

Gabriel Ribeiro Júnior

**Efeitos do resveratrol no pulmão de camundongos
idosos expostos à exaustão do motor a diesel**

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

Programa de Patologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Thais Mauad

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP).

**São Paulo
2023**

Gabriel Ribeiro Júnior

**Efeitos do resveratrol no pulmão de camundongos
idosos expostos à exaustão do motor a diesel**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências.

Programa de Patologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Thais Mauad

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP).

**São Paulo
2023**

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
Efeitos do resveratrol no pulmão de camundongos
idosos expostos à exaustão do motor a diesel /
Gabriel Ribeiro Júnior. -- São Paulo, 2023.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Patologia.
Orientadora: Thais Mauad.

Descritores: 1.Poluição do ar 2.Emissões de
veículos 3.Diesel 4.Pulmão senil 5.Resveratrol 6.
Sirtuínas.

USP/FM/DBD-114/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar aos meus pais, Gabriel e Maria Aparecida, pelo exemplo de integridade e por serem meus primeiros professores da vida. Aos meus irmãos, Ângelo e Sheila pelo carinho e incentivos! Aos meus amados sobrinhos, afilhado Raphael; Adele e Joaquim (“cacaliça”).

Meus sinceros agradecimentos à minha orientadora, Dra. Thais Mauad, pelas inúmeras oportunidades, exemplo de conduta profissional, pelas orientações profissionais e sempre humanas, pela confiança por todos esses anos. Obrigado pela paciência e pela maestria no direcionamento desse projeto a senhora foi essencial na minha formação profissional. Aprendi muito com a senhora!

Aos amigos de sempre, Natália; obrigado pelo exemplo de profissionalismo, competência e dedicação, você contribuiu muito para a minha formação. Obrigado pela amizade, pelos conselhos, pela presença e disponibilidade em todos os momentos! E foram muitos! Muito obrigado por sua amizade!

Ao amigo Luciano pela amizade de sempre, pela prontidão no auxílio e pelos conselhos, mas principalmente pela amizade. A minha amiga Adair, pelas conversas, conselhos, desabafos e pelo carinho de sempre. Meus amigos, muito obrigado!

Agradeço imensamente ao Thiago, funcionário da pós-graduação do programa de Patologia pelas orientações, esforços e comprometimento. A todos do laboratório de histopatologia do departamento de patologia, em nome da Kely

Soares, gratidão pela competência, disponibilidade, ensinamentos, acolhimento, mas principalmente amizade de vocês!

Agradeço o laboratório de imuno-histoquímica do departamento de patologia, em nome de Ângela Batista Gomes dos Santos e todos os funcionários que contribuíram na realização deste projeto. Estendo meus agradecimentos ao Reginaldo e Carlos pela prontidão e cuidados na digitalização das lâminas de histologia.

Agradeço ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas de Farmácia da USP, em nome da Professora Dra. Tania Marcourakis e a Stephanie Oliveira Duro pelas análises espectrofotometria.

Agradeço ao Laboratório LIM 60 - Departamento de Medicina Clínica, ao professor Dr. Esper Georges Kallás, Susan Pereira Ribeiro e Priscilla Ramos Costa pelas análises de citometria de fluxo.

Meus agradecimentos para todos que de alguma forma contribuíram para esse trabalho!

EPÍGRAFE

*“A menos que modifiquemos à nossa maneira de pensar,
não seremos capazes de resolver os problemas causados
pela forma como nos acostumamos a ver o mundo.”*

Albert Einstein

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

Referências: adaptado de International 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, Marialva 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 e siglas

Lista de figuras

Lista de gráficos

Lista de tabelas

Lista de símbolos

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1. Poluição atmosférica	23
2.2. Idosos e Poluição Atmosférica	26
2.3. Resveratrol	29
2.4. Sirtuínas	35
3. OBJETIVOS	38
3.1. Objetivos específicos	38
4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1. Aprovação de Ética	39
4.2. Delineamento experimental	39
4.3. Desenho experimental	40

4.4. Resveratrol utilizado no estudo	41
4.5. Sistema de Exposição Gerador de aerossol da queima do combustível diesel	43
4.5.1. Caracterização da Exposição	45
4.6. Coleta do Material Biológico	45
4.6.1. Pulmões	45
4.6.2. Análise do Sangue	46
4.6.3. Demais órgãos	46
4.6.4. Análises do Lavado Broncoalveolar (LBA)	46
4.7. Análise do estresse oxidativo	49
4.7.1. Atividade de glutathione peroxidase (GPx).....	49
4.7.2. Atividade de glutathione reductase (GR)	51
4.7.3. Atividade de glutathione S-transferase (GST)	52
4.7.4. Atividade da Cu/ZnSOD	53
4.8. Análise de colágeno e fibras elásticas no parênquima pulmonar e nas vias aéreas	55
4.9. Análise Imuno-histoquímica (IHQ)	56
4.10. Análise Estatística	58
5. RESULTADOS	60
5.1. Análise das propriedades físico-química do combustível diesel	60
5.2. Análise dos parâmetros monitorados em tempo real durante as exposições	62

5.3. Análises peso corpóreo, perfil inflamatório celular no LBA e MAC2 tecidual	65
5.4. Análises da quantificação das citocinas no soro e LBA	67
5.5. Análises das atividades enzimáticas antioxidantes	70
5.6. Análises morfológicas e remodelamento pulmonar	72
5.7. Histopatológico	73
5.8. Análises da expressão proteica das sirtuínas no parênquima pulmonar.....	74
6. DISCUSSÃO	78
7. CONCLUSÃO	82
8. ANEXOS	83
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

Lista de abreviaturas e siglas

OMS - Organização Mundial de Saúde

MP - material particulado

Sirt1 – sirtuina 1

Sirt2 – sirtuina 2

Sirt6 – sirtuina 6

DE – exaustão de diesel

Cetesb - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

Proconve - Programa de Controle da Poluição do Ar por Veículos Automotores

PM_{2.5} – material particulado 2.5 micrômetros ou menos diâmetro

NO₂ – dióxido de nitrogênio

NO – monóxido de nitrogênio

NO_x - óxidos de nitrogênio

CVF - capacidade vital forçada

FEV1 - volume expiratório no primeiro segundo

C57BL/6 – camundongos C57BL/6

AFVEI – ar filtrado + veículo

AFRSV - ar filtrado + resveratrol

DVEI - diesel + veículo

DRSV - diesel + resveratrol

LBA – lavado bronco alveolar

IL-1 β – interleucina 1 beta

IL-2 – interleucina 2

IL-5 – interleucina 5

IL-6 – interleucina 6

IL-8 - interleucina 8

IL-10 – interleucina 10

IL-17 - interleucina 17

IFN γ - Interferon-gama

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa

KC - citocina derivada de queratinócito

NLRP3 - proteína recombinante humana NLRP3

FOXO - fator de transcrição FOXO

GPx - glutathione peroxidase

GR - glutathione reductase

GST - glutathione S-Transferase

SOD - Superóxido dismutase

MnSOD/CuZn-SOD - manganês superóxido dismutase

CAT - catalase

NRF2 - factor nuclear eritróide 2

HO-1 - heme oxigenase 1

NF- κ B - fator de transcrição nuclear kappa B

FOXO - *forkhead box*

PGC-1 α - *receptor gamma coactivator 1-alpha*

JNK - c-Jun N-terminal cinase

Trx1/Trx2 - tioredoxina reductase 1 e 2

GCL - enzima glutamato cisteína ligase

UV - radiação ultravioleta

HIF1- α - fator indutor de hipóxia

Lista de figuras

Figura 1: Farmacocinética do Resveratrol	24
Figura 02: Representação do desenho experimental	32
Figura 03: Certificado do Resveratrol	34
Figura 04: Laboratório de Exposição do Diesel	35
Figura 5: Reação de conjugação do CDNB com a GSH catalisada pela GST....	44
Figura 6: Reações enzimas xantina oxidase e superóxido dismutase	45
Figura 7: Fotomicrografias - MAC2 e H&E.....	65
Figura 8: Fotomicrografias - Sirt1, Sirt2 e Sirt6	69

Lista de gráficos

- Gráfico 1:** Representação gráfica dos parâmetros monitorados em tempo real; (A) material particulado PM_{2,5}, (B) temperatura e (C) umidade.....53
- Gráfico 2:** Representação gráfica dos parâmetros monitorados em tempo real, (A) óxido de nítrico (NO) e (B) dióxido de nitrogênio (NO₂).....54
- Gráfico 3:** Representação gráfica: (A) Peso dos animais; (B) Número de células totais no lavado broncoalveolar; (C) Número total de macrófagos no lavado broncoalveolar; (D) Número total de neutrófilos no lavado broncoalveolar; (E) Número total de linfócitos no lavado broncoalveolar; (F) Proporção de macrófagos (MAC2) por unidade de área de tecido pulmonar58
- Gráfico 4:** Representação gráfica: (A) IL-1 β no soro; (B) IL-1 β no lavado broncoalveolar; (C) IL-2 no soro; (D) IL-2 no lavado broncoalveolar; (E) IL-5 no soro e (F) IL-5 no lavado broncoalveolar.....60
- Gráfico 5:** Representação gráfica: (M) TNF-alfa no soro; (N) TNF-alfa no lavado broncoalveolar; (O) IFNy no soro; (P) IFNy no lavado broncoalveolar; (Q) KC no soro e (R) KC no lavado broncoalveolar61
- Gráfico 6:** Representação gráfica: (A) Atividade enzimática de GPX; (B) Atividade enzimática de GR; (C) Atividade enzimática GST e (D) Atividade enzimática Cu/Zn SOD no tecido pulmonar63
- Gráfico 7:** Representação gráfica: (A) Volume total pulmonar; (B) Proporção de colágeno no parênquima pulmonar e (C) Proporção de fibras elásticas no parênquima pulmonar64
- Gráfico 8:** Representação gráfica: (A) Expressão proteica de Sirt1 no parênquima pulmonar; (B) Expressão proteica de Sirt2 no parênquima pulmonar e (C) Expressão proteica de Sirt6 no parênquima pulmonar68

Lista de tabelas

Tabela 1: Descrição da Imunomarcção, anticorpos utilizados e padronizações da concentração	49
Tabela 2: Propriedades físico-química do óleo diesel	51
Tabela 3: Caracterização elementar das amostras de MP _{2,5}	54
Tabela 4: Concentração qualitativa de enxofre no material particulado	56

Lista de símbolos

± - mais ou menos

% - percentual

≥ - maior / igual

< - menor

α - Alfa

β - Beta

m³ - milímetros cúbicos

mg - miligrama

ml - mililitro

μl - microlitros

pg - picogramas

g - gramas

°C - graus celsius

nm - nanômetro

rpm - rotações por minuto

v/v - porcentagem de volume

As - arsênio

Ba - bário

Br - bromo

Fe - ferro

K - potássio

Cl - cloro

Cr - cromo

Cu - cobre

Mn - manganês

Mo - molibdênio

Na - sódio

S - enxofre

Sb - antimônio

V - vanádio

Zn - zinco

LD - limite de detecção

LQ - limite de quantificação

Resumo: Ribeiro JG. Efeitos do resveratrol no pulmão de camundongos idosos expostos à exaustão do motor a diesel [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

A poluição do ar vem ganhando status de emergência global. Pode ser definida como uma mistura de partículas e gases que interagem entre si e com a atmosfera. A população idosa apresenta particularidades nesta fase da vida que favorecem o agravamento dos efeitos nocivos dos ambientes de exposição. Nas últimas décadas, houve um crescente interesse científico em alguns componentes da dieta humana que têm efeitos benéficos na saúde humana. O resveratrol, um composto fenólico, tem se destacado por seus efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e antienvhecimento. Alguns estudos avaliaram o efeito do resveratrol no sistema respiratório em condições estressantes na fase adulta, porém, até onde sabemos, nenhum estudo estendeu essas investigações a animais mais longevos. O objetivo deste estudo é avaliar os possíveis efeitos da administração do resveratrol no pulmão de camundongos idosos C57BL/6 expostos à exaustão do diesel. Para tanto, os animais idosos ($15 \pm$ meses) receberam o resveratrol na concentração de 20 mg/Kg, via intraperitoneal, durante 40 dias. Após o 10º de administração os animais foram submetidos às exposições da exaustão do motor a diesel ($1200 \mu\text{g}/\text{m}^3$ - 1h/ dia, por 30 dias) simultâneo com a administração do resveratrol. Avaliamos o perfil inflamatório no LBA e soro pela técnica CBA. Mensuramos as atividades enzimáticas de GPx, GR, GST e SOD em homogeneizado de tecido pulmonar por espectrofotometria. Quantificamos alterações na matriz extracelular pela proporção de colágeno e fibras elásticas por histoquímica por coloração PSH e RFO. Medimos os níveis das proteínas Sirt1, Sirt2 e Sirt6 e MAC2 no parênquima pulmonar por

imunohistoquímica. Em síntese, nossos dados mostraram que o resveratrol atenuou parcialmente a exposição DE nas respostas inflamatórias em animais mais velhos, porém, não modulou a atividade antioxidante, a expressão de sirtuína ou colágeno pulmonar após estimulação nociva.

Descritores: Poluição do Ar, emissões veiculares, diesel, pulmão senil, resveratrol, sirtuínas.

Abstract: Ribeiro J.G: Effects of resveratrol on the lung of aged mice exposed to diesel engine exhaust. [Thesis]. São Paulo; Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

Air pollution has been gaining the status of a global emergency. It can be defined as a mixture of particles and gases that interact with each other and with the atmosphere. The elderly population has particularities at this stage of life that favor the worsening of the harmful effects of exposure environments. In recent decades, there has been a growing scientific interest in some components of the human diet that have beneficial effects on human health. Resveratrol, a phenolic compound, has been highlighted for its anti-inflammatory, antioxidant and anti-aging effects. Some studies have evaluated the effect of resveratrol on the respiratory system under stressful conditions in adulthood, however, as far as we know, no study has extended these investigations to older animals. The aim of this study is to evaluate the possible effects of resveratrol administration in the lungs of elderly C57BL/6 mice exposed to diesel exhaust. For this purpose, the elderly animals (15 ± months) received resveratrol at a concentration of 20 mg/Kg, intraperitoneally, for 40 days. After the 10th day of administration, the animals were exposed to diesel engine exhaust (1200 µg/m³ - 1h/day, for 30 days) simultaneously with the administration of resveratrol. We evaluated the inflammatory profile in BAL and serum using the CBA technique. We measured the enzymatic activities of GPx, GR, GST and SOD in lung tissue homogenate by spectrophotometry. We quantified alterations in the extracellular matrix by the proportion of collagen and elastic fibers by histochemistry by PSH staining and RFO. We measured Sirt1, Sirt2 and Sirt6 and MAC2 protein levels in the lung parenchyma by immunohistochemistry. In summary, our data showed that

resveratrol partially attenuated ED exposure in inflammatory responses in older animals; however, it did not modulate antioxidant activity, sirtuin expression or pulmonary collagen after noxious stimulation.

Descriptors: Air pollution, vehicle emission, diesel, senile lung, resveratrol, sirtuins.

1. INTRODUÇÃO

A poluição atmosférica vem alcançando status de emergência global. Estima-se que atualmente 99% da população global já teve contato com ar poluído e a Organização Mundial de Saúde (OMS) associa 4,2 milhões de mortes anuais influenciadas pela poluição atmosférica (WHO 2021).

Os idosos e as crianças compõem o grupo etário mais vulnerável aos efeitos nocivos da poluição do ar. Apresentam particularidades e vulnerabilidades fisiológicas no sistema respiratório, inerentes às respectivas fases da vida, tornando-os mais suscetíveis aos danos (Bates DV 1995; Shumake et al, 2013; Saldiva et al.1995). Estudos anteriores mostraram que as exposições a poluentes originados do intenso fluxo de rodovias, causaram alterações epigenéticas inflamatórias, imunológicas e na função pulmonar em indivíduos idosos (Fischer et al., 2003; Lepeule 2014a; Lepeule et al., 2014b).

Existe um crescente interesse científico nos compostos polifenólicos por apresentarem propriedades benéficas para a saúde, como anticarcinogênicos, antiinflamatórios e antioxidantes, cardioprotetor e antienvelhecimento, entre outras funções (Cory et al., 2018). O resveratrol é um composto polifenólico que vem ganhando destaque nas últimas décadas é bem descrito como antagonista das proteínas da família das sirtuínas. As sirtuínas inicialmente identificadas como repressoras de transcrição em leveduras tiveram suas investigações estendidas para as bactérias e mamíferos (Grabowska et al., 2017). Em seres humanos, a família consiste em sete isoformas (SIRT1-7) com atividade de mono-ADP

ribosiltransferase ou desacetilase. São descritas como fundamental na resposta celular a uma variedade de estressores, como estresse oxidativo, manutenção do metabolismo celular, genotoxicidade (Price et al., 2012).

Previamente caracterizamos esse modelo experimental de envelhecimento, onde camundongos na idade de (\pm 15 meses) evidenciaram maiores vulnerabilidades, como diminuição de reserva e respostas no sistema respiratório quando expostos ao estímulo da DE (Ribeiro et al., 2019). Considerando os potenciais efeitos do resveratrol como antagonistas das sirtuínas e seus efeitos benéficos para a saúde humana, nós hipotetizamos se o resveratrol seria capaz de estabilizar ou mesmo restaurar os parâmetros pulmonares nos animais idosos submetidos ao estímulo nocivo da exposição ao DE.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Poluição atmosférica

A população dos centros urbanos está suscetível aos efeitos adversos à saúde decorrente da exposição à poluição atmosférica, que é definida como uma mistura de partículas e gases que interagem entre si e com a atmosfera (Brook et al., 2009).

A poluição atmosférica vem ganhando cada vez mais status de emergência global, afetando tanto países desenvolvidos como em desenvolvimento, associada ao aparecimento e a progressão de doenças. Estima-se que 99% da população global esteja exposta a poluentes atmosféricos que excedem os valores estabelecidos pela OMS. Além disso, a OMS atribui 4,2 milhões de mortes globais, anualmente decorrentes das exposições, acometendo principalmente os países de baixa e média renda (WHO 2021).

