THIAGO HENRIQUE GOMES DA SILVA

**ANÁLISE DA MECÂNICA RESPIRATÓRIA DE TRAQUEIAS
ISOLADAS DE RATOS**

**São Paulo
2013**

THIAGO HENRIQUE GOMES DA SILVA

**ANÁLISE DA MECÂNICA RESPIRATÓRIA DE TRAQUEIAS
ISOLADAS DE RATOS**

**Dissertação apresentada à Escola
Politécnica da Universidade de
São Paulo para obtenção do título
de Mestre em Ciências**

**São Paulo
2013**

THIAGO HENRIQUE GOMES DA SILVA

**ANÁLISE DA MECÂNICA RESPIRATÓRIA DE TRAQUEIAS
ISOLADAS DE RATOS**

**Dissertação apresentada à Escola
Politécnica da Universidade de
São Paulo para obtenção do título
de Mestre em Ciências**

**Área de Concentração: Sistemas
Eletrônicos**

Opção: Engenharia Biomédica

**Orientador:
Prof. Dr. Henrique Takachi Moriya**

**São Paulo
2013**

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

São Paulo, 29 de janeiro de 2013.

Assinatura do autor _____

Assinatura do orientador _____

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Thiago Henrique Gomes da
Análise da mecânica respiratória de traquéias isoladas de
ratos / T.H.G. da Silva. -- ed.rev. -- São Paulo, 2013.
110 p.

Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica da Universidade
de São Paulo. Departamento de Engenharia de Telecomunica-
ções e Controle.

1. Mecânica de tecidos 2. Traquéia 3. Respiração 4. Instru-
mentação elétrica I. Universidade de São Paulo. Escola Politéc-
nica. Departamento de Engenharia de Telecomunicações e Con-
trole II. t.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a José, Rita, Maria
Fernanda, Marcelo, Carla e Maria Eduarda ;
minha família, apoio e motivação para este
trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família e a minha futura esposa por todo o apoio e compreensão durante este longo caminho. Ao professor Adriano Alencar Mesquita, pela colaboração durante a pesquisa. Aos professores do Laboratório de Engenharia Biomédica Sergio Furuie e Andre Kohn, pelo conhecimento transmitido e pelas dicas sobre a vida acadêmica. Aos amigos do LIM61, Rogério Pazetti, Fabio Gava, Márcia Zotti pela colaboração durante as pesquisas. Aos colegas de trabalho da equipe de Planejamento de CapEx da Vivo pela compreensão nos momentos que tive que priorizar a vida acadêmica. Ao professor Henrique Takachi Moriya, pela orientação, apoio e compreensão durante todo o mestrado.

RESUMO

Um tema relevante de pesquisa em pneumologia atualmente é a contratilidade de via aérea, e como a mesma é modulada por estímulos mecânicos e farmacológicos. De modo a contribuir com este campo de pesquisa, este projeto tem por objetivo a execução de medições de grandezas associadas à mecânica respiratória de vias aéreas isoladas *in vitro* para avaliar sua resposta a estímulos externos como alterações de pressão transmural, estiramento, poluentes e drogas. Para tal finalidade, foi integrada uma nova instrumentação de processamento de imagens e condicionamento/estimulação de tecidos aos equipamentos já em uso em diversas pesquisas pelo Laboratório de Engenharia Biomédica da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Este ambiente foi testado em corpos de prova; foi avaliado o efeito da pressão transmural na mecânica de traqueias e o ambiente foi utilizado na análise do efeito de bronco-constritores na mecânica respiratória de traqueias decelularizadas (utilizadas em transplante traqueal). Os testes em corpos de prova demonstraram a capacidade do ambiente em executar as medidas de interesse; os estudos com pressão transmural quantificaram a expansão das paredes da traqueia com o incremento da pressão interna e os estudos com traqueias decelularizadas mostram que as mesmas não respondem a bronco-constritores, ao contrário de traqueias normais que apresentaram indícios de contração. Desta forma, o ambiente foi capaz de realizar pesquisas de contratilidade de via aérea, demonstrando indícios da insensibilidade de traqueias decelularizadas a bronco-constritores.

Palavras chave: Mecânica de tecidos. Traqueia. Respiração. Instrumentação Elétrica.

ABSTRACT

Currently, a relevant field in the research of pulmonology is the contractibility of airways, and their modulation through mechanical and pharmacological stimuli. In order to contribute to this research, the goal of this project is to execute measurements of respiratory mechanic indicators to assess the behavior of isolated airways *in vitro* to external stimuli such as modifications in transmural pressure, dynamic stretching, pollution and drugs. For this purpose a new image processing and tissue conditioning/stimulation environment was integrated with the existing instrumentation already in use by the Biomedical Engineering Laboratory in the Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. The environment was tested in tubular structures mimicking airways, the effect of transmural pressure in the respiratory mechanics of trachea was assessed and the environment was used in the research of the effect that bronchoconstrictor drugs have on the respiratory mechanics of decellularized tracheas (used in tracheal transplants). The tests in tubular structures proved the environment's capacity to execute the desired measurements; the expansion of the tracheal walls with the rise of internal pressure was quantified and the experiments with decellularized tracheas show that they are not responsive to bronchoconstrictor drugs, opposite to normal tracheas that presented evidences of contraction. The environment succeeded in the execution of research of airway contractibility and demonstrated evidences of insensitivity of decellularized trachea to bronchoconstrictor drugs.

Keywords: Tissue mechanics. Trachea. Respiration. Electrical instrumentation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CPT	Capacidade Pulmonar Total
CVF	Capacidade vital expiratória forçada
DIQ	Distância Interquartil
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
GND	Terra
HRVA	Hiper-responsividade de via aérea
HW	Hardware
LEB	Laboratório de Engenharia Biomédica
MLVA	Músculo Liso de Via Aérea
NTSC	<i>National Television System Committee</i>
PACV	Placa de Aquisição e Condicionamento de Vídeo
PAL	<i>Phase Alternating Line</i>
PCI	<i>Peripheral Component Interconnect</i>
PEEP	Pressão positiva no final da expiração
SAD	Sistema de Aquisição de Dados
SPF	<i>Specific Pathogen Free</i>
SW	Software
TTL	<i>Transistor Type Logic</i>
VEF ₁	Volume expiratório forçado em 1 segundo
VR	Volume Residual

