, Young EK, Mee YS, Yena K, Seong HB, Min JK, Tai YR, Choon SP, An SJ. Long-Term Effects of Diesel Exhaust Particles on Airways Inflammation and Remodeling in a mouse model. *Allergy Asthma Immunol Res* 2016; 8(3): 246-56.

Cançado JDF, Braga A, Pereira LAA, Arbex MA, Saldiva PHN, Santos UP. Repercussões clínicas da exposição à poluição atmosférica. *J BrasPneumol*. 2006; 32(1): 5-11.

Cantó C, Auwerx J. Caloric Restriction, Sirt1 and Longevity. *Trends Endocrinol Metab*. 2009; 20: 325-330.

Castro HA. O pulmão e o ambiente: os poluentes do ar e seus efeitos no aparelho respiratório. *J BrasPneumol*. 2001;1:3-9.

CETESB. Relatório Emissões veiculares no estado de São Paulo 2013. [2013]. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/ar/emissao-veicular/48-relatorios-e-publicacoes>. Acessado em: 06/06/2015.

CETESB. Relatório Qualidade do Ar Na Cidade no estado de São Paulo. [2014]. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/ar/relatorios/relatorio-ar-2014.pdf>. Acessado em: 06/06/2015.

CETESB. Qualidade do Ar Histórico. [2015a]. Disponível em: <http://ar.cetesb.sp.gov.br/>. Acessado: 02/06/2015.

CETESB. Emissões Veiculares. Histórico. [2015b]. Disponível em: <http://veicular.cetesb.sp.gov.br/>. Acessado: 02/06/2015.

Cesari M, Vellas B, Gambassi G. The stress of aging. *Experimental Gerontology*. 2013; 48(4): 451-456.

Comhair SAA, Erzurum SC. The Regulation and Role of Extracellular Glutathione Peroxidase. *Antioxidants & Redox Signaling* 2005; 7(1): 72-79.

Chang AB, Widdicombe JG. Cough throughout life: Children, adults and the senile. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*. 2007; 20:371–82.

Chaudhuri N, Paiva C, Donaldson K, Duffin R, Parker LC, Sabroe I. Diesel exhaust particles override natural injury-limiting pathways in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2010; 299(2): 263-71.

Chen D, Steele AD, Lindquist S, Guarente L: Increase in activity during calorie restriction requires SirT1. *Science*. 2005: 310(5754):1641.

Churg A, Brauer M, Avila-Casado MC, Fortoul TI, Wright JL. Chronic Exposure to High Levels of Particulate Air Pollution and Small Airway Remodeling. *Environmental Health Perspectives*. 2003; 111: 714-18.

Csiszar A, Wang M, Lakatta EG, Ungvari Z. Inflammation and endothelial dysfunction during aging. *J Appl Physiol*. 2008; 105(4):1333-41.

Danielsen PH, Risom L, Wallin H, Autrup H, Vogel U, Loft S, Moller P. DNA damage in rats after a single oral exposure to diesel exhaust particles. *Mutation Research*. 2008; 637:49-55.

Day BJ. Catalase and glutathione peroxidase mimics. *Biochemical Pharmacology*. 2009; 77:285-296.

D'Amato G, Cecchi L, D'Amato M, Liccardi G. Urban air pollution and climate change as environmental risk factors of respiratory allergy: an update. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2010; 20(2): 95-102.

DENATRAN. Radar SEADE. A Frota de veículos no Estado de São Paulo 2014. 4; 2015. Disponível em: http://www.seade.gov.br/produtos/midia/radar/radar_seade_n4.pdf. Acessado em: 15/11/2016.

Diaz-Sanchez D, Tsien A, Fleming J, Saxon A. Combined diesel exhaust particulate and ragweed allergen challenge markedly enhances human in vivo nasal ragweed-specific IgE and skews cytokine production to a T helper cell 2-type pattern. *J Immunol*. 1997; 158(5):2406-13.

