MARCELO HENRIQUE VALENGA

EFEITOS DA CONTRAÇÃO DA MUSCULATURA LISA DA TRAQUEIA NA
MECÂNICA RESPIRATÓRIA DE RATOS WISTAR

São Paulo
2017

MARCELO HENRIQUE VALENGA

EFEITOS DA CONTRAÇÃO DA MUSCULATURA LISA DA TRAQUEIA NA
MECÂNICA RESPIRATÓRIA DE RATOS WISTAR

Tese apresentada à Escola Politécnica da
Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Doutor em Ciências

São Paulo
2017

Este exemplar foi revisado e corrigido em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, 15 de dezembro de 2017

Assinatura do autor: Marcelo Valenga

Assinatura do orientador: Henrique J. Maringa

Catálogo-na-publicação

VALENGA, MARCELO HENRIQUE

Efeitos da contração da musculatura lisa da traqueia na mecânica respiratória de ratos Wistar / M. H. VALENGA -- versão corr. -- São Paulo, 2017. 106 p.

Tese (Doutorado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia de Sistemas Eletrônicos.

1.Ventilação pulmonar 2.Processamento de Imagem Assistida por Computador 3.Aloenxertos 4.Engenharia de tecidos I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia de Sistemas Eletrônicos II.t.

MARCELO HENRIQUE VALENGA

EFEITOS DA CONTRAÇÃO DA MUSCULATURA LISA DA TRAQUEIA NA
MECÂNICA RESPIRATÓRIA DE RATOS WISTAR

Tese apresentada à Escola Politécnica da
Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração:
Sistemas Eletrônicos
Orientador:
Prof. Dr. Henrique Takachi Moriya

São Paulo
2017

Aos meus pais Mário Valenga e Cecília
Barchiky Valenga, por esses muitos
anos investidos na minha formação.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Henrique Takachi Moriya pela sua exigência constante, pelas sugestões e por estar sempre disponível para revisar esse trabalho.

Ao Dr. Rogério Pazzeti e ao fisioterapeuta Thiago Guimarães Rodrigues por toda a coordenação e tempo dedicado à realização dos experimentos com animais no laboratório da Faculdade de Medicina da USP.

Ao Prof. Dr. Paulo Francisco Guerreiro Cardoso por todo o apoio inicial para a realização desse projeto, e a todos os pesquisadores do LIM 61, pela paciência e disponibilidade durante a realização dos experimentos com animais.

Ao Prof. Dr. Magno Santos Leite pelo empréstimo dos equipamentos e demais insumos usados nos experimentos. A Dr. Maria Aparecida Oliveira pela paciente preparação dos fármacos usados nos experimentos.

Aos professores da Poli que colaboraram na minha formação durante esses anos e aos amigos do Laboratório de Engenharia Biomédica, Fábio Gava, Andrea, Vitor e Renato.

Aos meus pais Mário e Cecília B. Valenga, irmãs e parentes, pelas palavras de incentivo e orações, que muito contribuiu para os resultados desse trabalho.

E por fim a todos os meus amigos de trabalho que me apoiaram nesses anos e suportaram as minhas ausências com desvelo e compreensão.

RESUMO

Os transtornos que afetam a traqueia podem levar a graves complicações de saúde e reduzir significativamente a qualidade de vida das pessoas. Até o presente não existe uma opção clinicamente viável disponível para pacientes com distúrbios severos dessa via aérea. As técnicas de Engenharia de Tecidos apresentam um cenário promissor na tentativa de produzir um substituto traqueal satisfatório, com características mecânicas e biológicas compatíveis com os tecidos do paciente. Nesse trabalho, apresenta-se um sistema de aquisição de imagens de vídeo que permite medir as variações da área da projeção bidimensional de traqueias autotransplantadas de ratos, *in vivo*, com o objetivo de apresentar uma ferramenta que possa caracterizar as suas propriedades mecânicas e acelerar a avaliação das técnicas e dos tecidos gerados. Seis ratos, da linhagem Wistar, tiveram exposição de toda a traqueia cérvico-mediastinal, foram ventilados e submetidos a um protocolo experimental com diferentes cenários de broncoconstrição, a fim de se poder relacionar os dados obtidos a partir da ventilação mecânica com as imagens da movimentação das paredes da traqueia antes e depois de um autotransplante e aprofundar a discussão do sistema respiratório nas situações de maior broncoconstrição. Os resultados do pré-transplante, no cenário de maior broncoconstrição, mostraram um aumento médio da área da projeção da traqueia de $0,9 \pm 0,24\%$ nas fases inspiratórias das perturbações quasi-senoidais e, nas fases expiratórias, reduções de $5,2 \pm 6,1\%$. No pós-transplante, o aumento médio foi de $0,7 \pm 0,26\%$ e a redução foi de $1,7 \pm 0,73\%$, para o mesmo cenário de broncoconstrição. As diferenças das fases inspiratórias e expiratórias sugerem uma maior cautela para interpretar os parâmetros da mecânica ventilatória nos cenários de maior broncoconstrição das vias aéreas. Por intermédio das imagens da traqueia, também foi possível observar os diferentes instantes de tempos de resposta para a ação de um agente constritor da musculatura lisa. Pode-se concluir que essa técnica de aquisição de imagens apresenta resolução e frequência de aquisição suficientes para monitorar as variações do calibre de traqueias autotransplantadas de ratos e trazem uma boa perspectiva para o seu uso na avaliação das propriedades mecânicas de enxertos traqueais produzidos por Engenharia Tecidual.

Palavras chave: Ventilação pulmonar. Processamento de imagem assistida por computador. Aloenxertos. Engenharia de tecidos.

ABSTRACT

Tracheal disorders can lead to serious health complications and significantly reduce the people life's quality. There is no clinically feasible option available for patients with several airway disorders. Tissue Engineering techniques present a promising scenario to produce a satisfactory tracheal replacement, with compatible mechanical and biological characteristics with the patient's tissues. This work presents a video image acquisition system that allows measure *in vivo two-dimensional projection area variations* of auto transplanted rat's tracheas with the objective of presenting a tools that can characterize its mechanical properties and accelerate the evaluation of techniques and tissues. Six Wistar rats were exposed to the entire cervical-mediastinal trachea, ventilated and submitted to an experimental protocol in different bronchoconstriction scenarios, before and after an auto transplantation in order to correlate the data obtained from the mechanical ventilation and images of the trachea walls movement before and after the auto transplantation and improve the discussion about respiratory system in greater bronchoconstriction status. The pre-transplant results, in the greater bronchoconstriction scenario, showed an average increase of $0.9 \pm 0.24\%$ in the inspiratory phases of the quasi-sinusoidal perturbations and, in the expiratory phases, a reduction of $5.2 \pm 6.1\%$. In the post-transplant, the mean increase was $0.7 \pm 0.26\%$ and the reduction was $1.7 \pm 0.73\%$, for the same bronchoconstriction scenario. Differences between inspiratory and expiratory phases suggest caution in interpreting the parameters of the ventilatory mechanics in the scenarios of greater bronchoconstriction. Through the trachea's images it was also possible to observe different response times for the action of a smooth muscle constriction agent. It can be concluded that this technique of acquisition of images presents sufficient resolution and frequency of acquisition to monitor the calibers variations of auto transplanted rat's tracheas and bring a good perspective for its use in the evaluation of the mechanical properties of tracheal grafts produced by Engineering Tissue.

Key words: Pulmonary Ventilation. Image Processing, Computer-Assisted. Allografts. Tissue engineering.

LISTA DE SIMBOLOS

$V(t)$	Volume
$\dot{V}(t)$	Fluxo
ω	Frequência angular
$\mu g/mL$	Micrograma por mililitro
$\mu g/kg$	Micrograma por quilograma
m^2	Metro quadrado
μm	Micrometro
mm	Milímetro
cmH_2O	Centímetros de água
bpm	<i>Breath per minute</i> - Respirações por minuto

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D	Três dimensões
ADC	<i>Analog to Digital Converter</i>
AVI	<i>Audio Video Interleaved</i>
CCD	<i>Charge-Coupled Device</i>
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação
COD	<i>Coeficient Of Determination</i>
DAC	<i>Digital to Analog Converter</i>
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
E	Elastância
ECM	Matriz extracelular
EPUSP	Escola Politécnica da Universidade de São Paulo
EV	<i>Expiration Valve</i>
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
G	Resistência tecidual
H	Elastância tecidual
IEEE	<i>Institute of Electrical and Electronics Engineers</i>
LEB	Laboratório de Engenharia Biomédica
LIM	Laboratório de Investigação Médica
LSCM	<i>Linear Single Compartment Model</i>
LVDT	<i>Linear Variable Differential Transducer</i>
MCh	Metacolina
MSC	<i>Mesenchymal Stem Cell</i>
MV	<i>Master Valve</i>
NTSC	<i>National Television System Committee</i>
P _{ao}	Pressão na entrada da via aérea

P_{atm}	Pressão atmosférica
P_i	Pressão predita
P_{br}	Pressão nos brônquios
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PC	Computador Pessoal
PCL	Poli e-caprolactona
P_{cyl}	Pressão no cilindro
PEEP	<i>Positive End Expiration Pressure</i>
P_{el}	Pressão elástica
PET	<i>Positron Emission Tomography</i>
P_i	Pressão medida no experimento
PLGA	Polilático Glicólico
P_{pl}	Pressão pleural
P_{tr}	Pressão na traqueia
R	Resistência
RV	<i>Refresh Valve</i>
SAV	<i>Small Animal Ventilator</i>
SPF	<i>Specific Pathogen Free</i>
SSR	<i>Sum of Squared Residual</i>
V_{cyl}	Volume no cilindro
$Z(f)$	Impedância no domínio da frequência
ΔP	Variação de Pressão

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Arranjo experimental típico para o estudo da mecânica respiratória. 6
- Figura 2 – Diagrama do gradiente de pressão nas paredes das vias aéreas de maior calibre na inspiração imposta (A) e na expiração imposta (B), sendo P_{tr} a pressão na traqueia, P_{atm} a pressão atmosférica, P_{br} a pressão nos brônquios e P_{pl} a pressão pleural. 7
- Figura 3 – (A) Modelo simplificado do sistema respiratório representado por meio de tubo e balão; (B) representação mecânica do modelo linear de compartimento único com uma mola e cilindros sobrepostos, que representam, respectivamente, a elastância dos tecidos (E) e as variações do volume pulmonar $V(t)$. P_{el} é a pressão elástica, R é a resistência do tubo, ΔP é a diferença de pressão nas extremidades do tubo e $\dot{V}(t)$ é o fluxo do ar. 11
- Figura 4 – Representação do modelo linear de múltiplos compartimentos. Cada compartimento pode ser representado por um valor de elastância (E) e de resistência (R). 14
- Figura 5 – Representação do modelo de fase constante. G e H representam os componentes dos tecidos e I e R_N das vias aéreas. 15
- Figura 6 – (A) ventilador Harvard 683; (B) esquema de conexão das válvulas de entrada e saída de ar. 17
- Figura 7 – Diagrama do ventilador de pequenos animais controlado por computador. RV é a válvula de respiro, MV é a válvula principal, EV é a válvula de expiração, DAC é o conversor analógico-digital, ADC é o conversor analógico digital, $LVDT$ é um sensor linear de medição de deslocamento e PV é um computador pessoal. 18
- Figura 8 – Evolução dos ventiladores *flexiVent*: (A) protótipo do ventilador; (B) primeiro modelo comercial; (C) versão atual. 19
- Figura 9 – Diagrama de funcionamento do ventilador *flexiVent FX*. Um motor linear com deslocamento controlado movimenta um pistão que desloca o ar dentro de um cilindro. Duas válvulas controlam o fluxo de ar para as vias aéreas do animal ou para o ambiente externo. Três transdutores fazem a aquisição dos dados: volume do ar deslocado no cilindro (V_{cyl}),

pressão no cilindro (P_{cyl}) e na entrada da via aérea (P_{ao}). P_{tr} é a pressão na traqueia, V_{tr} é o volume na traqueia, A/D é o conversor de sinal analógico para digital e PEEP é pressão positiva no final da expiração. ...20

Figura 10 – Diagrama de bifurcação das diferentes gerações das vias aéreas. 22

Figura 11 – (A) Diagrama da interdependência entre as vias aéreas e o parênquima; (B) estrutura básica da via aérea imersa no parênquima. As setas negras indicam as forças de interação com o parênquima e as setas brancas a tensão gerada pelo musculo liso presente na parede das vias. 23

Figura 12 – (A) Visão geral do rato intubado e ventilado; (B) Cervico-esternotomia mediana para a exposição da traqueia. 34

Figura 13 – (A) Detalhe das incisões dos ligamentos anulares; (B) segmento suturado. 34

Figura 14 – Sequência do protocolo experimental. Iniciada a ventilação, foram realizadas duas manobras de insuflação em rampa até um platô de $27 \text{ cmH}_2\text{O} + 3 \text{ cmH}_2\text{O}$ da pressão final da expiração para homogeneizar o pulmão (recrutamento). Para cada um dos cinco cenários (Basal, PBS, MCh 30, MCh 300 $\mu\text{g/kg}$ e metabolizado) foram realizadas quatro perturbações quasi-senoidais e quatro perturbações com múltiplas frequências para aquisição dos sinais respiratórios. 35

Figura 15 – Perturbações quasi-senoidal (A), com duração de 0,7 s, e múltiplas frequências (B), com duração de 3 s geradas pelo SAV para cálculo dos parâmetros do sistema respiratório. 36

Figura 16 – Diagrama do sistema de avaliação de mecânica respiratória de traqueias isoladas. 37

Figura 17 – Sistema de aquisição dos sinais respiratórios e da imagem da traqueia: (1) rato intubado; (2) ventilador mecânico e software de controle; (3) câmera de vídeo fixada no estéreo microscópio (4) e; (5) aquisição das imagens: controle da câmera, captura e armazenamento das imagens. ...38

Figura 18 – Tela da rotina desenvolvida em ambiente de instrumentação virtual. 39

Figura 19 – Fluxograma do software de pós processamento dos vídeos dos experimentos. 40

Figura 20 – (A) imagem da traqueia com a delimitação da área de interesse (retângulo) e (B) histograma da área de interesse (nível 0 representa um pixel preto e 255 um pixel branco).	41
Figura 21 – Sequência de varredura da imagem: (1) varredura do centro até o limiar da borda superior, (2) do centro até o limiar da borda inferior e (3) repetição dos passos (1) e (2) ao longo do comprimento da traqueia.....	42
Figura 22 – Imagem do primeiro <i>frame</i> de vídeo da traqueia do rato N, antes e depois do transplante, dividida em quatro segmentos. As linhas coloridas das figuras A e B indicam as bordas detectadas pela técnica de segmentação da imagem e as figuras C e D apresentam as áreas calculadas entre as bordas superior e inferior.	43
Figura 23 – Amostra de 2000 <i>frames</i> de vídeo (60 <i>frames</i> equivalem a 1 s) com as variações das áreas da projeção da traqueia. A linha preta do gráfico superior representa a variação da área total analisada e as linhas coloridas do gráfico inferior, das áreas das seções de cada um dos segmentos mostrados na figura 20. A marca (T) indica o período de um ciclo ventilatório normal; (1) repouso prévio à perturbação quasi-senoidal; (2) pico da perturbação; (3) vale da perturbação; (4) final da inspiração na ventilação; (5) final da expiração na ventilação; (6) perturbação com múltiplas frequências.	44
Figura 24 – Diagrama com principais sinais ventilatórios antes, durante e depois de uma perturbação quasi-senoidal.	45
Figura 25 – Detalhe da variação da área total da imagem da projeção da traqueia durante a primeira perturbação quasi-senoidal do cenário Basal (A) e MCh 300 µg/kg (B).	46
Figura 26 – Gráficos da pressão (Ptr) e volume (Vtr) na traqueia durante o primeiro estímulo quasi-senoidal, nos cenários de broncoconstrição do rato N, antes do transplante.....	49
Figura 27 – Valores da elastância (média ± desvio padrão) dos 6 ratos antes do autotransplante, calculados em quatro instantes para os cinco cenários do protocolo experimental: Basal, PBS, MCh 30 e 300 µg/kg e Metabolizado. Foram calculados três valores da elastância para diferentes instantes da perturbação quasi-senoidal: inspiração forçada, expiração forçada e ciclo completo.	50

Figura 28 – Valores da elastância (média $\pm$ desvio padrão) dos 6 ratos depois do autotransplante, calculados em quatro instantes para os seis cenários do protocolo experimental: Basal, PBS, MCh 30 e 300 $\mu\text{g/kg}$ e Metabolizado. Foram calculados três valores da elastância para diferentes instantes da perturbação quasi-senoidal: inspiração forçada, expiração forçada e ciclo completo.	51
Figura 29 – Valores da Resistência (média $\pm$ desvio padrão) dos 6 ratos antes do autotransplante, calculados em quatro instantes para os cinco cenários do protocolo experimental: Basal, PBS, MCh 30 e 300 $\mu\text{g/kg}$ e Metabolizado. Foram calculados três valores da resistência para diferentes instantes da perturbação quasi-senoidal: inspiração forçada, expiração forçada e ciclo completo.	52
Figura 30 – Valores da Resistência (média $\pm$ desvio padrão) dos 6 ratos depois do autotransplante, calculados em quatro instantes para os cinco cenários do protocolo experimental: Basal, PBS, MCh 30 e 300 $\mu\text{g/kg}$ e Metabolizado. Foram calculados três valores da resistência para diferentes instantes da perturbação quasi-senoidal: inspiração forçada, expiração forçada e ciclo completo.	52
Figura 31 – Valores do Coeficiente de Determinação dos valores de E e R para os cenários Basal, PBS, MCh 30 e 300 $\mu\text{g/kg}$ e Metabolizado. A linha tracejada no valor de 0,9 estabelece o valor do limiar mínimo para a validação da medida.	53
Figura 32 – Valores comparativos pré e pós-transplante da primeira medida de cada um dos cinco cenários do protocolo experimental: Basal, PBS, MCh 30 e 300 $\mu\text{g/kg}$ e Metabolizado (média $\pm$ desvio padrão). (A) Elastância calculada na fase inspiratória; (B) Resistência calculada na fase inspiratória.	54
Figura 33 – Valores do Coeficiente de Determinação das medidas de R_N , G e H para os cenários Basal, PBS, MCh 30 e 300 $\mu\text{g/kg}$ e Metabolizado. A linha tracejada no valor de 0,9 estabelece o valor do limiar mínimo para a validação das medidas.	54
Figura 34 – Variação da área da traqueia logo após a aplicação da dose de 300 $\mu\text{g/kg}$ no rato N, antes do transplante (1000 <i>frames</i> equivalem a 16,7 s).	56

Figura 35 – Variação da área da traqueia logo após a aplicação da dose de 300 µg/kg no rato N, após o transplante (1000 <i>frames</i> equivalem a 16,7 s).	57
Figura 36 – Envoltória dos valores máximos da fase inspiratória (azul) e mínimos da fase expiratória (laranja) da figura 34, após a aplicação da dose de metacolina (300 µg/kg), com as linhas tracejadas indicando os instantes em que as perturbações ventilatórias foram realizadas no rato N (SS – <i>SnapShot</i> ou quase-senoidal; QP – <i>QuickPrime</i> ou múltiplas frequências).	58
Figura 37 – Variação dos valores máximos das inspirações e mínimos das expirações para os diferentes cenários de broncoconstrição durante o pré-transplante (linhas azul e vermelha) e no pós-transplante (linhas cinza e amarela) do rato S, em relação ao cenário Basal.	59
Figura 38 – Variação da área da projeção da traqueia no final da expiração (repouso) dos seis ratos no pré-transplante (azul), pós-transplante (vermelho) e ventilação (preto) com a representação percentual das suas variações em relação ao cenário Basal durante todo o experimento. A letra “T” após a nomenclatura do rato significa transplantado.	60
Figura 39 – Variação das áreas das traqueias durante a inspiração forçada da primeira perturbação quase-senoidal para os cenários PBS, MCh 30 e 300 µg/kg em relação ao Basal. (A) Pré-transplante; (B) Pós-transplante.	61
Figura 40 – Variação das áreas das traqueias durante a expiração forçada da primeira perturbação quase-senoidal para os cenários PBS, MCh 30 e 300 µg/kg em relação ao Basal. (A) Pré-transplante; (B) Pós-transplante.	61
Figura 41 – Variação das áreas das traqueias dos seis ratos durante a inspiração imposta das quatro perturbações quase-senoidais do cenário MCh 300 µg/kg, em relação às medidas do cenário basal.	62
Figura 42 – Variação das áreas das traqueias dos 6 ratos durante a expiração imposta das quatro perturbações quase-senoidais do cenário MCh 300 µg/kg, em relação às medidas do cenário basal.	63
Figura 43 – Variação da área da traqueia de cada rato entre as primeiras e segundas perturbações quase-senoidais do cenário MCh 300 µg/kg, apresentados na figura 41.	63

- Figura 44 – Variação da projeção da área total da traqueia do rato N (gráfico inferior) e de quatro segmentos (gráfico superior), sendo que a cor vermelha representa o segmento mais distal e o magenta o mais proximal, durante os primeiros 3500 *frames*, do cenário MCh 300 µg/kg antes do transplante.....64
- Figura 45 – Variação da projeção da área total da traqueia do rato N (gráfico inferior) e de quatro segmentos (gráfico superior), sendo que a cor vermelha representa o segmento mais distal e o magenta o mais proximal, durante os primeiros 3500 *frames*, do cenário MCh 300 µg/kg depois do transplante. 65
- Figura 46 – Variação dos valores máximos da inspiração e da expiração de quatro segmentos da traqueia do rato N, antes e depois do transplante, durante a ventilação, apresentados nas figuras 44 e 45, respectivamente. A cor preta representa a variação dos valores máximos da expiração (repouso), sendo que os valores negativos representam um estreitamento do lúmen, e as cores representam os valores máximos da inspiração para os respectivos segmentos. 65
- Figura 47 – Variação da área dos quatro segmentos da traqueia do rato N durante a aplicação das duas primeiras perturbações quasi-senoidais, antes e depois do transplante, apresentados nas figuras 44 e 45, respectivamente. As cores representam a variação dos respectivos segmentos, sendo que os valores positivos representam a variação durante a inspiração imposta e os negativos durante a expiração imposta.....66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Cálculo dos períodos respiratórios (<i>frames</i>) e da frequência respiratória (bpm – do inglês <i>breath per minute</i>) para todos os ratos usados nos experimentos (média $\pm$ desvio padrão). Para os ratos A a G, 50 <i>frames</i> equivalem a um segundo e, para os demais experimentos, 60 <i>frames</i> equivalem a um segundo.	55
Tabela 2 – Instantes de tempo (segundos) do maior efeito da metacolina e das perturbações quasi-senoidais (<i>SnapShot</i>) para os seis animais no cenário MCh 300 μ g/kg. A letra “T” após a nomenclatura do rato significa transplantado.....	58

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	3
1.1 Objetivo geral.....	4
1.2 Objetivos específicos	4
1.3 Justificativa	5
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1 A mecânica respiratória.....	6
2.2 Modelos matemáticos da mecânica respiratória	8
2.2.1 Modelo linear de um compartimento	10
2.2.2 Modelo de fase constante	14
2.3 Medição dos sinais de pressão, fluxo e volume.....	16
2.3.1 Avaliação da mecânica respiratória na inspiração e na expiração	21
2.4 Biomecânica das vias aéreas	22
2.4.1 Transplante de traqueia.....	24
2.4.2 Responsividade de via aérea	29
2.5 Avaliação da função respiratória através de técnicas de imagem	30
3 METODOLOGIA	33
3.1 Sistema de medição	33
3.2 Protocolo experimental	35
3.3 Processamento das imagens.....	37
3.4 Preparação dos animais	47
3.5 Análise dos dados coletados	47
4 RESULTADOS	48
4.1 Resultados da mecânica respiratória.....	49
4.2 Resultados das imagens de vídeo	55
4.3 Comportamento dos segmentos da traqueia pré e pós-transplante	64

5 DISCUSSÃO	67
5.1 Imagens da traqueia	68
5.2 Ação da Metacolina.....	69
5.3 Instantes de tempo de resposta máxima à Metacolina	73
5.4 Autotransplante	76
5.5 Imagens da traqueia nos diferentes cenários antes e depois do transplante ..	77
5.5.1 Avaliação dos segmentos da traqueia antes e depois do transplante	77
6 CONCLUSÃO	80
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

1 INTRODUÇÃO

Os transtornos que afetam a traqueia podem levar a graves complicações de saúde e reduzir significativamente a qualidade de vida dos pacientes. Até o presente não existe uma opção clinicamente viável disponível para pacientes com distúrbios extensos dessa via aérea. Em adultos, apenas a metade do comprimento traqueal – aproximadamente seis centímetros – pode ser tratada com sucesso por ressecção e, em crianças, apenas um terço do comprimento da traqueia pode ser reconstruído (HONG et al., 2012; KOJIMA; VACANTI, 2014).