LISTA DE SÍMBOLOS

C_T	Complacência pulmonar
F	Fluxo
l	Comprimento
ρ	Densidade
P	Pressão
P_{ao}	Pressão na boca
P_c	Pressão no pletismógrafo
P_{el}	Pressão gerada pela retração elástica do pulmão
P_{fr}	Pressão gerada pela resistência ao fluxo de ar pelas vias aéreas
P_{pl}	Pressão no espaço pleural
P_{tm}	Pressão transmural
P_A	Pressão alveolar
P_L	Pressão transpulmonar
r	Raio
R	Resistência ao fluxo de ar
R_e	Número de Reynolds
R_{aw}	Resistência de vias aéreas
V	Volume
μ	Viscosidade

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1 Objetivos	3
1.2 Justificativa	3
2. Revisão Bibliográfica	5
2.1 Sistema Respiratório.....	5
2.1.1 Descrição funcional da atividade respiratória	5
2.1.2 Anatomia do sistema respiratório	6
2.1.3 Avaliação da mecânica respiratória	7
2.1.4 Resistência de vias aéreas	10
2.1.5 Resistência de vias aéreas em patologia.....	13
2.2 Vias Aéreas.....	14
2.2.1 Anatomia de vias aéreas	14
2.2.2 Músculo liso de via aérea	15
2.2.3 Mecanismos de contração e dilatação de vias aéreas.....	17
2.2.4 Responsividade de via aérea.....	19
2.3 Situação atual da pesquisa em vias aéreas	19
2.3.1 Efeito broncoprotetor da inspiração profunda	19
2.3.2 Modulação da responsividade de via aérea.....	20
2.3.3 Mecânica Respiratória de neotraqueias.....	23
2.4 Instrumentação biomédica	23
2.4.1 Introdução à instrumentação biomédica	24
2.4.2 Etapa de transdução.....	25
2.4.3 Etapa de condicionamento	26
2.4.4 Etapa de conversão A/D	27
2.4.5 Instrumentação virtual.....	27
2.5 Instrumentação via processamento de imagens	28
2.5.1 Introdução à instrumentação via processamento de imagens	29
2.5.2 Segmentação de figuras	30
2.5.3 Quantificação e interpretação	32
2.6 Avaliação de mecânica respiratória em modelos animais de doença	33

3. Materiais e Métodos	35
3.1 Ambiente de medição e controle da mecânica respiratória de vias aéreas isoladas <i>in vitro</i>	35
3.1.1 Ventilador de pequenos animais.....	37
3.1.2 Transdutores de pressão e fluxo.....	38
3.1.3 Condicionador de sinais.....	39
3.1.4 Conversão A/D.....	40
3.1.5 Condicionador de vias aéreas	41
3.1.6 Ambiente de processamento de imagens	42
3.1.7 Instrumento virtual	43
3.1.8 Funcionamento do instrumento virtual	49
3.2 Pós-processamento de dados experimentais	51
3.3 Protocolo Experimental	57
3.3.1 Experimento 1: Corpos de teste	58
3.3.2 Experimento 2: Medições preliminares de mecânica de traqueias	58
3.3.3 Experimento 3: Mecânica respiratória de traqueias expostas a distintas pressões transmuralis.....	60
3.3.4 Experimento 4: Mecânica respiratória em presença de bronco-constritores de traqueias normais / descelularizadas.....	62
4. Resultados	64
4.1 Experimento 1: Corpos de teste.....	64
4.2 Experimento 2: Medições preliminares de mecânica de traqueias de ratos	66
4.3 Experimento 3: Mecânica respiratória de traqueias expostas a distintas pressões transmuralis.....	69
4.4 Experimento 4: Mecânica respiratória em presença de bronco-constritores de traqueias normais / descelularizadas	77
5. Discussão	94
6. Conclusão	99
7. Referências	100
APÊNDICE A - A non-invasive method for assessing airway narrowing of isolated airways in vitro.....	107

1. Introdução

A atividade respiratória pode ser definida como a série de eventos funcionais que viabilizam o fornecimento de oxigênio aos tecidos e a remoção do dióxido de carbono (troca gasosa). (GUYTON; HALL, 1997) Dentro da pneumologia, um quadro patológico relevante em termos de frequência e severidade é o incremento de limitação da ventilação pulmonar, suprimindo a troca gasosa. Esta condição é observada em maior ou menor grau nas principais doenças pulmonares: asma, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), pneumonia, fibrose entre outras; podendo ser resultante de incremento da resistência de vias aéreas, redução da complacência do parênquima ou redução na área útil do parênquima. (QUTAYBA; JOANNE; JAMES, 2005) Neste cenário, se observa a importância do estudo de via aérea em patologias do sistema respiratório, de modo a melhor compreender os mecanismos das vias aéreas que contribuem para este incremento na limitação da ventilação pulmonar.

Outro importante campo de pesquisa que pode ser suportado pelos estudos em mecânica de vias aéreas é a engenharia de tecidos traqueais. A substituição traqueal tem sido proposta como alternativa em casos selecionados de defeitos / afecções da via aérea central que não são passíveis de tratamento cirúrgico. Inicialmente a substituição traqueal foi realizada através de alotransplante (ROSE; SESTERHENN; WUSTROW, 1979), atualmente está em investigação a substituição traqueal utilizando traqueias geradas por engenharia de tecidos (MACCHIARINI et al., 2008) e enxertos repopulados com células do receptor (DELAERE et al., 2010). O estudo da mecânica respiratória destas traqueias geradas por engenharia de tecidos é fundamental para apoiar a sua utilização em cenários clínicos. (informação pessoal)¹

O incremento de resistência de via aérea é estudado em diversas escalas: pacientes (SKLOOT; PERMUTT e TOGIAS, 1995; KAPSALI et al., 2000; JENSEN et al., 2001; SCICHLONE; PERMUTT e TOGIAS, 2001; CRIMI et al., 2002; BLACK et al., 2004 e JACKSON et al., 2004), pulmões isolados de animais (BATES et al., 1997