Dockery DW. Health Effects of Particulate Air Pollution. *Annals of Epidemiology*. 2009; 19:257-263.

Environmental Protection Agency. EPA. Particulate Matter (PM) Basic Information. [2015]. Disponível em: <http://www.epa.gov/airquality/particlepollution/basic.html>. Acesso em: 11/06/2015.

Espinoza SE, Guo H, Fedarko N, DeZern A, Fried LP, Xue QL, Leng S, Beamer B, Walston JD. Glutathione peroxidase enzyme activity in aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2008; 63(5):505-9.

Emmerechts J, Vooght V, Haenen S, Loyen S, Kerckhoven SV; Hemmeryckx B, Vanoirbeek; JAJ, Hoet PH, Ben Nemery B, HoylaertsMF. Thrombogenic changes in young and old mice upon subchronic exposure to air pollution in an urban roadside tunnel. *Thrombosis and Haemostasis*. 2012; 108: 75-768.

Fernandes CR, Neto PPR. The Respiratory System and the Elderly: Anesthetic Implications. *Rev Bras Anesthesiol* 2002; 52(4): 461 – 70.

Filleul L, Tertre AI, Baldi I, Tessier JF. Difference in the relation between daily mortality and air pollution among elderly and all-ages populations in the south western France. *Environ Res*. 2004; 94:249-253.

Finkel T, Deng CX, Mostoslavsky R. Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature*. 2009; 460(7255):587-91.

Fujimaki H, Saneyoshi K, Nohara O, Shiraishi F, Imai T. Intranasal instillation of diesel exhaust particulates and antigen in mice modulated cytokine productions in cervical lymph node cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 1995; 108(3):268-73.

Franceschi C, Capri M, Monti D, Giunta S, Olivieri F, Sevini F, Panourgia MP, Invidia L, Celani L, Scurti M, Cevenini E, Castellani GC, Salvioli S. Inflammaging and anti-inflammaging: A systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2007; 128:92–105.

Franceschi C, Garagnani P, Vitale G, Capri M, Salvioli S. Inflammaging and Inflammaging and 'Garb-aging'. *Trends Endocrinol Metab* 2016; 24(16):30125-4.

Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, De Benedictis G. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci*. 2000; 908:244-54.

Glasscock RJ & Rule AD. The implications of anatomical and functional changes of the aging kidney: with an emphasis on the glomeruli. *Kidney Int*. 2012; 82:270-77.

Guo YFF, Herrmann FJP, Michel JP, Janssens JP. Normal values for respiratory resistance using forced oscillation in subjects >65 years old. *Eur Respir J*. 2005; 26:602–608.

Gündüz F, Sentürk UK, Kuru O, Aktekin B, Aktekin MR. The effect of one year's swimming exercise on oxidant stress and antioxidant capacity in aged rats. *Physiol Res* 2004; 53(2):171-6.

Haigis MC, Sinclair DA. Mammalian Situations: Biological Insights and Disease Relevance. *Annu Rev Pathol*. 2010; 5: 253-295.

Harlan Laboratories. C57BL/6. [2015]. Disponível em: <http://guide.labanimal.com/supplier/harlan-laboratories-inc>. Acessado 17/08/2015.

Halliwell B, Gutteridge J. Free radicals in biology and medicine. Nova York: Oxford University Press. 2007; 4138-42.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1989. Free Radicals in Biology and Medicine. Clarendon Press, Oxford.

Han L, Zhou R, Niu J, McNutt MA, Wang P, Tong T. Sirt1 is regulated by a PPAR γ -Sirt1 negative feedback loop associated with senescence. *Nucleic Acids Res*. 2010; 38(21):7458-7471.

Happo MS, Hirvonen MR, Halinen AI, Jalava PIAS, Pennanen M, Sillanpaa R. Seasonal variation in chemical composition of size-segregated urban air particles and the inflammatory activity in the mouse lung. *Inhal Toxicol*. 2010; 22(1): 17-32.