A aparente simplicidade da substituição traqueal incentivou, entre os anos 1940 a 1960, o uso de objetos tubulares, inicialmente de materiais sólidos e não biológicos. No entanto, as próteses sólidas, apesar de alguns sucessos por intervalos de tempo variados, tendem a deslocar-se, obstruir as extremidades com tecidos conectivos, causar novas estenoses e provocar infecções na interface com o tecido biológico, sendo que a epitelização completa raramente ocorreu nesses estudos (TOOMES; MICKISCH; VOGT-MOYKOPF, 1995).

Mais recentemente, com o desenvolvimento da técnica de Engenharia de Tecidos, começou-se a buscar um substituto para o órgão danificado, imitando a matriz extracelular (ECM) nativa na sua estrutura e função, com um arcabouço para o apoio e adesão celular, bem como para a sua diferenciação e proliferação (CLARK et al., 2016).

Independentemente dos materiais escolhidos e dos métodos adotados para gerar um substituto traqueal satisfatório, uma questão chave para acelerar a avaliação das técnicas e dos tecidos gerados é o desenvolvimento de ferramentas que possam realizar medidas das suas propriedades mecânicas, de forma não invasiva e não destrutiva, preferencialmente em tempo real (SCHOEN, 2011).

Diversas técnicas de imagem foram adotadas na tentativa de prover imagens de tecidos e órgãos que permitam observar modificações estruturais e funcionais consequentes das doenças respiratórias (TGAVALEKOS et al., 2003). Porém, os trabalhos que utilizam técnicas de imagem para obter informações funcionais dos tecidos nem sempre conseguem superar uma dificuldade inerente do processo de aquisição, de fornecer uma imagem de alta resolução e com frequência de aquisição adequadas às variações morfológicas estudadas.

A proposta deste trabalho é apresentar uma nova técnica de aquisição de imagens de vídeo com uma frequência de aquisição e uma resolução que permita monitorar as variações do calibre de traqueias autotransplantadas de ratos, *in vivo*, durante a ventilação mecânica.

Para a realização deste estudo, adotou-se um agente constritor da musculatura lisa das vias aéreas a fim de provocar uma mudança no seu calibre e avaliar o comportamento da traqueia durante a ventilação em diferentes cenários de broncoconstrição. Neste sentido, além de uma revisão das técnicas de transplantes de traqueia já realizadas e dos sistemas usados para avaliar a mecânica respiratória, a revisão apresentada no capítulo 2 apresenta também as implicações do agente constritor no sistema respiratório.

A metodologia do estudo da traqueia *in vivo*, com a ação sistêmica de um agente constritor, descrita no capítulo 3, e os resultados apresentados no Capítulo 4 permitem observar que não se pode fazer uma avaliação das medidas obtidas da traqueia sem compreender o comportamento dos demais tecidos do sistema respiratório. Neste sentido, a discussão dos resultados apresentado no Capítulo 5 é realizado num contexto mais amplo, trazendo referências de trabalhos que buscam interpretar os mecanismos de ação do agente constritor da musculatura lisa no sistema respiratório.

1.1 Objetivo geral

Apresentar uma técnica de aquisição e processamento de imagem que permita monitorar o comportamento de traqueias de ratos durante a ação sistêmica de um agente constritor da musculatura lisa de via aéreas, permitindo relacionar os dados obtidos a partir da mecânica ventilatória com as imagens da movimentação das paredes da traqueia, em dois contextos: antes e depois de um autotransplante.

1.2 Objetivos específicos

Elaborar um novo sistema de aquisição de imagens para o estudo de traqueia *in vivo*, baseando-se na instrumentação previamente desenvolvida no Laboratório de Engenharia Biomédica (LEB) da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo (EPUSP) para estudos de traqueias de ratos *ex vivo*.

Avaliar o sistema de aquisição de imagens para a o monitoramento da mecânica da traqueia antes e depois de um autotransplante com base nas informações da mecânica respiratória obtidas de um ventilador para pequenos animais.

Aprofundar a discussão do modelo de compartimento único, amplamente usado para modelar o sistema respiratório em cenários de broncoconstrição ou outras afecções das vias aéreas, a partir das informações das imagens da traqueia.

1.3 Justificativa

Uma parceria com o Laboratório de Pesquisa em Cirurgia Torácica (LIM 61) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) vem sendo mantida desde 2008 e um dos grandes objetivos desse trabalho conjunto está relacionado aos estudos de transplantes de traqueias (BIBAS et al., 2014). A motivação principal é fazer um estudo piloto de um método de avaliação *in vivo* de autotransplante de traqueias para, posteriormente, aplicá-lo na avaliação das propriedades mecânicas de enxertos traqueais produzidos por Engenharia Tecidual.

A técnica já utilizada pelo Laboratório de Engenharia Biomédica (LEB) da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo (EPUSP), para adquirir imagens de traqueias de ratos *ex vivo* (SILVA et al., 2014), pode representar uma importante colaboração na obtenção de imagens dinâmicas das traqueias de ratos *in vivo*, bem como na relação entre as alterações anatômicas da traqueia e os parâmetros da mecânica ventilatória obtidos a partir de modelos matemáticos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste Capítulo será apresentada uma revisão dos principais conteúdos relacionados com a proposta desse trabalho. Nas sessões 2.1 e 2.2 descreve-se as principais técnicas e os modelos matemáticos para a avaliação da mecânica respiratória, na sessão 2.3 são apresentados alguns sistemas de medição dos sinais respiratórios, na sessão 2.4 descreve-se algumas características da mecânica das vias aéreas, bem como alguns métodos adotados para a substituição de segmentos traqueais afetados por doenças diversas e, por fim, na sessão 2.5, as principais técnicas de imagem usadas para avaliar a função respiratória são descritas.

2.1 A mecânica respiratória

O estudo da mecânica respiratória normalmente está baseado na medição de alguns sinais respiratórios, como, por exemplo, pressão e fluxo do ar (SCHUESSLER, 1993).

Esses dados podem ser adquiridos durante a ventilação regular (espontânea ou mecânica) ou enquanto a ventilação é interrompida e uma perturbação específica é aplicada. O arranjo experimental típico para se estudar a mecânica respiratória em roedores é mostrado na figura 1. Outros sinais como pressão esofágica, pressão sanguínea ou pressão alveolar, também podem ser acrescentados (SCHUESSLER, 1993).

Figura 1 – Arranjo experimental típico para o estudo da mecânica respiratória.

Fonte: traduzido de Schuessler (1993)

Os dados adquiridos são processados e ajustados de acordo com um modelo escolhido e os parâmetros desse modelo descrevem a dinâmica e o estado do sistema respiratório (SCHUESSLER, 1993).

Na inspiração por pressão positiva, o ar precisa ser pressionado a fim de vencer a impedância do pulmão e da caixa torácica. Esta impedância procede principalmente da força necessária para superar a resistência elásticas dos tecidos e da resistência provocado pelo atrito dos tecidos do pulmão e tórax, bem como da força necessária para superar a resistência do fluxo de ar ao longo das ramificações da traqueia e brônquios.

O movimento do pistão do ventilador deslocando o ar para dentro do pulmão provoca um aumento da pressão nas vias aéreas. Nesse instante, a pressão da traqueia é maior do que a pressão nos tecidos ao redor da traqueia (aproximadamente igual a pressão atmosférica), o que provoca também uma expansão das suas paredes, como mostra a figura 2A. O mesmo fenômeno ocorre no espaço intratorácico, onde a pressão das vias áreas de maior calibre é maior que a pressão pleural, provocando a expansão das paredes dessas vias.

No final da inspiração, a energia potencial acumulada pelos tecidos elásticos do pulmão e da caixa torácica, durante a inspiração, é usada para produzir o gradiente de pressão que irá promover a expiração (CARVALHO; ZIN, 2011).

Figura 2 – Diagrama do gradiente de pressão nas paredes das vias aéreas de maior calibre na inspiração imposta (A) e na expiração imposta (B), sendo P_{tr} a pressão na traqueia, P_{atm} a pressão atmosférica, P_{br} a pressão nos brônquios e P_{pl} a pressão pleural.

No caso das perturbações realizadas pelo ventilador, pode ocorrer também uma expiração imposta, ou seja, o deslocamento do pistão puxa o ar para fora do pulmão, promovendo uma diminuição da pressão no interior das vias aéreas, como mostra a figura 2B. Nessa situação, a pressão traqueal é menor que a pressão externa e essa diferença provoca um estreitamento do lúmen traqueal. O mesmo fenômeno ocorre nas vias aéreas de menor calibre, onde a pressão interna é menor que a pressão pleural.

2.2 Modelos matemáticos da mecânica respiratória

Para avaliar a mecânica respiratória, pode-se utilizar alguns modelos, no domínio do tempo ou da frequência, que expressam, por meio de equações matemáticas, algumas características fisiológicas do sistema respiratório.

A estratégia mais simples para modelar as propriedades mecânicas do sistema respiratório é o modelo linear de compartimento único (LSCM, do inglês *Linear Single-Compartment Model*). Neste modelo, o pulmão é representado como um balão cuja abertura está conectada com um tubo que representa as vias aéreas (CARVALHO; ZIN, 2011). O modelo é linear porque as suas variáveis de fluxo e volume são independentes e estão relacionadas linearmente com a pressão. Assim, se o fluxo for constante, a relação entre a pressão e o volume deverá ser linear e a elastância do sistema também será linear.

Um modelo que considera a não linearidade entre a variação da resistência total das vias aéreas e o fluxo de ar, é o modelo de resistência fluxo-dependente. Esse modelo pode ser usado quando o fluxo é turbulento. A aplicação mais comum ocorre quando o paciente é submetido à ventilação mecânica através de um tubo endotraqueal, em que a impedância do tubo pode contribuir significativamente na relação entre a pressão e o fluxo (SULLIVAN; PALIOTTA; SAKLAD, 1976).

O modelo de elastância volume-dependente considera a alteração da elastância do pulmão devido ao volume. Nesse modelo, a variável elastância é dividida em uma componente volume-independente e outra volume-dependente. Uma vantagem desse modelo é que ele pode ser usado independentemente da forma de onda do fluxo ventilatório e pode ser usado nos ventiladores com fluxo controlado por pressão ou por volume (CARVALHO; ZIN, 2011).

Nos modelos que consideram o pulmão como um compartimento único, a expiração passiva é descrita por uma exponencial simples. No entanto, numa análise simples do movimento expiratório é possível verificar a evidência de que o pulmão possui múltiplos compartimentos. Além disso, é bem conhecido o fato de que a elastância aumenta com a frequência respiratória (OTIS et al., 1956). Assim, uma exponencial simples não é a representação mais adequada para descrever o comportamento do sistema respiratório e vários autores propuseram modelos com dois ou mais compartimentos que preveem duas exponenciais para a expiração passiva e consideram a elastância dependente da frequência respiratória (CARVALHO; ZIN, 2011).

O modelo de dois compartimentos consiste no arranjo de dois balões com seus respectivos tubos, conectados a um tubo comum (OTIS et al., 1956). Cada compartimento é descrito por uma equação de pressão, introduzindo assim a noção da heterogeneidade fisiológica da ventilação. Assim, a diferença de pressão causada pela resistência das vias aéreas no modelo de compartimento único é reescrita, incluindo a bifurcação entre a via central e as periféricas, de cada compartimento.

Apesar de ser matematicamente plausível, esse modelo é bastante difícil de ser implementado, pois há uma dificuldade de se fazer uma interpretação fisiológica quando se trabalha com a variação simultânea de vários parâmetros. Além do mais, valores negativos e uma ampla variabilidade na estimativa dos parâmetros são frequentemente observados no cenário experimental (GILLIS; LUTCHEN, 1999a).

Os dois compartimentos podem também ser arranjados em série, a fim de se representar o parênquima distal e as vias aéreas proximais (MEAD, 1969).

Uma variação do modelo de um compartimento é proposta no modelo viscoelástico, no qual são incluídos elementos que permitem avaliar não apenas a resistência das vias aéreas ao fluxo do ar e a elastância do pulmão, mas também a resistência e a elastância dos tecidos distais ou parenquimais. A equação desse modelo é similar às equações dos modelos bi compartimentais série e paralelo e, do ponto de vista fisiológico, permite avaliar o comportamento viscoelástico do pulmão e da caixa torácica e/ou a heterogeneidade da ventilação devido às diferentes constantes de tempo do pulmão e da caixa torácica (BATES et al., 1985 a e b; AULER et al., 1987). Este modelo permite também separar a resistência das vias aéreas em central (vias aéreas de maior calibre) e periféricas (de menor calibre) (BATES et al., 1988; SALDIVA et al., 1992).

Uma outra abordagem sobre a avaliação da mecânica respiratória foi proposta por DuBois (DUBOIS et al., 1956) e consiste no estudo dos modelos no domínio da frequência. Na técnica de oscilação forçada (FOT, do inglês *Forced Oscillation Technique*), um dispositivo externo, normalmente um alto-falante com um acoplamento acústico, aplica uma oscilação senoidal de fluxo de ar para uma faixa de frequências, na entrada das vias aéreas, resultando em uma resposta em pressão do sistema respiratório. A relação entre as transformadas de Fourier da pressão e do fluxo do ar possibilitam encontrar a impedância do sistema respiratório para as diferentes faixas de frequências. Essa técnica pode ser aplicada nas equações dos modelos de um ou mais compartimentos.

Uma alternativa para simplificar os complexos sistemas de equações diferenciais é a adotada pelo modelo de fase constante (HANTOS et al., 1987 a, b), no qual os compartimentos são tratados separadamente e um número limitado de parâmetros são usados para descrever as propriedades mecânicas.

Nessa revisão, descrever-se-á com mais detalhes o LSCM e o modelo de fase constante, que podem ser aplicados em experimentos com ratos por meio de alguns ventiladores respiratórios de pequeno porte.

2.2.1 Modelo linear de um compartimento

O modelo de tubo e balão (figura 3A) é, intuitivamente, o modelo mais simples possível para se representar a anatomia/fisiologia do sistema respiratório. O tubo representa as vias aéreas e o balão representa os tecidos elásticos (BATES, 2009).

Os parâmetros encontrados neste modelo são a elastância (E) do balão e a resistência (R) que o ar sofre ao passar pelo tubo. Supõem-se ainda que o sistema seja linear, ou seja, as propriedades do sistema são independentes do volume (V) e do fluxo ($\dot{V}$) e que as forças inerciais sejam desprezíveis para frequências abaixo de 2 Hz (BATES, 2009; ZIN, 1999).

Para se compreender melhor esse modelo matemático, utiliza-se uma analogia mecânica como mostra a figura 3B, com uma mola que representa a elasticidade dos tecidos e, cilindros sobrepostos, que representam as variações do volume pulmonar (BATES, 2009).

Figura 3 – (A) Modelo simplificado do sistema respiratório representado por meio de tubo e balão; (B) representação mecânica do modelo linear de compartimento único com uma mola e cilindros sobrepostos, que representam, respectivamente, a elastância dos tecidos (E) e as variações do volume pulmonar $V(t)$. P_{el} é a pressão elástica, R é a resistência do tubo, ΔP é a diferença de pressão nas extremidades do tubo e $\dot{V}(t)$ é o fluxo do ar.

Fonte: modificado de Bates (2009)

As representações do modelo são matematicamente equivalentes porque o estado de ambos pode ser especificado em qualquer instante por uma única variável física, que é o volume do gás no compartimento elástico. No entanto, a representação da figura 3B é mais didática ao incorporar detalhes dos tecidos pulmonares. Nesta representação, o compartimento alveolar consiste num par de cilindros conectados por uma mola que fica mais tensionada à medida em que o volume do compartimento (V) aumenta. A tensão gerada produz uma pressão elástica (P_{el}) dentro do compartimento. Essa pressão faz com que o compartimento retorne ao estado original quando a pressão de entrada do ar é removida. Este processo reproduz a expiração passiva que ocorre em um pulmão quando os tecidos ficam tensionados no final da inspiração.

Alguns pulmões são mais facilmente inflados do que outros e a escolha da força da mola pode representar bem o estado de um pulmão em particular. Admitindo-se que a mola da figura 3B tenha as características de uma mola de *Hook*, a sua tensão aumenta linearmente com o comprimento. Assim, tem-se que:

$$P_{el}(t) = E \cdot V(t) \quad (1)$$

onde P_{el} representa a pressão de recolhimento elástico do balão, E é a elastância e V é o volume pulmonar.

Neste caso, o volume após uma expiração normal passiva é considerado zero. Desta forma, a elastância (E) denota a dificuldade para insuflar o pulmão.

Para deslocar o ar através do tubo que conecta o meio externo com o compartimento é necessário impor uma pressão (ΔP) tanto para a entrada como para a saída do ar, ou seja, o tubo oferece uma resistência ao fluxo do ar. Esta resistência é alta se o tubo for longo e estreito e pequena se o tubo for curto e grosso. A escolha correta das suas dimensões pode representar bem o conjunto de vias aéreas de qualquer pulmão (BATES, 2009).

A diferença de pressão (ΔP) entre as extremidades proximal e distal do tubo é diretamente proporcional ao fluxo de ar. Assim:

$$\Delta P = R \cdot \dot{V} \quad (2)$$

onde R é a resistência do tubo e o fluxo ($\dot{V}$) é a derivada do volume (V) em relação ao tempo.

Assim, a pressão total do modelo da figura 3A, entre a entrada do tubo e o interior do compartimento que representa o pulmão é a soma da queda de pressão ao longo do tubo e a pressão no compartimento:

$$P = P_{el} + \Delta P = E \cdot V + R \cdot \dot{V} \quad (3)$$

Como no interior do pulmão há sempre uma pressão residual que impede o colapamento dos alvéolos, faz-se necessário introduzir na equação do modelo um parâmetro P_0 , que representa a pressão interna do compartimento quando o volume (V) e o fluxo ($\dot{V}$) forem zero. Então, a equação do modelo é melhor representada por:

$$P = E \cdot V + R \cdot \dot{V} + P_0 \quad (4)$$

Com a equação do modelo de compartimento único e os dados de P , V e $\dot{V}$ medidos durante a ventilação mecânica, pode-se calcular os valores de E e R por meio da técnica de regressão múltipla linear.

Essa técnica permite encontrar os valores dos parâmetros que melhor se ajustam ao modelo utilizado. Para que isso ocorra, a soma dos resíduos quadrados (SSR, do inglês *Sum of Squared Residual*) deve ser mínima, ou seja, deseja-se obter o valor dos mínimos quadrados para o modelo representado pela eq. (4):

$$SSR = \sum_{i=1}^N (P_i - \hat{P}_i)^2 = \sum_{i=1}^N (P_i - E \cdot V_i - R \cdot \dot{V}_i)^2 \quad (5)$$

A soma é realizada sobre todos os pontos N medidos, P_i é a pressão medida no experimento, $\hat{P}_i$ é a sua predição dada pela eq. (3).

O próximo passo é fazer a derivada parcial de cada um dos parâmetros da SSR (E e R), mantendo o outro parâmetro fixo:

$$\frac{\partial SSR}{\partial E} = -2 \cdot \sum_{i=1}^N V_i \cdot (P_i - E \cdot V_i - R \cdot \dot{V}_i) = 0 \quad (6)$$

$$\frac{\partial SSR}{\partial R} = -2 \cdot \sum_{i=1}^N \dot{V}_i \cdot (P_i - E \cdot V_i - R \cdot \dot{V}_i) = 0 \quad (7)$$

Reescrevendo as equações tem-se:

$$\sum_{i=1}^N V_i \cdot P_i = E \cdot \sum_{i=1}^N V_i^2 + R \cdot \sum_{i=1}^N V_i \cdot \dot{V}_i \quad (8)$$

$$\sum_{i=1}^N \dot{V}_i \cdot P_i = E \cdot \sum_{i=1}^N V_i \cdot \dot{V}_i + R \cdot \sum_{i=1}^N \dot{V}_i^2 \quad (9)$$

Assim, os parâmetros E , R podem ser encontrados através da resolução das eq. (8) e (9).

Historicamente, o modelo linear de compartimento único é frequentemente aplicado para monitorar as propriedades mecânicas do sistema respiratório devido a facilidade de se medir os parâmetros de P , $\dot{V}$ e V nos pacientes ventilados. No entanto, a utilização da pressão nas vias aéreas como uma representação de toda a impedância do pulmão é bastante limitada (CARVALHO; ZIN, 2011).

Esse modelo utiliza como estímulo de entrada uma oscilação forçada de ar com uma frequência única, conhecida como perturbação quasi-senoidal, que impulsiona e retira um valor pré-definido de volume de ar nas vias aéreas.

2.2.2 Modelo de fase constante

Como já descrito, uma exponencial simples não é a representação mais adequada para descrever o comportamento do sistema respiratório. Assim, a estimulação com uma somatória de frequências permitiria trabalhar com várias exponenciais, ou seja, com constantes de tempos diferentes, simulando compartimentos com diferentes características expiratórias.

A aplicação de um volume de ar que representa a somatória de sinais senoidais de diferentes frequências e a medição dos respectivos sinais de pressão e fluxo, permitem encontrar os valores da elastância e resistência para cada uma das frequências, por meio da decomposição dos sinais gravados e dos cálculos de ajuste, através da eq. (4) do LSCM (Bates et al., 1997).