¹ Prof. Dr. Paulo F. Guerreiro Cardoso, material obtido através de discussões durante a definição do Projeto Reologia Celular Traqueia, em outubro/2012

e SHEN; GUNST e TEPPER, 1997), via aérea isolada (MITCHELL e SPARROW, 1994; NOBEL; TURNER e MITCHELL, 2002; LAPRAD et al., 2008 e LAPRAD et al., 2010) e músculo liso de via aérea (FREDBERG et al., 1997; WANG; PARE e SEOW, 2000; LATOURELLE; FABRY e FREDBERG, 2002 e OLIVER et al., 2007). Os estudos em via aérea isolada ainda estão em sua fase inicial e dependem de ultrassonografia para observar alterações estruturais nas paredes internas das vias aéreas (LAPRAD et al., 2010). A ultrassonografia implica em manter a parte interna da via aérea em uma solução líquida, condição distinta à *in vivo*. Uma alternativa a utilização de ultrassonografia é a utilização de tomografia de coerência óptica. A tomografia de coerência óptica é uma nova tecnologia capaz de gerar imagens de seções transversais de tecidos complexos com alta resolução e em tempo real, sem a necessidade de manter o tecido em solução líquida. Atualmente, para penetrações de 2 a 3 mm a tomografia de coerência óptica atinge resoluções de 10 μm . (HAN et al., 2004)

Neste trabalho se propõe uma avaliação da mecânica respiratória em vias aéreas isoladas baseada em uma nova metodologia para avaliar alterações estruturais de suas paredes internas e externas. Nesta metodologia, as evoluções da parede externa da via aérea são avaliadas através de imagens capturadas por uma câmera acoplada a um estereomicroscópio e as evoluções da parede interna são avaliadas através da resposta pressão-fluxo da via aérea, a qual depende de forma significativa do raio interno da mesma. Esta metodologia apresenta o benefício de que ar irá circular no interior da via aérea isolada, condição mais próxima à *in situ*.

1.1 Objetivos

Construir um ambiente para realizar estudos de mecânica respiratória de vias aéreas isoladas *in vitro* utilizando imagens da evolução temporal do diâmetro externo e medidas de resistência ao fluxo de ar da via aérea (intimamente associadas ao diâmetro interno). Testar o ambiente utilizando corpos de prova rígidos com diâmetros conhecidos. Utilizar o ambiente em pesquisas de mecânica respiratória de traqueias, avaliando o efeito da pressão transmural na mecânica de traqueias e avaliando o efeito de bronco-constritores em traqueias normais e traqueias decelularizadas (utilizadas em transplantes traqueiais).

1.2 Justificativa

A pesquisa em vias aéreas isoladas ainda é pouco executada no Brasil; este trabalho visa contribuir para a expansão nacional deste importante campo de pesquisa. De forma a suportar este trabalho, foi construído um ambiente de medição através da integração de equipamentos já existentes no Laboratório de Engenharia Biomédica (LEB) da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo (EPUSP) e no Laboratório de Pesquisa em Cirurgia Torácica (LIM61) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Atualmente não existe uma solução comercial para este tipo de análise; a solução comercial que se aproxima ao ambiente construído, o módulo de vias aéreas do ventilador de pequenos animais *flexiVent* (SCIREQ, Canadá) não tem a capacidade de realizar medições do diâmetro externo da via aérea. Este ambiente apresenta o benefício principal de realizar estudos de via aérea isolada em condições mais próximas a *in situ* (circulação de ar no interior da via aérea).

Este ambiente também fornece suporte à pesquisa de tecido traqueal transplantável atualmente em curso no Laboratório de Engenharia de Tecidos da Universidade Estadual de São Paulo em Botucatu (EVARISTO et al., 2011), viabilizando análises da mecânica respiratória destas traqueias transplantáveis.

A estratégia de integração reduziu o custo, a complexidade e o prazo de construção do ambiente de medição. Outro benefício da estratégia de integrar equipamentos já existentes foi incrementar o conhecimento em relação aos mesmos, abrindo espaço para melhorias em outras pesquisas que utilizem os equipamentos. Por ser composto de um conjunto de partes independentes, o ambiente é bastante versátil, permitindo a utilização de subcomponentes para finalidades específicas e a troca de subcomponentes para construir diferentes configurações experimentais.

2. Revisão Bibliográfica

Nesta revisão bibliográfica iremos iniciar com uma visão geral do sistema respiratório e os conceitos associados de mecânica respiratória (2.1); depois iremos descrever em detalhe as vias aéreas (2.2) e apresentaremos alguns temas importantes na pesquisa atual sobre mecânica respiratória de vias aéreas (2.3). Após a descrição do fenômeno estudado, iremos introduzir os conceitos de instrumentação que nortearam a integração do ambiente de medição (2.4), iremos detalhar os conceitos de instrumentação via processamento de imagens (2.5) e, finalmente, serão apresentados conceitos sobre a avaliação de mecânica respiratória em modelos animais de doença (2.6).

2.1 Sistema Respiratório

Nesta apresentação do sistema respiratório iremos realizar uma descrição funcional (2.1.1) e anatômica (2.1.2) do mesmo. Em seguida iremos introduzir os conceitos de mecânica respiratória (2.1.3), com atenção especial ao estudo da resistência de vias aéreas (2.1.4). Também será discutido o papel da resistência de vias aéreas em quadros patológicos (2.1.5).

2.1.1 Descrição funcional da atividade respiratória

Guyton e Hall definem a atividade respiratória da seguinte forma:

A respiração tem como objetivo o fornecimento de oxigênio aos tecidos e a remoção do dióxido de carbono (troca gasosa). A respiração pode ser dividida em quatro grandes eventos funcionais: (1) a ventilação pulmonar, que é a renovação cíclica do gás alveolar pelo ar atmosférico; (2) a difusão do oxigênio e do dióxido de carbono entre os alvéolos e o sangue; (3) o transporte, no sangue e nos líquidos corporais, do oxigênio (dos pulmões para as células) e do dióxido de carbono (das células para os pulmões); e (4) a regulação da ventilação e de outros aspectos da respiração. (GUYTON; HALL, 1997, p. 433).

De forma a complementar a descrição funcional, a seguir será introduzida a anatomia do sistema respiratório.

2.1.2 Anatomia do sistema respiratório

Na ventilação pulmonar, foco da pesquisa sobre vias aéreas, o ar distribui-se pelos pulmões através de tubos ramificados que se tornam mais estreitos, curtos e numerosos conforme eles se aprofundam na estrutura do pulmão. A traqueia, início da árvore brônquica (via aérea de primeira geração), se divide nos dois brônquios-fontes direito e esquerdo (segunda geração), os quais se dividem em brônquios lobares (terceira geração) e segmentares (quarta geração). Os brônquios segmentares se dividem em bronquíolos que se ramificam através das gerações 5-17 até atingirem os bronquíolos terminais. Os bronquíolos terminais se dividem em bronquíolos respiratórios (gerações 18-20), os quais apresentam uma baixa concentração de alvéolos. As gerações 21-23 são os dutos alveolares, cujas paredes estão repletas de alvéolos. Ao final dos dutos alveolares estão os sacos alveolares (geração 24). A árvore brônquica da traqueia até os bronquíolos terminais é a região condutora, cuja função é levar o gás inspirado até a região respiratória (gerações 18-24), na qual ocorre a troca gasosa. (WEST, 1985) Representações anatômicas do sistema respiratório podem ser vistas na figura 1.