Hasegawa K. Sirt1 protects against oxidative stress-induced renal tubular cell apoptosis by the bidirectional regulation of catalase expression. *Biochem.Biophys. Res.Communic.* 2008; 372: 51–56.

Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; 45:51-88.

Helenius M, Hänninem M, Lehtinem SK, Salminen A. Changes associated with aging and replicative senescence in the regulation of transcription factor nuclear factor- κ B. *Biochem.J.* 1996; 318: 603-08.

Hirai T, Hosokawa M, Kawakami K, Takubo Y, Sakai N, Oku Y, Chin K, Ohi M, Higuchi K, Kuno K. Age-related changes in the static and dynamic mechanical properties of mouse lungs. *Respir Physiol*. 1995; 102:195-203.

Holder AL, Lucas D, Goth-Goldstein R, Koshland CP. Inflammatory response of lung cells exposed to whole, filtered, and hydrocarbon denuded diesel exhaust. *Chemosphere*. 2007; 70(1):13-9.

Horn MA. Cardiac Physiology of Aging: Extracellular Considerations. *Compr Physiol*. 2015. 1; 5(3):1069-121.

Houtmeyers E, Gosselink R, Ramirez GG, Decramer M. Regulation of mucociliary clearance in health and disease. *Eur Respir J*. 1999; 13: 1177-88.

Hsia CC, Hyde DM, Ochs M, Weibel ER. An official research policy statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: standards for quantitative assessment of lung structure. *American Journal of respiratory and Critical Care medicine*. 2010; 181(4): 394-418.

Hsu CP, Zhai P, Yamamoto T, Maejima Y, Matsushima S, Hariharan N, Shao D, Takagi H, Oka S, Sadoshima J. Silent information regulator 1 protects the heart from ischemia/reperfusion. *Circulation* 2010; 122: 2170–2182.

Huang K, Rabold R, Schofield B, Mitzner W, Tankersley and CG. Age-dependent changes of airway and lung parenchyma in C57BL/6 mice. *J. Appl. Physiol*. 2007. 102; 200-06.

Hueiwang Anna Jeng. Chemical composition of ambient particulate matter and redox activity. *Environ Monit Assess*. 2010; 169:597–606.

IBGE. Perfil dos Idosos Responsáveis pelos Domicílios. 2013. [2015]. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/25072002pidoso.shtm>. Acessado em: 16/08/2015.

Irwin H. Rosenberg. Sarcopenia: Origins and Clinical Relevance. *Clin Geriatr Med*. 2011; 27:337–339.

Janssens JP, Pache JC, Nicod LP. Physiological changes in respiratory function associated with ageing. *Eur Respir J*. 1999; 13:197-05.

Jackson Laboratory. Life span as a biomarker. [2015]. Disponível em: <https://www.jax.org/research-and-faculty/research-labs/the-harrison-lab/gerontology/life-span-as-a-biomarker>. Acessado 17/08/2015.

Karthikeyan S, Thomson EM, Kumarathan P, Guénette J, Rosenblatt D, Chan T, Rideout G, Vincent R. Nitrogen dioxide and ultrafine particles dominate the biological effects of inhaled diesel exhaust treated by a catalyzed diesel particulate filter. *Toxicol Sci*. 2013; 135(2):437-50.

Kelly FJ, Dunster C, Mudway I. Air pollution and the elderly: oxidant/antioxidant issues worth consideration. *Eur Respir J*. 2003; 21(40): 70–75.

Kelly G. A review of the sirtuin system, its clinical implications, and the potential role of dietary activators like resveratrol: part 1. *Altern Med Rev*. 2010; 15(3): 245-63.

Kirkham P, Rahman I. Oxidative stress in asthma and COPD: Antioxidants as a therapeutic strategy. *Pharmacology & Therapeutics*. 2006; 111:476-94.

Kinnula VL, Crapo JD, Raivio KO. Biology of disease: generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung. *Lab. Invest* 1957; 3: 3–19.