O grupo etário mais suscetível aos efeitos nocivos dos poluentes ambientais são as crianças e os idosos, devido a particularidades fisiológicas, como a maturação do sistema do sistema respiratório e um declínio progressivo inerente do processo do envelhecimento, comprometendo respectivamente as respostas do sistema respiratório diante de estímulos nocivos (Bates DV 1995; Shumake et al, 2013; Saldiva et al.,1995).

Dentre os poluentes atmosféricos ressalta-se o material particulado (MP) que é constituído por uma mistura de partículas sólidas e/ou líquidas formadas por compostos orgânicos e inorgânicos, classificado como frações grossas (MP₁₀), finas

(MP_{2,5}) e ultrafinas (MP_{0,1}), sendo que, quanto menor o diâmetro da partícula maiores os efeitos adversos à saúde humana (Pope CA, 2000; WHO, 2005).

O MP produzido pela combustão do diesel é constituído de aglomerados de núcleo de carbono, onde hidrocarbonetos e sulfatos resultantes da combustão incompleta do óleo diesel se absorvem. Essas partículas são consideradas tóxicas por causarem estresse oxidativo, saturação do sistema antioxidante, inflamação e lesões no DNA (Braun et al., 2003; Danielsen et al., 2008).

Nos grandes centros urbanos os maiores contribuintes para a poluição atmosférica são as suspensões dos solos de rodovias, emissões industriais, emissões veiculares e aerossóis secundários. (Lodhi et al., 2009). No estado de São Paulo, a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (Cetesb) em conjunto com o governo nacional, vem promovendo avaliações e revisões na padronização das emissões veiculares “da frota em uso” e propostas de redução de até 90% nas emissões de poluentes ambientais para novos veículos (Miller et al., 2023).

Programas como o Controle da Poluição do Ar por Veículos Automotores (Proconve) criado em 1980, estabelecem regulamentação das medidas para incorporação ações políticas e tecnológicas estimulando o uso do etanol como alternativa “mais limpa” de combustível, além da substituição do chumbo por etanol na adição à gasolina (CONAMA/DOU n°18/1986; Cetesb 2023).

O Proconve estabeleceu consideráveis avanços tecnológicos como a incorporação da injeção eletrônica nos motores Otto reduzindo a combustão como alternativa aos carburadores. Além disso, estabeleceram a obrigatoriedade dos catalisadores nos motores para a redução dos gases da exaustão dos motores.

Estabeleceram a obrigatoriedade dos motores “categoria diesel” a redução nas emissões de NOx na atmosfera (Cetesb 2023).

Estipularam padrões de limites aceitáveis para as matrizes energéticas da frota automobilística, sendo preconizado para a gasolina valores máximos de enxofre de 50 mg/kg e a redução de compostos olefínicos e aromáticos. Para o diesel a adição de 10% de biodiesel e o limite de 500 mg/KG para o diesel comum e para o diesel de baixo teor de enxofre (utilizado nas regiões metropolitanas e veículos com sistema de catalisador) o limite de 10% mg/kg (Cetesb 2023).

Em contrapartida, o Brasil apresenta um crescimento expressivo na frota veicular principalmente nas regiões metropolitanas. No estado de São Paulo a frota veicular é composta por 29 milhões de automóveis. A Região Metropolitana de São Paulo (RMSP) concentra 46% de toda a frota nacional, sendo que 10% desse montante são movidos a óleo diesel (categorias dos caminhões, micro-ônibus, ônibus, caminhonetes e vans) (Denatran 2020; Cetesb 2023). Essa categoria merece atenção especial por emitir até 100 vezes mais poluentes na atmosfera em relação com os demais motores ciclo Otto (Riedl & Sanchez, 2005).

Evidências científicas correlacionam às altas concentrações poluentes ambientais com o impacto nas condições climáticas, no comprometimento da saúde pública e individual, associados com o aumento da morbidade e mortalidade (Moore et al., 2009; Fiore et al., 2012; Manisalidis et al., 2020). Portanto, a população nos grandes centros urbanos está mais suscetível às concentrações de poluentes atmosféricos. Além disso, muitas dessas pessoas têm uma percepção limitada ou ausente dos possíveis malefícios dessa condição, contribuindo

indiretamente para a negligência de ações efetivas tanto individuais, quanto coletivas e governamentais (Manisalidis et al., 2020).

A poluição ambiental é um problema com *status* de emergência em saúde pública internacional que reivindica integralização de ações governamentais nos âmbitos socioeconômico, educacional, transporte, infraestrutura; na tentativa de reverter esse cenário desafiador, ou ao menos, tentar amenizar os prejuízos já em curso. Sem desconsiderar os avanços alcançados até o momento. As projeções futuras apontam condições desfavoráveis se não tivermos regulamentações e aprimoramentos políticos de imediato (OECD, 2012). De qualquer forma, esses dados nos evidenciam um cenário desafiador.

2.2. Idosos e Poluição Atmosférica

O crescimento na proporção da população idosa vem atingindo escalas crescentes globalmente. Em 2013 os idosos com ≥ 80 anos representavam 14% da população global (Simoni et al., 2015). Em 2020 as pessoas com idade de ≥ 60 anos superaram o número de crianças com idade de 5 anos de vida. Nessa perspectiva as projeções apontam para um cenário desafiador, até o ano de 2050 haverá 392 milhões de pessoas com ≥ 80 anos, o equivalente a três vezes mais, quando comparado com o ano de 2013 (WHO 2022).

Esses dados refletem uma tendência de uma vida mais longa e geralmente mais saudável, apesar da alta incidência de doenças crônicas que comumente estão relacionadas com essa faixa etária (Boutayeb and Boutayeb et al., 2005; Maresova et al., 2019). Quando observamos a correlação dos fatores, tanto a

exposição à poluição atmosférica quanto os altos índices do envelhecimento global, nos evidenciam necessidades de ações multifocais nos aspectos sociais, em saúde pública/individual, aspectos econômicos, políticos, infraestrutura, ambientais e sociais (United Nations, 2013).

O processo do envelhecimento é um processo inerente, onde ocorre um declínio progressivo e multifatorial, acarretando em maior exposição, vulnerabilidade e fragilidade, comprometendo a adaptação do indivíduo. Alterações nas respostas imunológicas são comuns, causando deterioração progressiva na resposta a infecções, aumentando a morbimortalidade por doenças infecciosas entre os idosos (Simoni et al., 2015). Conseqüentemente, esse declínio fisiológico multi-sistêmico contribui para maior suscetibilidade dos idosos aos efeitos nocivos da poluição atmosférica (Sacks et al., 2011; Emmerechts et al., 2012).

Esse grupo etário apresenta algumas características peculiares, intrínsecas, tanto a nível metabólico como estrutural. No sistema respiratório são comumente relatadas alterações estruturais na conformação da parede torácica, causando sobrecarga da função diafragmática, diminuição de força e enrijecimento dos músculos respiratórios, comprometendo a ventilação-perfusão (Souza et al., 2002; Levitzky, 2009). Na estrutura tecidual pulmonar são descritas degeneração das fibras elásticas e colágenas nos ductos alveolares e alvéolos, associada com perda de área de superfície alveolar, comprometendo a elastância pulmonar, declínio de capilares nos alvéolos, acometendo as trocas gasosas (Carvalho & Garcia, 2003; Sharma & Goodwin, 2006).

Em modelo animal de envelhecimento são relatadas alterações como aumento do número e tamanho dos poros interalveolares, aumento da área de

superfície alveolar, aumento do volume pulmonar total, associados com a diminuição de fibras elásticas, acarretando em comprometimento de infecções respiratórias. Além disso, ocorre diminuição nas reservas de antioxidantes pulmonares provocando maior suscetibilidade a EROS (Anver & Haines, 2004).

Evidências epidemiológicas mostram relação positiva entre poluição atmosférica e o declínio do sistema respiratório em idosos. O estudo de Smargiasse et al., 2006 mostrou que idosos de 65 anos ou mais, residentes próximos a rodovias de intenso fluxo de veículos em Montreal/Canadá, apresentaram maior frequência de admissões hospitalares com diagnóstico respiratório, entre abril de 2001 e março de 2002. Os dados evidenciaram relação positiva entre exposição ao tráfego veicular com aumento nos índices das internações hospitalares por doenças respiratórias.

Lepeule et. al., (2014a) num estudo longitudinal (1999 até 2009) avaliaram o comprometimento do sistema respiratório em 776 homens com idade inicial de ≥ 65 anos ou mais, residentes na área metropolitana de Massachusetts em Boston/EUA. As exposições subcrônicas comprometeram a função pulmonar, causaram alterações epigenéticas inflamatórias e imunológicas nos idosos. Em outro estudo longitudinal (1995-2011) avaliaram 858 homens idosos que residiam na área metropolitana de Boston. Observaram que o aumento de $0,5 \text{ mg/m}^3$ nas concentrações de poluentes atmosféricos, a longo prazo, comprometeu o declínio da capacidade vital forçada (CVF) e volume expiratório no primeiro segundo (FEV1) (Lepeule et al., 2014b).

Em modelos experimentais, Suniel et al., (2010) demonstraram maior vulnerabilidade em camundongos idosos quando expostos à exaustão do diesel nas

concentrações de 300 ou 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ por 3h, dose única ou por 3 dias consecutivos. Os animais mostraram alterações estruturais no septo alveolar, aumento de células inflamatórias como neutrófilos e macrófagos associados com o aumento de marcadores inflamatórios como fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 8 (IL-8), além da diminuição do manganês superóxido dismutase (Mn-SOD).

Do mesmo modo, nosso estudo anterior mostrou comprometimento nas reservas antioxidantes e diminuição das sirtuínas nos pulmões dos animais idosos de (\pm 15 meses) quando comparados com animais mais jovens (\pm 2 meses de idade). Os animais idosos expostos ao DE apresentaram comprometimento no processo do envelhecimento pulmonar com aumento no influxo de macrófagos, alterações na expressão gênica e proteica de Sirt6, associado com aumento na deposição de colágeno no tecido pulmonar.

2.3 Resveratrol

Nas últimas décadas vários estudos vêm mostrando maior interesse em investigar os efeitos de alguns componentes da dieta humana, envolvidos na promoção/manutenção da saúde. Investigações envolvendo vitaminas C/E, polifenóis, flavonoides e os carotenos, são alguns exemplos desses componentes potencialmente benéficos para a saúde humana (Behnding 2006; Zhao et al., 2021).

Os compostos polifenólicos são definidos quimicamente como substâncias que possuem anel aromático com grupos hidroxila, incluindo ésteres, glicosídeos e derivados funcionais. São agrupados em classes com base no número de anéis e tipo de seus elementos estruturais de ligação. Nas últimas décadas, vem

despertando grande interesse científico devido às suas potencialidades de atuar em condições metabólicas e patológicas (Manach et al., 2004).

O resveratrol é um fenólico bem investigado, membro da família de polifenóis denominado estilbeno (Das et al., 2007). Há um crescente interesse científico em compostos polifenólicos por causa de suas propriedades antienvhecimento, principalmente por reduzir danos ao DNA, efeitos antiinflamatórios e antioxidantes, antimicrobiana e anticancerígena (Szkudelska and Szkudelski 2010; Timmer et al., 2011; Frankel et al., 1993; Alvarez et al., 2012; Seukep et al., 2016; Cory et al., 2018).

Pode ser encontrado em mais de 70 espécies de plantas na natureza, compreendidas em 32 gêneros, dentre elas, as uvas, frutas vermelhas, nozes, amendoins, nas bebidas alcoólicas derivadas da uva, entre outros. Curiosamente, os vinhos tintos apresentaram maior teor de trans-resveratrol de $1.089 \pm 0,002$ mg/L quando comparados com os vinhos brancos (Hanzlíková et al., 2004; Gürbuz et al., 2007).

Nas plantas o resveratrol não se encontra em abundância, sendo produzido em resposta a estresses ambientais como radiação UV, danos mecânicos, ataques fúngicos, bacterianos e outros patógenos (Langcake e Pryce 1976; Francioso et al., 2014; Tedesco et al., 2000; Careri et al., 2003). O resveratrol é sintetizado sob duas formas isômeras: trans-resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) e cis-resveratrol (cis-3,5,4'-trihidroxiestilbeno). A forma trans-resveratrol é biologicamente mais ativa, porém, em condições estressoras ocorre conversão da isoforma trans-resveratrol em cis-resveratrol, na tentativa de melhor estabilização (Francioso et al., 2014).

O trans-resveratrol apresentou características, *in vitro*, como baixa solubilidade aquosa, baixa biodisponibilidade, tendência à instabilidade, auto-oxidação e fotossensibilidade, comprometendo seu manuseio para o uso farmacêutico (Francioso et al.,2014). Em contrapartida, evidências consistentes mostraram que o trans-resveratrol tem propriedades anticancerígenas, antiinflamatórias, cardioprotetor e antimicrobiano (Signorelli and Ghidoni 2005; Wu and Hsieh 2011; Francioso et al.,2014). Além disso, em condições de cuidadoso manuseio, como proteção da luz, o trans-resveratrol mostrou estabilidade por pelo menos 42h em tampões aquosos neutros e por pelo menos 28 dias em meio ácido com meia-vida em pH 10,0 por 1,6h (Trela et al., 1996).

O resveratrol pode ser administrado de várias formas, como suplemento alimentar (cápsulas), como alimentos/bebidas, isolado ou associados com outros compostos fenólicos, álcool, administrados em jejum ou estado alimentado. Essa variabilidade na administração dificulta análises mais rigorosas de dosagens, no entanto, na administração em humanos as doses costumam variar entre 1 mg a 5 g/dia (Francioso et al.,2014). Sua administração por via oral em humanos e animais mostraram concentrações máximas após 30 minutos de ingestão e sua absorção se dá por difusão transepitelial no intestino (região íleo e jejuno). Ocorre à absorção de 75% do conteúdo e o restante é excretado pela urina e fezes (Soleas et al. 2001; Signorelli and Ghidoni, 2005).

O resveratrol apresenta *meia-vida* de 1/3h para dose única e de 2/5h após doses variadas. Após múltiplas aplicações com variações de doses entre (25, 50, 100 ou 150 mg) foram observados curto intervalo de 4h e ausência de acúmulos (Soleas et al., 2001). O resveratrol é disponibilizado na circulação sanguínea e

distribuído para múltiplos órgãos, como pulmão, coração, rim, baço, fígado, cólon intestino e estômago (Vitrac et al., 2003; Chen et al., 2016).

De acordo com Smoliga e Blanchard (2014) a metabolização do resveratrol ocorre primariamente na passagem pelo intestino delgado (enterócitos) e pelo fígado (hepatócito) (Smoliga e Blanchard, 2014). Ocorrendo a metabolização no fígado pelas enzimas de fase II transformando-o em metabólitos como os glucoronidos (trans-resveratrol-3-O-glicuronídeo) e sulfatados (trans-resveratrol-3-sulfato), redirecionados novamente para a circulação, via entero-hepática e reabsorvidos por hidrólise intestinal (Francioso et al., 2014).

Normalmente ocorre a excreção de 70-98% de seu volume após 24 horas de ingestão na urina e nas fezes. Em seres humanos, o tempo de excreção foi proporcional às concentrações plasmáticas de resveratrol e seus metabólitos. Meng et al., (2004) associaram essa condição com a possibilidade de acúmulo tecidual ao longo de um período de ingestão, tornando-se mais disponível para a captação e sinalização celular.

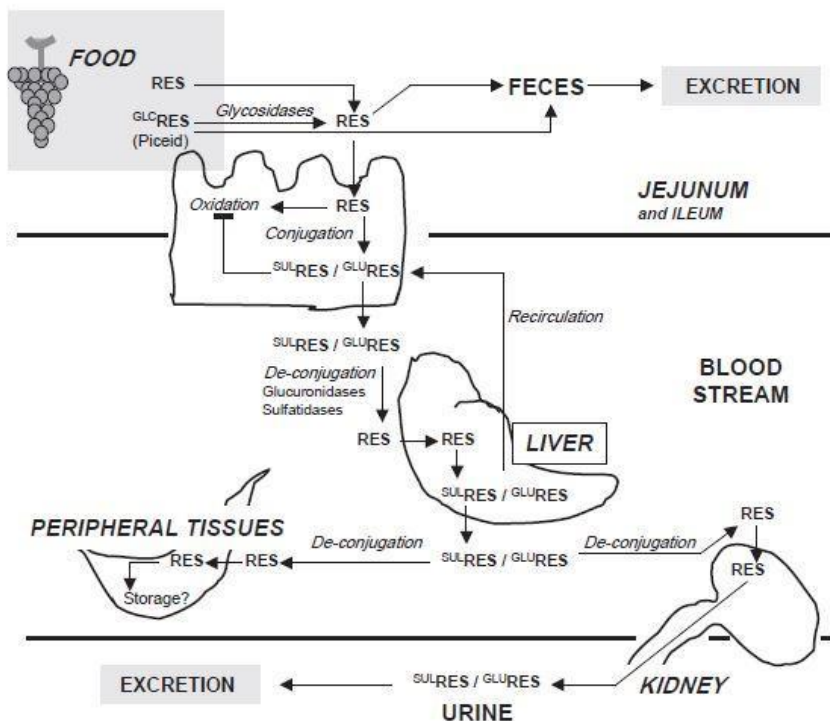


Figura 1: Farmacocinética do Resveratrol. FONTE: (Francioso et al.,2014).

Em mamíferos, vários estudos vêm investigando os efeitos da administração do resveratrol em diversos processos biológicos como no estresse oxidativo, na inflamação, no envelhecimento e até mesmo no aumento da longevidade (Baur et al., 2006; Chen et al., 2005).

Yen et al (2003); Cao e Li (2004); Brito et al (2006) mostraram o papel protetor do resveratrol contra danos oxidativos e correlacionaram esse efeito a sua capacidade de induzir algumas enzimas antioxidantes como a glutathiona reduzida (GSH), a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathiona peroxidase (GPx) e a glutathiona S-transferase (GST). Da mesma forma, o estudo de Li e col. (2013) demonstrou que camundongos tratados com resveratrol (30mg/Kg via intraperitoneal (i.p) quando expostos a uma aplicação única de *paraquat* (20 mg/Kg,

i.p.) mostraram atenuação das lesões pulmonares, induzindo a ativação da proteína sirtuina 1 (Sirt1) e fator nuclear eritróide 2 (NRF2), aumentando a atividade das defesas antioxidantes como a heme oxigenase 1 (HO-1), SOD e CAT.