Figura 1 - Vias Aéreas - (1.a) Idealização segundo Weibel com brônquios (BR), bronquíolos (BL), bronquíolos terminais (TBL), bronquíolos respiratórios (RBL), dutos alveolares (AD) e sacos alveolares (WEST, 1985); (1.b) Projeção da árvore brônquica de um pulmão humano (WEST, 1985).

A mecânica respiratória compreende o movimento dos elementos anatômicos descritos acima, movimento este que viabiliza a troca gasosa. A avaliação da mecânica respiratória é descrita a seguir.

2.1.3 Avaliação da mecânica respiratória

Para avaliar a mecânica respiratória é necessário o conhecimento do volume inspirado/expirado (V), os fluxos (F) e as pressões (P) existentes no sistema respiratório. Com estas informações é possível avaliar as resistências ao movimento dos pulmões. Em pacientes saudáveis, as principais resistências são: (i) resistência ao fluxo de ar através da árvore brônquica definida pelas propriedades físicas do gás, velocidade do gás e geometria das vias aéreas; (ii) retração elástica das paredes alveolares definidos pelo volume inspirado/expirado, propriedades elásticas das paredes alveolares e tensão superficial do revestimento líquido da parede alveolar; (iii) resistência devido à viscosidade nas paredes alveolares. (QUTAYBA; JOANNE; JAMES, 2005)

A diferença de pressão entre a boca (P_{ao}) e o espaço pleural (P_{pl}) é definida como pressão transpulmonar (P_L), que é o impulsor do movimento do pulmão. Os alvéolos estão entre a boca e o espaço pleural, e sua pressão (P_A) pode ser diferente em relação a P_{ao} ou P_{pl} . As relações anteriores são expressas na equação 1:

$$P_L = (P_{ao} - P_A) + (P_A - P_{pl}) \quad (1)$$

onde a queda de pressão através das vias aéreas ($P_{ao} - P_A$) provê a força motriz para o fluxo de ar através das vias aéreas superiores e árvore brônquica, superando a sua resistência ao fluxo e viabilizando a ventilação pulmonar (P_{fr} na figura 2). A diferença de pressão entre o alvéolo e o espaço pleural ($P_A - P_{pl}$) provê a força motriz para a expansão/retração dos alvéolos devido principalmente a retração elástica do pulmão (P_{el} , na figura 2). A expansão dos alvéolos permite a entrada do oxigênio inspirado, o qual será difundido na corrente sanguínea; a retração dos alvéolos permite a remoção do dióxido de carbono presente na corrente sanguínea e que realiza a difusão no sentido contrário do oxigênio.

Na modelagem mais simples do sistema respiratório (modelo linear de um compartimento) a árvore brônquica é representada por um tubo e o parênquima por um balão, o qual é mostrado na figura 2. (QUTAYBA; JOANNE; JAMES, 2005)

Figura 2 - Modelo linear de um compartimento do sistema respiratório. (adaptado de QUTAYBA; JOANNE; JAMES, 2005).

P_{fr} varia com o fluxo (equação 2) e P_{el} varia com o volume (equação 3). Desta forma, variações de P_{fr} ocorrem simultaneamente com o fluxo e as variações em P_{el} ocorrem com atraso, devido a que o histórico temporal do fluxo define o volume no balão em um dado momento, assim definindo P_{el} (a relação entre pressão e volume no pulmão, depende do histórico de volume no pulmão, desta forma os valores de pressão e volume na equação 3 devem ser entendidos como a variação em torno de uma referência específica – por exemplo a capacidade residual funcional). Desta forma, com a introdução dos parâmetros resistência de via aérea (R_{aw}) e complacência pulmonar (C_T), P_{fr} e P_{el} são modelados da seguinte forma: (QUTAYBA; JOANNE; JAMES, 2005)

$$P_{fr} = R_{aw} \cdot F \quad (2)$$

$$P_{el} = \frac{V}{C_T} \quad (3)$$

Na figura 3 são mostradas as relações temporais entre fluxo, P_{fr} e P_{el} , com variação sincronizada de fluxo e P_{fr} e atraso de P_{el} .

Figura 3 – Relação temporal entre fluxo, P_{fr} e P_{el} .

O foco deste trabalho, mecânica respiratória de vias aéreas, está intimamente conectado com a resistência de vias aéreas. A resistência de vias aéreas é discutida em mais detalhes a seguir.

2.1.4 Resistência de vias aéreas

A formulação de Poiseuille (equação 4) descreve a resposta pressão-fluxo de um condutor linear para fluxo laminar (sem turbulência) e incompressível. Nesta formulação R é a resistência; μ é a viscosidade; l e r são o comprimento e o raio interno do condutor, respectivamente e F é o fluxo. Nesta formulação observa-se uma grande dependência da resistência com o inverso do raio interno.

$$R = \frac{\Delta P}{F} = \frac{8\mu l}{\pi r^4} \quad (4)$$

O fluxo é caracterizado pelo número de Reynolds (Re), se o mesmo for inferior a 2300, o fluxo é laminar. Na equação 5 é introduzido o cálculo do número de Reynolds, o qual depende do fluxo (F), densidade (ρ), raio (r) e viscosidade (μ).

Quanto menor for o fluxo, menor será o número de Reynolds e mais laminar será o fluxo.

$$R_e = \frac{2.\rho..F}{\pi.\mu.r} \quad (5)$$

O estudo da resistência de vias aéreas tem um longo histórico dentro da medicina, permitindo quantificar a resistência a ventilação pulmonar, de forma a auxiliar a pesquisa e diagnóstico médico. Estes estudos iniciaram com Rohrer em 1915 realizando medições anatômicas e utilizando mecânica de fluidos para calcular a resistência cumulativa das vias aéreas. Os primeiros estudos experimentais em animais vivos foram feitos por von Neergard e Wirz em 1927, os quais estudaram a P_{pl} , analisando assim P_{fr} e P_{el} conjuntamente (DUBOIS; BOTELHO; COMROE, 1956). Em 1956, Dubois et al. introduziram o pletismógrafo corporal para medir a resistência de vias aéreas, método que tem se transformado no padrão médico atual.