Kovacs EJ, Grabowski KA, Duffner LA, Plackett TP, Gregory MS. Survival and cell consequences for immunity after vurn injury in aged mice. *J Am Agin Assoc*. 2002; 25(1):3-9.

Kurozumi M, Matsushita T, Hosokawa M, Takeda T. Age-related Changes in Lung Structure and Function in the Senescence-accelerated Mouse (SAM): SAM-P/I as

a New Murine Model of Senile Hyperinflation of Lung. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994; 149: 776-782.

Kwon Y, Kim Jongsik, Lee CY, Kim H. Expression of SIRT1 and SIRT3 varies according to age in mice. *Anat Cell Biol*. 2015; 48(1):54-61.

Lalley PM. The aging respiratory system – Pulmonary structure, function and neuronal control. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. 2013; 187:199-210.

Langley E, Pearso M, Faretta M, Bauer UM, Frye RA, Minucci S, Pelicci PG, Kouzarides T: Human SIRT2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53- induced cellular senescence. *Embo J*. 2002; 21: 2383-96.

Lepeule J, Litonjua AA, Coull B, Koutrakis P, Sparrow D, Vokonas PS, Schwartz J. Long-Term Effects of Traffic Particles on Lung Function Decline in the Elderly. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2014; 190(5): 542-48.

Lim CS. SIRT1: Tumor promoter or tumor suppressor? *Med Hypotheses*. 2006; 67:341-344.

Limin HH, Zhou R, JingNiu, Michael A, McNutt, an Wang P, Tong T. SIRT1 Is regulated by a PPAR γ -SIRT1 negative feedback loop associated with senescence. *Nucleic Acids. Research*. 2010; 38(21): 7458-71.

Liu T, Liu PY, Marshall GM. The critical role the class III histone deacetylase SIRT1 in cancer. *Cancer Res*. 2009; 69:1702-1702.

Lowery EM, Brubaker AL, Kuhlmann E, Kovacs EJ. The aging lung. *Clinical Interventions in Aging*. 2013; 8:1489-96.

Matsuzaki T, Amakawa K, Yamaguchi K, Ishizaka A, Terashima T, Matsumaru A, Morishita T. Effects of diesel exhaust particles on human activation. *Exp. Lung Res*. 2006; 32:427-439.

Meyer KC. Aging. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2005; 2:433-39.

Michan Shaday & Sinclair David. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J*. 2007; 404(1): 1-13.

Miller MR. Structural and physiological age-associated changes in aging lungs. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* . 2010; 31(5):521-27.

Miller RA, Nadon NL. Principles of animal use for gerontological research. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2000; 55(3):117-23.

Morris BJ. Seven sirtuins for seven deadly diseases of aging. *Free Radical Biol. Med*. 2013; 56: 133-171.

Mudway IS, Stenfors N, Duggan ST, Roxborough H, Zielinski H, Marklund SL, Blomberg A, Frew AJ, Sandstrom T, Kelly FJ. An in vitro and in vivo investigation of the effects of diesel exhaust on human airway lining fluid antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2004; 423:200-12.

Nasrin N, Kaushik VK, Fortier E, Wall D, Pearson KJ, de Cabo R, Bordone L. JNK1 phosphorylates SIRT1 and promotes its enzymatic activity. *PLoS One*. 2009; 4:8414.

Nemmar A, Hoet PH, Dinsdale D, Vermylen J, Hoylaerts MF, Nemery B. Diesel exhaust particles in lung acutely enhance experimental peripheral thrombosis. *Circulation*. 2003; 107:1202–08.

Nicolletti ALC. Efeitos dos ácidos anacárdicos no sistema respiratório de camundongos submetidos à instilação intranasal de partículas resultantes da combustão de diesel [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2011.

Nikasinovic L, Momas I, Just J. A Review of Experimental Studies on Diesel Exhaust Particles and Nasal Epithelium Alterations. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*. 2004; (7):81–104.