Outro efeito atribuído ao resveratrol relaciona-se com suas propriedades anti-inflamatórias. Prévios estudos demonstraram que o resveratrol foi capaz de inibir a produção de algumas interleucinas como IL-2, IL-6, IL-12 e TNF- α em macrófagos (Pendurthi e col., 1999; Zhong e col., 1999).

Gao e col (2001) evidenciaram, *in vitro*, o efeito supressor em linfócitos T do resveratrol [25 μ M] inibindo a ativação linfocitária em cerca de 90%. O mesmo estudo ainda mostrou que em camundongos que receberam via oral o resveratrol, 2 mg/dia/4 semanas, mostram redução na proliferação de linfócitos T.

Além disso, estudos vêm demonstrando uma importante função do resveratrol como um mediador da longevidade, por meio da ativação endógena nos níveis de Sirt1, interagindo com diversos processos metabólicos, vias *factor nuclear kappa B* (NF- κ B), *forkhead box* (FOXO), *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha* (PGC-1 α), prevenindo assim, o processo do envelhecimento e aumentando a longevidade em mamíferos (Baur e col., 2006; Chen e col., 2005; Howitz e col., 2003; Taylor e col., 2008; Haigis & Sinclair, 2010).

Navarro e col. (2017) utilizando camundongos *knockout* Tert^{-/-} com característica o envelhecimento prematuro, observaram menor perda de complacência pulmonar, menor comprometimento das estruturas pulmonares e diminuição de lesões de DNA nas células parenquimais, quando instilados com resveratrol (1 mg/Kg, uma vez por mês/ 3 meses).

2.4 Sirtuínas

A família das sirtuínas compreendem 7 isoformas com diferentes funções e localizações (Price et al., 2012). Sirt1 é extensivamente estudada e associada a uma variedade de processos biológicos e patológicos. Com localização predominantemente nuclear, podendo-se translocar para o citoplasma, tem sua função associada com a estabilidade metabólica, envelhecimento, estabilidade do genoma, migração e invasão celular, metástase, dano e reparo do DNA, e câncer (Bai e Zhang, 2016).

Vários mecanismos são recrutados na modulação de Sirt1. Atua no estresse oxidativo através da via de sinalização Sirt1/FOXO estimulando a expressão de enzimas antioxidantes como glutatona peroxidase (GPx), tioredoxina redutase (Trx1/Trx2), heme oxigenase-1 (HO-1), glutatona redutase (GR) e manganês superóxido dismutase (MnSOD/CuZn-SOD) (Pierre et al., 2006; Morgan et al., 2011; Hasegawa et al., 2013; Merksamer et al., 2013). Em resposta a dano celular Sirt1 regulou o fator transcricional NF-kB-p65/p50 envolvido na sinalização inflamatória (Salminen et al., 2008; Ren et al., 2019). Além disso, Sirt1 mostrou interação com o fator nuclear derivado do fator nuclear eritróide 2 (Nrf2) e induziu os receptores proliferadores gama peroxissômicos (PGC-1 α) aumentando a massa mitocondrial e regulando a apoptose (Hu et al., 2007; Chiou et al., 2011; Zhou et al., 2021).

Outro membro da família das sirtuínas, a Sirt2 tem sua localização predominantemente citoplasmática podendo-se translocar para o núcleo (North e Verdin 2007). Suas funções são bem estabelecidas, entretanto, seu comportamento no modelo da doença ainda é incipiente. Tem função na progressão do ciclo celular

(G2/M-H4/16) estimulando a condensação da cromatina, modula a via de sinalização da apoptose via p53-p38/MAPK/p300 (Matsumori et al., 2011). Além disso, tem funções relacionadas com apoptose, metabolismo e envelhecimento, modulando a via de sinalização FOXO1 e FOXO3 (Wang et al., 2007). Além disso, mostrou interação com o NF- κ B RelA/p65-K3100 e com o fator nuclear (Nrf2) estimulando a atividade enzimática glutatona (GSH) e a enzima glutamato cisteína ligase (GCL) (Rothgiesser et al., 2010; Singh et al. 2018).

Igualmente importante, Sirt6 compõe a família das sirtuínas com localização no nucléolo (Ardestani e Liang 2012). Tem suas funções relacionado com a manutenção e reparo do DNA, estabilização genômica e função da telomerase, modulação de genes de inflamação do NF- κ B Rel/p 65/H3-9, modulação do fator indutor de hipóxia HIF1 α , vias de sinalização JNK (Kawahara et al., 2009; Tennen e Chua, 2011; Xiao et al., 2012). Os resultados mostraram uma relação entre Sirt6 e senescência celular acelerada, desregulação do estado redox e aumento da vulnerabilidade ao estresse oxidativo (Pan et al., 2016). Além disso, a deficiência do Sirt6 mostrou associação com fenótipos de alteração relacionados ao envelhecimento precoce, como curvatura acentuada da coluna vertebral, osteoporose, perda de gordura subcutânea, associada à colite (Mostoslavsky et al., 2006).

Entretanto, ainda são bem escassas as investigações sobre o possível efeito protetor do resveratrol relacionado com a progressão do envelhecimento pulmonar. Até onde sabemos, nenhum estudo se estendeu para avaliar a resposta do resveratrol no pulmão envelhecido sob a influência de condições estressoras, como

nas exposições ao DE. Portanto, hipotetizamos que o resveratrol atenuaria os possíveis efeitos nocivos decorrentes das exposições à exaustão do motor a diesel nos desfechos do envelhecimento pulmonar.

3. OBJETIVOS

Avaliar os efeitos da administração do resveratrol no pulmão de camundongos idosos expostos à exaustão do motor a diesel. Assim, os objetivos específicos foram:

→ Avaliar marcadores inflamatórios (IL-1 β , IL-2, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17 e TNF- α , IFN γ , KC) no sangue e no lavado broncoalveolar;

→ Avaliar as atividades enzimáticas de GPx, GR, GST e Cu/Zn SOD no tecido pulmonar;

→ Avaliar o conteúdo de matriz extracelular do tecido pulmonar (conteúdo de colágeno e elastina);

→ Avaliar a expressão proteica de Sirt1, Sirt2 e Sirt6 no parênquima pulmonar.

4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aprovação de Ética

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de Animais (CEUA) na Faculdade de Medicina da USP, sob nº #093/17 (Anexo A).

4.2 - Delineamento experimental

Os animais experimentais foram expostos previamente ao resveratrol ou veículo (10 dias antes do início das exposições) e concomitante aos 30 dias de exposição ao diesel. Após o período das exposições (protocolo descrito abaixo) os pulmões foram coletados. O pulmão (D) foi fixado e destinado para análises histológicas para a mensuração do conteúdo de colágeno e fibras elásticas no parênquima pulmonar. Quantificamos os níveis de expressões proteicas de Sirt1, Sirt2, Sirt6 e MAC2 no parênquima pulmonar por imunohistoquímica. No sangue/soro e no lavado broncoalveolar avaliamos o perfil inflamatório (IL-1, IL-2, IL5, IL6, IL-10, IL-17, TNF, INF γ e KC) pela técnica de *Cytometric Bead Array* (CBA).

O pulmão contralateral foi dividido em três partes iguais, sendo o terço médio destinado para avaliações das atividades enzimáticas (GPx, GR, GST e SOD) por espectrofotometria e os terços superior e inferior armazenados e mantidos a -80°C para futuras análises que se façam necessárias.

4.3 - Desenho experimental

Neste estudo foram utilizados 40 camundongos machos da linhagem C57/BL6, adultos idosos na idade de (\pm 15 meses). 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. Os animais foram alimentados com água e ração “*ad libitum*” e mantidos e manipulados de acordo com as normas de “Uso de Animais de Laboratório” do Centro de Bioterismo da FMUSP. Os animais foram divididos em 4 grupos randômicos (Figura 02).



(AFVEI) Grupo ar filtrado + veículo: 10 camundongos com idade de (\pm 15 meses) receberam 20 ml/Kg de veículo (i.p) e foram expostos ao ar filtrado.



(AFVEI) Grupo ar filtrado + resveratrol: 10 camundongos com idade de (\pm 15 meses) receberam 20 ml/Kg de resveratrol (i.p) e foram expostos ao ar filtrado.



(DVEI) Grupo diesel + veículo: 10 camundongos com idade de (\pm 15 meses) receberam 20 ml/Kg de veículo (i.p) e foram expostos ao diesel.



(DRSV) Grupo diesel + resveratrol: 10 camundongos com idade de (\pm 15 meses) receberam 20 ml/Kg de resveratrol (i.p) e foram expostos ao diesel.

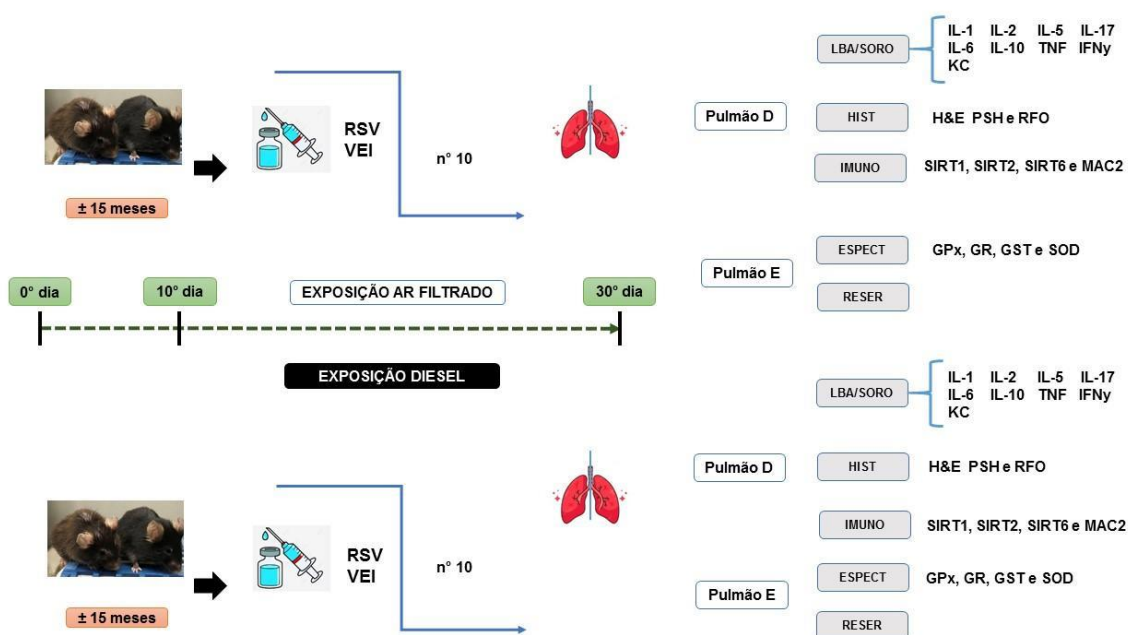


Figura 02 - Representação do desenho experimental.

4.4 - Resveratrol utilizado no estudo

O extrato de resveratrol, Trans-Resveratrol (100%) adquirido na indústria farmacêutica (Galena Química e Farmacêutica, Ltda) validado com Certificado de Análise - atestando a sua pureza e as boas condições de uso para a realização deste estudo (Figura 3).

Os animais experimentais neste estudo foram administrados com resveratrol ou veículo, via intraperitoneal (i.p) na dose de 20 ml/kg (Park et al.,2012). Para melhor padronização de dose, via de administração, duração do tratamento e adaptação dos animais, realizamos um projeto piloto avaliando os possíveis efeitos desse protocolo na nossa metodologia. O DMSO, extensamente utilizado como veículo condutor do resveratrol mostrou-se extremamente tóxico, com altas taxas de letalidade, inviabilizando sua utilização (Sussan et al., 2012; Tan et al., 2015; Tseng et al., 2019). Possivelmente, a idade avançada e o declínio fisiológico multissistêmico, inerente ao envelhecimento, podem ter contribuído nesse desfecho. Portanto, optamos pelo uso da vaselina líquida, estéril, frequentemente utilizada em grande escala em intervenções médicas, sua utilização decorreu sem intercorrências.

O armazenamento e o manuseio da solução matriz foram rigorosamente preconizados, sendo uma substância muito frágil a agentes desestabilizadores como temperatura, exposição à luz ambiente e solubilidade. Além disso, as soluções eram refeitas e reajustadas semanalmente, considerando a possibilidade de variação do peso corpóreo dos animais. Iniciamos as aplicações por 10 dias antes do início das exposições que se mantiveram no curso dos 30 dias de exposição do diesel ou ar filtrado.

Galena **Certificado de Análise**
Nr. Ctrf.: 0001874/201403G00093701

RESVERATROL EXTRACT 100% - 0,050 KG

C.A.S.: 501-36-0 Página: 01

Data de Fabricação: 11/08/2014 **Lote de Fabricação:** RRES98-140811
Data de Validade: 10/08/2016 **Pais de Origem:** CHINA
Lote Galena (CIQ): 1503026002 **Ordem Fracionamento (OF):** 00650802002

Dados do Requirante:
Requisitante: Galena Química e Farmacêutica Ltda **CNPJ:** 57.442.774/0001-90 **Fone:** 0800 77 14 270
Endereço: Rua Pedro Stancato, 860 **Cidade:** Campinas/SP **CEP:** 13.082/050
Fórmula Molecular: C14H12O3 **Peso Molecular:** 228,24 **Classe Terapêutica:** Antioxidante

Informações Complementares: Sinônimo: Trans-Resveratrol
Armazenamento: ARMÁZ. TEMP.AMB.CONTROLADA, FECHADO, PROTEGIDO DA LUZ E UMIDADE
 Produto higroscópico



Análises/Componentes	Especificações	Incerteza de Medição (U)	Resultados das Análises
LABORATORIO FISICO-QUIMICO			
- DESCRICAO (0)	Po fino branco a esbranquiçado, com odor e sabor característicos		Po fino esbranquiçado, com odor e sabor característicos
- PERDA POR DESSECAÇÃO (0)	Não mais que 1,00 %	0,17 %	0,17 %
- CINZAS * (0)	Não mais que 1,00 %	0,08%	0,33 %
- METAIS PESADOS * (0)	Não mais que 10 ppm		Conforme
- ARSENIO * (0)	Não mais que 2 ppm		Conforme
- CADMIO * (0)	Não mais que 1 ppm		Conforme
- CHUMBO * (0)	Não mais que 1 ppm		Conforme
- GRANULOMETRIA (0)	Não menos que 98% passa 80 mesh		98%
- RESÍDUO DE PESTICIDAS * (0)	Não mais que 1 ppm		Conforme
- FOSFATO ORGÂNICO * (0)	Não mais que 1 ppm		Conforme
- SOLUBILIDADE EM ALCÓOL (0)	Solúvel		Solúvel
- IDENTIFICAÇÃO POR TLQ * (0)	Positivo		Conforme
- DOSEAMENTO (BASE SECA) * (0)	Não menos que 98,0 %	1,40 %	98,7 %
- DENSIDADE APARENTE (7)	Informativo		0,301g/mL
LABORATORIO MICROBIOLÓGICO			
- CONTAGEM TOTAL DE BACTÉRIAS * (0)	Não mais que 10000 UFC/g	71	Conforme
- BACTÉRIAS E LEVEDURAS * (0)	Não mais que 100 UFC/g	35	Conforme
- E. COLI * (0)	Ausente		Ausente
- SALMONELLA SP * (0)	Ausente		Ausente

Observações:
 - Os resultados presentes neste Certificado de Análise tem seus valores restritos a este lote.
 - Análises de acordo com o certificado de análise do fabricante.
 - As demais análises foram realizadas no Laboratório de Controle da Qualidade Galena.

Referências: (0)CONFORME METODOLOGIA PRÓPRIA DO FORNECEDOR; (7)CONFORME METODOLOGIA INTERNA GALENA

- A incerteza expandida de medição relatada é declarada como a incerteza padrão da medição multiplicada pelo fator de abrangência K. Para o ensaio Água por Karl Fisher K=2,52; pH K=2,37; Ponto de Fusão K=2,65; Perda por Dessecação K=2,10; para os demais testes do escopo, K=2, que, para uma distribuição normal, corresponde a uma probabilidade de 95%. A incerteza padrão de medição foi determinada de acordo com a publicação EA-4/02.

Resultado: **Aprovado** **Data Início:** 23/03/2015 **Data Término:** 23/03/2015

Lúcia Eli Scarell **Renata Timm**
 Farmacêutica Responsável Gerente da Qualidade
 CRF-SP: 16.148 CRF-SP: 38.000

Figura 03 - Certificado de Análise do Resveratrol.

4.5 - Sistema de Exposição Gerador de 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 do laboratório de exposição. Em seguida, adicionado ar ambiente por 3 min com a finalidade de diluição do ar coletado da exaustão do motor. Com auxílio de uma bomba

pneumática as partículas da exaustão do motor armazenadas no BAG foram direcionadas para a câmara de exposição onde os camundongos estavam acondicionados para serem expostos. Os camundongos foram expostos por um período de 01 hora por dia, na dose de $1200 \mu\text{g}/\text{m}^3$, por um período de 30 dias. Monitoramos os parâmetros em tempo real de NO_x , NO_2 , NO (Thermo Scientific), O_3 (Thermo Fisher Scientific) e as concentrações de $\text{MP}_{2,5}$ (DataRam 4 TM, Thermo Fisher Scientific Inc.).

Com auxílio de uma bomba a vácuo, o ar ambiente foi drenado e direcionado ao sistema de filtração HEPA, em seguida esse ar filtrado foi conduzido à câmara para exposição dos animais que receberam ar filtrado (Figura 04).