Neste método, o paciente se senta em um compartimento vedado (pletismógrafo). Na primeira etapa da medição (figura 4), o paciente dentro do compartimento respira dentro de um conjunto manômetro-pneumotacógrafo aberto que permite a medição do fluxo e da pressão no pletismógrafo (P_c). A pressão no pletismógrafo é proporcional a pressão alveolar visto que a lei de Boyle estabelece que o produto pressão-volume é constante no compartimento, sendo assim, incrementos no volume de ar e pressão alveolar são refletidos em redução no volume de ar e pressão do pletismógrafo. Na segunda etapa (figura 5) o conjunto manômetro-pneumotacógrafo é fechado e o paciente faz esforços respiratórios, assim permitindo a medição da pressão no pletismógrafo e no manômetro (como não há movimento de ar, o conjunto está fechado, a pressão no manômetro é igual a pressão alveolar), obtendo-se a relação entre pressão no pletismógrafo e pressão alveolar. Usando os dados obtidos nas duas etapas é possível avaliar a curva de pressão alveolar e fluxo, necessária na obtenção da resistência de via aérea. (DUBOIS; BOTELHO; COMROE, 1956)

Figura 4 - Pletismógrafo corporal: primeira etapa, medição da pressão pletismógrafo (P_c) em relação ao fluxo (F), com movimento de ar.

Figura 5 - Pletismógrafo corporal: segunda etapa, medição da pressão pletismógrafo (P_c) na boca (P_{ao}), sem movimento de ar.

Conforme as vias aéreas penetram a periferia do pulmão elas incrementam em número, porém seu raio diminui consideravelmente. A equação de Poiseuille (equação 4) nos induz a pensar que estas vias aéreas estreitas de gerações superiores contribuem com a maior parte da resistência da árvore brônquica, no entanto pesquisas têm mostrado que as gerações de 1 a 7 contribuem com a maior parte da resistência da árvore brônquica. A razão deste aparente paradoxo é que a ramificação das vias aéreas se contrapõe ao incremento de resistência gerada pela redução do raio das mesmas. (WEST, 1985)

Diversos quadros patológicos estão associados a incremento na resistência de vias aéreas, motivando estudos sobre os fatores que afetam este parâmetro de mecânica respiratória. No próximo sub-item, se discute o papel da resistência de vias aéreas em quadros patológicos.

2.1.5 Resistência de vias aéreas em patologia

Incremento de limitação da ventilação pulmonar é observada em pacientes com asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), podendo ser resultante de incremento da resistência de via aérea ou redução da complacência do parênquima. Enquanto em asma, esta limitação ao fluxo é aguda e reversível, em pacientes com DPOC esta limitação é fracamente reversível, piorando progressivamente com a passagem do tempo. (QUTAYBA; JOANNE; JAMES, 2005)

Alterações estruturais nas vias aéreas têm sido amplamente documentadas em asma, com abundante evidência de engrossamento das paredes das vias aéreas. Evidências de alteração estrutural no parênquima em pacientes com asma, não são tão contundentes. Deste modo, há indícios de que o componente resistivo da limitação à ventilação tem um papel mais significativo em asma. Esta reestruturação das vias aéreas deveria resultar em incremento da resistência de vias aéreas para pacientes com asma em condições normais e em resposta a broncoconstrição induzida. Além disto, existem argumentos teóricos para suportar a noção que a reestruturação pode resultar em modulação da contratilidade da via aérea. Os dados clínicos ainda não têm mostrado resultados definitivos sobre a relação entre mudanças específicas na estrutura de vias aéreas e na função de modo a isolar a principal causa de asma. (QUTAYBA; JOANNE; JAMES, 2005)

Em DPOC, evidências de alterações estruturais são documentadas tanto para as vias aéreas quanto para o parênquima. A maior parte dos casos de DPOC são classificadas como enfisema centrolobular e enfisema panacinar. No enfisema panacinar os danos presentes no parênquima e a extensão de alteração das vias aéreas são reduzidas em relação ao enfisema centrolobular. Desta forma em DPOC, tanto o componente resistivo quanto a complacência do parênquima tem um papel importante no incremento a restrição à ventilação pulmonar. (QUTAYBA; JOANNE; JAMES, 2005)

2.2 Vias Aéreas

Neste item iremos realizar a descrição anatômica de vias aéreas (2.2.1), com detalhamento da anatomia (2.2.2) e mecanismos de contração e dilatação do músculo liso de via aérea (MLVA) (2.2.3), tendo-se em vista a sua importância no comportamento mecânico da via aérea. O conceito de responsividade de via aérea, tema relevante no estudo de mecânica respiratória de vias aéreas, também será introduzido (2.2.4).

2.2.1 Anatomia de vias aéreas

A morfologia básica das vias aéreas da região condutora é similar, e consiste em: (i) epitélio superficial, composto principalmente por células secretoras e ciliadas; (ii) tecido sub-epitelial composto principalmente por tecido conectivo (cartilagem, músculo e tecidos de suporte) e glândulas. Conforme nos aprofundamos na árvore brônquica, a região epitelial torna-se menos extensa até desaparecer por completo nos dutos alveolares. Na região subepitelial, a cartilagem torna-se cada vez mais irregular, desaparecendo por completo nos bronquíolos. Nos bronquíolos, as paredes das vias aéreas, são compostas principalmente por músculo liso e tecidos elásticos de suporte. (QUTAYBA; JOANNE; JAMES, 2005) Os bronquíolos não tem paredes rígidas que os impeçam de entrar em colapso, eles são expandidos pelas mesmas pressões transpulmonares que expandem os alvéolos. (GUYTON; HALL, 1997)

Na figura 6 são mostrados os detalhes da anatomia de vias aéreas, através de uma visão geral que permite a visualização dos tecidos conectivos mais importantes.

Figura 6 – Anatomia de vias aéreas. (QUTAYBA; JOANNE; JAMES, 2005)

O músculo liso de via aérea tem papel fundamental no comportamento mecânico da mesma. A seguir, a anatomia deste tecido será detalhada.