A figura 4 apresenta um modelo que permite incluir inúmeros compartimentos com diferentes valores de resistência e elastância e que pode representar bem diferentes regiões do pulmão. No entanto, devido à complexidade de se interpretar múltiplas equações com constantes de tempo diferentes, esse modelo só é aplicável quando se trabalha com um número pequeno de compartimentos.

Figura 4 – Representação do modelo linear de múltiplos compartimentos. Cada compartimento pode ser representado por um valor de elastância (E) e de resistência (R).

Fonte: Bates (2009)

Assim, o modelo de fase constante surgiu com a ideia de tentar simplificar a modelagem do pulmão para estimulação com sinais de múltiplas frequências, tendo em conta que o modelo da figura 4 aumenta muito o número de parâmetros que precisam ser equacionados. Outro aspecto relevante que torna necessário uma nova

abordagem para o problema é o fato de que a parte real da impedância dos tecidos tem uma relação quase fixa com a parte imaginária, para uma ampla faixa de frequências, ou seja, não parece adequado analisar separadamente a resistência da elastância, pois quando um deles é afetado, o outro invariavelmente também muda (Bates, 2009).

Em 1992, Hantos e seus colaboradores observaram que a resistência e a elastância tecidual variavam da mesma forma com a frequência, ou seja, com fase constante entre elas. Assim, não seria conveniente manipular separadamente a resistência e a elastância tecidual.

A figura 5 apresenta o modelo de fase constante para um compartimento. A resistência R_N representa uma resistência Newtoniana, similar ao do LSCM, ou seja, é devido à energia dissipada durante a condução do ar nas vias aéreas e I é a inertância da via de condução do ar.

Por outro lado, não existem análises físicas óbvias para G e H tal como existem para E no LSCM. O tecido pulmonar é um sistema complexo formado por células, fibras e fluidos a partir dos quais surgem as propriedades elásticas e dissipativas dos tecidos. A impedância dos tecidos é representada conjuntamente por G e H . G é comumente chamado de amortecimento de tecido e representa a componente dissipativa dessa impedância, ou seja, está associado a resistência dos tecidos. O componente H caracteriza o armazenamento de energia elástica dentro dos tecidos e se equipara à elastância tecidual.

Figura 5 – Representação do modelo de fase constante. G e H representam os componentes dos tecidos e I e R_N das vias aéreas.

Fonte: Bates (2009)

A eq. (10) representa o comportamento da impedância do sistema respiratório para o modelo de fase constante.

$$Z(f) = R_N + i\omega I + \frac{G-iH}{\omega^\alpha} \quad (10)$$

e

$$\alpha = \frac{2}{\pi} \tan^{-1} \frac{H}{G} \quad (11)$$

A grande utilidade do modelo de fase constante reside no fato de que, com apenas quatro parâmetros, pode-se dividir com mais precisão a impedância do pulmão em um componente relacionado às vias aéreas (caracterizadas por R_N e I) e um componente relacionado aos tecidos (caracterizados por G e H). Isso representa um avanço significativo sobre o LSCM, cuja resistência das vias aéreas contém uma contribuição substancial, mas geralmente desconhecida, da resistência dos tecidos.

A broncoconstrição, por exemplo, faz com que as vias aéreas se estreitem, o que aumenta R_N e I . Já a interpretação das mudanças em G e H não são tão simples. Existem várias formas possíveis de explicar essas alterações, uma das quais é que as propriedades reológicas intrínsecas dos tecidos mudaram. Alternativamente, se uma fração do pulmão se fecha, como resultado do fechamento da via aérea ou colapso alveolar, então tanto G quanto H aumentarão pela mesma fração. Por outro lado, se o pulmão tornar-se heterogêneo então, G aumentará proporcionalmente mais do que H (Hantos et al., 1992).

2.3 Medição dos sinais de pressão, fluxo e volume

A avaliação da mecânica respiratória é realizada analisando-se basicamente as informações de pressões, volumes e fluxos de ar.

Os ventiladores para pequenos animais (SAV, do inglês *Small Animal Ventilation*), normalmente utilizam a técnica de pressão positiva para controlar o fluxo de ar nos pulmões. Um modelo muito utilizado em pesquisas com pequenos animais é o Harvard Model 683 (Harvard Bioscience, EUA) que permite ventilar animais com peso entre 250 g e 10 kg, como por exemplo, ratos, coelhos, macacos e cachorros de

pequeno porte (figura 6A). Este aparelho é basicamente uma seringa cujo êmbolo ou pistão é deslocado pela rotação de um disco acoplado a um motor.

Figura 6 – (A) ventilador Harvard 683; (B) esquema de conexão das válvulas de entrada e saída de ar.

Fonte: adaptado do manual de usuário do Harvard 683

A combinação entre o movimento do pistão e a posição das válvulas permite controlar o fluxo de ar. O esquema da figura 6B mostra o diagrama do ventilador Harvard 683. Quando o pistão é deslocado para dentro do cilindro, comprimindo o ar, a válvula 2 é aberta e as válvulas 1 e 3 são fechadas, fazendo com que o ar seja impulsionado para as vias aéreas do animal. Quando o pistão atinge a posição prevista para o volume desejado, a válvula 2 é fechada e as válvulas 1 e 3 são abertas, permitindo que o ar seja expelido espontaneamente pelo animal para o ambiente externo (válvula 1) e possibilitando a entrada de ar no cilindro (válvula 3), para o próximo ciclo respiratório.

Neste aparelho, o controle da frequência respiratória e do volume do ar injetado nos pulmões é ajustado através de dispositivos eletromecânicos e as medições dos parâmetros respiratórios devem ser feitas com sensores e circuitos eletrônicos externos. Outra característica desse modelo de ventilador é que ele fornece um fluxo inspiratório com um envoltório quasi-senoidal, enquanto que a saída do ar é realizada passivamente pelo animal.

Nos arranjos experimentais que usam esse ventilador, como por exemplo, nos trabalhos de (ROMERO et al., 1992) e (WANG et al., 1986) um pneumotacógrafo e um sensor diferencial de pressão são conectados na entrada das vias aéreas para medir o fluxo do ar e a pressão na traqueia. No entanto, os pneumotacógrafos

fornece medidas satisfatórias de fluxo de ar em humanos e em animais de médio e grande porte, mas para animais menores, tais como, ratos e camundongos, esses sensores não apresentam uma precisão satisfatória na medida do fluxo. A impedância elevada do sistema respiratório desses animais resulta numa inadequada razão de rejeição em modo comum no sinal gerado por esses transdutores (SCHUESSLER, 1993). Além disso, os pneumotacógrafos aumentam o volume morto dos ventiladores para uma ordem de grandeza comparável ao volume corrente dos animais de pequeno porte, fazendo com que esses sensores só possam ser usados durante curtos períodos na aquisição dos dados (WANG et al., 1986).

Um ventilador para pequenos animais controlado por computador foi proposto por Schuessler e Bates (1995), com o objetivo de contornar as limitações dos arranjos experimentais com pneumotacógrafos bem como permitir a utilização de perturbações ventilatórias mais complexas, que permitam estudar modelos mais sofisticados do sistema respiratório. Um esquema desse ventilador pode ser visualizado na figura 7.

Figura 7 – Diagrama do ventilador de pequenos animais controlado por computador. RV é a válvula de respiro, MV é a válvula principal, EV é a válvula de expiração, DAC é o conversor analógico-digital, ADC é o conversor analógico digital, LVDT é um sensor linear de medição de deslocamento e PV é um computador pessoal.

Fonte: traduzido de Schuessler (1993)

A inovação desse modelo está no uso de um motor linear, acoplado ao êmbolo de uma seringa, cujo deslocamento pode ser controlado por um computador. A posição do êmbolo é determinada por um transdutor diferencial variável linear (LVDT), o que possibilita estimar o volume do ar deslocado. Um sensor de pressão piezo-

resistivo foi usado para medir a pressão na entrada das vias aéreas e o fluxo do ar é obtido a partir do cálculo da derivada do volume do ar deslocado pelo êmbolo da seringa (SCHUESSLER; BATES; MAKSYM, 1993).

Durante a inspiração o êmbolo é impulsionado na direção do animal, a válvula principal (MV, na figura 7) está aberta enquanto as válvulas de expiração (EV), e da entrada do ar (RV), estão fechadas. Na expiração, a válvula MV é fechada, a válvula (EV) é aberta, permitindo que o animal solte o ar passivamente, e é aberta também a válvula RV, permitindo a entrada do ar no movimento de retorno do pistão. Nessa configuração, o ventilador funciona no modo convencional.

Com o objetivo de identificar os parâmetros da mecânica respiratória, a ventilação convencional pode ser interrompida e perturbações em volume podem ser aplicadas, mantendo a válvula MV aberta e as válvulas EV e RV fechadas. Nesta configuração, tanto a entrada como a saída do ar das vias aéreas são controladas diretamente pelo movimento do êmbolo. Os resultados desse trabalho mostraram que o SAV é capaz de aplicar pequenas perturbações de volume com frequências de até 55 Hz.

Esse ventilador trouxe novas perspectivas para o estudo da mecânica respiratória em pequenos animais. O protótipo desse trabalho foi aprimorado e, em 1997 o modelo *flexiVent* foi produzido em escala comercial pela empresa SCIREQ. A figura 8 mostra a evolução do protótipo de Schuessler e sua evolução para os modelos comerciais.

Figura 8 – Evolução dos ventiladores *flexiVent*: (A) protótipo do ventilador; (B) primeiro modelo comercial; (C) versão atual.

Fonte: SCIREQ

No modelo *flexiVent* FX, o sensor LVDT foi substituído por um controle mais preciso de deslocamento, baseado em escaneamento ótico, e a sua válvula expiratória permite controlar a Pressão Positiva ao Final de Expiração (PEEP, do inglês *Positive End Expiratory Pressure*) sem a necessidade de uma coluna de água, como mostra o diagrama da figura 9.

Figura 9 – Diagrama de funcionamento do ventilador *flexiVent* FX. Um motor linear com deslocamento controlado movimenta um pistão que desloca o ar dentro de um cilindro. Duas válvulas controlam o fluxo de ar para as vias aéreas do animal ou para o ambiente externo. Três transdutores fazem a aquisição dos dados: volume do ar deslocado no cilindro (V_{cyl}), pressão no cilindro (P_{cyl}) e na entrada da via aérea (P_{ao}). P_{tr} é a pressão na traqueia, V_{tr} é o volume na traqueia, A/D é o conversor de sinal analógico para digital e PEEP é pressão positiva no final da expiração.

Fonte: modificado do manual *flexiVent*

O software de controle do SAV (*flexiWare* 7.0, SCIREQ, Canadá) faz a leitura contínua de três parâmetros: volume do ar deslocado no cilindro (V_{cyl}), obtido através de um sensor ótico que determina a posição do pistão no cilindro; a pressão no cilindro (P_{cyl}) e na entrada da via aérea (P_{ao}). As informações obtidas pelos transdutores são digitalizadas por um conversor analógico-digital de 12 bits, com uma frequência de aquisição de 256 Hz e podem ser visualizadas no *software* de interface de controle do SAV. A versão utilizada só permite a gravação desses três parâmetros durante manobras ventilatórias de perturbações em volume. Nessa situação, a válvula expiratória permanece fechada durante a inspiração e a expiração e o ar entra e sai das vias aéreas do animal de forma ativa, ou seja, controlado pelo movimento do pistão.

2.3.1 Avaliação da mecânica respiratória na inspiração e na expiração

A técnica de regressão múltipla linear, descrita anteriormente, permite encontrar os parâmetros da mecânica respiratória que melhor se ajustam ao sinal de saída esperado para o modelo escolhido.

Essa técnica, juntamente com os ventiladores que permitem um controle ativo dos movimentos inspiratório e expiratório, proporcionou resultados que estão de acordo com aqueles obtidos pelos métodos convencionais, como por meio da medição com fluxo constante, do método da oclusão no final da inspiração ou da medição da pressão esofágica (IOTTI et al., 1995), e é amplamente usada nos experimentos com pequenos animais que utilizam ventiladores similares ao previamente descrito, ou nos estudos com pessoas, nos mais variados quadros respiratórios (ROUSSELLOT; PESLIN; DUVIVIER, 1992; BENHAUMOU et al., 1987; e EBERHARD et al., 1992).

No entanto, em situações com limitação do fluxo expiratório, como por exemplo, nas doenças pulmonares obstrutivas crônicas (DPOC), o simples ajuste dos sinais obtidos a um modelo pode levar a resultados equivocados dos parâmetros respiratórios (VOLTA et al., 2002). Os resultados desse trabalho mostraram que, nos pacientes com uma limitação do fluxo expiratório, houve uma acentuada diminuição na precisão das medidas de Resistência e Complacência por meio da técnica de regressão múltipla linear. Por outro lado, foi possível calcular os parâmetros respiratórios aplicando a mesma técnica apenas durante a fase inspiratória do ciclo respiratório.

Esse resultado foi também observado em ratos submetidos à ventilação mecânicas e com constrição das vias aéreas induzidas por doses crescentes de metacolina (MCh) (AOKI et al., 2015). Nesse trabalho, os valores de resistência e complacência foram significativamente diferentes quando obtidos a partir do ajuste dos dados de fluxo e pressão na entrada das vias aéreas para o modelo linear de compartimento único, em diferentes fases do ciclo respiratório. Para concentrações elevadas de MCh (300 µg/mL), observou-se diferentes valores da Resistência e Elastância quando calculados exclusivamente na fase inspiratória, na fase expiratória ou no ciclo respiratório completo.

2.4 Biomecânica das vias aéreas

A função das vias aéreas é assegurar a troca eficiente dos gases na interface dos alvéolos com os vasos sanguíneos, e a estratégia principal do organismo para assegurar essa troca é maximizar a área de contato entre as duas superfícies. No pulmão humano o processo de condução do ar começa na traquéia, que é a via aérea com a maior seção transversal, é subdividido progressivamente em vias aéreas menores e termina após aproximadamente 24 gerações de bifurcações, quando a área de superfície alveolar somada pode chegar a 80m^2 (BATES, 2016).

Até aproximadamente a 16ª geração as vias aéreas são fundamentalmente para condução do ar, quando começa uma zona de transição, com os bronquíolos respiratórios, até chegar aos sacos alveolares, como mostra a figura 10. A partir da zona de transição, a área da região de troca de gás aumenta enormemente (WEST, 2002).

Figura 10 – Diagrama de bifurcação das diferentes gerações das vias aéreas.

Fonte: Modificado de West (2002)

O processo de ventilação é governado pelo músculo diafragma, que controla o gradiente de pressão entre o espaço intratorácico e o ambiente externo e promove a troca constante de gases. Nesse processo, a manutenção estrutural das vias aéreas é fundamental para o fluxo do ar.

No entanto, a ventilação não é um simples processo de escoamento de ar através de tubos estáticos. O fluxo de ar que percorre as ramificações interage com a

estrutura das vias aéreas, em parte por meio da chamada interdependência parenquimatosa. Ou seja, depois de atravessar as vias aéreas condutoras, o gás inalado passa para o parênquima (alvéolos e estruturas associadas) e, ao insuflar essa região, altera a estrutura do pulmão, modificando o ambiente mecânico em que as vias aéreas estão sustentadas. Assim, ao regular o fluxo de ar, as vias aéreas condutoras alteram o volume do parênquima, o que, por sua vez, altera o comportamento da via aérea (DONOVAN, 2016). Este processo é ilustrado esquematicamente na figura 11A.

Figura 11 – (A) Diagrama da interdependência entre as vias aéreas e o parênquima; (B) estrutura básica da via aérea imersa no parênquima. As setas negras indicam as forças de interação com o parênquima e as setas brancas a tensão gerada pelo músculo liso presente na parede das vias.

Fonte: traduzido de Donovan (2016)

Os detalhes das estruturas fisiológicas dentro e ao redor da via aérea poderiam ser abordados com um grande nível de detalhes; no entanto, para os propósitos deste trabalho, parece suficiente considerar uma via aérea individual como um cilindro, envolta por uma camada de músculo liso que, quando ativado, provoca o estreitamento do seu lúmen. Além disso, cada via aérea também está conectada ao tecido parenquimatoso circundante. Quando o músculo é estimulado a contrair, o movimento interno da parede da via aérea distende esses tecidos circundantes, gerando uma força de restauração, como mostra a figura 11B.

Dentre os estudos sobre o comportamento das vias aéreas, parece suficiente destacar três aspectos: (1) que as vias aéreas maiores e centrais são mais rígidas

(menos complacentes) do que as vias aéreas menores e periféricas, altamente complacentes (LAMBERT et al., 1982); (2) A ação da musculatura lisa da via aérea desempenha um papel crucial no grau de estreitamento das vias aéreas e tem sido objeto de inúmeros estudos de modelagem experimental (DONOVAN, 2013) e; (3) as interações das paredes das vias aéreas com o parênquima estabelece uma força restauradora que se opõe à constrição das vias aéreas (MA et al., 2013 a, b).

A traqueia e as primeiras ramificações brônquicas representam uma pequena parcela das vias aéreas que não estão submetidas aos mecanismos descritos. Além da condução do ar, a traqueia funciona como um canal de depuração de secreções traqueais e brônquicas. Em adultos, o lúmen traqueal tem um formato variável entre circular e elíptico, com um achatamento anteroposterior. Os anéis cartilagosos são normalmente em forma de "C", com a parede membranosa posterior que conecta os braços do "C" em uma linha essencialmente reta, medindo geralmente menos de um terço da circunferência da traquéia. O comprimento e o diâmetro da traquéia são proporcionais ao tamanho do indivíduo (GRILLO, 2004).

A forma da traqueia num adulto varia mesmo na ausência de uma doença. Algumas permanecem mais circulares outras mais elípticas e a área da seção transversal e a forma mudam dinamicamente com alterações da pressão intraluminal, respiração, ventilação, tosse ou outros movimentos de pescoço (GRILLO, 2004).

2.4.1 Transplante de traqueia

Os transtornos que afetam a traqueia podem levar a graves complicações de saúde, reduzindo significativamente a qualidade de vida dos pacientes. Os mais comuns são: fístula traqueo-esofágica, estenose pós-intubação, pós-actínicas, pós-traumáticas, neoplasias primárias e secundárias, a traqueomalácia e as doenças infecciosas e degenerativas que podem afetar a traqueia (GRILLO, 2012).

As opções de tratamento existentes são limitadas. Atualmente, o tratamento referencial é a ressecção traqueal com uma reconstrução primária para restaurar a continuidade. No entanto, até agora não existe uma opção clinicamente viável disponível para pacientes com distúrbios extensos da via aérea. Em adultos, apenas a metade do comprimento traqueal, aproximadamente seis centímetros, pode ser tratada com sucesso por ressecção e, em crianças, apenas um terço do comprimento da traqueia pode ser reconstruído (HONG et al., 2012; KOJIMA; VACANTI, 2014),

sendo que as ressecções mais longas estão relacionadas a índices de insucesso que frequentemente decorrem das complicações anastomóticas (WRIGHT et al., 2004).

A aparente simplicidade da substituição traqueal incentivou, entre os anos 1940 a 1960, o uso de objetos tubulares, inicialmente de materiais sólidos e não biológicos. Mais frequentemente essas substituições foram realizadas em cães, com tubos de aço inoxidável e vidro (DANIEL, 1948), bobinas rígidas de arame de aço (KESHISHIAN; BLADES; BEATTIE, 1956); Vitallium e acrílico (MICHELSON et al., 1961), polietileno (MORFIT et al., 1955), silicone (SPINAZZOLA; GRAZIANO; NEVILLE, 1969); Teflon (KRAMISH; MORFIT, 1963) e tubos de Teflon, Ivalon e elastômero de silicone (ARONSTAM; NIMS; WINN, 1961). As próteses sólidas também foram testadas clinicamente em alguns casos com silicone (NEVILLE; BOLANOWSKI; KOTIA, 1990; TOOMES; MICKISCH; VOGT-MOYKOPF, 1995) e polietileno (ATAMANYUK; MELROSE, 1965).

As próteses sólidas, apesar de alguns sucessos por períodos variados, tendem a deslocar-se, obstruir as extremidades com tecidos conectivos, causar novas estenoses e provocar infecções na interface com o tecido biológico, sendo que a epitelização completa raramente ocorreu nesses estudos (TOOMES; MICKISCH; VOGT-MOYKOPF, 1995).

Traqueias de cadáveres também foram utilizadas tanto experimental quanto clinicamente como substituições traqueais (GRILLO; DIGNA; MIURA, 1964). Os tecidos enxertados foram geralmente substituídos ao longo do tempo pelo tecido cicatricial do hospedeiro; porém, os tecidos mortos não funcionaram como um modelo para a regeneração da complexa estrutura da traquéia e, na maioria dos estudos, os enxertos tornaram-se fibróticos, não restando cartilagem viva na traquéia doadora (ELLIOTT; HAW; JACOBS, 1996).

Mais recentemente, com o desenvolvimento da área de Engenharia de Tecidos começou-se a buscar um substituto para o órgão danificado, imitando a matriz extracelular (ECM, do inglês *Extracellular Matrix*) nativa na sua estrutura e função, com um arcabouço para o apoio e adesão celular, a diferenciação e a proliferação (CLARK et al., 2016).

Resumidamente, a técnica de engenharia de tecidos compreende na semeadura de células (ao longo do espectro de células-tronco a diferenciadas) em um arcabouço de sustentação. O composto célula - arcabouço é, então, amadurecido em um biorreator (um dispositivo que simula *in vitro* um ambiente propício do ponto de

vista fisiológico, metabólico e mecânico) para consolidar um tecido. O último passo é o transplante de tecido de um ambiente *in vitro* para *in vivo*, onde ele irá crescer e se remodelar (SCHOEN, 2011).

Os arcabouços para os tecidos traqueais são projetados para atuar como uma estrutura de suporte a fim de manter uma via aérea aberta e imitar a função biológica e mecânica do ECM nativo. Fornecem também um modelo para as células-tronco até que essas tenham se proliferado, regenerando e estabilizando a área desejada (BONASSAR; VACANTI, 1998).

Vacanti e Langer (1999) mostraram que a composição do arcabouço é uma característica chave e pode acelerar a regeneração do tecido, mesmo sem células ou outros fatores de crescimento. Os arcabouços podem ser biológicos, como um alotransplante descelularizado, ou compostos por um material sintético, que pode ser biodegradável ou não.

Os arcabouços sintéticos foram estudados de várias formas, incluindo hidrogel à base de polietileno glicol, ácido polilático/glicólico (PLGA), poli (ε-caprolactona) (PCL), poliéster-uretano, esponja de gelatina, malhas Marlex e outras formas modificadas. Embora muitos desses tratamentos possam ser potencialmente utilizados em adultos, as opções de tratamento para crianças são mais limitadas a medida que o nível de complexidade aumenta e devido a variações no tamanho da traqueia ao longo do tempo, devido ao crescimento (BOGAN; TEOH; BIRCHALL, 2016).