Nightingale JA, Maggs R, Cullinan P, Donnelly LE, Rogers DF, Kinnersley R, Chung KF, Barnes PJ, Ashmore M, Taylor AN. Airway Inflammation after Controlled Exposure to Diesel Exhaust Particulates. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 162:161–66.

Oeder S, Kanashova T, Sippula O, Sapcariu SC, Streibel T, Arteaga-Salas JM. Particulate Matter from Both Heavy Fuel Oil and Diesel Fuel Shipping Emissions Show Strong Biological Effects on Human Lung Cells at Realistic and Comparable In Vitro Exposure Conditions. *PLoS ONE*. 2015; 10(6):1-17.

OPAS. Envelhecimento Ativo: uma política de saúde; 2005. [2015]. [Disponível em: http://www.prosaude.org/publicacoes/diversos/envelhecimento_ativo.pdf. Acessado em: 06/10/2015.

Park EJ, Roh J, Kim Y, Park K, Kim DS, Yu SD. PM 2.5 collected in a residential area induced Th1-type inflammatory responses with oxidative stress in mice. *Environmental Research*.2011; 111:348–355.

Palmieri GM. Hypertension in old age. *PR Health Sci J*.1995; 14(3): 217-21.

Pan H, Guan D, Liu X, Li J, Wang L, Wu J, Zhou J, Zhang W, Ren R, Zhang W, Li Y, Yang J, Hao Y, Yuan T, Yuan G, Wang H, Ju Z, Mao Z, Li J, Qu J, Tang F, Liu GH. Sirt6 safeguards human mesenchymal stem cells from oxidative stress by coactivating NRF2. *Cell Res* 2016; 26(2):190-205.

Pinkerton KE & Green FHY. in Ch 15. *The Lung: Development, Aging and the Environment*. Second Edition. Edited by Richard Harding and Kent E.Pinkerton. 2004. p.213-233.

Pinkerton KE, Green FH, Saiki C, Vallyathan V, Plopper CG, Gopal V, Hung D, Bahne EB, Lin SS, Ménache MG, Schenker MB. Distribution of particulate matter and tissue remodeling in the human lung. *Environ Health Perspect*. 2000; 108(11): 1063–69.

Pirkkala L, Nykänen P, Sistonen L. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J*. 2001; 15(7):1118-31.

Pope CA. Epidemiology of fine particulate air pollution and human health: biologic mechanism and Who's at risk? *Environ Health Perspect*. 2000; 108(4): 713:23.

Pope CA III, Dockery DW. Health effects of fine particulate air pollution: lines that connect. *J. Air Waste Manage. Assoc*. 2006; 56:709–42.

Purushotham A, Schug TT, Xu Q, Surapureddi S, Guo X, Li X: Hepatocyte-Specific Deletion of Sirt1 Alters Fatty Acid Metabolism and Results in Hepatic Steatosis and inflammation. *Cell Metabolim*.2009; 9:327-338.

Quan C, Sun Q, Lippmann M, Chen LC. Comparative effects of inhaled diesel exhaust and ambient fine particles on inflammation, atherosclerosis, and vascular dysfunction. *Inhal Toxicol*. 2010; 22(9): 738–53.

Rahman S, Islan R. Mammalian Sirt1: insights on its biological functions. *Cell Communication and Signaling*. 2011; 9:11-18.

Rahman I, Biswas SK, Kode A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *European Journal of Pharmacology*. 2006; (533):222-39.

Riedl M, Sanchez DD. Biology of diesel exhaust effects on respiratory function. *J Allergy Clin Immunol*. 2005; 8:115-221.

Ristovskil ZR, Branka Miljevic, Nicholas C. Surawski, Lidia Morawska, Kwun M. Fong, Felicia Goh and Ian A. Yang. Respiratory health effects of diesel particulate matter. *Respirology*. 2012; 17: 201–12.