2.2.2 Músculo liso de via aérea

Em linhas gerais, músculo liso de vias aéreas sadios são considerados do tipo multi-unitário, no qual cada célula (fibra) é enervada e a inervação entre células é reduzida. (RODGER, 1992) A comunicação é reduzida devido a escassez de junções abertas entre as membranas, as quais permitem a transmissão de sinais elétricos entre as fibras. Característica mais importante do músculo liso multi-unitário é que cada fibra pode contrair independente das demais e seu controle é exercido primariamente por sinais neurais, diferente do músculo liso unitário no qual as fibras se contraem em conjunto como uma só unidade.

Na figura 7, são mostrados ambos os tipos de músculo liso (GUYTON; HALL,1997).

Figura 7 - Comparação entre músculo liso unitário e multiunitário (GUYTON; HALL,1997)

Técnicas especiais recentes para a microscopia eletrônica sugerem a organização física do músculo liso mostrada na figura 8. Essa figura apresenta grande número de filamentos de actina presos aos chamados corpos densos. Alguns desses corpos densos estão fixados à membrana celular. Outros ocorrem dispersos pelo interior da célula, sendo mantidos em seu lugar por treliça de proteínas estruturais que interligam esses corpos densos entre si. Pontes proteicas intercelulares também unem corpos densos em membranas de células adjacentes, pontes que permitem a transmissão de força de contração entre células vizinhas. (GUYTON; HALL,1997)

Figura 8 - Organização da estrutura física do músculo liso, com detalhe da unidade contrátil (GUYTON; HALL,1997)

O músculo liso de via aérea afeta de forma significativa a mecânica respiratória devido a sua capacidade de contração e dilatação. A seguir estes mecanismos serão apresentados.

2.2.3 Mecanismos de contração e dilatação de vias aéreas

Ainda não existe consenso sobre os mecanismos que regem a contração e dilatação de vias aéreas. Entre os numerosos filamentos de actina existem alguns filamentos de miosina. A contração do músculo ocorreria quando os filamentos de actina resvalam sobre os filamentos de miosina dentro de uma unidade contrátil composta por dois corpos densos e respectivos filamentos de actina e um filamento de miosina central (figura 8 detalhe), assim aproximando os corpos densos. (GUYTON; HALL, 1997) Cabeças miosínicas, presas ao filamento de miosina, são os lugares no qual a interação miosina-actina ocorreria.

O evento que dispara o mecanismo de contração é o incremento de concentração de Ca^{++} no meio intracelular. Este incremento de íons cálcio no meio intracelular pode ser gerado por três mecanismos: (i) em resposta a estimulação neural, os terminais nervosos liberam neurotransmissores (acetilcolina) que geram a despolarização na membrana da fibra muscular, assim abrindo canais de cálcio dependentes de tensão, permitindo a entrada do cálcio do meio extracelular devido ao gradiente de concentração; (ii) o retículo sarcoplasmático, mesmo escasso em fibras musculares lisas, tem o potencial de liberar e sequestrar íons cálcio do meio intracelular, em resposta a despolarização ou interação agonista-receptores e (iii) abertura de canais de cálcio dependentes de receptores, no qual a interação entre os receptores e os diversos agonistas altera a permeabilidade iônica dos canais ao cálcio, permitindo maior ou menor fluxo de cálcio extracelular para o interior da célula. (RODGER, 1992)

Este excesso de Ca^{++} permite a fixação da actina na cabeça miosínica. Quando ocorre esta fixação, acredita-se que a cabeça miosínica se dobra, o que moveria assim a actina (vide figura 9). A actina se soltaria em resposta a outra enzima, chamada miosinofosfatase, permitindo que o ciclo recomece se houver Ca^{++} suficiente no meio intracelular. O processo de liberação da actina também depende da existência de ATP. (RODGER, 1992)

Figura 9 - Detalhe do filamento de actina (branco) e do filamento de miosina (preto), com detalhe da cabeça miosínica se dobrando. (BEAR; CONNOR e PARADISO, 2006)

Existem diversos mecanismos que regem a contração da musculatura lisa dos bronquíolos, mecanismos que tem um papel importante na asma: (i) dilatação da árvore brônquica, (ii) contração parassimpática dos bronquíolos e (iii) contração bronquiolar associada a reações alérgicas. (GUYTON; HALL, 1997)

A dilatação da árvore brônquica pode ser gerada pela liberação de norepinefrina e epinefrina no sangue devido à estimulação simpática da medula das glândulas supra-renais. A contração parassimpática dos bronquíolos pode ser gerada pela secreção de acetilcolina devida a ativação das fibras parassimpáticas presentes no parênquima pulmonar (por irritação da membrana epitelial que reveste as vias aéreas devido a agentes como poeira, gases irritantes, infecção brônquica), causando constrição moderada dos bronquíolos. A contração bronquiolar pode ser gerada pela liberação de substâncias como a histamina e a substância de reação lenta da anafilaxia nos tecidos pulmonares por mastócitos, em resposta a reações alérgicas. (GUYTON; HALL, 1997)

A sensibilidade da via aérea aos mecanismos que regem a sua contração é chamada de responsividade. Este conceito será aprofundado a seguir.

2.2.4 Responsividade de via aérea

Segundo QUTAYBA; JOANNE e JAMES (2005), o termo responsividade de via aérea se refere a capacidade das vias aéreas de se contraírem após serem expostas a agonistas contratores. Hiper-responsividade das vias aéreas (HRVA) descreve uma capacidade exacerbada de indivíduos desenvolverem esta resposta. Esta hiper-responsividade é denominada específica em resposta a agentes alérgenos e não específica quando ocorre em resposta a outros estímulos químicos ou físicos. Hiper-responsividade não específica é uma das principais características de asma, sendo incluída como uma das características que definem a condição, no entanto a hiper-responsividade também pode ocorrer para outras doenças. A medição de hiper-responsividade de vias aéreas é executada utilizando-se testes inalatórios padronizados com agonistas constritores de vias aéreas, comumente histamina ou metacolina.

2.3 Situação atual da pesquisa em vias aéreas

Neste item iremos apresentar dois temas centrais na pesquisa atual sobre mecânica respiratória de vias aéreas: o efeito broncoprotetor da inspiração profunda (2.3.1) o qual deu origem a pesquisa atual sobre a modulação de responsividade de via aérea (2.3.2). Além disto se apresenta a pesquisa atual sobre avaliação da mecânica respiratória de neotraqueias (2.3.3).