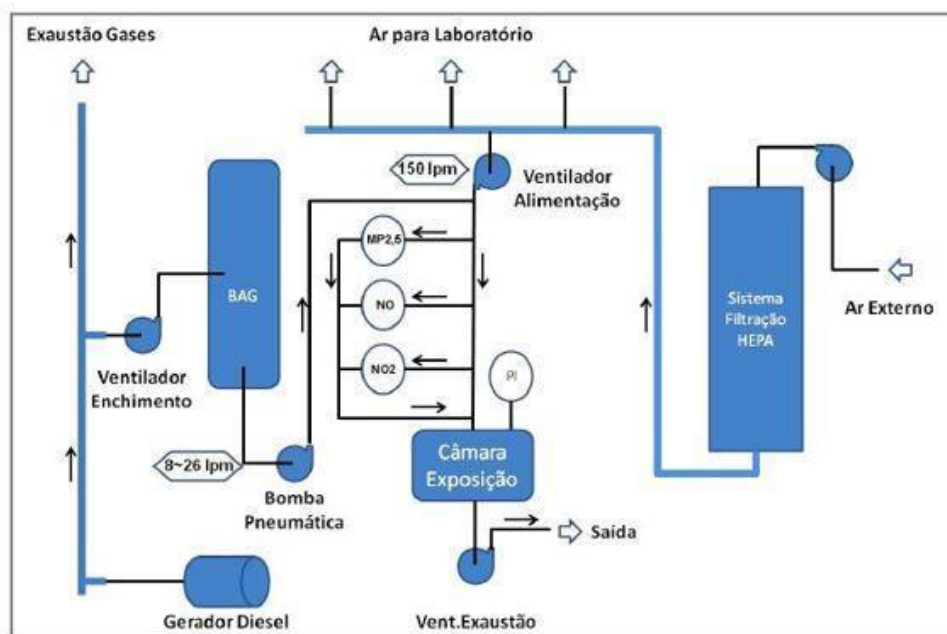


Figura 04: Laboratório de Exposição do Diesel. FONTE: (Ribeiro et al., 2019).

4.5.1 - Caracterização da exposição

A análise físico-química do combustível bruto foi realizada pelo Instituto Nacional de Tecnologia por meio de relatórios técnicos. A caracterização da exposição da exaustão do motor a diesel foi feita a partir da coleta de filtros de amostragem equipados, conectados às câmaras de exposição. A análise quali-quantitativa elementar (Na, Al, Si, P, S, K, Ca, Ti, V, Fe, Ni, Cu, Zn e Pb) foram realizadas com auxílio de um espectrofotômetro de fluorescência de raio X (Shimadzu EDX 700).

4.6 - Coleta do Material Biológico

4.6.1 - Pulmões

Após 24 horas do término do protocolo de exposição, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de tiopental sódico (200 mg/kg^{-1} peso corporal) traqueostomizados e canulados. O sangue foi coletado e processado, em seguida, armazenado em freezer -80°C até o momento das análises.

Em 10 animais de cada grupo foi realizada uma toracotomia mediana e os pulmões foram expostos. Em seguida os pulmões foram perfundidos com PBS pela via de acesso ventricular esquerda. O pulmão esquerdo foi clipado, fracionado em 3 partes iguais e acondicionadas em criotubos, sendo o terço inferior e o superior armazenados em criotubos no freezer -80°C como materiais reservas, destinados para futuras análises que se façam necessárias. O terço mediano foi direcionado para a análise da atividade enzimática antioxidantes por espectrofotometria.

O pulmão direito foi lavado com 3 x 0,5 ml de PBS e aproximadamente 1,0 ml de lavado broncoalveolar (LBA) e recuperado para as análises do perfil inflamatório. Em seguida o pulmão direito foi insuflado com aproximadamente 0,4 ml de solução salina 0,9% e mantido em solução fixadora por 24 horas. Posteriormente, o material foi transferido para álcool 70% para análise histopatológica.

4.6.2 - Análise do Sangue

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

4.6.3 - 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.

4.6.4. Análises do Lavado Broncoalveolar (LBA)

O LBA foi centrifugado a 850 rpm durante 10 minutos a 4°C, em seguida coletados sobrenadantes e acondicionados em novos tubos eppendorf para a dosagem de interleucinas. O pellet foi ressuspenso em 300 µl de PBS e

homogeneizado, utilizado para a 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, onde adicionamos 20 µl da solução ressuspensa do “pellet” para a obtenção dos resultados no número total. A fórmula aplicada: Contagem Total x 10⁵ x diluição da amostra.

Para a análise diferencial celular realizamos com auxílio de uma centrífuga (Cytospin 3 - Chandon) a confecção das lâminas de esfregaços. As lâminas foram acondicionadas num suporte metálico na centrífuga, em seguida colocadas 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 pipetados 100 µl das amostras nos funis do cilindro plásticos e centrifugados a 450 rpm por 6 minutos. As amostras foram feitas em duplicatas, após a secagem das lâminas segundo orientações do fabricante, foram coradas com o auxílio do *Kit Instant 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 escaneadas com o auxílio do scanner de lâminas digital Panoramic SCAN (3DHistech Ltd., Budapest, Hungary) e as análises feitas com a ajuda do software Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Durante a análise, as células foram diferenciadas em: macrófagos, linfócitos, eosinófilos, neutrófilos.

Nas amostras do sobrenadante do LBA e soro foram avaliadas as dosagens das citocinas, *Mouse IL-1β 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) *Mouse KC Flex Set* (limite de detecção 0.1 pg/mL) *Mouse IFN γ Flex Set* (limite de detecção 0.5 pg/mL) *Mouse IL-2 Flex Set* (limite de detecção 0.2 pg/mL) *Mouse IL-5 Flex Set* (limite de detecção 0.9 pg/mL) *Mouse IL-17 Flex Set* (limite de detecção 0.95 pg/mL) pelo método de citometria de fluxo em ensaios multiplex (*Cytometric Bead Assay* - CBA - BD Bioscience, CA, USA).

Para cada citocina foi gerada 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 realizada uma diluição seriada, segundo orientações do fabricante.

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, acrescentamos 1ml de tampão de lavagem e centrifugado por 5 min a 200g e o sobrenadante desprezado e as amostras ressuspendidas 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.

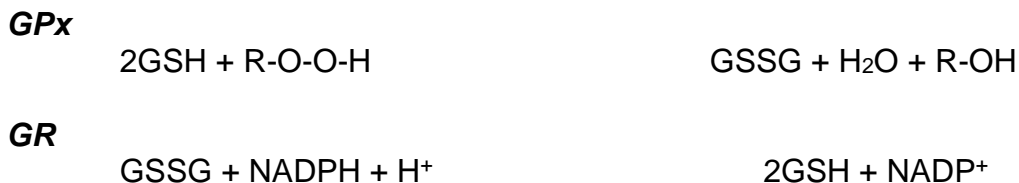
4.7- Análises do estresse oxidativo

As atividades das enzimas glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione 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 protein assay - Bio Rad) cujo princípio consiste na adição de um corante ácido a uma solução de proteínas e subsequente medição da absorbância no comprimento de onda de 595 nm. Foi A comparado com uma curva padrão de soroalbumina bovina e a concentração de proteínas presente nas amostras, que foram aliqüotadas e armazenadas em freezer -80C até o momento das análises.

4.7.1 - Atividade de glutathione peroxidase (GPx)

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



O substrato utilizado neste ensaio é o tercbutilhidroperóxido. A oxidação de NADPH a NADP⁺ foi acompanhada pelo decaimento da absorbância a 340 nm e à 37°C foi adicionado em cada cavidade de uma microplaca, 125µL de tampão fosfato 0,1M pH=7,0 e EDTA 1,0 mM; 30µL de amostra (correspondente à 80µg de proteína totais); 5µL de solução de glutatona reduzida (GSH) 80mM; 0,048U de glutatona redutase (5µL da solução 0,0096 U/µL). Essa mistura foi incubada por 5 minutos a 37 °C, em seguida foi adicionado 5µL de solução de terc butilhidroperóxido 0,46% e 30µL de solução de NADPH 1,20mM. O decréscimo na absorbância foi monitorado a 340 nm por 3 minutos. As amostras foram analisadas em triplicata.

A atividade foi determinada a partir da fórmula:

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

onde:

Atividade: atividade específica da GPx (U/µg de proteína); **k:** inclinação da curva

de decaimento (min⁻¹); **b:** caminho óptico (0,524 cm); ξ_{NADPH} : 6,22 x 10⁻³ (µM⁻¹cm⁻¹)

80µg : quantidade de proteínas totais utilizada no ensaio (80µg); $\frac{200\mu\text{L}}{30\mu\text{L}}$: diluição

da amostra na cubeta; **30 μ L** : volume de amostra correspondente a 80 μ g de proteína.

4.7.2 - Atividade de glutathiona 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⁺ foi acompanhada pelo decaimento da absorbância a 340 nm e à 37°C.

GR



Foi preparado 10mL de meio reagente com 4mL de tampão fosfato 0,10 M 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. Adicionamos em cada poço de uma microplaca 20 μ L (volume de amostra correspondente à 80 μ g de proteínas totais) e 180 μ L de meio reacional. O decréscimo dos valores de absorbância foi monitorado a 340 nm por 5 min a 37°C. As amostras foram analisadas em triplicata.

A atividade foi determinada a partir da fórmula:

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

onde:

Atividade = atividade específica da GR (U/ μ g de proteína); **k** = inclinação da curva de decaimento (min^{-1}); **b** = caminho óptico (0,524 cm); $\xi_{NADPH} = 6,22 \times 10^{-3}$ ($\text{l M}^{-1} \text{cm}^{-1}$); **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 a 80 μ g de proteína.

4.7.3 - Atividade de 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 absorvância foi diretamente proporcional à atividade da GST na amostra.

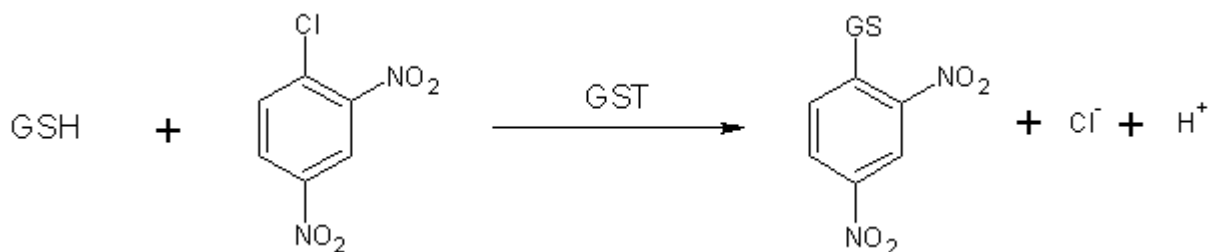


Figura 5: Reação de conjugação do CDNB com a GSH catalisada pela GST.

Foi adicionado em cada cavidade de uma microplaca, 20 μ L (volume de amostra correspondente à 80 μ g de proteínas totais), tampão fosfato 0,1M pH=6,5 (160 μ L); 5 μ L 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 340 nm por 5 minutos a 25°C. As amostras foram analisadas em triplicata.

A atividade foi 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/µg de proteína); **k**= inclinação da curva (min⁻¹); **b**= caminho óptico (0,524 cm); $\xi_{CDNB} = 9,60 \times 10^{-3}$ (l M⁻¹cm⁻¹);

80µg = quantidade de proteínas totais utilizada no ensaio; $\frac{200\mu L}{20\mu L}$ = diluição da amostra na cubeta; **20µL** = volume de amostra correspondente a 80 µg de proteína.

4.7.4 - Atividade da Cu/ZnSOD

A enzima Cu/ZnSOD dismuta o O₂^{•-} na presença de H⁺ formando H₂O₂ e H₂O. No ensaio utilizamos o sistema hipoxantina-xantina oxidase como gerador de O₂^{•-}. O ferricitocromo C foi reduzido na presença do O₂^{•-} e a taxa de redução monitorada por espectrofotômetro a 550 nm e a 25°C. A Cu/ZnSOD compete pelo O₂^{•-} diminuindo a taxa de redução do ferricitocromo C. Uma unidade de SOD foi definida

como a quantidade de SOD que inibe a taxa de redução do ferricitocromo C sob condições específicas, em 50% (McCord & Fridovich, 1969; Flohé Ötting, 1984).

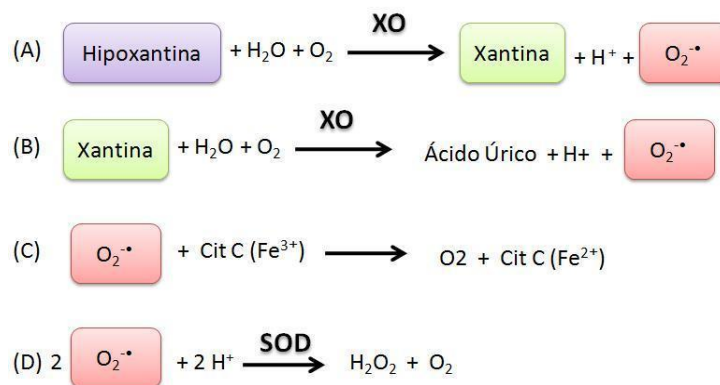


Figura 6: Reações catalisadas pelas enzimas xantina oxidase (XO) e superóxido dismutase (SOD). (A) Reação de conversão de hipoxantina em xantina catalisada pela XO; (B) reação de conversão de xantina em ácido úrico catalisada pela XO; (C) reação de redução do ferricitocromo C oxidado [Cit C(Fe³⁺)] formando 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, centrifugados a 3000g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante foi retirado e reservado para as análises.

Prepararemos um meio reacional composto por 37,5 mL de tampão fosfato $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (50mM – pH 7,8) com EDTA 0,1mM; 10 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 10 mM; 6,2 mg de ferricitocromo C e 0,68 mg de hipoxantina.

Para determinarmos a taxa de redução do ferricitocromo C na ausência de CuZnSOD, adicionamos à uma cubeta de quartzo, 950 μL de meio reacional, 25 μL de tampão fosfato $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (50mM – pH 7,8) e 25 μL 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 a 550 nm e a 25°C. Para determinar a porcentagem de inibição (%) na taxa de redução do ferricitocromo C produzida pela presença de CuZnSOD a leitura foi realizada, adicionando à cubeta 950 μL de meio reacional, 25 μL de amostra extraída e 25 μL da solução de xantina oxidase ($\sim 0,8$ U/mL). O branco consiste na leitura da adição de 950 μL meio reacional e 50 μL de tampão fosfato $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (50mM – pH 7,8) à cubeta de quartzo.

4.8 - 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). Depois as lâminas foram coradas com Picro-Sirius red por 15 minutos e lavadas em águas corrente. Na sequência, 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 Fuscina oxidada. As lâminas foram desparafinadas e hidratadas em gradiente de álcool (absoluto – 95% - 70% - água). Depois as lâminas 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 coradas com resorcina-fucsina por 1 hora em temperatura ambiente e lavada por mais 5 minutos. As lâminas foram diferenciadas em álcool 70% até ser possível ver 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 as lâminas foram escaneadas com o auxílio do scanner de lâminas digital Pannoramic SCAN (3DHistech Ltd, Budapest, Hungary) e analisadas com a ajuda do software Image-Pro[®] Plus versão 4.5 para Windows[®] (Media Cybernetics – Silver Spring MD, USA).

4.9 – Análise Imuno-histoquímica (IHQ)

Para a análise proteica das sirtuínas (Sirt1, Sirt2 e Sirt6) e MAC2 foram utilizadas a pesquisa de anticorpo em tecido pulmonar pelo método peroxidase.

Os cortes histológicos a 5 µm de espessura foram realizados em lâminas silanizadas (3-Aminopropil-trietoxisilano – Sigma) seguindo o protocolo: As lâminas foram desparafinizadas com xilol quente a 60°C por 15 min e xilol frio por 15 min. Lavados em álcool absoluto 95% e hidratadas em água corrente e deionizada. A

recuperação antigênica foi obtida através de alta temperatura em panela de pressão a 125°C por 1 min em tampão citrato Ph6,0. Após este período as lâminas foram lavadas em PBS. Foram feitos os bloqueios da peroxidase endógena com água oxigenada (H₂O₂) 10v 3% por 4 vezes durante 5 minutos cada, em seguida as lâminas foram lavadas com água e PBS.

Os anticorpos primários foram aplicados sobre os cortes, incluindo os controles (positivo e negativo) e permaneceram “overnight” em geladeira a 4 graus em câmara úmida. Na sequência as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas pelo ABC Kit Vectastain (Vector Elite – Vector Laboratories, Inc. Ingold Road Burlingame, CA).

Na etapa seguinte, as lâminas foram lavadas em PBS e a revelação feita pelo cromógeno 3,3 Diaminobenzidine (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA). As lâminas foram lavadas em água corrente abundante e contra-coradas com Hematoxilina de Harris por 30 segundos (Merck, Darmstadt, Alemanha). Novamente as lâminas foram lavadas em água corrente, desidratadas e montadas com resina para microscopia Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Por fim, as lâminas foram escaneadas com auxílio do escâner de lâminas Panoramic SCAN (3DHistech Ltd., Budapest, Hungary) e foram analisadas no software Image-Pro® Plus versão 4.5 para Windows® (Media Cybernetics – Silver Spring MD, USA). Os anticorpos, concentrações e padronizações utilizadas neste estudo estão apresentados abaixo (tabela 10).

Tabela 1: Descrição da Imunomarcção, anticorpos utilizados e padronizações da concentração.

IMUNOMARCAÇÃO	ANTICORPO	PADRONIZAÇÃO
Sirt1	Anti – Sirt1 (Santa Cruz – cod. SC 135792)	1:100
Sirt2	Anti – Sirt2 (Santa Cruz – cod. SC20966)	1:300
Sirt6	Anti – Sirt6 (ABCAM – cod. AB135566)	1:400
MAC2	Anti – MAC 2 (Cerdarlane - cód. CL8942AP)	1:50.000

4.10 - Análise Estatística

As análises descritas foram realizadas para as variáveis, exposição ao diesel ou exposição ao ar filtrado; administração de resveratrol ou administração do veículo.

Para todas as variáveis quantitativas a homogeneidade das variâncias e a aderência à curva normal foram analisadas através dos 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 Bonferroni. Foram considerados estatisticamente significativos os

valores de $p < 0,05$. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão ou mediana (intervalo interquartil) conforme a distribuição.

5. RESULTADOS

5.1 Análise das propriedades físico-química do combustível diesel

As propriedades físico-químicas do combustível fornecidas pelo Laboratório de Combustíveis e Lubrificantes são descritas na (tabela 2).