Robertson S, Gray GA, Duffin R, McLean SG, Shaw CA, Hadoke PW, Newby DE, Miller MR. Diesel exhaust particulate induces pulmonary and systemic inflammation in rats without impairing endothelial function ex vivo or in vivo. *Part Fibre Toxicol*. 2012; 5:2-13.

Ruivo S, Viana P, Martins C, Baeta C. Effects of aging on lung function. A comparison of lung function in healthy adults and the elderly. *Rev Port Pneu*. 2009; 15:629-653.

Sacks JD, Stanek LW, Luben TJ, Johns DO, Buckley BJ, Brown JS, Ross M. Diesel matter-induced health effects: who is susceptible? *Environ Health Perspect*. 2011; 119(4):446–454.

Sharma G, Goodwin J. Effect of aging on respiratory system physiology and immunology. *Clinical Interventions in Aging*. 2006; 1(3): 253-60.

Sakamoto J, Miura T, Shimamoto K, Horio Y. Predominant expression of Sir2a, a NAD-dependent histone deacetylase, in the embryonic mouse heart and brain. *FEBS Lett*. 2004; 556:281-86.

Saldiva PHN, Pope CA, 3rd, Schwartz J et al. Air pollution and mortality in elderly people: a time series study in São Paulo, Brazil. *Archives of Environmental Health*. 1995; 50:159-163.

Saldiva PHN, et al., 2013. ISS. Avaliação do impacto da poluição atmosférica no Estado de São Paulo sob a visão da saúde. Setembro de 2013. [2015] .Disponível http://www.saudeesustentabilidade.org.br/site/wpcontent/uploads/2013/09/Documentofinaldapesquisapadrao_2409-FINAL-sitev1.pdf. Acessado em: 06/06/2015.

Salminen, A.; Kauppinen, A.; Suuronen, T.; Kaarniranta, K. Sirt1 longevity factor suppresses NF- κ B- driven immune responses: Regulation of aging via NF- κ B acetylation? *BioEssays*. 2008; 30: 939-942.

Salminen A, Hyttinen JMT, Kaarniranta K. AMP-activated protein Kinase inhibits NF- κ B signaling and inflammation: Impact on healthspan and lifespan. *J.Mol Med*. 2011; .89: 668-676.

Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. Crosstalk between Oxidative Stress and SIRT1: Impact on the Aging Process. *Int J Mol Sci.* 2013; 14: 3834-59.

Salvi S, Blomberg A, Rudell B, Kelly F, Sandstrom T, Hogate ST, Frew A. Acute inflammatory responses in the airways and peripheral blood after short-term exposure to diesel exhaust in healthy human volunteers. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 159: 702-709.

Saraiva Margarida and Garra Anne O'. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Reviews Immunology.* 2010; 10:171-81.

Seagrave JC, McDonald JD, Reed MD, Seikop SK, Mauderly JL. Responses to Subchronic Inhalation of Low Concentrations of Diesel Exhaust and Hardwood Smoke Measured in rat Bronchoalveolar Lavage Fluid. *Inhalation Toxicology.* 2005; 17: 657-70.

Sunil VR, Patel KJ, Mainelis G, Turpin BJ, Ridgely S, Laumbach RJ, Kipen HM, Nazarenko Y, Veleparambil M, Gow AJ, Laskin JD, Laskin DL. Pulmonary effects of inhaled diesel exhaust in aged mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009; 241(3):283-93.

Schug TT, Ku Q, Gao H, Peres da Silva A, Draper DW, Fessler MB, Purushotham A, Li X. Myeloid deletion of SIRT1 induces inflammatory signaling in response to environmental stress. *Mol Cell Biol.* 2010; 30:4712-21.

Slezakova K, Fonseca J, Morais S, Pereira MC. Ultrafine Particles in Ambient air of an Urban Area: Dose Implications for Elderly. *Journal of Toxicology and Environmental Health.* 2014; 77:827–836.