2.3.1 Efeito broncoprotetor da inspiração profunda

Em 1961, Nadel e Tierney, usando pletismógrafo corporal, constataram que a inspiração profunda reduz temporariamente a resistência das vias aéreas de pacientes expostos a broncoconstrição; identificando este efeito como um item a ser avaliado em experimentos de broncoconstrição. Em 1981, Fish et al. confirmaram os resultados de Nadel e Tierney e constataram que este efeito é bem reduzido em

pacientes com asma. A partir destes resultados, Fish et al. sugeriram que o fator determinante da asma é uma incapacidade da inspiração alongar o músculo liso das vias aéreas. (SKLOOT; PERMUTT; TOGIAS, 1995).

Em 1995, Skloot, Permutt e Togias testaram esta hipótese de uma perspectiva reversa, avaliando se pacientes normais responderiam como pacientes com asma se expostos a broncoconstritores em um ambiente em que a inspiração profunda não pudesse ocorrer. Nestas condições, pacientes sadios tiveram a mesma resposta que pacientes com asma aos broncoconstritores em diversas concentrações. Além disto, mesmo realizando inspirações profundas, os pacientes sadios mantinham uma elevada sensibilidade a metacolina por um período após a conclusão dos protocolos de restrição à inspiração profunda. (Kapsali et al., 2000)

Em Kapsali et al., (2000) é avaliado, em pacientes sadios e asmáticos, este potente efeito broncoprotetor (inibição do desenvolvimento de HRVA) da ventilação pulmonar associada aos esforços de inspiração profunda.

Em Kapsali et al., (2000), os sujeitos foram expostos à metacolina (broncoconstritor) após terem feito um número determinado de inspirações profundas. Após a exposição à metacolina foi medida: (i) a redução percentual no volume expiratório forçado em um segundo (VEF_1) e (ii) a redução percentual na capacidade vital expiratória forçada (CVF). A ausência de inspirações profundas pré-exposição a metacolina gera resultados semelhantes para pacientes com asma e sem asma. Conforme o número de inspirações profundas aumenta, maior é a diferença entre os resultados dos dois grupos. Enquanto a inspiração profunda tem um efeito broncoprotetor nos pacientes não asmáticos (menor redução na VEF_1 e CVF após exposição a broncoconstritor) este efeito não é observado nos pacientes asmáticos.

Este efeito broncoprotetor da inspiração profunda motivou diversos estudos sobre os fatores que modulam a responsividade de via aérea. Estes estudos são apresentados a seguir.

2.3.2 Modulação da responsividade de via aérea

Esta modulação da HRVA tem sido estudada em diversos níveis, conforme discutido em LaPrad et al. (2010). Em diversos estudos como Kapsali et al. (2000), Black et al. (2004), Crimi et al. (2002), Jackson et al. (2004), Jensen et al. (2001),

Scichilone; Permutt e Togias (2001) e Skloot; Permutt e Togias (1995); a responsividade de via aérea foi avaliada em pacientes saudáveis / asmáticos. Em Fredberg et al. (1997), Latourelle; Fabry e Fredberg (2002), Oliver et al. (2007) e Wang; Pare e Seow (2000); a responsividade de via aérea foi avaliada em músculo liso das vias aéreas isoladas, estimuladas por estiramento. Em Bates et al. (1997) e Shen; Gunst e Tepper (1997) a responsividade de via aérea foi avaliada em animais submetidos à ventilação artificial (análise da resposta sistêmica do pulmão). Em LaPrad et al. (2010), (2008), Mitchell e Sparrow (1994) e Nobel; Turner e Mitchell (2002), a responsividade de via aérea foi avaliada em vias aéreas isoladas.

Os estudos em pacientes se aprofundam nas características do efeito broncoprotetor que a inspiração profunda tem em indivíduos saudáveis, e que não está presente em indivíduos asmáticos.

As pesquisas em MLVA isolada realizados por Fredberg et al. e por outros grupos de pesquisa mostram que a capacidade contrátil do MLVA traqueal isolado é bastante atenuada com o estiramento dinâmico. Desta forma, as vias aéreas se tornariam menos rígidas e contráteis com o estiramento dinâmico, reduzindo assim a HRVA (LAPRAD et al. 2010). Em Fredberg et al. (1997), foi avaliada a força ativa (F) e a rigidez (E) do MLVA sujeito à diversas amplitudes de estiramento dinâmico (ϵ expresso em % do comprimento ótimo do músculo acionado à 0,33Hz). Foi observado que, conforme a amplitude aumenta, a força ativa e a rigidez do MLVA se reduzem. Conforme discutido em LaPrad et al. (2010), estes resultados geram indícios que a responsividade da via aérea seja modulada pelo estiramento dinâmico da mesma (maior estiramento, menor rigidez, menor responsividade).

Mesmo com estes resultados no nível do MLVA, existe uma brecha entre a compreensão do MLVA isolado e a responsividade de via aérea *in vivo*, visto que existem diversas interações de maior escala entre o MLVA e os outros componentes da via aérea, como a matriz extracelular, que têm impacto na capacidade de contração da via aérea como um todo. (LAPRAD et al. 2010)

Os estudos da resposta sistêmica indicam uma redução da responsividade com o aumento do volume/pressão no pulmão. Em Shen; Gunst e Tepper (1997), a redução da responsividade ocorre com o aumento da amplitude/frequência do volume corrente. Em Bates et al. (1997), a redução da responsividade ocorre com o incremento da pressão expiratória positiva final (PEEP). Estes estudos não conseguem separar os efeitos de incremento de pressão média e incremento da

amplitude da oscilação de volume insuflado, conforme discutido por LaPrad et al. (2010).

Os estudos em via aérea isolada analisam as características de sua contração. Em LaPrad et al. (2008), é avaliada a resposta da via aérea contraída à inspiração profunda. Em Mitchell e Sparrow (1994), se avalia a relação entre a redução no comprimento do MLVA e o estreitamento do lúmen dos brônquios. Em Noble; Turner e Mitchell (2002), é avaliada a contratibilidade da via aérea em diversas condições (existência ou não de cartilagem, diversos patamares de complacência).