Tabela 2 – Propriedades físico-química do óleo diesel

ENSAIO	RESULTADO	MÉTODO BASEADO
Aspecto	Turvo com impurezas	Visual
Cor	Vermelha	Visual
Cor ASTM	Cor ASTM L	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 9619/0
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/	1.249	ASTM D 2624

FONTE: ANP, 2011. 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.

5.2 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.

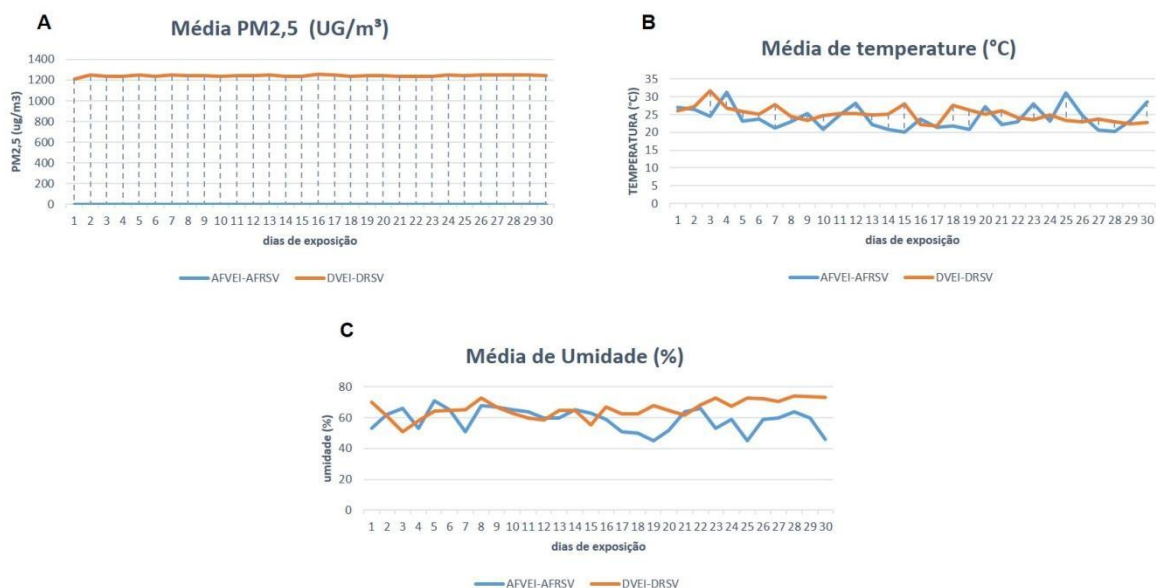
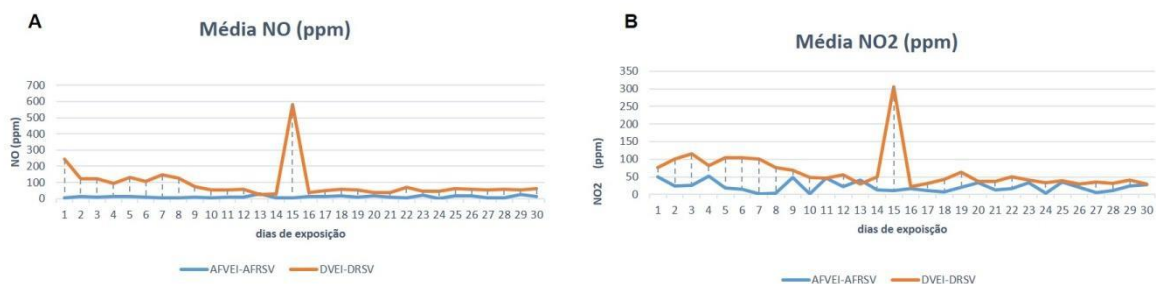


Gráfico 2: Representação gráfica dos parâmetros monitorados em tempo real, (A) óxido de nítrico (NO) e (B) dióxido de nitrogênio (NO₂).



A análise química do PM_{2,5} foi obtida pela técnica de ativação de nêutrons (INAA) (tabela 3).

Tabela 3 – 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	-
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 ($\mu\text{g g}^{-1}$)	1,762	0,019
Na ($\mu\text{g g}^{-1}$)	25,092	0,874
Sb ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0,9120	0,0191
V ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0,0943	0,0136
Zn ($\mu\text{g g}^{-1}$)	2197,67	6,23

Legenda: Resultado foi calculado considerando erros nas medições das atividades da amostra e padrão.

O teor de enxofre (%) nas amostras do PM_{2,5} foi obtido pela análise EDX qualitativa (tabela 4).

Tabela 4 - Concentração qualitativa de enxofre no material particulado

Elemento	Concentração
S (%)	2.7

5.3 Análises peso corpóreo, perfil inflamatório celular no LBA e MAC2 tecidual

O peso dos animais (g) não apresentou alterações significativas entre os grupos. Os valores de média, mediana, desvio padrão ou intervalo interquartil são apresentados na tabela 5, anexo B.

O número de células inflamatórias totais no lavado broncoalveolar (10^3 células/mL) mostrou-se aumentado nos animais expostos ao diesel administrados com veículo (267,50 (59,0); $p=0,0001$) em relação aos animais expostos ao ar filtrado administrado com veículo (70,50 (7,3)). Os animais expostos ao ar filtrado administrados com resveratrol apresentaram diminuição (32,00 (37,0); $p=0,0001$) quando comparado com os animais expostos ao diesel administrados com resveratrol (164,00 (24,0)). Houve ainda diminuição nos animais expostos ao diesel administrados com resveratrol (164,00 (24,0); $p=0,0001$) quando comparado com os animais expostos ao ar filtrado administrado com veículo (267,50 (59,0)).

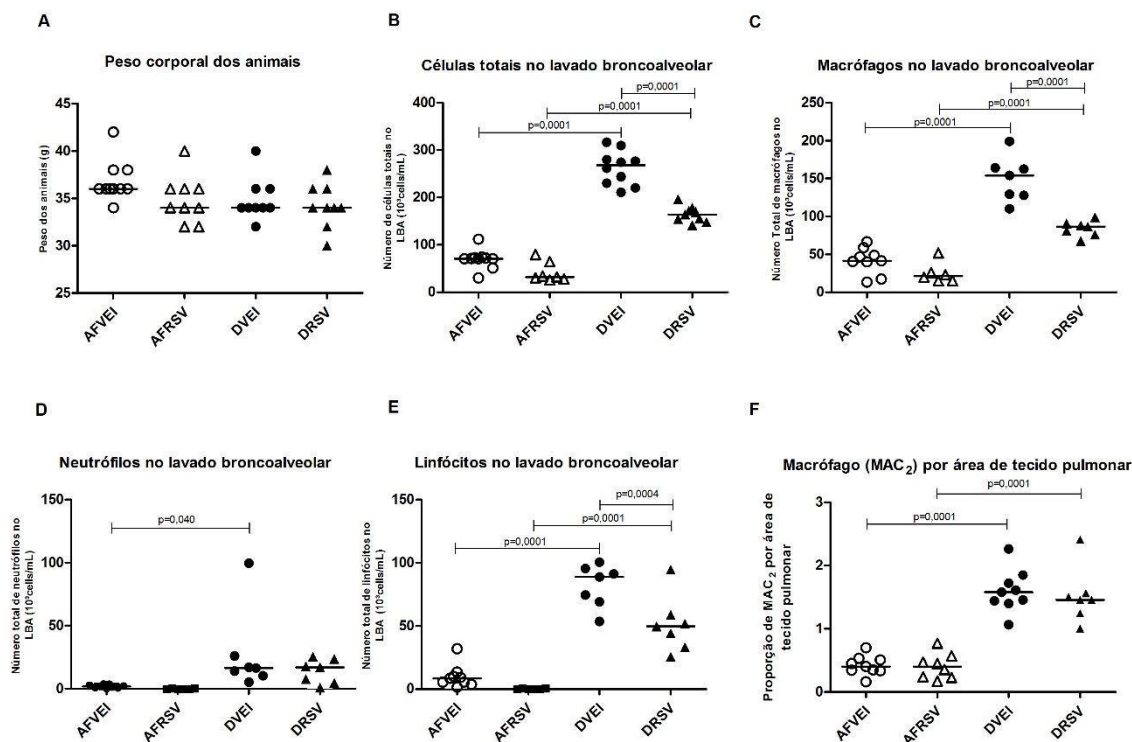
O número total de macrófagos no lavado broncoalveolar (10^3 células/mL) mostrou-se aumentado nos animais expostos ao diesel e administrados com veículo (1,15 (0,36); $p=0,0001$) comparado aos animais expostos ao ar filtrado administrados com veículo (0,40 (0,18)). Os animais expostos ao diesel administrados com resveratrol mostraram aumento no número de macrófagos (1,45 (0,31); $p=0,0001$) quando comparados aos animais expostos ao ar filtrado administrados com resveratrol (0,40 (0,31)). Além disso, os animais expostos ao diesel administrados com o resveratrol mostraram diminuição no número de macrófagos (1,45 (0,31); $p=0,0001$) em relação aos animais expostos ao diesel administrados com veículo (1,57 (0,36)).

O número de neutrófilos no lavado broncoalveolar (10^3 células/mL) mostrou-se aumentado nos animais expostos ao diesel e administrados com veículo (16,00 (16,00); $p=0,040$) em relação aos animais expostos ao ar filtrado administrados com veículo (1,00 (2,5)).

O número de neutrófilos no lavado broncoalveolar (10^3 células/mL) apresentou-se aumentado nos animais expostos ao diesel administrados com veículo ($88,00 \pm 26,0$; $p=0,0001$) quando comparados com os animais que receberam ar filtrado e administrados com veículo ($8,44 \pm 8,88$). Os animais expostos ao diesel administrados com resveratrol mostraram aumento ($50,57 \pm 22,17$; $p=0,0001$) quando comparados com os animais expostos ao ar filtrado e administrado com o resveratrol ($81,42 \pm 16,74$). Houve ainda, diminuição no número de linfócitos nos animais expostos ao diesel administrados com resveratrol ($50,57 \pm 22,17$; $p=0,0004$) em relação aos animais expostos ao diesel administrados com veículo ($81,42 \pm 16,74$).

No parênquima pulmonar observamos aumento no influxo de macrófagos tipo 2 (proporção de MAC2 por área de tecido pulmonar 10^3 células/mL) nos animais expostos ao diesel e administrados com veículo (1,15 (0,36); $p=0,001$) quando comparados com os animais expostos ao ar filtrado administrado com veículo (0,40 (0,18)). Os animais quando exposto ao diesel e administrados com resveratrol mostraram aumento na densidade de macrófagos (1,45 (0,31); $p=0,0001$) comparado aos animais expostos ao ar filtrado administrados com resveratrol (0,40 (0,31)).

Gráfico 3: Representação gráfica: (A) Peso dos animais; (B) Número de células totais no lavado broncoalveolar; (C) Número total de macrófagos no lavado broncoalveolar; (D) Número total de neutrófilos no lavado broncoalveolar; (E) Número total de linfócitos no lavado broncoalveolar; (F) Proporção de macrófagos (MAC2) por unidade de área de tecido pulmonar.



5.4 Análises da quantificação das citocinas no soro e LBA

Não encontramos alterações significativas nas concentrações de IL-1 β (pg/ml) no soro; IL-2 (pg/ml) no soro e LBA; IL-5 (pg/ml) no soro e LBA; IL-6 (pg/ml) no LBA, IL-17 (pg/ml) no soro e LBA; TNF- α (pg/ml) no soro e LBA; IFN γ (pg/ml) no soro e LBA e KC (pg/ml) no soro. Os valores de média, mediana, desvio padrão ou intervalo interquartil são apresentados na tabela 5, anexo B.

Os níveis de IL-1 β (pg/ml) no lavado broncoalveolar mostraram-se aumentados nos animais expostos ao diesel administrado com veículo (3,98 (3,5); $p=0,0001$) quando comparado com os animais expostos ao ar filtrado e

administrado com veículo (< do limite de detecção). Observamos também diminuição nos animais expostos ao diesel e administrados com resveratrol (1,90 (0,01); $p=0,001$) quando comparado com os animais expostos ao diesel e administrado com veículo (3,98 (3,5)).

Os níveis séricos de IL-6 (pg/ml) mostraram-se aumentados nos animais expostos ao diesel e administrado com veículo (3,51 (2,0); $p=0,004$) em relação aos animais expostos ao ar filtrado e administrados com veículo (1,40 (0,01)).

Os níveis séricos de IL-10 (pg/ml) mostraram-se aumentados nos animais expostos ao diesel e administrados com resveratrol (11,83 (5,2); $p=0,028$) quando comparados com os animais expostos ao ar filtrado e administrado com veículo (< do limite de detecção). Além disso, os níveis de IL-10 (pg/ml) no lavado broncoalveolar mostraram-se aumentados nos animais expostos ao diesel e administrados com veículo (13,04 (19,2); $p=0,057$) em relação aos animais expostos ao ar filtrado e administrado com veículo (< do limite de detecção).

Os níveis de KC no lavado broncoalveolar mostraram-se aumentados nos animais expostos ao diesel e administrados com resveratrol (5,47 (11,9); $p=0,032$) quando comparado com os animais expostos ao ar filtrado e administrado com veículos (0,10 (0,5)).

Gráfico 4: Representação gráfica: (A) IL-1 β no soro; (B) IL-1 β no lavado broncoalveolar; (C) IL-2 no soro; (D) IL-2 no lavado broncoalveolar; (E) IL-5 no soro e (F) IL-5 no lavado broncoalveolar.

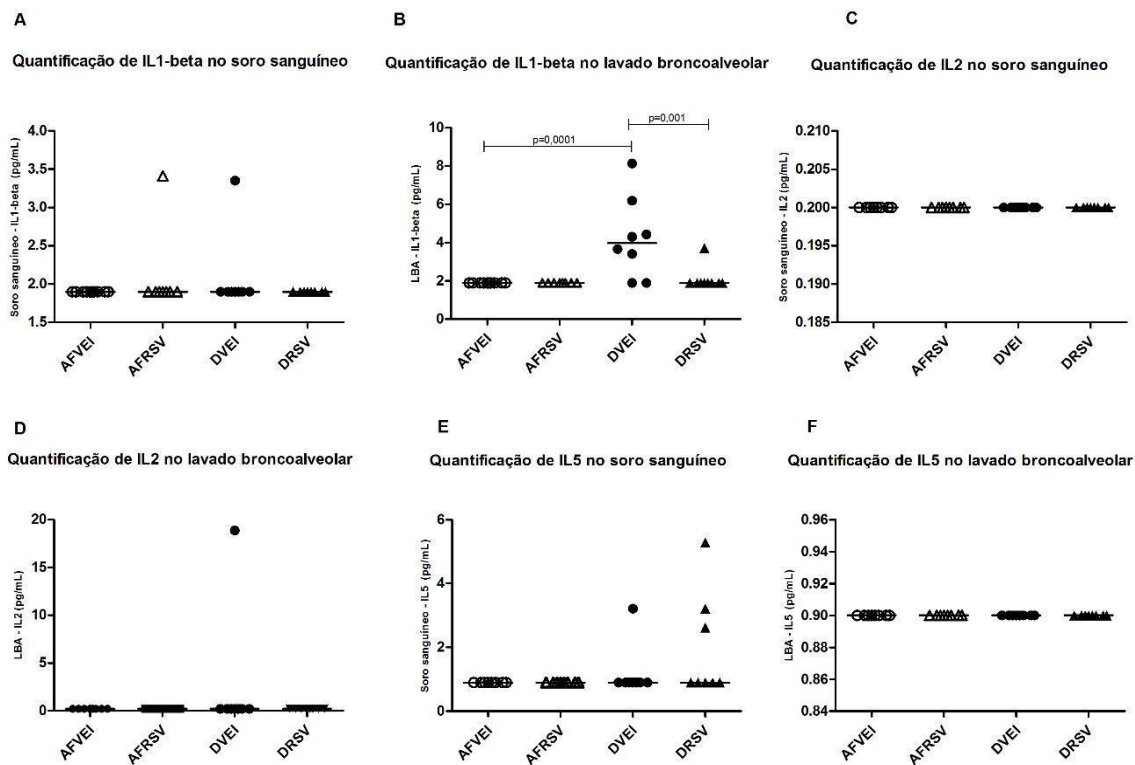


Gráfico 03: Representação gráfica: (G) IL-6 no soro; (H) IL-6 no lavado broncoalveolar; (I) IL-10 no soro; (J) IL-10 no lavado broncoalveolar; (K) IL-17 no soro e (L) IL-17 no lavado broncoalveolar.