Na prática clínica os arcabouços decelularizados são atualmente os mais utilizados no implante traqueal. Para criar um arcabouço decelularizado, uma traqueia doadora é retirada de um cadáver, submetida a inúmeros ciclos de lavagem para remover as células do doador através de detergentes, sais, enzimas e/ou meios físicos (CONCONI; COPPI; LIDDO, 2005; SCARRIT, 2015), e é, então, recelularizada com as células do próprio paciente. Isso assegura as características biomecânicas e diminui a possibilidade de problemas imunológicos, ao eliminar complexos maiores de histocompatibilidade classes I e II (BADER; MACCHIARINI, 2010). Para a completa integração do arcabouço, o processo de decelularização deve manter as características de um ECM saudável.

A ECM é uma estrutura dinâmica e também tem um papel bioquímico e biomecânico, sendo muito mais do que um mero substrato (FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010). É composto por uma miríade de componentes que podem variar

dependendo do tecido em que são encontrados, e alguns exemplos incluem colágeno, elastina, proteoglicanos, hialuronano, laminina e fibronectina (FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010; JÄRVELÄINEN et al., 2009).

Os receptores de ECM presentes na membrana celular (por exemplo, integrinas) permitem a ligação de ECM ao citoesqueleto que, por sua vez, possui uma conexão de nucleoesqueleto (STARR; FRIDOLFSSON, 2010). As propriedades mecânicas do ECM têm também várias funções no fenótipo e comportamento celular, como a forma celular, migração, diferenciação, proliferação e adesão (HUMPHREY; DUFRESNE; SCHWARTZ, 2014; PEYTON et al., 2007).

Para que o processo de consolidação de uma traqueia gerada a partir da engenharia de tecidos alcance êxito, são essenciais, ainda, dois conjuntos de células: as células epiteliais e os condrócitos.

As populações celulares que compõem esse epitélio pseudo estratificado incluem células ciliadas, caliciformes e basais. Como a traquéia é exposta ao ambiente externo por meio da passagem do ar, o epitélio respiratório proporciona a proteção e mantém a homeostase. Através das camadas mucosas, pode-se aderir partículas e agentes patogênicos, limpar o muco e manter um epitélio saudável (BOGAN; TEOH; BIRCHALL, 2016).

Os condrócitos produzem e conservam a matriz extracelular da cartilagem. As principais fontes de condrócitos são as cartilagens auricular, nasal, traqueal e costal. Os anéis da traquéia em forma de U são formados a partir de cartilagem hialina, que só está presente nas articulações, nas vias respiratórias e no esqueleto em fase de crescimento. A distinção entre os tipos de cartilagem (hialina, elástica e fibrocartilagem) pode ser problemática quando se trata de cultivar condrócitos para fins específicos. Como a obtenção e o crescimento dos condrócitos são mais difíceis do que as células epiteliais, tem-se usado células tronco mesenquimais da medula óssea (MSCs), que podem ser diferenciadas em condrócitos, bem como em células epiteliais. Ao longo do tempo, os condrócitos cultivados *in vitro*, independentemente da sua fonte, alteram a expressão de seus genes e efetivamente diferenciam-se (BOGAN; TEOH; BIRCHALL, 2016).

Ainda com relação à técnica de engenharia de tecidos, os fibroblastos, que são células constituintes do tecido conjuntivo e sintetizam a matriz extracelular e a rede de colágeno que forma a estrutura básica para todos os tecidos, desempenham um papel fundamental nas interações das células epiteliais-mesenquimatosas e

demonstraram apoiar o crescimento das células epiteliais e mesenquimais por meio da reconstrução da membrana basal (KOBAYASHI; NOMOTO; SUZUKI, 2006). Os fibroblastos também melhoram a migração, a proliferação e a diferenciação das células em células ciliadas, caliciformes e basais, permitindo a reconstrução de um epitélio ciliado pseudo estratificado semelhante ao epitélio nativo (KOBAYASHI; NOMOTO; SUZUKI, 2006).

Além dos arcabouços decelularizados, a impressão tridimensional e a bioimpressão apresentam grande potencial para a criação de estruturas de sustentação e a consolidação de novos tecidos. Esta técnica permite a produção de arcabouços sólidos tridimensionais de qualquer forma a partir de imagens digitais, como as tomografias, proporcionando um alto nível de reprodutibilidade e controle sobre as propriedades do material estruturante, como porosidade e rugosidade da superfície. Avanços também foram realizados com o desenvolvimento da bioimpressão, permitindo tanto a impressão de uma estrutura de suporte sobre a qual as células podem proliferar, como a incorporação de populações de células biológicas na solução de impressão, resultando em um arcabouço bastante coeso (BOGAN; TEOH; BIRCHALL, 2016).

Um dos principais benefícios nos arcabouços gerados a partir da impressão tridimensional é sua precisão e a reprodutibilidade em relação aos procedimentos tradicionais. No entanto, apesar dessas vantagens, uma questão chave é a escolha do material de impressão, que deve imitar o tecido nativo. Os materiais naturais têm integridade estrutural inferior em comparação com os materiais sintéticos, mas fornecem um ambiente biocompatível superior. Já os polímeros sintéticos, que apresentam maior resistência mecânica, têm um grau de biocompatibilidade limitado. Por esta razão, a combinação de materiais naturais e sintéticos em um arcabouço híbrido resultaria em uma prótese mais satisfatória (BOGAN; TEOH; BIRCHALL, 2016).

Independentemente dos materiais escolhidos e das técnicas adotadas para gerar um substituto traqueal satisfatório, uma questão chave para acelerar a avaliação das técnicas e dos tecidos gerados é o desenvolvimento de ferramentas que possam realizar medidas das suas propriedades mecânicas, de forma não invasiva e não destrutiva, preferencialmente em tempo real. Cada pesquisador deve ter a preocupação de escolher a ferramenta adequada para avaliar a integridade estrutural antes e depois da implantação (SCHOEN, 2011).

2.4.2 Responsividade de via aérea

São inúmeros os estudos que usam a MCh ou a histamina como agente constritor da musculatura lisa para estudar hipóteses sobre as alterações fisiológicas do sistema respiratório. Os primeiros estudos acreditavam que a MCh causava constrição apenas nas vias aéreas condutivas (PETÁK et al., 1997). Posteriormente, ocorreu uma divisão no estudo da resistência das vias entre vias aéreas condutivas e vias aéreas parenquimais e obteve-se um importante conhecimento da responsividade pulmonar para diferentes estímulos constritores (KARIYA et al., 1989; NAGASE et al., 1994; ROBATTO et al., 1993; ROMERO et al., 1992; SALERNO et al., 1995).

No entanto, vários estudos apresentaram resultados conflitivos sobre a região de atuação do agente constritor, bem como sobre as diferentes ações em função das formas de administração da MCh nos tecidos. Peták propôs um estudo para avaliar as diferentes respostas dos tecidos pulmonares, administrando a MCh por via endovenosa e por meio da sua nebulização na entrada das vias aéreas (PETÁK et al., 1997).

Seus resultados apresentaram diferenças significativas. Na injeção endovenosa, a constrição triplicou o valor da resistência das vias aéreas e do amortecimento provocado pelos tecidos parenquimais e não alterou o valor da inertância e da elastância, sugerindo que a constrição foi induzida principalmente nas vias aéreas. Por outro lado, na administração por nebulização, a resistência e elastância dobraram de valor e o amortecimento provocado pelos tecidos parênquimas aumentou quatro vezes, sugerindo que a constrição ocorreu nas vias aéreas e no parênquima (PETÁK et al., 1997).

Uma possível explicação para a diferença de resultado é que a MCh atua em diferentes estruturas quando injetada por via endovenosa ou administrada por inalação. Ainda que o efeito tardio pode ter produzido uma não homogeneidade na constrição das vias aéreas periféricas que provocaria uma redução do volume do pulmão, o autor acredita que a ação da MCh através de diferentes receptores também é um fator que precisa ser considerado (PETÁK et al., 1997).

Essa e outras conclusões de estudos sobre a mecânica respiratória mostram que os dados obtidos por meio da mecânica ventilatória são insuficientes para se conhecer com mais detalhes as alterações fisiológicas do pulmão. Questões em

relação à heterogeneidade da constrição e a consequente heterogeneidade da distribuição do ar durante a ventilação, ou ainda, sobre a relação do calibre das vias aéreas afetadas pela constrição e a alteração da função respiratória, só podem ser respondidas com o auxílio de técnicas de imagem que permitam observar o comportamento do órgão durante a ação dos agentes usados para modificar a sua fisiologia (TGAVALEKOS et al., 2005).

2.5 Avaliação da função respiratória por meio de técnicas de imagem

O avanço de diferentes técnicas para prover imagens de tecidos e órgãos possibilitaram novas descobertas nas modificações estruturais e funcionais consequentes das doenças respiratórias. Numa escala mais grosseira, as imagens de ressonância magnética fornecem uma boa diferenciação dos tecidos moles de todo o órgão, com resolução milimétrica, possibilitando medidas morfológicas das vias aéreas (OAKES et al., 2012) ou de todo o pulmão (BRAGA et al., 2011).

Equipamentos de tomografia computadorizada de alta resolução foram usados para medir, com resolução espacial da ordem de centenas de micrometros, a espessura das paredes e a área das vias aéreas (BROWN; MITZNER, 2003; KING et al., 2004; MOTT et al., 2012; NAKANO et al., 2002). Regiões de pulmões enfisematosos e áreas de aprisionamento de ar são habitualmente identificadas por meio da tomografia computadorizada (GODDARD et al., 1982; NEWMAN et al., 1994) e técnicas similares, com resolução de dezenas de micrometros, já foram usadas em experimentos com pequenos animais para adquirir imagens de câncer (NAMATI et al., 2010), asma (LEDERLIN et al., 2010), inflamações pulmonares crônicas (ARTAECHEVARRIA et al., 2010), enfisema (GODDARD et al., 1982), desafio com agente broncoconstritor (DUBSKY et al., 2017), e imagens *ex vivo*, com escala de 5 μm , em tecidos humano e animal (LANGHEINRICH et al., 2004; LITZLBAUER et al., 2006; PARAMESWARAN et al., 2009; WATZ et al., 2005).

Equipamentos síncronos de raio-X de alta potência foram usados para adquirir imagens dinâmicas, com frequência de 60 *frames*¹ por segundo, e construir imagens em 3D com resolução de 20 μm /voxel, possibilitando o estudo de distintas regiões do pulmão (DUBSKY et al., 2012).

---

¹ Um *frame* corresponde a uma imagem individual da sequência de vídeo, também conhecida como quadro ou fotograma. Nessa tese será empregado o termo *frame*.

A tomografia por coerência óptica, técnica que oferece imagens com resolução entre 1 e 20 μm e com penetração de 2 a 3 mm nos tecidos, vem sendo utilizada nos estudos *in vivo* na quantificação dos tecidos, calibre e complacência das vias aéreas e dos alvéolos (MCLAUGHLIN et al., 2014).

Modelos computacionais também foram usados para simular estruturas consistentes com a morfologia das vias aéreas e estudar o comportamento da Resistência e da Complacência do pulmão após a imposição de condições como broncoconstrições heterogêneas e a contração da musculatura lisa. Estes estudos mostraram a relação da Resistência e da Elastância do pulmão com a frequência respiratória (HANTOS et al., 1992, GILLIS; LUTCHEN, 1999a) e previram que o padrão de constrição pode ser um componente crucial da asma. Observaram também um aumento substancial na Resistência e na Complacência do pulmão, para frequências respiratórias típicas, mesmo para constrições de uma pequena parte (~10%) das vias aéreas periféricas, distribuídas randomicamente (GILLIS; LUTCHEN, 1999b).

Tgavalekos e seus colaboradores (2003) relacionou um modelo matemático tridimensional com a estrutura, função e imagem de um pulmão humano, isto é, estabeleceram uma correlação entre as ramificações das vias aéreas e a sua real anatomia, com seus lobos e vias aéreas, para conhecer não apenas o calibre das vias que provocam alterações funcionais significativas, mas também a sua localização e a gradação dos defeitos estruturais e funcionais gerados.

Nesse estudo, as imagens da distribuição do ar nas vias aéreas e alvéolos foram feitas com um tomógrafo por emissão de pósitrons (PET, do inglês *Positron Emission Tomography*), permitindo observar a heterogeneidade da ventilação. Esses dados foram comparados com os dados de Resistência e Complacência do pulmão, obtidos da mecânica ventilatória, a fim de identificar condições de constrição consistentes com as duas técnicas de aquisição de dados.

Os resultados mostraram que após a imposição de um mesmo grau de constrição em regiões específicas dos pulmões (superior, medial e inferior) não ocorreu alterações substanciais nas propriedades da mecânica ventilatória. No entanto, quando as medidas da Resistência e Complacência foram anormais, observou-se que a constrição ocorreu em toda a extensão das ramificações das vias aéreas, o que estaria de acordo com a noção de que a função pulmonar não é abalada por constrições localizadas (TGAVALEKOS et al., 2003).

Os mesmos autores propuseram uma nova abordagem para comparar a influência da constrição entre as vias aéreas de menor e maior calibre de pacientes com asma, com uma avaliação simultânea dos parâmetros obtidos a partir da mecânica ventilatória. Utilizando a mesma técnica de formação das imagens pelo tomógrafo por emissão de pósitrons, incorporaram a capacidade de analisar a distribuição do ar em cada terminação brônquica (TGAVALEKOS et al., 2005).

Essa estratégia permitiu concluir que, nos indivíduos asmáticos ocorre uma disfunção ventilatória quando há um fechamento não homogêneo e confinado nas vias aéreas com calibre menor que 2 mm. No entanto, a constrição forte dessas vias aéreas, por si só, não é suficiente para provocar uma degradação da função respiratória, ou seja, é necessária também a constrição das vias aéreas de menor calibre. Essa conclusão sugere que, no tratamento da asma, deve-se prevenir o fechamento das vias aéreas de pequeno calibre, podendo ser necessário também promover uma hiper-reatividade nas vias aéreas de pequeno e grande calibre (TGAVALEKOS et al., 2005).

Em um trabalho do LEB, utilizou-se essa mesma estratégia de trabalhar com uma imagem funcional do órgão e informações da mecânica ventilatória para avaliar a ação da MCh nas traqueias isoladas de ratos. A principal diferença foi que as alterações da geometria da traqueia foram medidas a partir da aquisição de imagens de vídeo de uma câmara com tecnologia CCD (do inglês *Charge-Coupled Device*), que possibilitou a aquisição de 30 *frames* por segundo durante a ventilação da traqueia com um ventilador para pequenos animais (SILVA et al., 2011).

Os resultados mostraram que é possível medir as variações do diâmetro externo da traqueia durante a ventilação e avaliar o efeito da MCh nos tecidos, ao longo do tempo. Por intermédio dessa técnica, observou-se também que a amplitude da variação do diâmetro da traqueia durante a ventilação foi maior na extremidade distal do que na proximal, comportamento já observado pela técnica de tracionamento dos segmentos da traqueia para avaliação da sua resposta contrátil (TAVARES; SILVA, 1998).

3 METODOLOGIA

A descrição da metodologia foi dividida em quatro partes: preparação dos animais, protocolo experimental, sistema de medição e processamento das imagens.

3.1 Preparação dos animais

Foram utilizados seis ratos machos da linhagem Wistar não SPF (do inglês *Specific Pathogen Free*) com peso médio de 314 ± 17 g (média $\pm$ desvio padrão) e dez semanas de vida. Os animais provenientes do Biotério da FMUSP, receberam ração e água de acordo com as suas necessidades e foram mantidos num ambiente com ciclos de iluminação de 12 h com luz artificial e 12 sem luz. Todos os animais receberam cuidados de acordo com as normas estabelecidas no *Guide for the Care and Use of Laboratory Animal (Institute of Laboratory Animal Resources – National Academy of Sciences, Washington, D.C., 1996)* e segundo os Princípios Éticos na Experimentação Animal da Legislação Brasileira e do Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA). O experimento com animais foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq – 0057/12) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da FMUSP. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no laboratório LIM 61 da FMUSP, pelo Dr. Rogério Pazetti, auxiliado pelo fisioterapeuta Thiago Guimarães Rodrigues.

Os animais foram pesados e anestesiados por via intraperitoneal com xilazina 1 mg/100 g (cloridrato de xilazina 20 mg /ml, Rompun, Bayer) e cetamina 7,5 mg/100g (cloridrato de dextrocetamina 75 mg/ml, Cristália). Foram colocados em posição supina para a intubação endotraqueal, onde uma cânula de polietileno (ID = 3 mm, L = 85 mm) foi ajustada. Com uma respiração espontânea, uma segunda cânula foi inserida na veia jugular para as injeções doses de solução salina e MCh que foram aplicadas durante o protocolo experimental.

Posteriormente, foi realizada uma cervico-esternotomia mediana, com exposição de toda a traqueia cérvico-mediastinal, como mostra a figura 12. Um pequeno pedaço de tecido preto foi posicionado entre a traqueia e os outros tecidos para melhorar o contraste do processo da detecção dos movimentos da traqueia por imagem durante a ventilação. O tempo médio desse procedimento cirúrgico foi de 25 minutos.

Após essa preparação, os animais foram mantidos com ventilação mecânica através do SAV, usando um volume corrente de 10 mL/kg, frequência respiratória de 90 bpm e uma PEEP de 3 cmH₂O.

Figura 12 – (A) Visão geral do rato intubado e ventilado; (B) Cervico-esternotomia mediana para a exposição da traqueia.

Fonte: próprio autor

Depois de realizar as medições descritas no protocolo experimental (item 3.3) correspondentes a primeira parte do experimento, foi realizado o autotransplante, através de uma incisão nos ligamentos anulares do 2º - 3º ou 3º - 4º anéis abaixo do cricoide e uma segunda incisão, espaçada de 6 ou 7 anéis, seguida de sutura das seções. Na figura 13 pode-se visualizar em detalhe as incisões e o segmento da traquéia suturada.

Tendo em conta que a traquéia está sob tensão e para não alongar o tempo da cirurgia, o segmento autotransplantado não foi completamente seccionado e uma pequena parte membranosa foi mantida para facilitar a sua posterior sutura.

Figura 13 – (A) Detalhe das incisões dos ligamentos anulares; (B) segmento suturado.

Fonte: próprio autor

3.2 Protocolo experimental

Realizada a calibração do SAV e com o animal sendo ventilado, foi iniciado o protocolo experimental, que consiste na aplicação de perturbações ventilatórias para a aquisição dos sinais respiratórios de pressão (P_{tr}) e volume (V_{tr}) na traqueia e a captura das imagens da traqueia em cinco diferentes cenários de broncoconstrição das vias aéreas: basal, solução salina (cloreto de sódio 0,9%), MChMCh 30 $\mu\text{g/kg}$, 300 $\mu\text{g/kg}$ e metabolizado. A figura 14 ilustra como foram feitas as medidas ao longo do tempo.

Figura 14 – Sequência do protocolo experimental. Iniciada a ventilação, foram realizadas duas manobras de insuflação em rampa até um platô de 27 cmH_2O + 3 cmH_2O da pressão final da expiração para homogeneizar o pulmão (recrutamento). Para cada um dos cinco cenários (Basal, PBS, MCh 30, MCh 300 $\mu\text{g/kg}$ e metabolizado) foram realizadas quatro perturbações quasi-senoidais e quatro perturbações com múltiplas frequências para aquisição dos sinais respiratórios.

Fonte: próprio autor

Ao iniciar o protocolo e antes de realizar as perturbações do cenário metabolizado, foram realizadas manobras de insuflação em rampa até um platô de 27 cmH_2O + 3 cmH_2O da PEEP (recrutamento na figura 14) para homogeneizar as regiões dos pulmões.

Quatro perturbações ventilatórias quasi-senoidais (*SnapShot*) com volume de 5 mL/kg e frequência de 90 bpm (1,5 Hz), foram aplicadas a cada 30 s a fim de calcular

os parâmetros de elastância e resistência do sistema respiratório segundo o LSCM, descrito no Capítulo 2, sendo que a primeira perturbação foi realizada 15 s após a injeção endovenosa. Nessas manobras, o pistão do SAV simula uma inspiração e uma expiração em um circuito pneumático fechado, ou seja, com as válvulas de entrada e saída do ar fechadas, como mostra a figura 15A.

Figura 15 – Perturbações quasi-senoidal (A), com duração de 0,7 s, e múltiplas frequências (B), com duração de 3 s geradas pelo SAV para cálculo dos parâmetros do sistema respiratório.

Fonte: próprio autor

Outras quatro perturbações ventilatórias com múltiplas frequências (*QuickPrime*) compostas por uma somatória de 13 frequências (1 a 20 Hz) foram aplicadas a cada 30 s com o intuito de calcular a impedância do sistema respiratório e aplicar o modelo de fase constante, sendo que a primeira perturbação foi realizada 30 s após a injeção endovenosa. Nessas manobras, o pistão do SAV reproduz movimentos de acordo com o sinal apresentado na figura 15B, com a válvula de expiração fechada.

No cenário basal foram aplicadas perturbações ventilatórias para a aquisição dos sinais respiratórios sem a injeção de solução no acesso venoso. No segundo cenário foi aplicado uma dose da solução PBS (do inglês *Phosphate Buffered Saline*) no acesso da veia jugular, seguido das quatro perturbações para as medições. Nos dois cenários seguintes foram realizadas medições logo após as aplicações de MCh nas doses de 30 e 300 µg/kg. Por fim, foi realizada uma última aquisição dos sinais respiratórios, 5 min após a última dose de MCh, que representa o cenário onde a droga já teria sido metabolizada.

3.3 Sistema de medição

Para realizar a aquisição dos sinais respiratórios dos animais e monitorar as variações do diâmetro das traqueias durante a ventilação, foi aprimorado o sistema de aquisição de imagens de um projeto previamente desenvolvido no LEB (SILVA et al., 2011), cujo diagrama é apresentado na figura 16.

Figura 16 – Diagrama do sistema de avaliação de mecânica respiratória de traqueias isoladas.

Fonte: modificado de Silva et al. (2011)

No trabalho de Silva e seus colaboradores (2011), utilizou-se um ventilador convencional para pequenos animais com transdutores externos de pressão e pneumotacógrafo conectados a um sistema de condicionamento e aquisição dos sinais, e uma câmera padrão NTSC (do inglês *National Television System Committee*) com 30 *frames* por segundo, 752 x 582 pixels e transferência analógica de dados.

Para realizar a aquisição dos sinais respiratórios dos animais e monitorar as variações do diâmetro das traqueias *in vivo* e durante a ventilação, foi desenvolvido um novo sistema de aquisição, como mostra a figura 17, utilizando um SAV, (*flexiVent FX2*, SCIREQ Inc., Canada) que já incorpora os transdutores de pressão e volume.

Uma câmera de vídeo mono cromática (scA640-70fm, BASLER, Alemanha) foi fixada num estéreo microscópio (SZ61, OLYMPUS, Japão) para adquirir as imagens das traqueias expostas dos ratos durante a ventilação. O sistema de lentes do estéreo microscópio permitiu ampliação de 40 vezes das imagens das traqueias.

Figura 17 – Sistema de aquisição dos sinais respiratórios e da imagem da traqueia: (1) rato intubado; (2) ventilador mecânico e software de controle; (3) câmera de vídeo fixada no estéreo microscópio (4) e; (5) aquisição das imagens: controle da câmera, captura e armazenamento das imagens.