Smargiassi A, Berrada K, Fortier I, Kosatsky T. Traffic intensity, dwelling value, and hospital admissions for respiratory disease among the elderly in Montreal (Canada): a case-control analysis. *J Epidemiol Community Health* 2006; 60:507–12.

Sehlstedt M, Forsberg B, Westerholm R. The role of particle size and chemical composition for health risks of exposure to traffic related aerosols—a review of the current literature. *Final report.* 2007; 1–85.

Sigman, Richard, Hilderink H, Delrue N, Braathen NA, Leflaive X. Health and Environment in OECD, OECD Environmental Outlook to 2050: The Consequences of Inaction, OECD Publishing. 2012. Disponível em: [http:](http://)

www.keepeek.com/Digital-Asset-Management/oecd/environment/oecd-environmental-outlook-to-2050/health-and-environment_env_outlook-2012-9-en#page3. Acessado em: 06/06/2015.

Straub RH, Miller LE, Schölmerich J, Zietz B. Cytokines and hormones as possible links between endocrinosenescence and immunosenescence. *J Neuro immunol*. 2000; 109 (1): 10-5.

Stohs SJ, Lawson T, Al-Turk WA. Changes in glutathione and glutathione metabolizing enzymes in erythrocytes and lymphocytes of mice as a function of age. *Gen Pharmacol* 1984; 15(3): 267-70.

Sydbom A, Blomberg A, Parnia S, Stendors N, Sandstrom T, Dahlén SE. Health effects of diesel exhaust emissions. *Eur Respir J*. 2001; 17:733-746.

Tao F, Flecha BG, and Kobzik L. Reactive oxygen species in Pulmonary Inflammation by Ambient Particulates. *Free Radical Biology & Medicine*. 2003; 35(4): 327–340.

Tarnawski AS, Ahluwalia A, Jones MK. Increased susceptibility of aging gastric mucosa to injury: The mechanisms and clinical implications. *World J Gastroenterol* 2014; 20(16):4467-82.

Tennen RI, Chua KF. Chromatin regulation and genome maintenance by mammalian SIRT6. *Trends Biochem Sci* 2011;36(1):39-46.

Thomaz de Carvalho Filho Eurico, Papaléo Netto Matheus. *Geriatrics Fundamentos, Clínica e Terapêutica*. 2 ed., Atheneu. São Paulo. 2005. Cap I; 3-18: Biologia e Teorias do Envelhecimento.

UNFPA. UNFPA and help Age International-Ageing in the Twenty-First Century: A Celebration and A Challenge; 2012. [2015]. Disponível em: <http://www.unfpa.org/public/op/edit/home/publications/pid/11584>. Acessado em: 16/10/2015.

Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol*. 2009; 27:693-733.

Vyskočilová E, Szotáková B, Skálová L, Bártíková H, Hlaváčová J, Boušová I. Age-Related Changes in Hepatic Activity and Expression of Detoxification Enzymes in Male Rats. *Biomed Res Int* 2013; 22: 408-573.

Wang L, Green FHY, Jewell SMS, PinKerton KE. Susceptibility of the Agin Lung to Environmental Injury. *Semin Respir Crit Care Med*. 2010; 31(5): 539-533.

Weldy CS, Luttrell IP, White CC, Stevenson VM, Cox DP, Carosino CM, Larson TV, Stewart JA, Kaufman JD, Kim F, Chitaley K, Kavanagh T J. Glutathione (GSH) and the GSH synthesis gene *Gclm* modulate plasma redox and vascular responses to acute diesel exhaust inhalation in mice. *Inhal Toxicol*. 2013; 25(8): 2-21.

Westerheide SD, Anckar J, Stevens SM J, Sistonen L, Morimoto RI. Stress-Inducible Regulation of Heat Shock Factor 1 by the Deacetylase SIRT1. *Science*. 2009; 323(5917): 1063–1066.