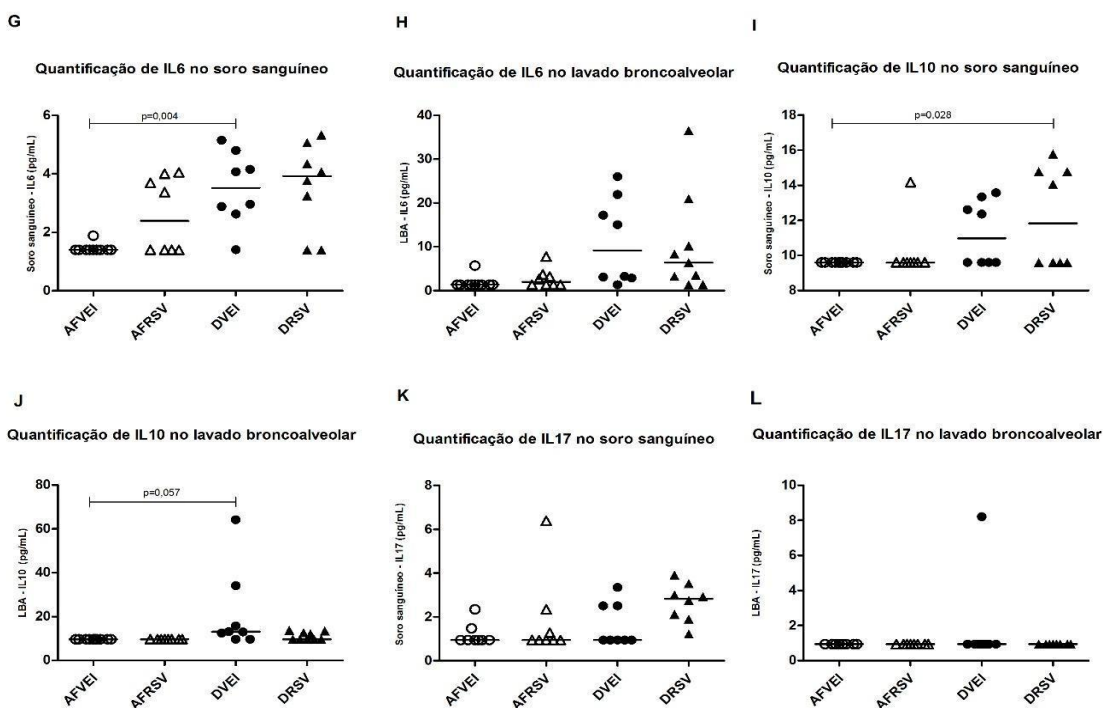
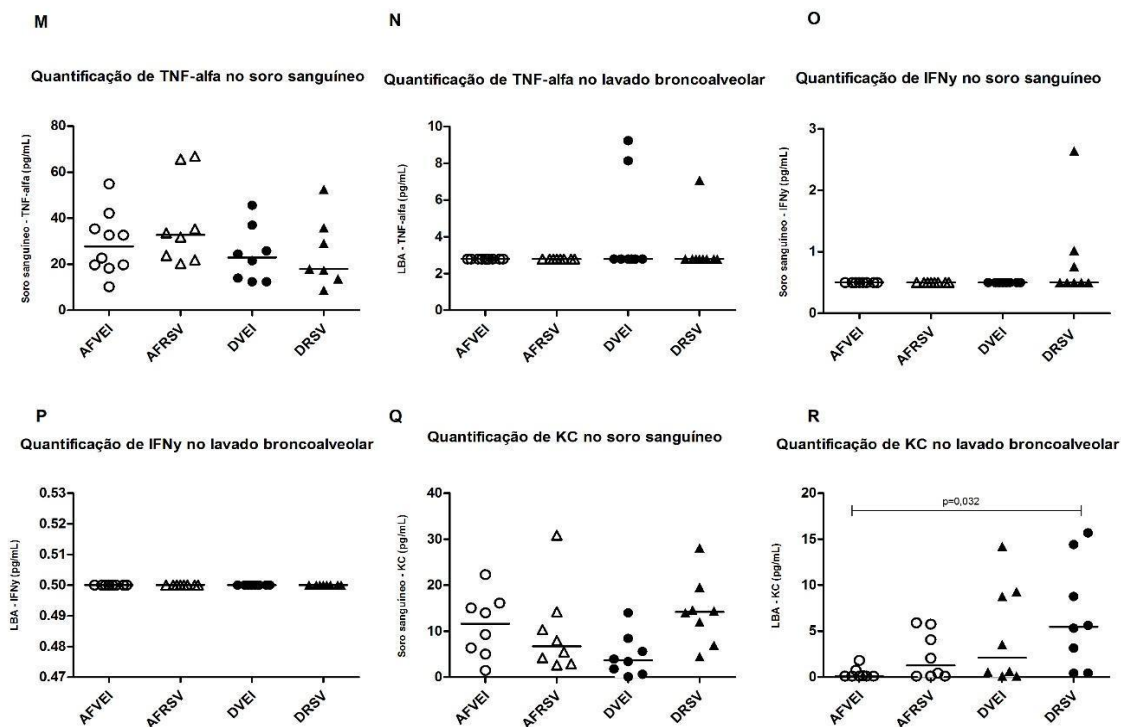


Gráfico 5: Representação gráfica: (M) TNF- α no soro; (N) TNF- α no lavado broncoalveolar; (O) IFNy no soro; (P) IFNy no lavado broncoalveolar; (Q) KC no soro e (R) KC no lavado broncoalveolar.



5.5 Análises das atividades enzimáticas antioxidantes

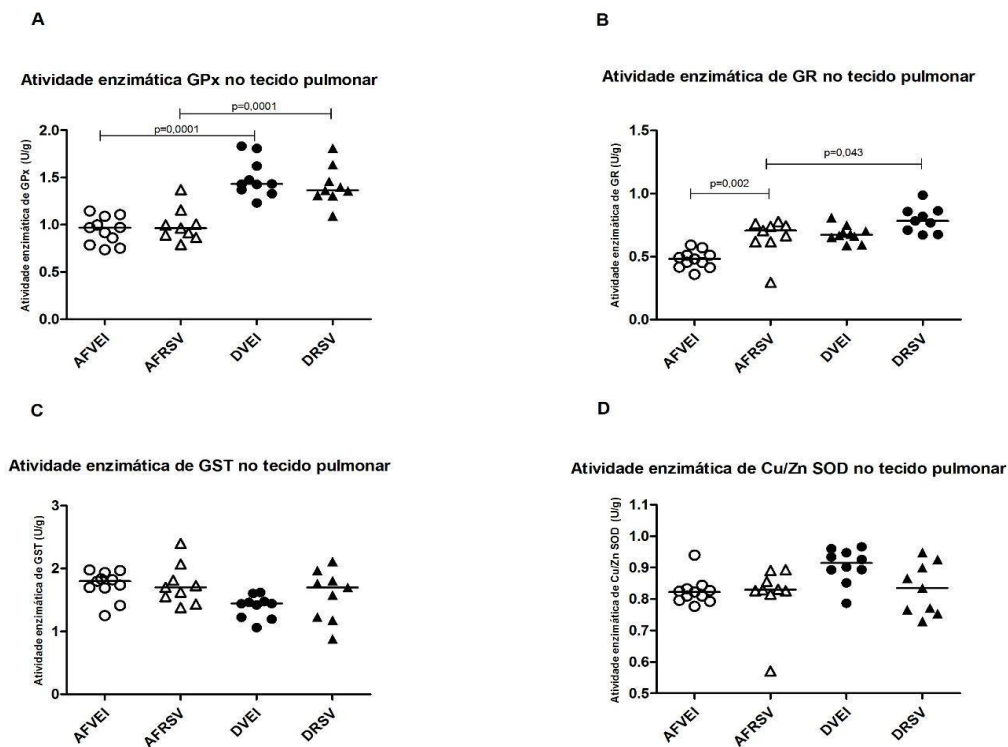
As atividades enzimáticas da glutathiona S-transferase - GST (U/ug de proteína) e da superóxido dismutase cobre-zinco - Cu/Zn SOD (U/ug de proteína) não apresentaram alterações significativas entre os grupos. Os valores de média, mediana, desvio padrão ou intervalo interquartil são apresentados na tabela 5, anexo B.

A atividade da glutathiona peroxidase – GPx (U/ug de proteína) mostrou-se aumentada nos animais expostos ao diesel e administrados com veículo ($1,49 \pm 0,19$; $p=0,00001$) quando comparado com os animais expostos ao ar filtrado e administrado com veículo ($0,93 \pm 0,14$). Além disso, os animais expostos ao diesel

e administrado com resveratrol mostraram aumento ($1,41 \pm 0,20$; $p=0,0001$) quando comparados aos animais expostos ao ar filtrado administrados com resveratrol ($0,99 \pm 0,17$).

A atividade da glutatona redutase - GR (U/ug de proteína) mostrou-se aumentada nos animais expostos ao ar filtrado e administrado com resveratrol ($0,70$ ($0,13$); $p=0,002$) em relação aos animais expostos ao ar filtrado administrados com veículo ($0,48$ ($0,09$)). Houve ainda, aumento na atividade de GR nos animais expostos ao diesel administrados com resveratrol ($0,78$ ($0,16$); $p=0,043$) em relação aos animais expostos ao ar filtrado administrado com resveratrol ($0,70$ ($0,13$)).

Gráfico 6: Representação gráfica: (A) Atividade enzimática de GPx; (B) Atividade enzimática de GR; (C) Atividade enzimática GST e (D) Atividade enzimática Cu/Zn SOD no tecido pulmonar.

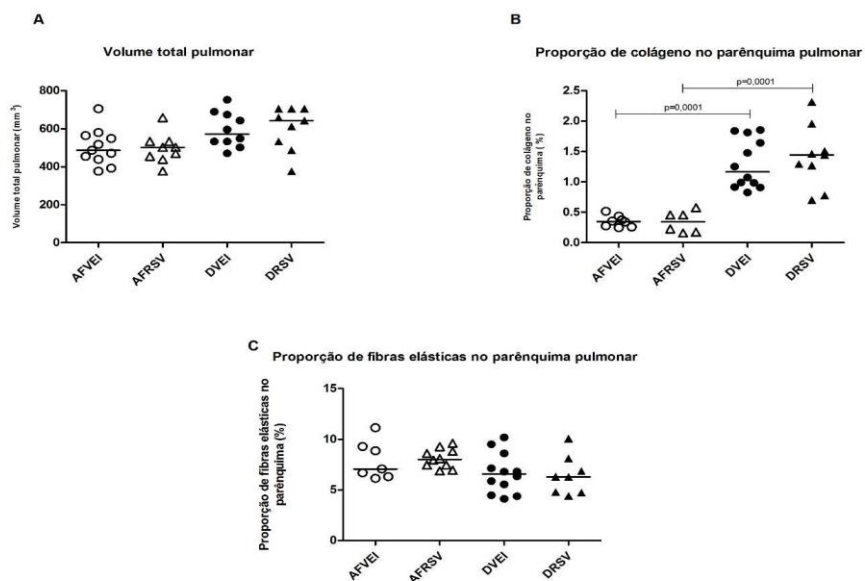


5.6 Análises morfológicas e remodelamento pulmonar

O volume pulmonar (mm^3) e proporção de densidade das fibras elásticas por área de tecido no parênquima pulmonar (%) não apresentaram alterações significativas. Os valores de média, mediana, desvio padrão ou intervalo interquartil são apresentados na tabela 5, anexo B.

A proporção de densidade de colágeno por área de tecido no parênquima pulmonar (%) mostrou-se aumentada nos animais expostos ao diesel e administrado com veículo ($1,29 \pm 0,40$; $p=0,0001$) em relação aos animais expostos ao ar filtrado e administrados com veículo ($0,35 \pm 0,09$). Houve ainda, aumento na densidade de colágeno no parênquima pulmonar nos animais expostos ao diesel e administrado com resveratrol ($1,42 \pm 0,50$; $p=0,0001$) quando comparados com os animais expostos ao ar filtrado e administrados com resveratrol ($0,31 \pm 0,18$).

Gráfico 7: Representação gráfica: (A) Volume total pulmonar; (B) Proporção de colágeno no parênquima pulmonar e (C) Proporção de fibras elásticas no parênquima pulmonar.



5.7 Histopatológico

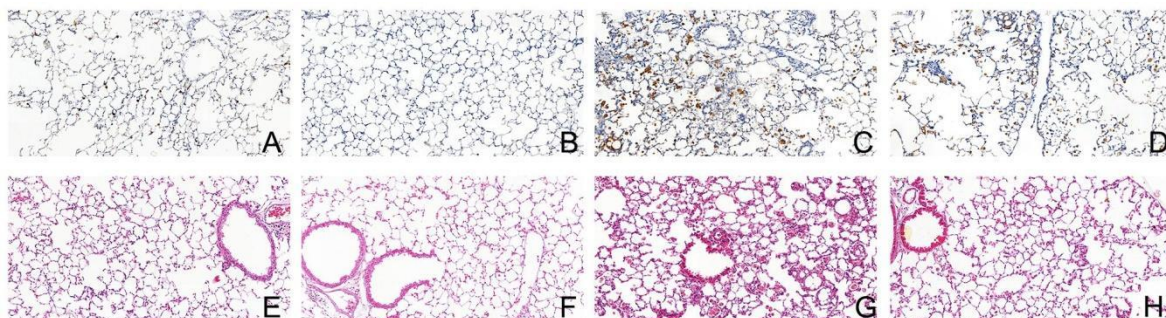


Figura 7: Fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar (*Imunohistoquímica* MAC2 e *H&E*). **MAC2:** **A:** grupo ar filtrado e veículo (10x); **B:** grupo ar filtrado e resveratrol (10x); **C:** grupo diesel e veículo (10x) e **D:** grupo diesel e resveratrol (10x). **H&E:** **E:** grupo ar filtrado e veículo (10x); **F:** grupo ar filtrado e resveratrol (10x); **G:** grupo diesel e veículo (10x) e **H:** grupo diesel e resveratrol (10x).

Os animais idosos que receberam ar filtrado e veículo ou resveratrol não apresentaram alterações pronunciadas na densidade de macrófagos alveolares (Fig1A e B). No entanto, quando expostos ao DE mostraram aumento no influxo de MAC2 (Fig. 1C). A administração do resveratrol diminui a densidade de macrófagos no parênquima desses animais (Fig1D). Conforme mostrado na (Fig1E e F) os animais idosos apresentaram discreto espessamento do septo, alargamento do espaço alveolar do septo e discreto influxo de macrófagos, características explanadas anteriormente nesse modelo de envelhecimento pulmonar (Ribeiro et al., 2019). As exposições DE cursam com aumento na densidade de MAC2 e espessamento e alargamento septal (Fig1G). O resveratrol atenuou as áreas irregulares de inflamação em todo o parênquima pulmonar dos animais expostos ao DE (Fig1H).

5.8 Análises da expressão proteica das sirtuínas no parênquima pulmonar

A expressão proteica de Sirt1 mostrou-se aumentada nos animais expostos ao ar filtrado e administrados com o resveratrol ($14,23 \pm 2,59$; $p=0,005$) quando comparado com os animais expostos ao ar filtrado com veículo ($10,00 \pm 2,93$). Houve diminuição proteica de Sirt1 nos animais expostos ao diesel e administrados com veículo ($4,85 \pm 1,74$; $p=0,001$) em relação aos animais expostos ao ar filtrado que receberam veículo ($10,00 \pm 2,93$). Observamos também, diminuição nos níveis proteicos de Sirt1 nos animais expostos ao diesel administrados com resveratrol ($4,62 \pm 2,11$; $p=00001$) quando comparado ao grupo ar filtrado administrados com resveratrol ($14,23 \pm 2,59$).

Em contrapartida, a expressão proteica de Sirt2 mostrou-se diminuída nos animais expostos ao ar filtrado e administrado com resveratrol ($8,55 \pm 4,21$; $p=0,009$) em relação aos animais que receberam ar filtrado e administrados com veículo ($14,55 \pm 5,52$). Os animais expostos ao diesel e administrados com veículo evidenciaram diminuição ($0,52 \pm 0,30$; $p=0,001$) quando comparados com os animais que receberam ar filtrado e administrados com veículo ($14,55 \pm 5,52$). Houve ainda, diminuição dos níveis proteicos de Sirt2 nos animais expostos ao diesel administrados com resveratrol ($1,07 \pm 0,62$; $p=0,002$) em relação aos animais que receberam ar filtrado e administrados com resveratrol ($8,55 \pm 4,21$).

A expressão proteica de Sirt6 mostrou-se diminuída nos animais expostos ao diesel e administrado com veículo ($7,68 \pm 3,47$; $p=0,0001$) quando comparados ao grupo exposto ao ar filtrado administrados com veículo ($23,35 \pm 4,16$). Além disso, os animais expostos ao diesel e administrados com resveratrol mostraram diminuição ($9,06 \pm 6,96$; $p=0,0001$) em relação aos animais expostos ao ar filtrado administrados com resveratrol ($24,43 \pm 5,70$).

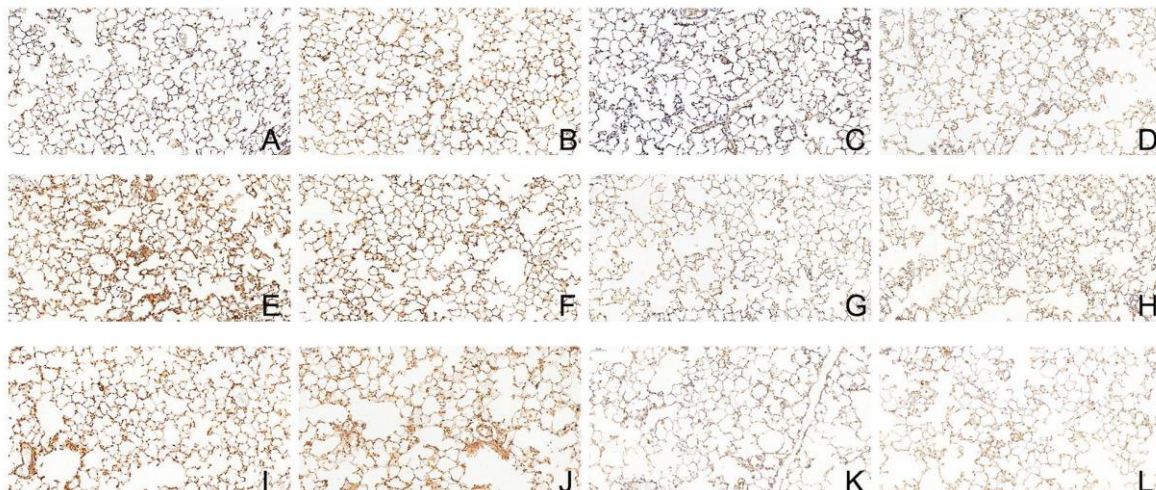


Figura 8: Fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar, imunohistoquímica (**Sirt1:** A-D; **Sirt2** E-H e **Sirt6** I-L. **Fotos:** **A-E-I:** grupo ar filtrado e veículo (10x); **fotos:** **B-F-J:** grupo ar filtrado e resveratrol (10x); **fotos:** **C-G-K:** grupo diesel e veículo (10x) e **fotos** **D-H-L:** grupo diesel e resveratrol (10x).

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, abordamos os potenciais efeitos benéficos do resveratrol nos parâmetros inflamatórios/antioxidantes e na expressão de sirtuínas nos pulmões de camundongos idosos (\pm 15 meses) expostos por 30 dias a DE. A administração de resveratrol nos animais idosos, não expostos, causou aumento na atividade antioxidante pulmonar e na modulação das sirtuínas, no entanto, não observamos esses efeitos nos animais sob o estímulo da exposição do DE. Nesses animais, o resveratrol foi capaz de promover um efeito anti-inflamatório no LBA. No entanto, o conteúdo de colágeno pulmonar não foi afetado pela administração de resveratrol. Segundo nosso conhecimento, nenhum estudo investigou os efeitos do resveratrol no sistema respiratório de camundongos idosos, onde se acredita que as respostas a estressores estejam em declínio (Sunil et al., 2009).