Fonte: Valenga et al. (2016)

O controle da câmera foi feito por uma placa de aquisição de imagens (NI PCI-8252, NATIONAL INSTRUMENTS, EUA) instalada no computador e gerenciada por uma rotina computacional desenvolvida num ambiente de instrumentação virtual (LabVIEW, NATIONAL INSTRUMENTS, EUA), responsável por capturar e armazenar as imagens de vídeo, como mostra a figura 18. Essas imagens foram adquiridas com uma resolução de 640 x 480 pixels a uma frequência de aquisição de 60 *frames* por segundo.

Para cada uma das cinco etapas do protocolo experimental, a gravação foi iniciada logo após a injeção endovenosa, e teve duração de 150 s, sendo que os vídeos foram salvos no formato AVI (do inglês *Audio Video Interleaved*), sem perdas por compactação.

Figura 18 – Tela da rotina desenvolvida em ambiente de instrumentação virtual.

Fonte: próprio autor

Para facilitar o enquadramento das imagens adquiridas pela câmera, foi desenhado um retângulo amarelo no centro da interface gráfica. Como o foco do trabalho era avaliar o potencial dessa técnica de imagem para o monitoramento da traqueia, não foram realizadas calibrações de escala ou correções devido às distorções da lente, procedimentos básicos num sistema de instrumentação por imagem, pois não se pretendia obter medidas absolutas da traqueia, mas sim observar a variação das amplitudes dos movimentos em relação às medições do período de repouso, ou seja, no final da expiração.

3.4 Processamento das imagens

As imagens capturadas foram pós processadas por uma rotina computacional dedicada desenvolvida num ambiente de programação matemática (Matlab, The MATHWORKS Inc., EUA), cujo fluxograma é mostrado na figura 19.

O arquivo no formato AVI de cada experimento foi aberto e, a partir do primeiro *frame* da imagem, delimitou-se manualmente a região que se deseja segmentar, por meio de uma seleção retangular, como mostra a figura 20A. Após essa seleção, fez-

se um ajuste de contraste através da função *imadjust()* (Matlab, The MATHWORKS Inc., EUA) para realçar os valores dos pixels da área selecionada e melhorar a qualidade da imagem para o processo de segmentação. Posteriormente, cada *frame* de vídeo foi convertido em uma matriz de 256 tons de cinza, representados por números inteiros entre 0 e 255.

Figura 19 – Fluxograma do software de pós processamento dos vídeos dos experimentos.

Fonte: próprio autor.

Para determinar a variação da área da traqueia durante a ventilação, cada *frame* de vídeo passa por um processo de segmentação, visando delimitar os tecidos da traqueia. Dois passos foram usados para a realização dessa tarefa.

O primeiro passo foi estabelecer um valor de tom de cinza do pixel que melhor representa a interface entre o tecido traqueal e a imagem do fundo.

Como a imagem da traqueia tem um espectro bem delimitado (tons de cinzas mais claros para o tecido cartilaginoso e tons escuros para os tecidos moles) e com um tom de cinza próximo do preto de fundo (figura 20A), foi possível usar um algoritmo de valor ótimo de limiar para estabelecer as bordas da traqueia (OTSU, 1979). Esse algoritmo de segmentação de imagens permite escolher, a partir do histograma de tons de cinza, um limiar ótimo de separação entre um objeto e uma imagem de fundo. A figura 20B mostra o histograma da área selecionada na figura 20A, bem como o resultado do pixel que determina o limiar ótimo de separação entre o fundo escuro e a traqueia, ou seja, a borda da traqueia (seta vermelha).

Figura 20 – (A) imagem da traqueia com a delimitação da área de interesse (retângulo) e (B) histograma da área de interesse (nível 0 representa um pixel preto e 255 um pixel branco).

Fonte: próprio autor

O segundo passo foi realizar uma varredura pixel a pixel a partir do eixo central da traqueia até encontrar o pixel com valor igual ao do limiar ótimo, previamente calculado, na direção das bordas superior e inferior, como mostra as setas 1 e 2 da figura 21.

Esse procedimento foi repetido ao longo de todo o comprimento da traqueia, da extremidade distal até a proximal (seta 3), com a finalidade de se obter a área total da projeção da seção da traqueia, ou seja, a somatória de todos os pixels cujos valores estão acima do limiar da borda, durante toda a varredura.

Figura 21 – Sequência de varredura da imagem: (1) varredura do centro até o limiar da borda superior, (2) do centro até o limiar da borda inferior e (3) repetição dos passos (1) e (2) ao longo do comprimento da traqueia.

Fonte: próprio autor

Esse processo de delimitação dos tecidos da traqueia e cálculo da área da seção foi repetido para todos os 7500 *frames* do vídeo de cada experimento. Por fim, os valores das áreas calculadas de cada *frame* foram salvos numa planilha (Excel, Microsoft, EUA) para posterior análise.

Para poder avaliar com mais detalhes o comportamento da traqueia durante os experimentos, foram feitas subdivisões na área delimitada pelo processo de segmentação para cada conjunto anel cartilaginoso e ligamento anular. A determinação desses conjuntos foi feita manualmente, no primeiro *frame* de vídeo. Como as traqueias autotransplantadas sofrem uma redução do seu tamanho devido às suturas e, para poder comparar o comportamento de cada segmento antes e depois do transplante, as escolhas de cada conjunto anel cartilaginoso e ligamento anular foram feitas primeiramente na traqueia suturada (pós-transplante). Posteriormente, fez-se a delimitação na traqueia intacta (pré-transplante), mantendo a correspondência com os mesmos segmentos.

A figura 22 mostra a imagem do primeiro *frame* da traqueia capturada pela câmera de vídeo antes e depois do transplante, subdividida em quatro segmentos, formados pela cartilagem e pelo ligamento anular, e identificados, respectivamente, pelos tons claros e escuros na imagem. Os segmentos foram diferenciados em quatro cores: vermelho para o mais distal, verde e azul para os segmentos centrais e magenta para o segmento mais proximal. As figuras 22 A e B mostram as bordas da

traqueia que foram delimitadas pelo processo de segmentação e as figuras 22 C e D mostram como foi delimitada a área de cada segmento.

Figura 22 – Imagem do primeiro *frame* de vídeo da traqueia do rato N, antes e depois do transplante, dividida em quatro segmentos. As linhas coloridas das figuras A e B indicam as bordas detectadas pela técnica de segmentação da imagem e as figuras C e D apresentam as áreas calculadas entre as bordas superior e inferior.

Fonte: próprio autor

As variações das áreas desses segmentos durante a ventilação mecânica, antes do transplante, podem ser visualizadas na figura 23. É possível identificar o movimento de entrada de ar na traqueia, representada pelas fases ascendentes dos gráficos até alcançar um valor de pico (nº 4), e o movimento de saída, representada pela fase descendente, até um valor mínimo, que é a posição de repouso (nº 5).

Nos resultados apresentados na figura 23, um período de repouso mais longo pode ser observado ao redor do *frame* 1000 (nº 1), seguido por um estímulo quase-senoidal – *SnapShot* –, (nºs 2 e 3). Esta manobra ventilatória é usada pelo SAV para calcular os parâmetros da mecânica do sistema respiratório através do LSCM. O nº 6

indica a manobra ventilatória de múltiplas frequências – *QuickPrime* –. As linhas tracejadas indicam o período T de um dos ciclos ventilatórios.

Figura 23 – Amostra de 2000 *frames* de vídeo (60 *frames* equivalem a 1 s) com as variações das áreas da projeção da traqueia. A linha preta do gráfico superior representa a variação da área total analisada e as linhas coloridas do gráfico inferior, das áreas das seções de cada um dos segmentos mostrados na figura 20. A marca (T) indica o período de um ciclo ventilatório normal; (1) repouso prévio à perturbação quasi-senoidal; (2) pico da perturbação; (3) vale da perturbação; (4) final da inspiração na ventilação; (5) final da expiração na ventilação; (6) perturbação com múltiplas frequências.

Fonte: próprio autor

É possível observar um pequeno ruído de alta frequência ao longo do sinal que representa o valor da área da seção da traqueia no tempo. Esse ruído é inerente ao processo de segmentação das imagens e está associado à resolução da imagem da câmera de vídeo. Para atenuar esse ruído foi escolhido um filtro passa baixa de Savitzky-Golay com uma janela de onze amostras e polinômio de sétima ordem, implementado por meio da função *sgolayfilt()* (Matlab, The MATHWORKS Inc., EUA). Esse filtro apresenta a vantagem de suavizar os ruídos de alta frequência preservando as informações dos picos e vales do sinal original, sendo mais eficiente do que os filtros de média ou mediana com janela móvel.

O controle do SAV foi realizado por um software dedicado (*FlexWare 7.0*, SCIREQ Inc., Canadá) que permite configurar os principais parâmetros ventilatórios por meio de uma interface gráfica amigável. Além disso, esse software permite elaborar pequenos códigos com instruções para o ventilador ao longo do tempo (*scripts*), possibilitando executar os protocolos experimentais com mais precisão e

reprodutibilidade. A figura 24 apresenta um diagrama com os sinais de volume e pressão do SAV gerados a partir do movimento do pistão. Nas perturbações quasi-senoidal e de múltiplas frequências, a válvula de expiração permanece fechada e a entrada e saída do ar para o animal são controlados de forma ativa pelo movimento do pistão. Para diferenciar esses movimentos dos que ocorrem durante a ventilação corrente adotou-se para esses instantes a nomenclatura “inspiração-imposta” e “expiração-imposta”.

Figura 24 – Diagrama com principais sinais ventilatórios antes, durante e depois de uma perturbação quasi-senoidal.

Fonte: próprio autor

As análises das variações das imagens da traqueia foram realizadas em dois instantes: durante a ventilação corrente e nas perturbações quasi-senoidais.

Na ventilação corrente o pistão do SAV desloca aproximadamente 3 mL de ar (10 mL/kg) para os pulmões, sendo que a expiração ocorre espontaneamente devido a força elástica dos tecidos.

Uma vez que os valores das áreas da traqueia de todo o experimento foram salvos numa planilha (Excel, Microsoft, EUA), foi elaborada uma rotina computacional (Matlab, The MATHWORKS Inc., EUA) para ler esses valores e calcular os instantes de tempo e os valores de pico da inspiração e da expiração. Esse cálculo foi realizado através da função *findpeaks* () (Matlab, The MATHWORKS Inc., EUA), adotando uma distância mínima de 55 *frames* entre dois picos consecutivos. A confirmação dos valores detectados pela rotina computacional foi realizada visualmente para assegurar

a correção de todo o processo. Essa medida possibilitou avaliar o comportamento de cada segmento da traqueia durante todo o experimento.

Durante as perturbações quasi-senoidais o software (*FlexWare 7.0*, SCIREQ Inc., Canadá) faz a gravação (frequência de amostragem de 256 Hz) dos valores de pressão e volume no cilindro do pistão do SAV e também calcula, a partir dos valores de calibração da cânula, os valores de pressão e volume na traqueia. Assim, esses são os instantes em que é possível comparar as variações da área da traqueia com os parâmetros da mecânica respiratória.

Para calcular as variações máximas e mínimas da área da projeção da traqueia durante as perturbações, foram usadas as informações das imagens em três momentos, como mostram as marcações da figura 23: (1) no período de repouso prévio à perturbação quasi-senoidal; (2) no valor máximo, ou seja, quando o pistão do SAV atingiu o máximo volume inspiratório e; (3) no valor mínimo, quando o pistão do SAV retornou à posição original.

Uma rotina computacional (Matlab, The MATHWORKS Inc., EUA) foi criada para detectar automaticamente as perturbações quasi-senoidais, encontrar os pontos de repouso, máximo e mínimo e realizar o cálculo da amplitude inspiratória (= valor máximo - valor repouso) e expiratória (= valor máximo - valor mínimo).

A figura 25 apresenta com mais detalhes a variação das amplitudes da área da traqueia durante a perturbação quasi-senoidal nos cenários basal e MCh 300 µg/kg.

Figura 25 – Detalhe da variação da área total da imagem da projeção da traqueia durante a primeira perturbação quasi-senoidal do cenário Basal (A) e MCh 300 µg/kg (B).

Fonte: próprio autor

3.5 Análise dos dados coletados

Em função do baixo número de ratos com autotransplante bem sucedido ($n = 6$), não foi possível fazer uma análise estatística dos resultados dos experimentos. Assim, os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão e os gráficos foram elaborados com o auxílio de *softwares* comerciais (GraphPad Prism 6, GraphPad Software, EUA) (Excel, Microsoft, EUA). Para algumas medidas, nas quais não foram observados um padrão de comportamento entre os animais, ou antes e depois dos transplantes, foram apresentados apenas os resultados referentes a um único rato, a fim de ilustrar o potencial da técnica de captura e análise das imagens.

4 RESULTADOS

Os resultados dos experimentos são apresentados em três partes: avaliação da mecânica respiratória, imagens de vídeo pré e pós-transplante e comportamento dos segmentos da traqueia pré e pós-transplante.

Durante todo o trabalho foram usados 24 ratos Wistar. Os cinco primeiros ratos (A, B, C, D e E) foram empregados na primeira fase do estudo para testar a viabilidade da técnica de captura das imagens por vídeo. Foram realizados outros dois experimentos com os ratos F e G para a prática da técnica cirúrgica de transplante, ajustes do protocolo, medição da mecânica respiratória e captura das imagens pré e pós-transplante.

Após esses testes iniciais, foram programados outros 12 experimentos com o objetivo de comparar a mecânica respiratória pré e pós-transplante e ampliar a discussão desses resultados com as imagens da traqueia. Nesse sentido, optou-se por fazer o autotransplante em seis ratos e usar outros seis como grupo controle, realizando a exposição da traqueia, executando o mesmo protocolo experimental, mas sem o transplante.

Nessa fase, quatro ratos morreram antes da metade do experimento (H, I, J e K) e a causa só foi esclarecida no experimento do rato K. As mortes ocorreram pela elevada concentração das doses de MCh, que estavam sendo preparadas, desde o experimento do rato A, com uma concentração de 30 mg/kg e 300 mg/kg. Esse erro só foi identificado quando se verificou que nos primeiros experimentos foi usado um fármaco fora da data de validade, ou seja, provavelmente com um efeito diminuído. Assim, foi corrigida a concentração da MCh para 30 µg/kg e 300 µg/kg e descartados os resultados de todos os experimentos anteriores.

Os experimentos com os ratos L, M, N, P, Q e S ocorreram conforme o planejado, sendo que os ratos O e R morreram devido a complicações do procedimento cirúrgico. Por fim, foram realizados os experimentos controles com os ratos C1, C2, C3, C4 e C5. O rato C2 também morreu na segunda metade do experimento, provavelmente devido a uma dose mais elevada de anestesia. Como os experimentos eram relativamente longos (aproximadamente 2 h) e o controle da dose de manutenção da anestesia era difícil, para evitar outras mortes optou-se por manter a sedação através da inalação de Isoflurano, acoplado na entrada de ar do SAV.

Posteriormente, ao processar as imagens das traqueias desses animais

verificou-se que esse acoplamento da entrada do anestésico interferiu na pressão do ar na traqueia e inviabilizou a análise das imagens desses experimentos (C3, C4 e C5). Devido à morte dos ratos O e R não havia mais animais para o experimento C6. Em resumo, foram coletados dados da mecânica de seis animais transplantados e de quatro do grupo controle e imagens dos seis animais transplantados e um do grupo controle.

Esses contratempos impediram obter resultados com uma amostragem mais significativa, mas permitiu avaliar o potencial da técnica de imagem para a avaliação dinâmica da mecânica da traqueia.

4.1 Resultados da mecânica respiratória

Como já descrito, o cálculo dos valores da elastância e resistência do LSCM está baseado nas medidas de pressão e volume do ar na traqueia durante o movimento do pistão do SAV no estímulo quasi-senoidal. A figura 26 apresenta as medidas dessas duas variáveis para o rato N, antes do transplante. Nos cenários Basal, PBS e Metabolizado os valores da pressão são bastante similares. Nos cenários MCh 30 e 300 $\mu\text{g/kg}$ os valores da pressão na traqueia são maiores durante a inspiração imposta e menores durante a expiração imposta, sendo que no cenário MCh 300 $\mu\text{g/kg}$ a pressão de pico no final da expiração é negativa (-5,1 cmH_2O).

Os valores do volume na traqueia apresentam valores bastante similares nos diferentes cenários de broncoconstrição.

Figura 26 – Gráficos da pressão (Ptr) e volume (Vtr) na traqueia durante o primeiro estímulo quasi-senoidal, nos cenários de broncoconstrição do rato N, antes do transplante.

Fonte: próprio autor

As figuras 27 e 28 apresentam, respectivamente, os cálculos da elastância pré e pós-transplante, de acordo com a **eq. (4)**. O LSCM foi aplicado para as quatro perturbações quasi-senoidais provocados em cada cenário do experimento, fazendo o ajuste dos dados de pressão, fluxo e volume, obtidos experimentalmente, para três diferentes situações: inspiração forçada, expiração forçada e ciclo completo. Os dados apresentados são referentes aos ratos L, M, N, P, Q e S.

Figura 27 – Valores da elastância (média $\pm$ desvio padrão) dos 6 ratos antes do autotransplante, calculados em quatro instantes para os cinco cenários do protocolo experimental: Basal, PBS, MCh 30 e 300 $\mu\text{g/kg}$ e Metabolizado. Foram calculados três valores da elastância para diferentes instantes da perturbação quasi-senoidal: inspiração forçada, expiração forçada e ciclo completo.

Fonte: próprio autor

Figura 28 – Valores da elastância (média $\pm$ desvio padrão) dos 6 ratos depois do autotransplante, calculados em quatro instantes para os seis cenários do protocolo experimental: Basal, PBS, MCh 30 e 300 $\mu\text{g/kg}$ e Metabolizado. Foram calculados três valores da elastância para diferentes instantes da perturbação quasi-senoidal: inspiração forçada, expiração forçada e ciclo completo.

Fonte: próprio autor

Observa-se que as diferentes formas de aplicação do modelo – inspiração forçada, expiração forçada e ciclo completo – apresentaram diferenças significativas nas duas primeiras medidas da elastância para o cenário com maior dose de MCh (300 $\mu\text{g/kg}$).

As figuras 29 e 30 apresentam, respectivamente, os cálculos da Resistência pré e pós-transplante, para três diferentes momentos da perturbação quasi-senoidal: inspiração forçada, expiração forçada e ciclo completo.

Figura 29 – Valores da Resistência (média $\pm$ desvio padrão) dos 6 ratos antes do autotransplante, calculados em quatro instantes para os cinco cenários do protocolo experimental: Basal, PBS, MCh 30 e 300 $\mu\text{g/kg}$ e Metabolizado. Foram calculados três valores da resistência para diferentes instantes da perturbação quasi-senoidal: inspiração forçada, expiração forçada e ciclo completo.

Fonte: próprio autor

Figura 30 – Valores da Resistência (média $\pm$ desvio padrão) dos 6 ratos depois do autotransplante, calculados em quatro instantes para os cinco cenários do protocolo experimental: Basal, PBS, MCh 30 e 300 $\mu\text{g/kg}$ e Metabolizado. Foram calculados três valores da resistência para diferentes instantes da perturbação quasi-senoidal: inspiração forçada, expiração forçada e ciclo completo.

Fonte: próprio autor

Os valores médios dos coeficientes de determinação (COD, do inglês *Coefficient Of Determination*) de cada uma das quatro perturbações quasi-senoidais, realizadas nos diferentes cenários de broncoconstrição antes e depois dos transplantes, e que foram apresentados nas figuras 27 a 30, estão acima do limiar de 0,9 estabelecido pelo SAV, como mostra a figura 31, confirmando que os valores da elastância e resistência permitem um bom ajuste da curva prevista como modelo para o cálculo.

Figura 31 – Valores do Coeficiente de Determinação dos valores de E e R para os cenários Basal, PBS, MCh 30 e 300 $\mu\text{g/kg}$ e Metabolizado, pré e pós-transplante. A linha tracejada no valor de 0,9 estabelece o valor do limiar mínimo para a validação da medida.

Fonte: próprio autor

Na figura 32 é possível observar a variação das medidas da elastância e resistência antes e depois do transplante, para a primeira perturbação quasi-senoidal, ou seja, no instante mais próximo da máxima ação da MCh, para cada um dos cenários do protocolo experimental.

Figura 32 – Valores comparativos pré e pós-transplante da primeira medida de cada um dos cinco cenários do protocolo experimental: Basal, PBS, MCh 30 e 300 $\mu\text{g/kg}$ e Metabolizado (média $\pm$ desvio padrão). (A) Elastância calculada na fase inspiratória; (B) Resistência calculada na fase inspiratória.

Fonte: próprio autor

As medidas de R_N , G e H realizadas pelo SAV através das perturbações de múltiplas frequências (*QuickPrime*) para o modelo de fase constante apresentaram uma grande variação entre os cenários do protocolo experimental e também entre os ratos. A figura 33 apresenta os valores médios dos COD de cada uma das quatro perturbações *QuickPrime*, realizadas em cada cenário de broncoconstrição (pré e pós-transplante).

Figura 33 – Valores do Coeficiente de Determinação das medidas de R_N , G e H para os cenários Basal, PBS, MCh 30 e 300 $\mu\text{g/kg}$ e Metabolizado, pré e pós-transplante. A linha tracejada no valor de 0,9 estabelece o valor do limiar mínimo para a validação das medidas.

Fonte: próprio autor

4.2 Resultados das imagens de vídeo

Foi possível capturar e processar as imagens das traqueias de quase todos os ratos, com exceção dos ratos O, R, C3, C4 e C5.

A informação mais elementar que pode ser extraída dos vídeos é a medida dos intervalos de tempos entre os ciclos respiratórios. A tabela 1 mostra os períodos médios dos ciclos respiratórios (média $\pm$ desvio padrão), calculados a partir de um programa desenvolvido em ambiente de programação matemática (Matlab, The MATHWORKS, EUA) para detectar os picos e os vales do sinal que representa a variação das áreas e calcular automaticamente os períodos de cada ciclo. A tabela da esquerda apresenta as medições dos ratos usados na fase inicial dos experimentos e a tabela da direita as medições dos ratos cujos experimentos foram satisfatórios.

Tabela 1 – Cálculo dos períodos respiratórios (*frames*) e da frequência respiratória (bpm – do inglês *breath per minute*) para todos os ratos usados nos experimentos (média $\pm$ desvio padrão). Para os ratos A a G 50 *frames* equivalem a 1 s e, para os demais experimentos, 60 *frames* equivalem a 1 s.