Williams AE, José RJ, Brown JS, Chambers RC. Enhanced inflammation in aged mice following infection with *Streptococcus pneumoniae* is associated with decreased IL-10 and augmented chemokine production. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015; 308(6):539-49.

Wu W, Peden DB, McConnell R, Fruin S, Sanchez DD. Glutathione-S- transferase M1 regulation of diesel exhaust particle-induced pro-inflammatory mediator expression in normal human bronchial epithelial cells. *Particle and Fibre Toxicology*. 2012; 9(31):1-10.

Wu Z, Liu MC, Liang M, Fu J. Sirt1 protects against thrombomodulin down-regulation and lung coagulation after particulate matter exposure. *The American Society of Hematology*. 2012b; 119(10): 2422-2429.

WHO. 7 million premature deaths annually linked to air pollution. [2015]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/air-pollution/en/>. Acessado em : 02/06/2015.

WHO. Air Quality Guidelines for particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide. Sumary of risk assessment. Global update 2005, Copenhagen: WHO, 2006. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/69477/1/WHO_SDE_PHE_OEH_06.02_eng.pdf.

Xiao GG, Wang M, Li N, Loo JA, Nel AE. Use of Proteomics to Demonstrate a Hierarchical Oxidative Stress Response to Diesel Exhaust Particle Chemicals in a Macrophage Cell Line. *The J Biol Chem*. 2003; 278(50): 50781-50790.

Xu Y, Barregard L, Nielsen J, Gudmundsson A, Wierzbicka A, Axmon A, Jönsson BA, Kåredal M, Albin M. Effects of diesel exposure on lung function and inflammation biomarkers from airway and peripheral blood of healthy volunteers in a chamber study. *Particle and Fibre Toxicology* 2013; 10(60):1-9.

Yanagi Y, Assunção JV, Barrozo LV. The impact of atmospheric particulate matter on cancer incidence and mortality in the city of São Paulo, Brazil. *Cad Saude Publica*. 2012; 28(9):1737- 48.

Yamamoto T, Sadoshima J. Protection of the heart against ischemia/reperfusion by silent information regulator 1. *Trends Cardiovasc Med*. 2011; 21: 27-32.

Yang SR, Wright J, Bauter M, Seweryniak K, Kode A, Rahman I. Sirtuin regulates cigarette smoke-induced proinflammatory mediator release via RelA/p65 NF-kappaB in macrophages in vitro and in rat lungs in vivo: implications for chronic inflammation and aging. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007; 292: 567–76.

Yao H, Chung S, Hwang JW, Rajendrasozhan S, Sundar IK, Dean DA, McBurney MW, Guarente L, Gu W, Rönty M, Kinnula VL, Rahman I. SIRT1 protects against emphysema via FOXO3-mediated reduction of premature senescence in mice. *The Journal of Clinical Investigation*. 2012; 122(6): 2032-2045.

Yao H, Hwang JW, Sundar IK, Friedman AE, McBurney MW, Guarente L, Gu W, Kinnula VL, Rahman I. SIRT1 redresses the imbalance of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-9 in the development of mouse emphysema and human COPD. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2013; 305:615-624.

Yao H, Sundar IK, Ahmad T, Lerner C, Gerloff J, Friedman AE, Phipps RP, Sime PJ, McBurney MW, Guarente L, Rahman I. SIRT1 protects against cigarette smoke-induced lung oxidative stress via a FOXO3-dependent mechanism. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014; 306:816-828.

Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA, Mayo MW. Modulation of NF-kB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *The Embo Journal*. 2004; 23:2369-80.

Yoshizaki K¹, Brito JM, Toledo AC, Nakagawa NK, Piccin VS, Junqueira MS, Negri EM, Carvalho AL, Oliveira AP, Lima WT, Saldiva PH, Mauad T, Macchione M. Subchronic effects of nasally instilled diesel exhaust particulates on the nasal and airway epithelia in mice. *Inhal Toxicol*. 2010; 22(7):610-7.

Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Rad Biol Med.* 2002; 33(3):337-49.