Nossos achados confirmam os efeitos antioxidantes e o aumento na expressão nos níveis de Sirt1 decorrentes da administração de resveratrol (Price et al., 2012; Li et al., 2016), também em animais idosos. Nosso estudo anterior (Ribeiro et al., 2019) e outros (Sunil et al., 2009; Han et al., 2010) mostraram que nos animais idosos as reservas antioxidantes e os níveis de expressão de Sirt1 são reduzidos no tecido pulmonar quando comparamos com camundongos mais jovens. Conseqüentemente, apresentam diferentes respostas ao DE, com alterações estruturais pulmonares severas. Nossos dados atuais sugerem que, diante de estímulos nocivos como o DE, o resveratrol não melhora suficientemente as respostas antioxidantes nos animais mais velhos que já apresentam reservas diminuídas. Nesse sentido, Santos et al (2023) mostraram que em células

mononucleares do sangue periférico humano, o resveratrol teve seus mecanismos protetores antioxidantes e anti-inflamatórios diminuídos no envelhecimento.

Outros estudos abordando os efeitos do resveratrol no envelhecimento pulmonar experimentaram animais mais jovens ou modelos de envelhecimento prematuro. Navarro et al., (2017) avaliaram o envelhecimento pulmonar prematuro em camundongos modelo *Terc^{-/-}* com 2 meses de idade. A administração de resveratrol retardou a deterioração da função pulmonar, manteve a integridade estrutural pulmonar e bloqueou dano ao DNA em células parenquimatosas. Além disso, a expressão de Sirt1 estabilizou a biogênese mitocondrial, modulando a resposta apoptótica e as vias de sobrevivência celular.

Yan et al, (2016) expuseram ratos machos de oito semanas de idade a partículas ambientais artificiais (reproduzindo as partículas encontradas na atmosfera de Pequim/China) e mostraram que a administração de resveratrol impediu o declínio da função pulmonar, reduziu o dano oxidativo, diminuiu espessamento intersticial e o infiltrado de macrófagos e linfócitos no tecido pulmonar. Ding et al., (2019) mostraram que o resveratrol foi capaz de diminuir os níveis de IL-1 β , IL-6, TNF- α no LBA, inibir o NLR 3, atenuar o processo fibrótico no tecido pulmonar e diminuir a atividade da caspase-1 em camundongos (6 semanas de idade, expostos às concentrações médias de material particulado PM_{2,5} (131,99 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) e PM₁₀ (192,16 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), 6h/dia por 7 dias/semana, durante 5 meses. Em nosso estudo, apenas efeitos anti-inflamatórios foram observados, por uma diminuição na inflamação do LBA induzida pela DE.

No nosso modelo, não observamos efeitos do resveratrol sobre o conteúdo de colágeno pulmonar. O aumento do conteúdo de colágeno nos animais expostos ao

DE e também nos animais não expostos, não alteraram com a administração do Resveratrol. Ao contrário dos nossos achados, Ding et al. (2019) mostraram diminuição na formação de fibrose pulmonar induzida por DE em camundongos de 6 semanas de idade pela administração de resveratrol. Sabe-se que camundongos idosos apresentam mais colágeno nos pulmões do que camundongos mais jovens (Samuel et al., 2003; Ribeiro et al., 2019). Portanto, possivelmente os efeitos dessa molécula sejam mais pronunciados no processo de formação de fibrose do que na reversão da deposição de colágeno estabelecida (Ding et al. 2019). Nesse sentido, Ritzenthaler et al., (2022) demonstraram que fibroblastos pulmonares de camundongos de 24 meses de idade, que apresentam fenótipo pró-fibrótico, também apresentam respostas alteradas na regulação do estado redox, o que explicaria a falta de resposta ao resveratrol.

Estudos anteriores indicando os efeitos do resveratrol na ativação do inflamassoma NLRP3 como mediador da fibrose pulmonar foram realizados apenas em animais mais jovens (Zhang et al. 2015; Jiang et al., 2016). Seria interessante verificar os efeitos do resveratrol em camundongos idosos que se apresentam com hiper-ativação do Inflammasome NLRP3 induzida pela idade (Lara et al., 2020).

Os efeitos observados na diminuição da inflamação pulmonar podem ser justificados pelo efeito direto do resveratrol como antioxidante. Devido aos seus anéis fenólicos, o resveratrol atua como um eliminador de vários oxidantes, como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, hidroxila radical, oxigênio singleto, óxido de nitrogênio e peroxinitrito. Além disso, na presença de metais no sistema, como nas partículas de diesel, o resveratrol pode atuar como um quelante, abolindo a oxidação induzida por metais (Jia et al., 2008; Truong et al., 2018).

Nossos dados mostraram resultados divergentes em relação aos níveis de proteína sirtuína pulmonar após a administração de resveratrol. A administração de RSV foi associada a aumento dos níveis de Sirt1, mas diminuição dos níveis de Sirt2, sem alterações em Sirt 6. O papel de Sirt2 em doenças pulmonares é menos conhecido do que o de Sirt1. Estudos anteriores mostraram efeitos pró-inflamatórios de Sirt2 em modelos de inflamação alérgica e sepse. (Lee et al., 2019; Zhao et al., 2015). A maioria dos estudos indica que o resveratrol aumenta os níveis de Sirt1 (Rieder et al., 2012; Li et al., 2013; Li et al., 2016), mas também pode diminuir os níveis de sirtuína por meio da indução da senescência celular (Eren et al., 2015) dose dependente. Ainda não está claro se a diminuição nos níveis de Sirt2 contribuiu especificamente para os efeitos anti-inflamatórios observados no líquido LBA.

Algumas limitações deste estudo incluem a ausência de um grupo de animais mais jovens. No entanto, descrevemos os efeitos da exposição a DE em camundongos idosos em um estudo anterior usando o mesmo modelo de exposição, comparando com animais mais jovens, mostrando alterações relacionadas ao envelhecimento e resposta de DE em animais, da mesma idade dos usados neste modelo em comparação com animais mais jovens (Ribeiro et al., 2019). Teria sido interessante abordar os diferentes mecanismos pelos quais o resveratrol induz alterações, como a senescência celular.

7. CONCLUSÃO

A partir deste estudo é possível concluir que o resveratrol atenuou parcialmente as respostas inflamatórias nos pulmões dos camundongos idosos de exaustão de DE e não modulou a atividade antioxidante, a expressão das sirtuínas ou colágeno pulmonar após o estímulo nocivo. Esses dados sugerem que a suplementação de resveratrol, embora atue no retardo do processo de envelhecimento pulmonar, tem efeitos limitados no pulmão senil.

8.ANEXOS

Anexo A : Aprovação da Comissão de Ética no uso de animais



Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos do Resveratrol no pulmão de camundongos idosos expostos a exaustão do motor a diesel", registrada com o nº 093/17, sob a responsabilidade de Thais Mauad e Gabriel Ribeiro Júnior, apresentada pelo Departamento de Patologia - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 05.07.17

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 25-06-2017 Término: 25-05-2021
Espécie/linhagem/raça	material coletado
Nº de animais	Não se aplica
Peso/Idade	Não se aplica
Sexo	Não se aplica
Origem	Não se aplica

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 05 de Julho de 2017

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

Anexo B : Tabela 5 – Resultados não significativos. Apresentado em média, desvio padrão, mediana e intervalo interquartil dos grupos: idoso ar filtrado veículo (AFVEI); idoso ar filtrado resveratrol (AFRSV); idoso exposto veículo (DVEI) e idoso exposto resveratrol (DRSV).

VARIÁVEIS	AFVEI	AFRSV	DVEI	DRSV
Peso do animal	36,0 (2)	34,0 (3)	34,0 (2,2)	34,0 (3)
IL-1 β soro	2,08 \pm 0,53	2,08 \pm 0,51	2,08 \pm 0,53	2,08 \pm 0,51
IL-2 soro	<LD	<LD	<LD	<LD
IL-2 BAL	2,53 \pm 6,59	2,53 \pm 6,59	2,53 \pm 6,59	2,53 \pm 6,59
IL-5 soro	0,90 (0,0)	0,90 (0,0)	0,90 (2,2)	0,90 (2,2)
IL-5 BALF	<LD	<LD	<LD	<LD
IL-6 BALF	1,40 (0,0)	2,02 (2,2)	9,14 (17,8)	6,41(13,2)
IL-17 soro	0,95 (0,40)	0,95 (1,56)	0,95 (1,13)	2,83 (1,44)
IL-17 BALF	1,85 \pm 2,56	1,85 \pm 2,56	1,85 \pm 2,56	1,85 \pm 2,56
TNF soro	27,67 (17,7)	32,67 (35,69)	22,97 (21,38)	18,87 (22,20)
TNF-BALF	2,80 (0,0)	2,80 (4,0)	2,80 (4,0)	2,80 (0,0)
IFN γ -soro	<LD	<LD	<LD	<LD
IFN γ -BALF	<LD	<LD	<LD	<LD
Fibras elásticas parênquima	7,19 \pm 3,12	8,10 \pm 0,94	6,65 \pm 1,97	6,44 \pm 1,92
KC-soro	11,21 \pm 6,86	4,74 \pm 4,62	9,82 \pm 9,36	14,27 \pm 7,30
GST	1,50 \pm 0,40	1,61 \pm 0,18	1,68 \pm 0,34	1,46 \pm 0,33
Cu/Zn SOD	0,82 (0,04)	0,83 (0,05)	0,91 (0,06)	0,83 (0,15)

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alvarez MV, Moreira MR, Ponce A. Antiquorum sensing and antimicrobial activity of natural agents with potential use in food. *J. Food Saf.* 2012; 32(3): 379–387.
2. Anver MR, Haines DCH. Gerontology. In: Hedrich Hans. The Laboratory Mouse. Edited by Series editors: Gillian Bullock & Peter Petruz. Elsevier. 2004; 322-343.
3. Ardestani PM and Liang F. Sub-cellular localization, expression and functions of Sirt6 during the cell cycle in HeLa cells. *Nucleus.* 2012; 3(5):442-51.
4. Araújo-Jorge TC, Cotta-de-Almeida V, Olivieri BP, Henriques-Pons A. Preparo de células para Avaliação de Parâmetros Inflamatórios e Imunológicos. In: Araújo-Jorge TC, Castro SL. Doenças de chagas: manual para experimentação animal. Rio de Janeiro. Fiocruz; 2000. P.253. Disponível em: <http://static.scielo.org/scielobooks/cdbjg/pdf/araujo-9788575413937.pdf>.
5. Bai W and Zhang X. Nucleus or cytoplasm? The mysterious case of SIRT1's subcellular localization. *Cell Cycle News & Views.* 2016; 15(24); 3337–3338.
6. Bates David V. The Effects of Air Pollution on Children. *Environmental Health Perspectives.* 1995; 6(103): 49-53.
7. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature.* 2006.16; 444 (7117):337-42.

8. Behnding 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; 27:359-65.
9. Beutler E, Kuhl W. Limiting role of 6-phosphogluconolactonase in erythrocyte hexose monophosphate pathway metabolism. *J Lab Clin Med*. 1985; 106 (5):573-7.
10. Boutayeb A and Boutayeb S. The burden of non-communicable diseases in developing countries. *International Journal for Equity in Health*. 2005; 4(2):1-8.
11. 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.
12. Brito PM., Mariano A., Almeida LM. Dinis TC. Resveratrol affords protection against peroxynitrite-mediated endothelial cell death: A role for intracellular glutathione. *Chem.Biol Interact*. 2006; 164:157-166.
13. Brook RD, Rajagopalan S. Particulate matter, air pollution, and blood pressure. *Journal of the American Society of Hypertension*. 2009; 3(5): 332-350.
14. Cao Z. and Li Y. Potent induction of cellular antioxidants and phase 2 enzymes by resveratrol in cardiomyocytes: protection against oxidative and electrophilic injury. *Eur J Pharmacol*. 2004; 489:39-48.
15. Careri M.; Corradini C; Elvir L; Nicolletti I; Zagnnoni I. Direct HPLC analysis of quercetin and trans-resveratrol in red wine, grape, and winemaking by products. *J Agric Food Chem*. 2003; 51: 5226-5231.

16. Carvalho JAM, Garcia RA. O Envelhecimento da população Brasileira: um enfoque demográfico. *Cad. Saúde Pública*. 2003; 19 (3): 725-33.
17. CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Proconve – Emissão Veicular; 2023. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/veicular/proconve/>.
18. CONAMA/DOU N°18/1986
19. Cory H, Passarelli S, Szeto J, Tamez M, Mattei J. The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. *Front Nutr*. 2018; 21;5:87.
20. Chen, W.; Yeo, S.C.M. Elhennawy, M.G.A.A.; Lin, H-S. Oxyresveratrol: A bioavailable dietary polyphenol. *J. of Func. Foods*. 2016; 22:122-131.
21. Chen D, Steele AD, Lindquist S, Guarente L: Increase in activity during calorie restriction requires SirT1. *Science*. 2005; 310 (5754):1641.
22. Chiou, YS, Tsai ML, Nagabhushanam K, Wang YJ, Wu CH, Ho CT, and Pan MH. Pterostilbene Is More Potent than Resveratrol in Preventing Azoxymethane (AOM)-Induced Colon Tumorigenesis via Activation of the NF-E2-Related Factor 2 (Nrf2). Mediated Antioxidant Signaling Pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011, 59(6); 2725–2733.
23. 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.
24. Das DK; Maulik N. Resveratrol in cardioprotection: a therapeutic promise of alternative medicine. *Molecular interventions*. 2007; 6:36-47.

25. DENATRAN – Radar SEADE – Uma visão das estatísticas de São Paulo em alguns segundos – A Frota de veículos no Estado de São Paulo.2015; 4.1:4. Disponível: <http://www.imp.seade.gov.br/frontend/>. Acessado em: 07/03/2021.
26. Ding S, Wang H, Wang M, Bai L, Yu P and Wu W. Resveratrol alleviates chronic “real-world” ambient particulate matter induced lung inflammation and fibrosis by inhibiting NLRP3 inflammasome activation in mice. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2019; 182: 1-9; 109425.
27. 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.
28. Eren MK, Kilincli A and Eren Ö. Resveratrol Induced Premature Senescence Is Associated with DNA Damage Mediated SIRT1 and SIRT2 Down-Regulation. *PLoS One*. 2015; 29; 10(4):e0124837.
29. Fiore AM, Naik V, Spracklen DV, Steiner A, Unger N, Prather M, Bergmann D, Cameron-Smith PJ, Cionni I, Collins WJ,Dalsøren S, Eyring V, Folberth GA, Ginoux P, Horowitz LW, Josse B, Lamarque JF, MacKenzie IA, Nagashima T, O'Connor FM, Righi M, Rumbold ST, Shindell DT, Skeie RB, Sudo K, Szopa Takemura T and Zeng G. Global air quality and climate. *Chem Soc Rev*. 2012; 7; 41(19):6663-83.
30. Fischer P, Hoek G, Brunekreef B,Verhoeff A and Wijnen van J. Air pollution and mortality in The Netherlands: are the elderly more at risk? *Eur Respir J Suppl*. 2003; 40:34s-38s.
31. Flohé L and Otting F. Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol*.1984; 105:93-104.
32. Francioso A, Mastromarinob P, Mascia A, d’Ermea M and Mosca L. Chemistry, Stability and Bioavailability of Resveratrol. *Medicinal Chemistry*. 2014; 10: 237-245.

33. Frankel EN, Waterhouse AL, Kinsella JE. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet*. 1993; 341 (8852):1103–1104.
34. Gao X, Xu YX, Janakiraman N, Chapman RA e Gautam SC. Immunomodulatory activity of resveratrol: suppression of lymphocyte proliferation, development of cell-mediated cytotoxicity, and cytokine production. *Biochem Pharmacol*. 2001; 62:1299-1308.
35. Grabowska W, Sikora E and Zmijewska AB. Sirtuins, a promising target in slowing down the ageing process. *Biogerontology*. 2017; 18(4):447-476.
36. Gürbüz O, Göçmen D, Dağdelen F, Gürsoy M, Aydın S, Şahin I, Büyükuysal L and Usta M. Determination of flavan-3-ols and trans-resveratrol in grapes and wine using HPLC with fluorescence detection. *Food Chemistry*. 2007; 100(2): 518-525.
37. Haigis MC, Sinclair DA. Mammalian Sirtuins: Biological Insights and Disease Relevance. *Annu Rev Pathol*. 2010; 5:253-295.
38. Hanzlíková IK, Melzoch K, Filip V, Smidrkal J. Rapid method for resveratrol, determination by HPLC with electrochemical and UV detections in wines. *Food Chem*. 2004; 87; 151-158.
39. 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 Research*. 2010; 38(21): 7458–7471.
40. Hasegawa K; Wakino S; Simic P; Sakamaki Y; Minakuchi H; Fujimura K; Hosoya K; Komatsu M; Kaneko Y; Kanda T; Kubota E; Tokuyama H; Hayashi K; Guarente L and Itoh H. Renal tubular Sirt1 attenuates diabetic albuminuria by epigenetically suppressing Claudin-1 overexpression in podocytes. *Nature Medicine*. 2013; 19: 1496–1504.
41. Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B and Sinclair DA. Small molecule

activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*. 2003; 425: 191–196.

42. Hu Y, Rahlfs S, Sundermann VM, and Becker K. Resveratrol modulates mRNA transcripts of genes related to redox metabolism and cell proliferation in non-small-cell lung carcinoma cells. *Biol Chem*. 2007; 388; 207–219.

43. Jia Z , Zhu H, Misra BR, Mahaney JE, Li Y and Misra HP. EPR studies on the superoxide-scavenging capacity of the nutraceutical resveratrol. *Mol Cell Biochem*. 2008; 313(1-2):187-94.