Rato	<i>frames</i>	<i>bpm</i>
A	35,3 $\pm$ 1,1	85,0 $\pm$ 2,7
B	35,3 $\pm$ 0,9	85,0 $\pm$ 2,2
C	35,2 $\pm$ 1,9	85,2 $\pm$ 4,4
D	35,3 $\pm$ 2,1	85,1 $\pm$ 4,9
E	35,2 $\pm$ 0,6	85,0 $\pm$ 1,5
F	35,3 $\pm$ 2,1	85,0 $\pm$ 1,5
G	35,2 $\pm$ 2,5	85,2 $\pm$ 5,7
H	39,8 $\pm$ 0,5	90,5 $\pm$ 1,2
I	39,4 $\pm$ 2,9	91,3 $\pm$ 6,3
J	40,2 $\pm$ 3,4	89,6 $\pm$ 6,9
K	40,7 $\pm$ 2,4	88,5 $\pm$ 4,9

Rato	<i>frames</i>	<i>bpm</i>
L	39,8 $\pm$ 0,7	90,4 $\pm$ 1,5
M	39,4 $\pm$ 2,5	91,3 $\pm$ 5,5
N	39,5 $\pm$ 1,7	91,1 $\pm$ 3,7
P	39,5 $\pm$ 1,8	91,1 $\pm$ 3,9
Q	39,7 $\pm$ 1,5	90,8 $\pm$ 3,3
S	39,5 $\pm$ 1,8	91,2 $\pm$ 3,9
C1	39,6 $\pm$ 1,7	91,0 $\pm$ 3,7
C2	39,1 $\pm$ 3,8	92,2 $\pm$ 8,2

Fonte: próprio autor

A principal informação obtida a partir dos vídeos capturados foi o cálculo da projeção da área do segmento da traqueia ao longo do experimento. A figura 34 apresenta a variação da área de um segmento da traqueia do rato N, antes do transplante, durante 133 s (8000 *frames*), com início logo após a aplicação da dose de MCh 300 μ g/kg.

É possível observar a variação da área devido ao movimento de entrada e saída de ar do pulmão, ou seja, da ventilação promovida pelo SAV e uma modulação dos valores máximos e mínimos devido à ação da MCh no tempo. Logo após a aplicação da dose (instante zero) há uma diminuição dos valores de pico da inspiração e também dos valores no final da expiração. Após o *frame* 300 percebe-se a estabilização dos valores do final da expiração e de um aumento nos picos da inspiração, até um valor máximo, que ocorre por volta do frame 2400, momento em que os valores voltam a diminuir.

Também é possível observar os movimentos do pistão do SAV durante as quatro perturbações quasi-senoidais (*frames* 900, 2800, 4700, 6500) e as quatro perturbações *QuickPrime* (*frames* 1800, 3700, 5600, 7500).

O resultado do aumento médio da área da projeção da traqueia foi de $0,9 \pm 0,24\%$ nas fases inspiratórias e, nas fases expiratórias, redução de $5,2 \pm 6,1\%$, nos picos das perturbações quasi-senoidais dos cenários de maior broncoconstrição, no pré-transplante. No pós-transplante os aumentos médios foram de $0,7 \pm 0,26\%$ e as reduções de $1,7 \pm 0,73\%$, para o mesmo cenário.

Figura 34 – Variação da área da traqueia logo após a aplicação da dose de 300 $\mu\text{g/kg}$ no rato N, antes do transplante (1000 *frames* equivalem a 16,7 s).

Fonte: próprio autor

A figura 35 apresenta a variação da área do mesmo segmento da traqueia do rato N e para o mesmo cenário de broncoconstrição, depois do autotransplante. É

possível observar que logo após a aplicação da dose (instante zero) há uma elevação dos valores de pico da inspiração e também um aumento dos valores do final da expiração.

Figura 35 – Variação da área da traqueia logo após a aplicação da dose de 300 $\mu\text{g/kg}$ no rato N, após o transplante (1000 *frames* equivalem a 16,7 s).

Fonte: próprio autor

Para ilustrar melhor as alterações provocadas pela ação da MCh ao longo do tempo, foi realizado um pós-processamento por meio de uma rotina computacional, a partir das informações temporais das variações da traqueia, conforme mostrado nas figuras 34 e 35, retirando as variações de área referentes à ventilação e às perturbações ventilatórias. A figura 36 apresenta a variação dos valores do final da inspiração e da expiração das informações da figura 34. Visualiza-se com mais clareza a rápida e acentuada diminuição dos valores da área no final da inspiração e da expiração, indicando o início do efeito da MCh e o posterior crescimento dos picos da inspiração até aproximadamente o frame 2500, quando começa a reduzir.

Com a possibilidade de observar o efeito da MCh ao longo do tempo, foi calculado o ponto de maior efeito da dose para cada um dos experimentos antes e depois do transplante.

Figura 36 – Envoltória dos valores máximos da fase inspiratória (azul) e mínimos da fase expiratória (laranja) da figura 34, após a aplicação da dose de MCh (300 µg/kg), com as linhas tracejadas indicando os instantes em que as perturbações ventilatórias foram realizadas no rato N (SS – *SnapShot* ou quasi-senoidal; QP – *QuickPrime* ou múltiplas frequências).

Fonte: próprio autor

A tabela 2 apresenta esses valores bem como a diferença de tempo entre o instante desse valor e os instantes das 1ª e 2ª medidas das perturbações quasi-senoidais.

Tabela 2 – Instantes de tempo (segundos) do maior efeito da MCh e das perturbações quasi-senoidais (*SnapShot*) para os seis animais no cenário MCh 300 µg/kg. A letra “T” após a nomenclatura do rato significa transplantado.

Rato	Pico da dose de MCh (s)	Δt entre pico MCh e 1ª SS (s)	1ª <i>SnapShot</i> (s)	Δt entre pico MCh e 2ª SS (s)	2ª <i>SnapShot</i> (s)
L	15,0	2,5	17,5	34,2	49,2
LT	42,0	24,4	17,6	6,8	48,7
M	38,7	21,0	17,8	10,7	49,4
MT	41,4	24,3	17,1	6,7	48,1
N	41,8	23,7	18,1	7,3	49,1
NT	31,1	13,5	17,6	17,4	48,6
P	28,2	10,3	17,9	21,2	49,5
PT	30,7	13,5	17,2	17,4	48,1
Q	37,6	20,1	17,4	11,4	48,9
QT	36,2	19,3	16,9	12,2	48,5
S	37,4	19,7	17,8	11,3	48,7
ST	38,8	21,6	17,2	9,5	48,2

Fonte: próprio autor

Com exceção dos ratos L, NT, P e PT, o pico da dose de MCh ocorreu entre os instantes 35 e 42 s, a primeira perturbação quasi-senoidal ocorreu por volta de 17,5 s e a segunda por volta do instante 48,7 s.

A informação dos valores máximos da inspiração e mínimos da expiração permitem avaliar o comportamento da parede da traqueia nos diferentes cenários. A figura 37 apresenta um resumo da variação da projeção da área da traqueia do rato S durante todos os ciclos respiratórios do experimento, antes e depois do transplante, em relação ao cenário Basal.

Figura 37 – Variação dos valores máximos das inspirações e mínimos das expirações para os diferentes cenários de broncoconstrição durante o pré-transplante (linhas azul e vermelha) e no pós-transplante (linhas cinza e amarela) do rato S, em relação ao cenário Basal.

Fonte: próprio autor

Observa-se que antes do transplante não ocorreram variações significativas da área no final da inspiração e da expiração no cenário PBS, antes e depois do transplante. No cenário MCh 30 µg/kg percebe-se uma diminuição da área no final da expiração no pré-transplante, indicando um estreitamento do lúmen traqueal, seguido por um aumento da área do final da inspiração, indicando que está ocorrendo um aumento na amplitude da ventilação. No pós-transplante desse cenário, não há uma variação significativa devido à ação da MCh, ocorrendo apenas um aumento do lúmen traqueal de aproximadamente 3,8%. No cenário MCh 300 µg/kg percebe-se a ação da MCh no pré e pós-transplante, sendo que as variações nas amplitudes da ventilação são maiores no pré-transplante. No cenário metabolizado, percebe-se que a área da

traqueia aumentou de tamanho em relação ao início do experimento (cenário Basal), no pré e pós-transplante, indicando um aumento do seu lúmen.

Não foi observado um padrão de comportamento da variação da traqueia nos experimentos dos seis ratos. A figura 38 apresenta de forma resumida as variações da área antes e depois do transplante.

Figura 38 – Variação da área da projeção da traqueia no final da expiração (repouso) dos seis ratos no pré-transplante (azul), pós-transplante (vermelho) e ventilação (preto) com a representação percentual das suas variações em relação ao cenário Basal durante todo o experimento. A letra “T” após a nomenclatura do rato significa transplantado.

Fonte: próprio autor

As figuras 39 e 40 apresentam um resumo da variação da projeção da área da traqueia dos seis ratos durante o primeiro estímulo quasi-senoidal para os diferentes cenários de broncoconstrição antes e depois do transplante, separando os momentos da inspiração e da expiração impostas.

Na figura 39A observa-se um aumento médio na área da projeção da traqueia, normalizada em relação às variações do cenário basal, de 1,7 vezes durante a inspiração imposta para os cenários MCh 30 µg/kg e 3,1 vezes para os cenários MCh 300 µg/kg, antes do transplante. No pós-transplante (figura 39B) praticamente não houve variação significativas para os cenários MCh 30 µg/kg e ocorreu um aumento de 2,4 vezes nos cenários MCh 300 µg/kg.

Figura 39 – Variação das áreas das traqueias durante a inspiração forçada da primeira perturbação quase-senoidal para os cenários PBS, MCh 30 e 300 $\mu\text{g/kg}$ em relação às variações do cenário Basal. (A) Pré-transplante; (B) Pós-transplante.

Fonte: próprio autor

A figura 40A mostra uma diminuição na área da traqueia durante a expiração imposta de 3,3 vezes para o cenário MCh 30 $\mu\text{g/kg}$ e de 13,4 vezes para o cenário MCh 300 $\mu\text{g/kg}$. No pós-transplante (figura 40B) só houve variações significativas para o cenário MCh 300 $\mu\text{g/kg}$, com uma redução média de 4,5 vezes em relação ao cenário basal.

Figura 40 – Variação das áreas das traqueias durante a expiração forçada da primeira perturbação quase-senoidal para os cenários PBS, MCh 30 e 300 $\mu\text{g/kg}$ em relação às variações do cenário Basal. (A) Pré-transplante; (B) Pós-transplante.

Fonte: próprio autor

A figura 41 apresenta com mais detalhes a variação da área da traqueia no cenário MCh 300 $\mu\text{g/kg}$ durante a fase inspiratória das quatro perturbações quasi-senoidais, para os seis animais, antes e depois do transplante. No pré-transplante, observa-se uma diminuição do valor médio entre as primeiras e a segundas medidas de 2,9 vezes para 1,8 vezes, com uma dispersão que mostra similaridade entre alguns resultados. No pós-transplante a dispersão dos valores entre as primeiras e a segundas medidas é ainda maior.

Figura 41 – Variação das áreas das traqueias dos seis ratos durante a inspiração imposta das quatro perturbações quasi-senoidais do cenário MCh 300 $\mu\text{g/kg}$, em relação às medidas do cenário basal.

Fonte: próprio autor

Durante a fase expiratória, as diferenças das médias entre as primeiras e segundas medidas aumentam ainda mais, como mostra a figura 42. A primeira medida do pré transplante mostra que está ocorrendo um estreitamento médio de 13,3 vezes em relação ao tamanho da área no cenário basal. Já na segunda medida esse estreitamento é menos intenso, com uma redução média de 2,2 vezes. No pós-transplante os estreitamentos são menores, com uma redução média na área de 4,5 vezes na primeira medida e 1,8 vezes na segunda em relação ao seu tamanho no cenário basal. Os valores das terceiras e quartas medidas são similares e indicam uma redução do efeito da dose da MCh.

Figura 42 – Variação das áreas das traqueias dos 6 ratos durante a expiração imposta das quatro perturbações quase-senoidais do cenário MCh 300 $\mu\text{g/kg}$, em relação às medidas do cenário basal.

Fonte: próprio autor

Por fim, a figura 43 apresenta com mais detalhes as variações das áreas das traqueias de cada rato entre as primeiras e segundas medidas do cenário MCh 300 $\mu\text{g/kg}$, antes e depois do transplante. No pré-transplante é possível observar que a área da traqueia do rato L apresenta um valor similar entre as medidas (3,74 vezes na primeira e 3,70 na segunda) e a área da traqueia do rato N tem um aumento na segunda medida, passando de 2,68 para 2,79 vezes em relação ao cenário basal. No pós-transplante, as traqueias dos ratos LT e ST apresentam pouca variação entre as medidas e o rato MT apresenta um aumento maior na segunda medida, passando de 2,4 para 3,8 vezes em relação ao tamanho do basal.

Figura 43 – Variação da área da traqueia de cada rato entre as primeiras e segundas perturbações quase-senoidais do cenário MCh 300 $\mu\text{g/kg}$, apresentados na figura 41.

Fonte: próprio autor

4.3. Comportamento dos segmentos da traqueia pré e pós-transplante

A técnica de captura de imagem de vídeo permitiu avaliar o comportamento de alguns segmentos da traqueia (anel cartilaginoso e ligamento anular) antes e depois dos autotransplantes. A figura 44 mostra a variação de quatro segmentos da traqueia do rato N, durante o cenário MCh 300 $\mu\text{g/kg}$, antes do transplante. Observa-se que o segmento mais distal (vermelho) sofre uma acentuada redução dos valores finais da expiração nos primeiros 500 *frames*. Percebe-se também um aumento na amplitude da área durante a ventilação, sendo que os segmentos centrais (linhas azul e verde) apresentaram maior ampliação de movimento.

Figura 44 – Variação da projeção da área total da traqueia do rato N (gráfico inferior) e de quatro segmentos (gráfico superior), sendo que a cor vermelha representa o segmento mais distal e o magenta o mais proximal, durante os primeiros 3500 *frames*, do cenário MCh 300 $\mu\text{g/kg}$ antes do transplante.

Fonte: próprio autor

A figura 45 apresenta as variações dos mesmos segmentos e no mesmo cenário de broncoconstrição apresentado na figura 44, após o autotransplante. Observa-se que nenhum segmento sofreu alterações na fase final da expiração e a dose de MCh provocou um aumento nos picos da inspiração por volta do *frame* 500. Comparando o comportamento dos segmentos no pré e pós-transplante, percebe-se que o segundo segmento mais distal (verde) teve uma menor variação de área após o transplante.

Figura 45 – Variação da projeção da área total da traqueia do rato N (gráfico inferior) e de quatro segmentos (gráfico superior), sendo que a cor vermelha representa o segmento mais distal e o magenta o mais proximal, durante os primeiros 3500 *frames*, do cenário MCh 300 µg/kg depois do transplante.

Fonte: próprio autor

A figura 46 apresenta um resumo do comportamento de cada segmento visualizado nas figuras 44 e 45 durante a ventilação. Pode-se visualizar que antes do transplante ocorreu um estreitamento de 2,5 % no segmento mais distal (vermelho) e de 1,2 % no segundo segmento distal (verde).

Figura 46 – Variação dos valores máximos da inspiração e da expiração de quatro segmentos da traqueia do rato N, antes e depois do transplante, durante a ventilação, apresentados nas figuras 44 e 45, respectivamente. A cor preta representa a variação dos valores máximos da expiração (repouso), sendo que os valores negativos representam um estreitamento do lúmen, e as cores representam os valores máximos da inspiração para os respectivos segmentos.

Fonte: próprio autor

Outra informação relevante sobre os movimentos das paredes da traqueia foi observada durante as perturbações quasi-senoidais, quando o movimento de expiração imposta provocou acentuados estreitamentos do lúmen traqueal. A figura 47 apresenta a variação percentual da área de cada segmento visualizado nas figuras 44 e 45 durante a primeira e a segunda perturbação.

Figura 47 – Variação da área dos quatro segmentos da traqueia do rato N durante a aplicação das duas primeiras perturbações quasi-senoidais, antes e depois do transplante, apresentados nas figuras 44 e 45, respectivamente. As cores representam a variação dos respectivos segmentos, sendo que os valores positivos representam a variação durante a inspiração imposta e os negativos durante a expiração imposta.

Fonte: próprio autor

Pode-se observar que o segundo segmento (verde) teve uma menor variação na primeira perturbação após o transplante e o quarto segmento (magenta) um discreto aumento. As variações foram menores para as medidas da segunda perturbação, principalmente durante a expiração imposta.

5 DISCUSSÃO

Como já apresentado no Capítulo 2, uma questão chave para acelerar a avaliação das técnicas e dos tecidos gerados pela Engenharia de Tecidos é o desenvolvimento de ferramentas que possam realizar medidas das suas propriedades mecânicas, de forma não invasiva e não destrutiva, preferencialmente em tempo real (SCHOEN, 2011).

Vários testes precisam ser feitos previamente *in vitro*, assegurando as condições mínimas necessárias para a viabilidade de um implante. Entretanto, o ponto mais crítico e complexo é sempre a avaliação da integridade estrutural e biológica *in vivo*.

O aprimoramento do sistema de aquisição de imagens previamente desenvolvido no LEB possibilitou contornar algumas dificuldades descritas por Silva e colaboradores (2011) para o contexto *in vitro*.

A utilização de um ventilador mais sofisticado (*flexiVent FX*, SCIREQ, Canadá) tornou o sistema de medição mais simples e robusto. Além disso, esse ventilador possibilitou realizar manobras ventilatórias nas fases inspiratórias e expiratória e permitiu avaliar a mecânica ventilatória através do LSCM de forma mais direta, sendo que é o modelo mais amplamente usado na avaliação da mecânica respiratória em roedores.

A utilização de uma câmera de vídeo com interface *Fireware* IEEE 1394b, possibilitou uma transmissão digital das imagens capturadas, eliminando os ruídos e interferências presentes no sistema de transmissão analógica da câmera anterior. A maior frequência de aquisição da câmera de vídeo também melhorou a resolução temporal das variações da área da traqueia de 30 para 60 *frames* por segundo.

A aquisição das imagens da traqueia *in vivo* diminuiu o problema relatado por Silva et al. (2011) com relação as dificuldades de se manter um padrão de distensibilidade das traqueias no sistema de medição *in vitro*, bem como a manutenção das propriedades fisiológicas dos tecidos.

5.1 Imagens da traqueia

Os resultados das imagens da traqueia mostraram que foi possível obter informações relevantes sobre o deslocamento das paredes da traqueia em condições normais e de broncoconstrição com a utilização de apenas uma câmera.

Como mostrado na figura 23 as informações extraídas das imagens correspondem à área da projeção da seção da traqueia a partir da posição da câmera (plano frontal). Assim, as variações das áreas das imagens capturadas correspondem às variações laterais das paredes da traqueia a partir da visão ventral. Essas variações permitem estimar as alterações na área da seção transversal da traqueia e do seu volume se for feita uma comparação com um cilindro, no qual a área da seção e o volume variam o dobro da variação do raio. Assim, um aumento de 1% na área da imagem da traqueia significaria um aumento de 1% no seu diâmetro e, portanto, um aumento de 2% na área da seção da traqueia e no seu volume.

No entanto, como o formato do lúmen traqueal é irregular ao longo do seu comprimento, a comparação com um cilindro acaba sendo uma simplificação imprecisa e não foi adotada nesse trabalho.

As medições dos deslocamentos das paredes da traqueia foram feitas a partir da posição do repouso, ou seja, adotando como referência o final da expiração e com uma PEEP de 3 cmH₂O. A construção de um sistema que permitisse medições absolutas da traqueia exigiria adotar um aparato para controlar com precisão a posição, a distância da câmera, a posição do animal, o controle da iluminação, bem como um sistema de calibração prévia, fatores que ultrapassam o escopo desse trabalho. Assim, a adoção de medidas relativas, normalizadas com a notação percentual, tornou viável o uso dessa técnica em um ambiente laboratorial.

Variações do ângulo de iluminação, por exemplo, podem alterar a detecção da região segmentada em um ou dois pixels ao longo de toda a borda da traqueia, o que por si só pode representar uma alteração de 1 a 2% da área total medida. Por outro lado, para realizar as medições relativas, uma vez iniciado o protocolo, foi fixado um cenário de medição (posição do animal e da câmera, iluminação e foco) que permaneceu inalterado durante todo o experimento.

É possível observar na figura 22 que a colocação de um tecido escuro, produziu um bom contraste entre a imagem de fundo e a traqueia, tornando mais simples e

preciso o processo de detecção das bordas. Uma pequena quantidade de líquido acumulou-se sobre o tecido, ocultando as irregularidades próprias da malha têxtil.

As frequências respiratórias calculadas através da contagem dos *frames* de vídeo ao longo do tempo, como mostra a tabela 1, apresentou um valor médio de 39,5 *frames* por ciclo respiratório, que corresponde a uma frequência respiratória de 91,1 bpm, com um desvio padrão de 3,9. A proximidade com a frequências de 90 bpm imposta pelo SAV assegura que o sistema de captação de imagens é estável e fornece uma referência de tempo com suficiente precisão para as análises feitas a partir das informações extraídas das imagens.

Nota-se também que frequência respiratória dos ratos A a G foi de 85 bpm enquanto que a frequência ventilatória do SAV tinha sido ajustada para 90 bpm. Essa diferença deve-se ao fato de que o sinal de controle da captura dos *frames* de vídeo (*trigger*) estava sendo feito por *software* nesses primeiros experimentos. Posteriormente, optou-se por fazer um controle de captura das imagens com um trigger externo por *hardware* e uma frequência de 60 Hz, ou seja, 60 *frames* por segundo, e que apresentou resultados mais próximos dos 90 bpm impostos pelo SAV. As figuras 34 e 35 exemplificam bem como pode-se extrair informações temporais sobre os instantes de início das perturbações geradas pelo SAV.

Com uma frequência de aquisição de 60 Hz, o sistema de captura de imagem e pós processamento foi capaz de identificar pequenas variações no deslocamento das paredes da traqueia, como por exemplo, durante a ventilação corrente e as perturbações.

5.2 Ação da Metacolina

Como apresentado no Capítulo 2, foi usado um agente constritor da musculatura lisa (MCh) para produzir uma mudança de cenário no sistema respiratório e possibilitar a observação das alterações fisiológicas da traqueia. Como a aplicação da MCh foi realizada por um acesso venoso, a sua ação produziu efeito em toda a musculatura lisa dos ratos.

Essa ação sistêmica assegura uma maior uniformidade temporal na absorção da dose pelos diversos tecidos do sistema respiratório (PETÁK et al., 1997), ao mesmo tempo, torna mais complexa a interpretação das variações da dimensão da traqueia, devido às diversas alterações que ocorrem no sistema respiratório. A simples

consideração das diferentes velocidades e magnitudes dos estreitamentos provocados nas vias aéreas ao longo das ramificações brônquicas gera uma variedade de cenários que precisam ser cuidadosamente avaliados ao se fazer uma interpretação dos parâmetros da mecânica respiratória como um todo.

De uma forma geral, os resultados da mecânica ventilatória apresentados nas figuras 27 a 30 estão de acordo com os dados encontrados por Bates e seus colaboradores (1997) quando se utiliza a MCh como agente agonista da musculatura lisa. Através do modelo de um compartimento, pode-se interpretar que a constrição nas vias aéreas de maior calibre provoca um aumento no valor da resistência e a constrição das vias aéreas de menor calibre pode dificultar ou até mesmo impedir a entrada de ar em algumas regiões do pulmão. Essa redução é caracterizada pelo aumento no valor da elastância, ou seja, o pulmão fica mais “rígido” devido, ou a maior dificuldade da entrada de ar nas regiões mais distais, ou ao ar que ficou aprisionado nessas regiões mais distais (volume residual), durante as ventilações anteriores e que não está saindo com a mesma facilidade, dificultando a entrada do ar nas inspirações posteriores.

Uma primeira informação complementar na discussão desse modelo que se pode extrair da análise da variação das imagens da traqueia durante a ação da MCh, ou seja, nos cenários de maior broncoconstrição, é o intenso estreitamento do lúmen traqueal observado no momento da expiração imposta da primeira perturbação quasi-senoidal. Esse fenômeno pode ser observado pela diminuição da área da projeção da traqueia do rato N logo após o *frame* 1000 nas figuras 34 e 35 e, com mais detalhes, nas figuras 44 e 45. Essa diminuição está associada ao movimento de retorno do pistão do SAV durante a manobra ventilatória, ou seja, o que se observa é uma maior dificuldade do SAV para extrair o ar dos pulmões, o que provoca uma grande redução da pressão no interior da traqueia.

Esse fenômeno foi observado em todos os animais como mostra a variação das áreas da primeira medida do cenário MCh 300 µg/kg. Durante a fase inspiratória (figura 39A), observa-se um aumento médio na área da projeção das traqueias de 3,1 vezes em relação ao cenário basal e na fase expiratória (figura 40A), ocorre uma diminuição de 13,4 vezes.

A partir da diferença das imagens da traqueia nas fases inspiratória e expiratória do estímulo quasi-senoidal, foi formulada a hipótese de que o modelo LSCM apresentaria resultados diferentes quando o cálculo da elastância e resistência

fossem realizados com os valores de volume e pressão obtidos pelo SAV para a manobra completa do pistão ou separadamente, nas fases inspiratória e expiratória.

Os resultados dos valores da elastância apresentados na figura 27 confirmam um aumento de 47% no valor médio da primeira medida da elastância durante a fase expiratória no cenário MCh 300 $\mu\text{g/kg}$ quando comparado com o cálculo do ciclo total. Quando calculada apenas durante a fase inspiratória, ocorreu uma diminuição de 60% em relação ao cálculo para o ciclo total. Essas diferenças são bem atenuadas na segunda medida desse cenário, e praticamente são insignificantes nas demais medidas dos experimentos, sem broncoconstrição.

Nos cálculos da resistência também foram observadas diferenças, como mostra a figura 29. A resistência média das vias aéreas na inspiração imposta foi 34% menor em relação ao ciclo total e 52% menor quando calculada apenas na expiração imposta do primeiro estímulo quasi-senoidal do cenário MCh 300 $\mu\text{g/kg}$.

No entanto, os valores da elastância calculados apenas na fase inspiratória são significativamente menores do que quando calculados no ciclo total ou na expiração. Esses valores sugerem que o ar está conseguindo entrar e se acomodar nas regiões mais distais do pulmão na inspiração imposta, mas na expiração imposta está ocorrendo um aprisionamento do ar, o que explicaria a maior “rigidez” do pulmão, refletida no valor mais alto da elastância quando calculada apenas durante a fase expiratória.

Possivelmente está ocorrendo um fechamento de algumas vias aéreas de menor calibre, sendo que boa parte do volume de ar removido no retorno do pistão estaria nas vias aéreas de maior calibre (proximais). Nesse sentido, o grande estreitamento nas imagens da traqueia durante a fase expiratória parece reforçar essa hipótese. A pressão negativa no interior da traqueia parece ser um reflexo de que o ar das vias de maior calibre está sendo retirado, mas parte significativa está ficando aprisionado nas regiões distais.

Fenômeno similar deveria ocorrer com a medida da resistência. Durante a inspiração forçada, o deslocamento do pistão consegue proporcionar um fluxo de ar para dentro dos pulmões, gerando um valor de resistência menor do que na expiração forçada, quando se observa uma forte redução na pressão devido à redução do fluxo de saída do ar, aprisionado nas regiões mais distais do pulmão. Porém, esse resultado só foi observado nas segundas medidas do cenário MCh 300 $\mu\text{g/kg}$, como mostra a figura 29. Nas primeiras medidas ocorre uma inversão na relação dos valores

esperados e o valor da resistência na inspiração forçada é maior do que na expiração forçada.

Uma justificativa para os diferentes valores encontrados na inspiração e na expiração impostas é a mudança de cenário provocado pelo deslocamento do pistão. Durante a inspiração, o ar é impulsionado de forma ativa pelo deslocamento do pistão e a pressão positiva superaria as dificuldades impostas pelo estreitamento das vias aéreas e pelas forças elásticas contrárias, exercidas pelos tecidos pulmonares e da caixa torácica. No regresso do pistão, as forças elásticas dos tecidos e a diminuição da pressão no interior das vias aéreas colaborariam ainda mais com o estreitamento das vias aéreas provocadas pelo agente constritor.

O estudo de Kriger e seus colaboradores (1976) apresenta uma abordagem diferente sobre os gradientes de pressão nas paredes das vias aéreas durante a entrada e a saída de ar dos pulmões que permite reforçar essa influência do pistão do SAV.

Na figura 2, pode-se perceber que os movimentos do pistão durante a inspiração e a expiração forçadas exercem uma influência no gradiente de pressão das paredes das vias aéreas. Os parâmetros da mecânica ventilatória mostrados nas figuras 27 e 29 e o aumento da área da traqueia na inspiração bem como a sua diminuição durante a expiração, como mostrados nas figuras 39 e 40, sugerem que essa influência do pistão do SAV pode ser ainda maior nos cenários de maior broncoconstrição.

Estudos com traqueia de porcos *in vitro* (NOBLE et al., 2010) mostraram que os segmentos mais distais das vias aéreas ao longo das ramificações dos brônquios apresentam um estreitamento maior que os segmentos mais proximais, quando submetidos a um agente agonista. Resultados similares foram encontrados no trabalho de Duguet e seus colaboradores (2010), para quatro diferentes estirpes de camundongos, onde, além do maior estreitamento dos segmentos mais distais, foi observado também uma maior velocidade de resposta para a dose.

Essas características sugerem que o estreitamento das vias aéreas após a aplicação sistêmica da MCh está ocorrendo primeiramente nas vias mais distais, promovendo um eventual aprisionamento do ar nessas regiões. Nesses instantes a expiração forçada do ar será mais difícil e o fenômeno da diminuição da pressão nas vias aéreas de maior calibre, incluindo a traqueia, será mais acentuado, como indicados na figura 2B.

Uma outra questão que pode ser considerada na discussão sobre a diferença no cálculo dos parâmetros ventilatórios durante a inspiração e a expiração é devido a forma indireta na qual o SAV faz a medida do fluxo e do volume do ar deslocado. O *FlexiVent* calcula o fluxo e o volume de ar pela medida do deslocamento do pistão. Se a força do motor linear for suficiente para promover o retorno do pistão, pode não haver um fluxo de ar correspondente – devido à constrição das vias aéreas – gerando valores equivocados do fluxo e do volume.

No gráfico da figura 26B, percebe-se que no rato N, os valores do volume na traqueia obtidos pelo SAV são muito similares para as primeiras perturbações quasi-senoidais dos cenários Basal e MCh 300 µg/kg. Por outro lado, os valores de pressão na traqueia no cenário MCh 300 µg/kg (figura 26A) são significativamente maiores durante a inspiração em relação ao cenário Basal, e com um pico negativo durante a expiração, que indica uma dificuldade para a retirada do ar. Dificuldade essa que não ficará evidenciada nos valores de fluxo do ar na traqueia, dado que o SAV obtém esses valores através da derivada dos valores do volume, obtidos indiretamente através do deslocamento do pistão.

Assim, os valores dos COD, que foram bastante satisfatórios no caso do rato N (0,996 no cenário Basal e 0,992 no MCh 300 µg/kg) e nos demais ratos, como mostra os resultados da figura 31, também precisam ser avaliados com cautela nos cenários de maior broncoconstrição.

Portanto, a aplicação do LSCM durante o ciclo completo, procedimento padrão do SAV, pode apresentar parâmetros respiratórios que não correspondem à situação fisiológica real dos tecidos pulmonares em cenários de maior broncoconstrição.

5.3 Instantes de tempo de resposta máxima à Metacolina

Uma outra informação relevante que se pode extrair da análise da variação das imagens da traqueia durante a ação da MCh é a observação dos diferentes instantes de tempos de resposta máxima para a contração e relaxamento da musculatura lisa.

A ação sistêmica da MCh produz uma contração na musculatura lisa da traqueia, e também nas vias aéreas do sistema respiratório. Essas alterações, como já apresentadas, provocam um aumento na resistência e na elastância do sistema respiratório bem como um aumento nos valores da pressão na traqueia durante a

inspiração e a expiração. A variação dos valores máximos e mínimos da traqueia durante a ventilação permitem monitorar o efeito da dose no sistema respiratório.

Na figura 34 é possível observar a ação da MCh no aumento da envoltória formada pelos picos da inspiração durante a ventilação, que atinge um valor máximo no instante de captura ao redor do *frame* 2500, e começa a diminuir, indicando assim o instante de maior resposta à MCh. Na figura 36 é possível observar com mais precisão a modificação dos valores máximos e mínimos das áreas da traqueia, tornando mais precisa a identificação do instante de maior efeito da dose.

Os instantes em que ocorreram os picos das doses para cada um dos ratos, apresentados na tabela 2, indicam um intervalo de tempo médio de 39,4 s (*frame* 2100). O rato P e PT apresentaram uma resposta mais rápida e o rato L teve um pico precoce da dose, provavelmente, devido a um descuido na aplicação da dose através da seringa com a liberação de uma fração do volume antes do instante previsto.

O controle manual da aplicação das doses de MCh gerou uma variação entre os intervalos de tempo de início e fim do deslocamento do embolo da seringa e é um fator que impede uma comparação mais precisa dos instantes de maior ação da dose entre os ratos.

De qualquer forma, a determinação do instante de maior efeito da MCh possibilita compreender melhor os motivos das diferenças que podem ocorrer nas medidas dos parâmetros respiratórios de experimentos com broncoconstrição. As linhas tracejadas da figura 36 apresentam os instantes em que as perturbações foram realizadas no rato N e pode-se observar que o pico da dose está mais próximo da segunda perturbação quase-senoidal (2ª SS). Essa informação poderia justificar o fato de a segunda medida da elastância do rato N (5,74 cmH₂O/mL), ser maior do que a primeira medida (4,83 cmH₂O/mL), quando calculado apenas na fase inspiratória. O mesmo não ocorre com a medida da resistência que é maior na primeira medida. No entanto, devido às limitações desse cálculo pelo SAV, como já explicado, não parece possível fazer uma comparação precisa dos parâmetros respiratórios obtidos com o LSCM para os cenários de maior broncoconstrição.

Por outro lado, se de um modo geral o pico da dose está ocorrendo mais próximo da segunda perturbação quase-senoidal, como mostram as diferenças de intervalos de tempo entre o pico da dose e as primeiras e segundas perturbações da tabela 2, por que os valores de elastância e resistência foram significativamente maiores nas primeiras medidas, como mostram os resultados das figuras 27 a 30?

A mesma pergunta pode ser feita ao observar a redução das áreas das imagens da traqueia durante a expiração imposta da perturbação quasi-senoidal, quando os valores mínimos que representam o estreitamento do lúmen traqueal, são maiores nas primeiras medidas do que nas segundas, como mostra a figura 42.

Uma possível explicação para esse fenômeno parece estar justamente no efeito da MCh na musculatura lisa, que provoca um “enrijecimento” das paredes dos brônquios e bronquíolos ao longo do tempo. As informações das imagens da traqueia mostram que está havendo uma maior dificuldade para se extrair o ar do pulmão na primeira medida, quando a dose da MCh ainda não teria chegado ao seu efeito máximo. Ou seja, as vias aéreas ainda não se enrijeceram suficientemente e estariam colabando mais facilmente no instante em que o ar é retirado pela diferença de pressão. Quando as paredes das vias aéreas enrijecem mais devido ao efeito da MCh, algumas vias permanecem abertas, facilitando a saída do ar. Esse fenômeno é confirmado pelas medidas das resistências (figuras 29 e 30), que são menores nas segundas perturbações, ou seja, está mais fácil de extrair o ar nesses instantes.

Os resultados encontrados por Bates e seus colaboradores (1997) nas medidas de elastância e resistência obtidas pelo SAV em cenários de broncoconstrição provocados por MCh, mostram que há diferenças significativas nos valores quando obtidos com diferentes PEEP (2, 4 ou 6 cmH₂O). Quando a PEEP é maior, os valores da elastância e resistência diminuem significativamente. Esses resultados estão de acordo com a linha de raciocínio apresentada, pois uma maior pressão interna das vias aéreas favorece à manutenção do seu lúmen e o fluxo do ar.

Considerando a variação da área da traqueia na inspiração imposta, como mostra a figura 41, percebe-se que a diferença entre os valores médios das primeiras e segundas perturbações são menores do que na expiração (figura 42) e a figura 43 mostra que no pré-transplante, o rato N teve um aumento de 4% da área da traqueia na segunda perturbação e no rato L praticamente não houve variação (-1%). No pós-transplante o rato MT teve um aumento de 58% na segunda medida, e os rato ST e LT tiveram medidas muito similares nas primeiras e segundas medidas. Essas medições estão mais de acordo com os instantes de maior efeito da dose de MCh apresentados na tabela 2, onde pode-se ver que os ratos LT, M, MT, N, Q, QT, S, ST tiveram o pico da dose mais próximos da segunda medição.

Essas informações novamente sugerem que a fase da inspiração forçada parece ser o melhor instante para se avaliar a mecânica da traqueia em situações de maior broncoconstrição.

5.4 Autotransplante

Além do uso da MCh como agente causador de mudança no cenário , foi realizado o autotransplante de um segmento da traqueia a fim de se comparar através das imagens de vídeo o comportamento dos segmentos pré e pós- transplante.

Essas avaliações foram realizadas através da comparação entre as imagens da traqueia nos diferentes cenários, antes e depois do transplante e entre cada segmento da mesma traqueia e cenários similares, antes e depois do transplante.

Através dos resultados da figura 37, percebe-se uma diferença no comportamento da traqueia antes e depois do transplante. No caso do rato S, a ação da MCh provocou efeitos diferentes na variação da área da traqueia. No pré-transplante, observa-se uma maior amplitude entre os valores da área no final da inspiração e expiração nos cenários MCh 30 e 300 $\mu\text{g/kg}$. No pós-transplante, praticamente não houve uma diferenciação nas amplitudes da inspiração e da expiração no cenário MCh 30 $\mu\text{g/kg}$, mas houve um aumento de aproximadamente 4% da área no final da expiração, indicando que o lúmen traqueal aumentou. No cenário MCh 300 $\mu\text{g/kg}$, percebe-se um aumento na amplitude entre os valores da área no final da inspiração e expiração, mas de menor magnitude que no pré-transplante. No cenário Metabolizado, as traqueias permaneceram com aumento de da área no final da expiração, sendo o valor do pós-transplante um pouco maior.

A variação da seção do lúmen traqueal, identificado pela variação da área da traqueia no final da expiração, ou seja, na posição de repouso da traqueia, sugere que essa variável pode estar relacionada com a PEEP. Assim, um aumento estável do lúmen traqueal pode estar indicando uma auto-PEEP, ou seja, está ocorrendo um aumento na pressão da traqueia no final da expiração devido, por exemplo, a limitações do fluxo expiratório.

Por outro lado, um aumento na amplitude das áreas entre o final da inspiração e o final da expiração sugere que está ocorrendo um aumento da pressão na traqueia devido à dificuldade de deslocar o ar para dentro do pulmão no cenário de broncoconstrição.

Avaliando as áreas da traqueia durante a ventilação, não foram observados padrões de comportamento nos demais ratos. A figura 38 apresenta um resumo das variações percentuais das áreas do final da expiração e das variações das amplitudes máximas durante a ventilação e não se observa um padrão de comportamento entre os animais.

5.5 Imagens da traqueia nos diferentes cenários antes e depois do transplante

Uma primeira alteração entre os experimentos pré e pós-transplante pode ser observada nos parâmetros da mecânica respiratória. O gráfico da figura 32 mostra que há uma redução de 21% no valor médio da primeira medida da elastância no cenário MCh 30 $\mu\text{g/kg}$ e 30% no cenário MCh 300 $\mu\text{g/kg}$. Uma redução média de 45% também ocorreu nas medidas da resistência nos dois cenários de broncoconstrição.

As comparações das demais medidas podem ser feitas entre as figuras 27 e 28 para a elastância e entre as figuras 29 e 30 para a resistência. Percebe-se que não ocorreram diferenças significativas nos valores de elastância e resistência nos cenários sem broncoconstrição.

Uma redução da variação da área das imagens da traqueia também foi observada após os transplantes. Os gráficos das figuras 39B e 40B apresentam uma redução na área da traqueia durante as fases inspiratórias e expiratórias da primeira perturbação para os cenários MCh 30 e 300 $\mu\text{g/kg}$.

A partir dessas informações, se poderia pensar que a traqueia transplantada, sem irrigação sanguínea e, portanto, sem sofrer a ação da MCh, colaborou para alterar os parâmetros da mecânica respiratória. No entanto, essa hipótese não pôde ser validade sem os resultados de um grupo controle.

5.5.1 Avaliação dos segmentos da traqueia antes e depois do transplante

Foi possível medir também as variações de cada um dos segmentos da traqueia. A figura 44 apresenta uma visão geral da variação da área dos quatro segmentos da traqueia do rato N, antes do transplante. Observa-se que os segmentos indicados pelas cores vermelho e verde, que são os mais distais, sofrem uma redução do valor da área de final da expiração, indicando um maior estreitamento desses segmentos devido à ação da MCh. Esse fenômeno não se repete nos gráficos da

figura 45 que apresenta o comportamento dos mesmos segmentos e no mesmo cenário de broncoconstrição, após o transplante.

Uma observação mais detalhada da variação percentual das áreas de cada segmento, apresentada na figura 46, mostra que houve um estreitamento de 2,5% do segmento mais distal e de 1,2% do segundo segmento mais distal no pré-transplante. No pós-transplante não ocorreu um estreitamento, pelo contrário, ocorre uma expansão da área dos segmentos no final da expiração, durante a ventilação e as variações das amplitudes entre o final da inspiração e da expiração foram pequenas.

Essa alteração possivelmente está relacionada com o fato de o autotransplante ter interrompido os vasos sanguíneos desses segmentos não permitindo a ação da MCh no músculo liso. Assim, o que se observa nas imagens da traqueia no pós-transplante é uma movimentação passiva das paredes em função dos gradientes de pressão durante a ventilação.

Esse fenômeno do estreitamento de alguns segmentos da traqueia foi observado nos ratos em que a exposição da traqueia atingiu um maior número de segmentos (cartilagem e ligamento anular) e sempre nos segmentos mais distais.

Essas diferenças de efeito de um agente constritor nos segmentos da traqueia estão de acordo com os resultados encontrados por Lima e Silva (1998), que apresentaram uma contração significativamente mais intensa dos segmentos distais, além de apresentarem uma resposta no tempo mais rápida em relação aos segmentos proximais, quando estimulados por um agente constritor num ambiente *in vitro*.

Ao observar a variação dos segmentos apenas durante as duas primeiras perturbações quase-senoidais, como mostra a figura 47, percebe-se que durante a inspiração imposta as variações dos segmentos entre a primeira e a segunda medidas não são tão acentuadas quanto nas fases da expiração imposta, tanto para as medidas do pré quanto no pós-transplante. Essas diferenças confirmam o que já foi discutido anteriormente que as vias aéreas podem estar colabando no início da ação da MCh e dificultando a saída do ar. Quando o efeito da dose aumenta, as paredes das vias ficam mais enrijecidas e o ar consegue ser extraído com mais facilidade, como observa-se na fase expiratória das segundas medidas.

Não foram observadas outras singularidades no comportamento dos segmentos de cada anel cartilaginoso entre o pré e o pós-transplante nos diferentes cenários de broncoconstrição.

Por fim, as variações da pressão no interior da traqueia podem provocar ainda uma distensão e contração dos ligamentos anulares, aumentando e diminuindo as distâncias entre os anéis cartilagosos. Porém, essas variações foram nulas ou muito pequenas, sugerindo que os deslocamentos mais significativos dessas estruturas estão relacionados com os movimentos de cabeça e pescoço (GRILLO, 2004).

6 CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho permitem concluir que a técnica de aquisição de imagens de vídeo da traqueia apresenta resolução e frequência de aquisição suficientes para monitorar as variações do calibre de traqueias auto transplantadas de ratos, durante a ventilação mecânica e nas perturbações mecânicas provocados pelo ventilador. Esses resultados trazem uma boa perspectiva para o uso dessa técnica na avaliação das propriedades mecânicas de enxertos traqueais produzidos por Engenharia Tecidual.

O monitoramento das paredes da traqueia em tempo real, possibilitou ampliar a discussão dos resultados obtidos por meio da mecânica respiratória e alertar sobre eventuais equívocos que podem ocorrer na interpretação dos parâmetros obtidos com o modelo de compartimento único em cenários de maior broncoconstrição.

Apesar das dificuldades relatadas durante os experimentos e da consequente redução do número de animais, o sistema de aquisição de imagens permitiu monitorar o comportamento individual dos anéis cartilaginosos – e do respectivo ligamento anular – o que o qualifica como um instrumento adequado para avaliar as alterações morfológicas dos tecidos antes e depois dos transplantes.

Com isso, considera-se que os objetivos propostos e os resultados apresentados são satisfatórios e cumprem com os requisitos do programa de pós-graduação para o depósito da presente tese.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOKI, F. G.; VALENGA, M. H.; RODRIGUES, T. G.; CARDOSO, P. F. G.; PAZETTI, R.; e MORIYA, H. T. Respiratory parameters have different patterns in imposed-inspiration and imposed-expiration within a closed pneumatic circuit in rats. **IFMBE Proceedings**, p. 1080-1083. IUPESM World Congress, Toronto, Canada, 2015.

ARONSTAM, E. V.; NIMS, R. M.; WINN, D. F. Studies in segmental replacement of the thoracic trachea. **Journal of Surgical Research**, 1:108–10, 1961.

ARTAEACHEVARRIA, X.; BLANCO, D.; PEREZ-MARTIN, D.; BIURRUN, G.; MONTUENGA, L. M.; TORRES, J.P.; ZULULUETA, J. J.; BASTARRIKA, G.; MUNOZ-BARRUTIA, A.; ORTIZ-DE-SOLORZANO, C. Longitudinal study of a mouse model of chronic pulmonary inflammation using breath hold gated micro-CT. **European Radiology**, v. 20, p. 2600–2608, 2010.

ATAMANYUK, M.Y.; MELROSE, D.G. The treatment of circumferential defects of the trachea. **British Journal of Surgery**, 52:59–65, 1965.