44. Jiang L, Zhang L, Kang K, Fei D, Gong R, Cao Y, Pan S, Zhao M, Mingyan Zhao MD. Resveratrol ameliorates LPS-induced acute lung injury via NLRP3 inflammasome modulation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2016;84: 130-138.

45. Kawahara TLA, Michishita E, Adler AS, Damian M, Berber E, Lin M, McCord RA, Ongaigui KCL, Boxer LD, Chang HY and Chua KF. SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF-kappaB-dependent gene expression and organismal life span. *Cell*. 2009. 9; 136 (1):62-74.

46. Langcake, P; Pryce, RJ. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol Plant Pathol*. 1976; 9:77-86.

47. Lara PC, Verde MD, Burgos-Burgos J. Age-induced NLRP3 Inflammasome Over-activation Increases Lethality of SARS-CoV-2 Pneumonia in Elderly Patients. *Aging Dis*. 2020; 23; 11(4):756-762.

48. Lee YG, Reader BF, Herman D, Streicher A, Englert JA, Ziegler M, Chung S, Karpurapu M, Park GY, Christman JW and Ballinger MN. Sirtuin 2 enhances allergic asthmatic inflammation. *JCI Insight*. 2019; 4(4); e124710.

49. Lepeule J, Bind MAC, Baccarelli AA, Koutrakis P, Tarantini L, Litonjua A, SparrowD, Vokonas P, Schwartz JD. Epigenetic influences on associations

between air pollutants and lung function in elderly men: the Normative Aging Study. *Environ Health Perspect.* 2014a; 122:566–572.

50. 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(b); 190(5): 542-48.

51. Levitzky MG. Fisiologia Pulmonar. Rio de Janeiro. Ventilação alveolar. *McGraw Hill Interamericana Editores, AS.* 2009; (7): 81-85.

52. Li S, Zhao G, Chen L, Ding Y, Lian J, Hong G and Lu Z. Resveratrol protects mice from paraquat-induced lung injury: The important role of SIRT1 and NRF2 antioxidant pathways. *Molecular Medicine Reports.* 2016; 13: 1833-1838.

53. Li T, Zhang J, Feng J, Li Q, Wu L, Ye Q, Sun J, Lin Y, Zhang M, Huang R, Cheng J, Cao Y, Xiang G, Zhang J and Wu Q. Resveratrol reduces acute lung injury in a LPS induced sepsis mouse model via activation of Sirt1. *Mol. Med. Rep.* 2013: 7, 1889-1895.

54. Lodhi A, Ghauri B, Khan MR, Rahman S and Shafique S. Particulate matter (PM_{2.5}) concentration and source apportionment in lahore. *J. Braz. Chem. Soc;* 2009. 20(10); 1811-1820.

55. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004; 79(5):727-47.

56. Manisalidis I, Stavropoulou E, Stavropoulou A and Bezirtzoglous E. Environmental and Health Impacts of Air Pollution: A Review. *Front Public Health-Sec Environmental health and Exposome.* 2020. 8: 1-13.

57. Maresova P, Javanmardi E, Barakovic S, Husic JB, Tomsone S, Kreicar O and Kuca K. Consequences of chronic diseases and other limitations associated with old age – a scoping review. *BMC Public Health.* 2019; 19(1431).

58. Matsumori LY; Nakayama YH; Osaki M; Kojima H; Kurimasa A; Ito H; Mori S; Katoh M; Oshimura M and Inoue T. SIRT2 down-regulation in HeLa can induce p53 accumulation via p38 MAPK activation-dependent p300 decrease, eventually leading to apoptosis. *Genes Cells*. 2011; 16: 34–45.
59. Meng X, Maliakal P, Lu H, Lee MJ, Yang CS. Urinary and plasma levels of resveratrol and quercetin in humans, mice, and rats after ingestion of pure compounds and grape juice. *J Agric Food Chem*. 2004; 52:935– 42.
60. Merksamer PI; Liu Y; He W; Hirschey MD; Chen D and Verdin E. The sirtuins, oxidative stress and aging: an emerging link. *Aging*. 2013; (5):3:144-150.
61. Miller J, Du L and Façanha C. Vehicle and Fuel Standards can dramatically reduce air pollution in Brazil, São Paulo's air Quality Data. The International Council on Clean Transportatio (ICCT). [cited 2013 Fev 06] Available from: <https://theicct.org/vehicle-and-fuel-standards-can-dramatically-reduce-air-pollution-in-brazil-sao-paulos-air-quality-data-demonstrate/>.
62. Moores FC. Climate change and air pollution: exploring the synergies and potential for mitigation in industrializing countries. *Sustainability*. (2009) 1:43–54.
63. Mostoslavsky R; Chua KF; Lombard DB; Wendy WBD; Miriam RP; Gellon FL; Liu P; Mostoslavsky G; Michael MSF; Kevin DM; Patel MP; Hsu JT; Hong AL; Ford E; Cheng HL; Kennedy C; Nunez N; Bronson R; Frenthewey D; Auerbach W; Valenzuela D; Karow M; Hottiger MO; Hursting S; Barrett JC; Guarente L; Mulligan R; Demple B; Yancopoulos GD and Frederick W. Genomic Instability and Aging-like Phenotype in the Absence of Mammalian SIRT6. *Cell*. 2006; 124(2): 315–329.
64. Morgan MJ and Liu ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Research*. 2011. 21; 103–115.
65. McCord JM and Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem*. 1969; 244(22):6049-55.

66. Navarro S, Reddy R, Lee J, Warburton D, Driscoll B. Inhaled resveratrol treatments slow ageing-related degenerative changes in mouse lung. *Thorax*. 2017; 72: 451–459.
67. North B and Verdin E. Interphase nucleo-cytoplasmic shuttling and localization of SIRT2 during mitosis. *PLoS One*. 2007; 2(8):e784.
68. OECD. Organisation for Economic Co-Operation and Development. Environmental Outlook to 2050: The Consequences of Inaction. 2012: Acessado em: 22/02/2023 em: <https://www.oecd.org/environment/indicators-modelling-outlooks/49928853.pdf>.
69. 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; Jing Qu J; Tang F & Hui Liu G. SIRT6 safeguards human mesenchymal stem cells from oxidative stress by coactivating NRF2. *Cell Research*. 2016, 26; 190–205.
70. Park SJ, Ahmad F, Philp A, Baar K, , Williams T, Luo H, Ke H, Rehmann H, Taussig R, Brown AL, Kim MK, Beaven MA, Burgin AB, Manganiello V, Chung JH. Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. *Cell*. 2012; 148(3):421-33.
71. Pendurthi UR., Williams JT and Rao LV. Resveratrol, a polyphenolic compound found in wine, inhibits tissue factor expression in vascular cells: A possible mechanism for the cardiovascular benefits associated with moderate consumption of wine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999; 19:419-426.
72. Pierre J ST, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jager S, Handschin C, Zheng K, Lin J, Yang W, Simon DK, Bachoo R and Spiegelman BM. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell*. 2006. 127; 397-408.

73. Pope CA. Epidemiology of fine particulate air pollution and human health: biologic mechanism and Who's at risk? *Environ Health Perspect.* 2000; 108 (4): 713-723.
74. Price NL, Gomes AP, Ling AJY, Duarte FV, Martin-Montalvo A, North BJ, Agarwal B, Ye L, Ramadori G, Teodoro JS, Hubbard BP, Varela AT, Davis JG; Varamini B, Hafner A, Moaddel R, Rolo AP, Coppari R, Palmeira CM, Cabo R, Baur JA and Sinclair DA. SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell Metab.* 2012; 2; 15(5):675-90.
75. Ren Z, He H, Zuo Z, Xu Z, Wei & Z, Deng J. The role of different SIRT1-mediated signaling pathways in toxic injury. *Cellular & Molecular Biology Letters.* 2019; 24: 1-36.
76. Ribeiro Júnior G, de Souza Xavier Costa N, Belotti L, Dos Santos Alemany AA, Amato-Lourenço LF, da Cunha PG, de Oliveira Duro S, Ribeiro SP, Veras MM, Quirino Dos Santos Lopes FDT, Marcourakis T, Nascimento Saldiva PH, Poliselli Farsky SH, Mauad T. Diesel exhaust exposure intensifies inflammatory and structural changes associated with lung aging in mice. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2019. 15;170:314-323.
77. Rieder SA, Nagarkatti P and Nagarkatti M. Multiple anti-inflammatory pathways triggered by resveratrol lead to amelioration of staphylococcal enterotoxin-induced lung injury. *British Journal of Pharmacology.* 2012; 167; 1244–1258
78. Riedl M, Sanchez DD. Biology of diesel exhaust effects on respiratory function. *J Allergy Clin Immunol.* 2005; 8:115-221.
79. Ritzenthaler JD; Gonzalez TE; Zheng Y; Zelko IN; Berkel VV; Nunley DR; Kidane B; Halayko AJ; Summer R; Watson WH and Roman J. The pro-fibrotic and senescence phenotype of old lung fibroblasts is reversed or ameliorated by genetic and pharmacological manipulation of Slc7a11 expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2022; 322(3):449-461.

80. Rothgiesser KM, Erener S, Waibel S, Luscher B, Hottiger MO. SIRT2 regulates NF- κ B dependent gene expression through deacetylation of p65 Lys310. *J. Cell Sci.* 2010; 123:4251–4258.
81. Sacks JD, Stanek LW, Luben TJ, Johns DO, Buckley BJ, Brown JS, Ross. Particulate Matter-induced health effects: who is susceptible? *Environ Health Perspect.* 2011; 119(4):446–454.
82. Saldiva PHN, Pope AC 3rd, Schwartz J, Dockery DW, Lichtenfels AJ, Salge JM, Barone I, Bohm GM. Air pollution and mortality in elderly people: a time-series study in São Paulo, Brazil. *Arch Environ Health.* 1995; 50:159–63.
83. 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.
84. Samuel CS, Zhao C, Bathgate RAD, BondCP, Matthew DÜ, á Laura JB, Parry, Summers RJ, á Mimi LK, Tang Edward PÜ . Amento,ß and Tregear GW. Relaxin deficiency in mice is associated with an age related progression of pulmonary fibrosis. *The FASEB Journal.* 2003: 17(1); 121-123.
85. Santos MA, Franco FN, Caldeira CA, de Araújo GR, Vieira A, Chaves MM. Resveratrol has its antioxidant and anti-inflammatory protective mechanisms decreased in aging. *Arch Gerontol Geriatr.* 2023; 5(107):104895
86. Seukep JA, Sandjo LP, Ngadjui BT, Kuete V. Antibacterial and antibioticresistance modifying activity of the extracts and compounds from *Nauclea pobeguinii* against gram-negative multi-drug resistant phenotypes. *BMC Complement. Altern. Med.* 16 (1) (2016) 1–8.
87. Signorelli P and Ghidoni R. Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 2005; 16:449 – 466.

88. Simoni M, Baldacci S, Maio S, Cerrai S, Sarno G and Viegi G. Adverse effects of outdoor pollution in the elderly. *J Thorac Dis.* 2015;7(1):34-45.
89. Singh CK; Chhabra G; Ndiaye MA, Garcia-Peterson LM, Mack NJ and Ahmad N. The Role of Sirtuins in Antioxidant and Redox Signaling. *Antioxidants & Redox Signaling.* 2018; 28(8); 643-661.
90. Soleas GJ, Angelini M, Grass L, Diamandis EP, Goldberg DM. Absorption of trans-resveratrol in rats. *Methods Enzymol.* 2001; 335:145– 54.
91. Souza JAG, Antônio, Iglesias CRG. Trauma no idoso. *Rev Assoc Med Bras.* 2002; 48(1): 79-86.
92. 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.
93. Sussan ZJ, Storms DH, Newman, John W, Pedersen TL, Keen CL, Ducore JM. Resveratrol given intraperitoneally does not inhibit the growth of high-risk t(4;11) acute lymphoblastic leukemia cells in a NOD/SCID mouse model. *International Journal of Oncology.* 2012; 40: 1277-1284.
94. Sharma G, Goodwin J. Effect of aging on respiratory system physiology and immunology. *Clinical Interventions in Aging.* 2006; 1(3): 253–260.
95. 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.
96. Smoliga J and Blanchard O. Enhancing the Delivery of Resveratrol in Humans: If Low Bioavailability is the Problem, What is the Solution? *Molecules.* 2014; 19(11): 17154-17172.

97. Shumake K, Sacks JD, Lee J S and Johns D. Susceptibility of older adults to health effects induced by ambient air pollutants regulated by the European Union and The United States. *Aging Clin Exp Res*. 2013; 15(1); 3-8.
98. Szkudelska and Szkudelski T. Resveratrol, obesity and diabetes, *Eur. J. Pharmacol*. 2010; 635 (1); 1–8.
99. Tan LBS, Wang W, He GBS, Rork D. Kuick MA, Gossner GMD, Kueck ASMD, Wahl HMD, Opirari AWMD, Liu RMD. Resveratrol inhibits ovarian tumor growth in an in vivo mouse model. *Cancer*. 2015; 1: 722-729.
100. Taylor DM; Maxwell MM; Luthi-Carter R; Kazantsev AG. Biological and potential therapeutic roles of sirtuin deacetylases. *Cell Mol Life Sci*. 2008; 65(24); 4000-18.
101. Tedesco I, Russo M, Russo P, Iacomino G, Russo GL, Carraturo A, Faruolo C, Moio L, Palumbo R. Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells. *J Nutr Biochem*. 2000; 11(2):114-9.
102. Tennen RI, and Chua KF. Chromatin regulation and genome maintenance by mammalian SIRT6. *Trends in Biochemical Sciences*. 2011; 36(1):39–46.
103. Timmers S, Konings E, Billet L, Houtkoope RR, Weijer TW, Goossen GH, Hoeks J, Krieken S, Ryu D, Kerten S, Moonen-Kornips E, Hesselink MKC, Kunz I, Hinderling VBS, Blaak EE, Auwerx J, Schrauwen P. Calorie Restriction-like Effects of 30 Days of Resveratrol Supplementation on Energy Metabolism and Metabolic Profile in Obese Humans. *Cell Metabolism*. 2011; 14 (5): 612-622.
104. Trela BC, Waterhouse AL. Resveratrol: Isomeric molar absorptivities and stability. *J. Agr. Food Chem*. 1996; 44:1253-1257.
105. Truong VL, Jun M and Jeong WS. Role of resveratrol in regulation of cellular defense systems against oxidative stress. *Biofactors*. 2018; 44(1):36-49.

106. Tseng FJ, Lin GJ, Chen YW, Lee HS, Sytwu HK, Chia WT. Knee joint injection resveratrol amelioration inflammation in collagen antibody induced arthritis. *J Med Sci.* 2019; 39:223-30.
107. United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2013). *World Population Ageing 2013*. ST/ESA/SER.A/348. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4311079/pdf/jtd-07-01-034.pdf>.
108. Vitrac X, Desmoulière A, Brouillaud B. Distribution of [14C] Trans-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration. *L. Sci.* 2003; 72: 2219–2233.
109. Xiao C, Wang R, Lahusen TJ; et al., “Progression of chronic liver inflammation and fibrosis driven by activation of c-JUN signaling in Sirt6 mutant mice,” *The Journal of Biological Chemistry.* 2012; 287(50): 41903–41913.
110. Yan Xiao-Dan, Wang Qi-Ming, Tie Cai , Jin Hong-Tao, Han Yan-Xing, Zhang Jin-Lan, Yu Xiao-Ming, Hou Qi, Zhang Piao-Piao, Wang Ai-Ping, Zhang Pei-Cheng, Gao Zhonggao, Jiang Jian-Dong. Polydatin protects the respiratory system from PM2.5 exposure. *Nature Scientific Reports.*2016; 7:40030.
111. Yen G. C., Duh P. D. e Lin C. W. Effects of resveratrol and 4-hexylresorcinol on hydrogen peroxide-induced oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Free Radic.Res.*2003; 37:509-514.
112. Wang F, Nguyen M, Xiao-Feng Qin F and Tong Q. SIRT2 deacetylates FOXO3a in response to oxidative stress and caloric restriction. *Aging Cell.* 2007: 6; 505–514.
113. Wu JM, Hsieh TC. Resveratrol: a cardioprotective substance. *The New York Academy of Sciences – Annals of the New York Academy of Sciences.* 2011; 1215:16-21.
114. WHO - World Health Organization Air Pollution. [Cited in 2023; Jan 31] Available from: <https://www.who.int/health-topics/air-pollution>.

115. WHO - World Health Organization. São Paulo: WHO; Air quality guidelines for particulate matter, ozone, nitrogen, dioxide and sulfur dioxide; [2005]. Disponível em: http://www.who.int/phe/health_topics/outdoorair_aqg/en/.
116. WHO - World Health Organization. Ageing and health. Acessado: 06/02/2023. Disponível em: <https://translate.google.com.br/?hl=pt-BR&tab=rT&sl=pt&tl=en&text=acessado&op=translate>.
117. Zhang YQ, Liu YJ, Mao YF, Dong WW, Zhu XY and Jiang L. Resveratrol ameliorates lipopolysaccharide-induced epithelial mesenchymal transition and pulmonary fibrosis through suppression of oxidative stress and transforming growth factor- β 1 signaling. *Clinical Nutrition*. 2015; 34 (4); 752-760.
118. Zhao L, Zhao X, Xu Y, Liu X, Zhang J, He Z. Simultaneous determination of 49 amino acids, B vitamins, flavonoids, and phenolic acids in commonly consumed vegetables by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*. 2021; 344: 128712.
119. Zhao T, Alam HB, Liu B, Bronson RT, Nikolian VC, Wu E, Chong W, Li Y. Selective Inhibition of SIRT2 Improves Outcomes in a Lethal Septic Model. *Curr Mol Med*. 2015; 15(7):634-41.
120. Zhong M., Cheng G. F., Wang W. J., Guo Y., Zhu X. Y. e Zhang J. T. Inhibitory effect of resveratrol on interleukin 6 release by stimulated peritoneal macrophages of mice. *Phytomedicine*. 1999; 6: 79-84.
121. Zhou DD; Luo M; Huang SY; Saimaiti A; Shang A; Gan RY and Li HB. Effects and Mechanisms of Resveratrol on Aging and AgeRelated Diseases. *Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2021; 9932218: 01- 15.