AULER, J. O. Jr.; ZIN, W. A.; CALDEIRA, M. P.; CARDOSO, W. V.; SALDIVA, P. H. Pre and postoperative inspiratory mechanics in ischemic and valvular heart disease. **Chest**, v. 92, p. 984–990, 1987.

BADER A.; MACCHIARINI P. Moving towards in situ tracheal regeneration: the bionic tissue engineered transplantation approach. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, 14(7): 1877-1889, 2010.

BATES, J. H. T. **Lung Mechanics: An Inverse Modeling Approach**. 1st ed. New York: Cambridge University Press, 2009, 220p.

BATES, J. H. T. Systems physiology of the airways in health and obstructive pulmonary disease. **WIREs System Biology and Medicine**, 8: 423–437, 2016.

BATES, J. H.; DECRAMER, M.; CHARTRAND, D.; ZIN, W. A.; BODDENER, A.; MILIC-EMILI, J. Volume-time profile during relaxed expiration in the normal dog. **Journal of Applied Physiology**, v. 59, p. 732–737. 1985a.

BATES, J. H.; LUDWIG, M. S.; SLY, P. D.; BROWN, K.; MARTIN, J. G.; FREDBERG, J. J. Interrupter resistance elucidated by alveolar pressure measurement in open-chest normal dogs. **Journal of Applied Physiology**, v. 65, p. 408–414, 1988.

BATES, J. H.; ROSSI, A.; MILIC-EMILI, J. Analysis of the behavior of the respiratory system with constant inspiratory flow. **Journal of Applied Physiology**, v. 58, p. 1840–1848, 1985b.

BATES, J. H.; SCHUESSLER, T. F.; DOLMAN, C.; EIDELMAN, D. H. Temporal dynamics of acute isovolume bronchoconstriction in the rat. **Journal of Applied Physiology**, v. 82, n. 1, p. 55-62, 1997.

BENHAMOU, D.; LORINO, A. M.; LORINO, H.; ZERAH, F.; HARF, A. Automated measurement of respiratory mechanics in anaesthetized ventilated patients. **Bulletin European Physiopathol Respiratory**, v. 23, p. 423-428, 1987.

BIBAS, B. J.; TERRA, R. M.; OLIVEIRA, A. L.; TAMAGNO, M. F.; MINAMOTO, H.; CARDOSO, P. F.; et al. Predictors for postoperative complications after tracheal resection. **Annals of Thoracic Surgery**, v. 98, p. 277-282, 2014.

BOGAN, S. L.; TEOH, G. Z.; BIRCHALL, M. A. Tissue Engineered Airways: A Prospects Article. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 117, n. 7, p. 1497–1505, 2016.

BONASSAR L. J.; VACANTI C. A. Tissue engineering: The first decade and beyond. **Journal of Cellular Biochemistry**, 72 (S30-31): 297-303, 1998.

BRAGA, C. W.; CHEN, Q.; BURSCHTIN, O. E.; RAPOPORT, D. M.; AYAPPA, I. Changes in lung volume and upper airway using MRI during application of nasal expiratory positive airway pressure in patients with sleep-disordered breathing. **Journal of Applied Physiology**, v. 111, p. 1400–1409, 2011.

BROWN, R. H.; MITZNER, W. Understanding airway pathophysiology with computed tomography. **Journal of Applied Physiology**, v. 95. p. 854–862, 2003.

CARVALHO, A. R.; ZIN, W. A. Respiratory system dynamical mechanical properties: modeling in time and frequency domain. **Biophysics Review**, v. 3, p. 71–84, 2011.

CLARK E. S.; BEST C.; ONWUKA E. Effect of cell seeding on neotissue formation in a tissue engineered trachea. **Journal of Pediatric Surgery**, 51(1): 49–55, 2016.

CONCONI M.T.; DE COPPI P.; DI LIDDO R. Tracheal matrices, obtained by a detergent-enzymatic method, support in vitro the adhesion of chondrocytes and tracheal epithelial cells. **Transplant International**, 18(6): 727-734, 2005.

DANIEL, R.A. The regeneration of defects of the trachea and bronchi: an experimental study. **The Journal of Thoracic Surgery**, 17(3):335-349, 1948.

DONOVAN G. M. Modelling airway smooth muscle passive length adaptation via thick filament length distributions. **Journal of Theoretical Biology**, 333:102–108, 2013.

DONOVAN G. M. Systems-level airway models of bronchoconstriction. **WIREs System Biology and Medicine**, 8:459–467, 2016.

DUBOIS, A. B.; BRODY, A. W.; LEWIS, D. H.; BURGESS, B. F. Oscillation mechanics of lung and chest in man. **Journal of Applied Physiology**, v. 8, p. 546–549, 1956.

DUBSKY, S.; ZOSKY, G.R.; PERKS, K.; SAMARAGE, C.R.; HENON, Y.; HOOPER, S.B.; FOURAS, A. Assessment of airway response distribution and paradoxical airway dilation in mice during methacholine challenge. **Journal of Applied Physiology**, 122: 503–510, 2017.

DUBSKY, S.; HOOPER, S. B.; SIU, K. K. W.; FOURAS, A. Synchrotron- based dynamic computed tomography of tissue motion for regional lung function measurement. **Journal Royal Society Interface**, v. 9, p. 2213–2224, 2012.

DUGUET, A; BIYAH; K; MINSHALL, E; GOMES, R; WANG, C-G; TAOUDI-BENCHEKROUN, M; BATES, J. H. T.; EIDELMAN, D. H. Bronchial responsiveness among inbred mouse strains: role of airway smooth-muscle shortening velocity. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, Vol 161. pp 839–848, 2000.

EBERHARD, L.; GUTTMAN, J.; WOLFF, G.; BERTSCHMANN, W.; MINZER, A.; KOHL, H. J.; ZERAVIK, J.; ADOLPH, M.; ECKART, J. Intrinsic PEEP monitored in the ventilated ARDS patient with a mathematical method. **Journal of Applied Physiology**, v. 73, p. 479–485, 1992.

ELLIOTT, M. J.; HAW, M. P.; JACOBS, J. P. Tracheal reconstruction in children using cadaveric homograft trachea. **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery**, 10:707–12, 1996.

GILLIS, H. L.; LUTCHEN, K. R. Airway remodeling in asthma amplifies heterogeneities in smooth muscle shortening causing hyper responsiveness. **Journal of Applied Physiology**, v. 86, p. 2001–2012, 1999a.

GILLIS, H. L.; LUTCHEN, K. R. Convective ventilation distribution during heterogeneous constriction in human lungs assessed via morphometric modeling. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 27, p.14-22, 1999b.

GODDARD, P. R.; NICHOLSON, E. M.; LASZLO, G.; WATT, I. Computed tomography in pulmonary emphysema. **Clinical Radiology**, v. 33, p. 379–387, 1982.

GRILLO, H. C. **Surgery of the Trachea and Bronchi**. Hamilton: BC Decker Inc, 2004, 872p.

GRILLO, H.C. Tracheal replacement: a critical review. **Annals of Thoracic Surgery**, v. 73(6), p. 1995-2004, 2002.

GRILLO, H.C.; DIGNA, E. F.; MIURA, T. Extensive Resection and Reconstruction of Mediastinal Trachea without Prosthesis or Graft: An Anatomical Study in Man. **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, V. 48, P. 741-749, 1964.

Guide for the Care and Use of Laboratory. National Research Council (USA), 8th ed. Washington, DC: Academic Press, 2011, 220p.

HANTOS, Z.; DAROCZY, B.; SUKI, B.; NAGY, S.; DEBRECZENI, L. A. Respiratory mechanical impedance in the rat. **Acta Physiologica Hungarica**, V. 70, p. 289–296, 1987b.

HANTOS, Z.; DAROCZY, D.; SUKI, B.; NAGY, S.; FREDBERG, J. J. Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs. **Journal of Applied Physiology**, v. 72, p.168–178, 1992.

HANTOS, Z.; SUKI, B.; CSENDES, T.; DAROCZY, B. Constant-phase modelling of pulmonary tissue impedance. **Bulletin European Physiopathol Respiratory**, v. 23, p. 326, 1987a.

HONG H. J.; LEE J. S.; CHOI J. W.; MIN B. H.; LEE H. B.; KIM C. H. Transplantation of autologous chondrocytes seeded on a fibrin/hyaluronan composite gel into tracheal cartilage defects in rabbits: preliminary results. **Artificial Organs**. 36 (11):998-1006, 2012.

HUMPHREY, J. D.; DUFRESNE, E. R.; SCHWARTZ, M. A. Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 12, p. 802–812, 2014.

IOTTI, G. A.; RASCHI, A.; BRUNNER, J. X.; SMITS, T.; OLIVEI, M.; PALO, A.; VERONESI, R. Respiratory mechanics by least squares fitting in mechanically ventilated patients: applications during paralysis and during pressure support ventilation. **Intensive Care Medicine**, v. 21, p. 406–413, 1995.

JÄRVELÄINEN, H.; SAINIO, A.; KOULU, M.; WIGHT, T. N.; PENTTINEN, R. Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. **Pharmacological Reviews**, v. 61, n. 2, p. 198–223, 2009.

KARIYA, S. T.; THOMPSON, L. M.; INGENITO, E. P.; e INGRAM, R. H. Jr. Effect of lung volume, volume history, and methacholine on lung tissue viscance. **Journal of Applied Physiology**, v. 66, p. 977–982, 1989.

KESHISHIAN, J. M.; BLADES, B.; BEATTIE, E. J. Tracheal reconstruction. **The Journal of Thoracic Surgery**, 32:707–27, 1956.

KING, G. G.; CARROLL, J. D.; MULLER, N. L.; WHITTALL, K. P.; GAO, M.; NAKANO, Y.; PARE, P. D. Heterogeneity of narrowing in normal and asthmatic airways measured by HRCT. **European Respiratory Journal**, v. 24, p. 211–218, 2004.

KOBAYASHI, K.; NOMOTO, Y.; SUZUKI, T., Effect of fibroblasts on tracheal epithelial regeneration in vitro. **Tissue Engineering**, 12(9): 2619-2628, 2006.

KOJIMA K.; VACANTI C. A. Tissue engineering in the trachea. **Anatomical Record** (Hoboken), 297 (1): 44-50, 2014.

KRAMISH, D.; MORFIT, H. M. The use of a Teflon prosthesis to bridge complete sleeve defects in the human trachea. **American Journal of Surgery**, 106:704–8, 1963.

KRYGER, M.; BODE, F.; ANTIC, R.; et al. Diagnosis of obstruction of the upper and central airways. **American Journal of Medicine**, 61:85–93, 1976.

LAMBERT, R. K.; WILSON, T. A.; HYATT, R. E.; RODARTE, J. R. A computational model for expiratory flow. **Journal of Applied Physiology**, Vol. 52, n. 1, 44-56, 1982.

LANGHEINRICH, A. C.; LEITHAUSER, B.; GRESCHUS, S.; VON GERLICH, S.; BREITHECKER, A.; MATTHIAS, F. R.; RAU, W. S.; BOHLE, R. M. Acute rat lung injury: feasibility of assessment with micro-CT. **Radiology**, v. 233, p. 165–71, 2004.

LEDERLIN, M.; OZIER, A.; MONTAUDON, M.; BEGUERET, H.; OUSOVA, O.; MARTHAN, R.; BERGER, P.; LAURENT, F. Airway remodeling in a mouse asthma model assessed by *in-vivo* respiratory-gated micro-computed tomography. **European Radiology**, v. 20, p. 128–137, 2010.

LIMA, W. T.; SILVA, Z. L. Contractile Responses of Proximal and Distal Trachea Segments Isolated from Rats Subjected to Immunological Stimulation: Role of Connective Tissue Mast Cells, **General Pharmacology**, Vol. 30, No. 5, pp. 689–695, 1998.

LITZLBAUER, H. D.; NEUHAEUSER, C.; MOELL, A.; GRESCHUS, S.; BREITHECKER, A.; FRANKE, F. E.; KUMMER, W.; RAU, W. S. Three-dimensional imaging and morphometric analysis of alveolar tissue from microfocal X-raycomputed tomography. **American Journal of Physiology**, v. 291, p. 535–545, 2006.

MA B.; BREEN B.; BATES J. H. T. Influence of parenchymal heterogeneity on airway-parenchymal interdependence. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, 188:94–101, 2013a.

MA B.; SANDERSON M.; BATES J. H. T. Airway-parenchymal interdependence in the lung slice. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, 185:211–216, 2013b.

MCLAUGHLIN, R. A.; NOBLE, P. B.; SAMPSON, D. D. Optical Coherence Tomography in Respiratory Science and Medicine: From Airways to Alveoli. **Physiology**, v. 29, p. 369–380, 2014.

MEAD, J. Contribution of compliance of airways to frequency dependent behavior of lungs. **Journal of Applied Physiology**, v. 26, p. 670–673, 1969.

MICHELSON, E.; SOLOMON, R.; MAUN, L.; RAMIREZ, J. Experiments in tracheal reconstruction. **Thoracic and Cardiovascular Surgery**, 41:748–59, 1961.

MORFIT, H. M.; NEERKEN, A. J.; PREVEDEL, A.; LIDDLE, E. B.; KIRCHER, L. Sleeve resection of the trachea. Experimental studies on regenerative capacity and principles of reconstruction and repair. **Archives of Surgery**, 70:654–61, 1955.

MOTT, L. S.; PARK, J.; MURRAY, C. P.; GANGELL, C. L.; KLERK, N. H.; ROBINSON, P. J.; ROBERTSON, C. F.; RANGANATHAN, S. C.; SLY, P. D.; STICK, S. M. Progression of early structural lung disease in young children with cystic fibrosis assessed using CT. **Thorax**, v. 67, p. 509–516, 2012.

NAGASE, T.; MORETTO, A.; LUDWIG, M. S. Airway and tissue behavior during induced constriction in rats: intravenous vs. aerosol administration. **Journal of Applied Physiology**, v. 76, p. 830–838, 1994.

NAKANO, Y.; MULLER, N. L.; KING, G. G.; NIIMI, A.; KALLOGER, S. E.; MISHIMA, M.; PARE, P. D. Quantitative assessment of airway remodeling using high-resolution CT. **Chest**, v. 122, p. 271–275, 2002.

NAMATI, E.; THIESSE, J.; SIEREN, J. C.; ROSS, A.; HOFFMAN, E. A., MCLENNAN, G. Longitudinal assessment of lung cancer progression in the mouse using in vivo micro-CT imaging. **Medical Physics**, v. 37, p. 4793-4805, 2010.

NEVILLE, W.E.; BOLANOWSKI, P. J. P.; KOTIA, G.G. Clinical experience with the silicone tracheal prosthesis. **The Journal of Thoracic Surgery**, 99:604–13, 1990.

NEWMAN, K. B.; LYNCH, D. A.; NEWMAN, L. S. ; ELLEGOOD, D.; NEWELL, J. D. Jr. Quantitative computed tomography detects air trapping due to asthma. **Chest**, v. 106, p. 105-109, 1994.

NOBLE, P. B.; MCLAUGHLIN, R. A.; WEST, A. R.; BECKER, S.; ARMSTRONG, J. J.; MCFAWN, P. K; EASTWOOD, P. R. ; HILLMAN, D. R.; SAMPSON, D. D.; MITCHELL, H. W.. Distribution of airway narrowing responses across generations and at branching points, assessed in vitro by anatomical optical coherence tomography, **Respiratory Research**, 11:9, 2010.

OAKES, J. M.; SCADENG, M.; BREEN, E. C.; MARSDEN, A. L.; DARQUENNE, C. Rat airway morphometry measured from in situ MRI-based geometric models. **Journal of Applied Physiology**, v. 112, p. 1921-1931, 2012.

OTIS, A. B.; MCKERROW, C. B.; BARTLETT, R. A.; MEAD, J.; MCLLROY, M. B.; SELVERSTONE, N. J.; RADFORD, F. P. Jr. Mechanical factors in distribution of pulmonary ventilation. **Journal of Applied Physiology**, v. 8, p. 427-443, 1956.

OTSU, N., Threshold selection method from gray-level histograms. **IEEE Transactions on Systems Man and Cybernetics**, 9, 62-66, 1979.

PARAMESWARAN, H.; BARTOLAK-SUKI, E.; HAMAKAWA, H.; MAJUMDAR, A.; ALLEN, P. G.; SUKI, B. Three-dimensional measurement of alveolar airspace volumes in normal and emphysematous lungs using micro-CT. **Journal of Applied Physiology**, v. 107, p. 583–592, 2009.

PETÁK, F.; HANTOS, Z.; ADAMICZA, A.; ASZTALOS, T.; and SLY, P. D. Methacholine-induced bronchoconstriction in rats: effects of intravenous vs. aerosol delivery. **Journal of Applied Physiology**, v. 82, p.1479–1487, 1997.

PEYTON, S. R.; GHAJAR, C. M.; KHATIWALA, C. B.; PUTNAM, A. J. The emergence of ECM mechanics and cytoskeletal tension as important regulators of cell function. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 47, n. 2, p. 300–320, 2007.

ROBATTO, F. M.; SIMARD, S.; LUDWIG, M. S. How changes in the serial distribution of bronchoconstriction affect lung mechanics. **Journal of Applied Physiology**, v. 74, p. 2838–2847, 1993.

ROMERO, P. V.; ROBATTO, F. M.; SIMARD, S.; LUDWIG, M. S. Lung tissue behavior during methacholine challenge in vivo. **Journal of Applied Physiology**, v. 73, p. 207–212, 1992.

ROUSSELLOT, J. M.; PESLIN, R.; DUVIVIER, C. Evaluation of the multiple linear regression method to monitor respiratory mechanics in ventilated neonates and young children. **Pediatric Pulmonology**, v. 13, p.161–168, 1992.

SALDIVA, P. H.; ZIN, W. A.; SANTOS, R. L.; EIDELMAN D. H.; MILIC-EMILI, J. Alveolar pressure measurement in open-chest rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 72, p. 302–306, 1992.

SALERNO, F. G.; MORETTO A.; DALLAIRE, M.; LUDWIG, M. S. How mode of stimulus affects the relative contribution of elastance and hysteresivity to changes in lung tissue resistance. **Journal of Applied Physiology**, p. 78, v. 282–287, 1995.

SCARRIT M. E. A review of cellularization strategies for tissue engineering of whole organs. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 3:1-17, 2015.

SCHOEN, F. J., Heart valve tissue engineering: quo vadis?, **Current Opinion Biotechnology**, 22: 1–8, 2011.

SCHUESSLER, T. F. **A computer controlled research ventilator for small animals**. In: M. Eng. thesis, Dep. Biomed. Eng., McGill University, Montreal, Canada, 1993.

SCHUESSLER, T. F.; BATES, J. H.; A Computer-Controlled Research Ventilator for Small Animals: Design and Evaluation, **IEEE TRANSACTIONS ON BIOMEDICAL ENGINEERING**, VOL. 42, n° 9, 1995.

SCHUESSLER, T. F.; BATES, J. H.; MAKSYM, G. N: Estimating tracheal flow in small animals. In: **Proceedings 15th Ann. Int. Conf. IEEE Eng. Med Biol. Soc.**, San Diego, California: 1993, p. 560-561.

SILVA, T. H. G.; FERREIRA, M. Z. J.; ALENCAR, A. M.; MORIYA, H. T. A non-invasive method for assessing airway narrowing of isolated airways in vitro. **IFMBE Proceedings**, Budapest, Hungary, p. 137-140, 2011.

SILVA, T. H.; PAZETTI, R.; AOKI, F. G.; CARDOSO, P. F.; VALENGA, M. H.; DEFFUNE, E.; EVARISTO, T.; PÊGO-FERNANDES, P. M.; MORIYA, H. T. Assessment of the mechanics of a tissue-engineered rat trachea in an image processing environment. **Clinics**, v. 69, p. 500-503, 2014.

SPINAZZOLA, A.J.; GRAZIANO, J.L.; NEVILLE, W. E. Experimental reconstruction of the tracheal carina. **The Journal of Thoracic Surgery**, 58:1–13, 1969.

STARR, D. A.; FRIDOLFSSON, H. N. Interactions between nuclei and the cytoskeleton are mediated by SUN-KASH nuclear-envelope bridges. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 26, n. 1, p. 421–444, 2010.

SULLIVAN, M.; PALIOTTA, J.; SAKLAD, M. Endotracheal tube as a factor in measurement of respiratory mechanics. **Journal Applied Physiology**. v. 41, p. 590-592, 1976.

TGAVALEKOS, N. T.; VENEGAS, J. G.; SUKI, B.; LUTCHEN K. R. Relation between structure, function, and imaging in a three-dimensional model of the lung. **Annals of Biomedical Engineering**, 31: 363–373, 2003.

TGAVALEKOS, N. T.; TAWHAI, M. R.; HARRIS, S.; MUSH, G.; VIDAL-MELO, M.; VENEGAS, J. G.; LUTCHEN, K. R. Identifying airways responsible for heterogeneous ventilation and mechanical dysfunction in asthma: an image functional modeling approach. **Journal of Applied Physiology**, v. 99, p. 2388-2397, 2005.

TOOMES, H.; MICKISCH, G.; VOGT-MOYKOPF, I. Experiences with prosthetic reconstruction of the trachea and bifurcation. **Thorax**, 40: 32–37, 1985.

VALENGA, M. H.; AOKI, F. G.; RODRIGUES, T. G.; CARDOSO, P. F. G.; PAZETTI R.; MORIYA, H. T. **Video image environment for mechanical evaluation of tracheal tissue in rats**. XXV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica – CBEB, Foz do Iguaçu, 2016.

VACANTI, J. P.; LANGER, R. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. **Lancet**, 354:32-34, 1999.

VOLTA, C. A.; MARANGONI, E.; ALVISI, V.; CAPUZZO, M.; RAGAZZI, R.; PAVANELLI, L.; ALVISI, R. Respiratory mechanics by least squares fitting in mechanically ventilated patients: application on flow-limited COPD patients. **Intensive Care Med.**, v. 28, p. 48-52, 2002.

WANG, C. G.; DIMARIA G.; BATES J. H. T.; GUTTMANN, R. D.; e MARTIN, J. G. Methacholine-Induced airway reactivity of inbred rats, **Journal Applied Physiology**, v. 61, p. 2180-2185, 1986.

WATZ, H.; BREITHECKER, A.; RAU, W. S.; KRIETE, A. Micro-CT of the human lung: imaging of alveoli and virtual endoscopy of an alveolar duct in a normal lung and in a lung with centrilobular emphysema: initial observations. **Radiology**, v. 236, p. 1053-1058, 2005.

WRIGHT, C. D.; GRILLO, H. C.; WAIN, J. C.; WONG, D. R.; DONAHUE, D. M.; GAISSERT, H. A.; et al. Anastomotic complications after tracheal resection: prognostic factors and management. **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 128(5), p.731-739, 2004.

ZIN, W. A. Principles of measurement of respiratory mechanics. In: MILIC-EMILI, J.; LUCANGELO, U.; PESENTI, A.; ZIN, W. A. (Eds), **Basic of Respiratory Mechanics and Artificial Ventilation**: Topics in Anaesthesia and Critical Care. Milano: Springer, Ch. 1, p. 3-8, 1999.