Em LaPrad et al. (2010), é avaliado o efeito da pressão transmural na contratibilidade da via aérea intacta. Neste estudo, a inspiração profunda e a ventilação corrente foram reproduzidas através de expansões da pressão transmural e os seus efeitos sobre a responsividade da via aérea (avaliada via medições das dimensões da via aérea com o uso de ultrassonografia) foram estudados em diversas condições de broncoconstrição (diferentes níveis de concentração de acetilcolina na solução de Krebs-Henseleit). No estudo, fora alguns efeitos transientes, não foi observado modulação na responsividade da via aérea em resposta aos distintos protocolos de inspiração (estático, ventilação corrente e ventilação corrente com inspiração profunda).

Em Noble et al. (2011) também é avaliado o efeito da pressão transmural na contratibilidade de bronquíolos humanos. Neste estudo se observa somente uma redução temporária na responsividade de vias aéreas estimuladas com inspirações profundas, e nenhuma alteração na responsividade de vias aéreas estimuladas com ventilação corrente em relação a vias aéreas estimuladas com pressão estática.

Poucos experimentos têm sido realizados em via aérea isolada. Os estudos em outros níveis indicam que a inspiração profunda, com o resultante aumento de volume, pressão e estiramento das vias aéreas, tem um papel importante na redução da contratibilidade das vias aéreas. Isolando o efeito da pressão (pressão transmural - P_{tm}) na contratibilidade da via aérea isolada, a variação da P_{tm} parece não ter efeito sobre a capacidade contrátil da via aérea. Os resultados relativos ao efeito da pressão transmural na responsividade de vias aéreas isoladas motivam maiores estudos sobre o tema para que seja melhor avaliado o papel que as flutuações de forças fisiológicas sobre as vias aéreas têm em modular a responsividade *in vivo*. (LAPRAD et al., 2010)

2.3.3 Mecânica Respiratória de neotraqueias

A confecção de neotraqueia a partir de engenharia tecidual combina processos de descelularização de aloenxertos traqueais, com posterior recelularização destes enxertos com células do receptor. Apesar da similaridade do epitélio respiratório e da musculatura lisa produzidos por técnicas de engenharia tecidual, pouco se sabe sobre as possíveis alterações do citoesqueleto destas células geradas em cultura, bem como seu impacto nas propriedades mecânicas intrínsecas da traqueia propriamente dita. (informação pessoal)²

Modificações biomecânicas em cartilagem de vias aéreas podem influenciar a sua mecânica respiratória através de alterações no fluxo expiratório máximo, no grau de encurtamento de MLVA ativado e na mecânica do reflexo de tosse (RAINS et al., 1992). O MLVA da traqueia une os anéis cartilagosos (QUTAYBA; JOANNE; JAMES, 2005) e tem um papel relevante na constrição / distensão da traqueia, especialmente durante a expiração forçada e o reflexo da tosse (OLSEN; STEVENS; McILROY, 1967) Além disto, o MLVA da traqueia também tem um papel importante em reduzir o estreitamento do lúmen por compressão externa através da aproximação das extremidades dos anéis cartilagosos (OLSEN et al., 1967).

2.4 Instrumentação biomédica

Neste item iremos introduzir os conceitos principais de instrumentação biomédica (2.4.1) com o detalhamento de cada etapa do processo de medição de grandezas biomédicas: transdução (2.4.2), condicionamento (2.4.3) e conversão A/D (2.4.4). Também será introduzido o conceito de instrumentação virtual (2.4.5).

² Prof. Dr. Paulo F. Guerreiro Cardoso, material obtido através de discussões durante a definição do Projeto Reologia Celular Traqueia, em outubro/2012

2.4.1 Introdução à instrumentação biomédica

A validade e aplicabilidade das conclusões obtidas em qualquer experimento são totalmente dependentes dos dados experimentais nos quais estão baseadas. Desta forma, a compreensão do processo de obtenção dos dados é fundamental para a correta apreciação dos resultados. (BATES, 2009)

Os dados necessários para a avaliação e construção de modelos de mecânica respiratória normalmente consistem de pressões, fluxos e volumes de gás. Estas variáveis podem ser medidas em diversos locais no corpo, sendo a entrada das vias aéreas o ponto de medição mais comum (boca / nariz de pacientes). Outros locais de medição incluem a superfície do corpo, a entrada da traqueia, o esôfago e o alvéolo individualmente. (BATES, 2009)

A medição destas variáveis ocorre em uma sequência de passos como mostrado na figura 10, processo que inicia com a variável em si e conclui com os dados gravados.

Figura 10 - Processo de medição das variáveis (adaptado Bates, 2009)

Primeiro a variável entra em contato com o transdutor, transformando assim a variável em um sinal elétrico correspondente. Esta transdução é acompanhada pela adição de ruído ao sinal elétrico referente a aspectos do experimento que não são passíveis de controle. Este sinal elétrico é condicionado de modo a preparar o mesmo para a gravação. Este condicionamento geralmente consiste em amplificar e filtrar o sinal, aumentando a relação sinal/ ruído e compatibilizando a amplitude do sinal elétrico com a amplitude de operação do conversor analógico digital (A/D). O conversor A/D transforma o sinal elétrico (tensão) em informação digital (bits), os quais poderão ser manipulados pelo computador para gravação e posterior processamento. (BATES, 2009)

A seguir iniciamos a descrição das etapas mostradas na figura 10, detalhando a etapa de transdução.

2.4.2 Etapa de transdução

Em linhas gerais, o termo transdutor é definido com um dispositivo que realiza a conversão de uma forma de energia (pressão, por exemplo) em outra (tensão elétrica, por exemplo). O transdutor deve responder somente a variações da forma energia de que se pretende medir, com a exclusão de outras. Além disto, o transdutor deve minimizar a energia extraída do fenômeno em estudo e ser minimamente invasivo. (WEBSTER, 2010)

Os transdutores apresentam diversas propriedades que caracterizam o desempenho do transdutor, ou seja, a fidelidade do sinal elétrico de saída em relação a variável medida. As características estáticas são: (i) linearidade – como a proporção entre sinal elétrico e variável medida se altera na região de operação; (ii) histerese – como a proporção entre sinal elétrico e variável medida depende do histórico de operação do transdutor; (iii) resolução – a menor alteração da variável que gera uma alteração no sinal elétrico de saída; (iv) região de operação – a maior alteração da variável que o transdutor pode detectar, ou seja, os valores de tensão mínimo e máximo que o transdutor opera e (v) razão sinal/ruído – razão entre a magnitude do sinal e a magnitude do ruído do sinal elétrico de saída do transdutor. Além das características estáticas, os transdutores apresentam uma resposta em frequência determinada que descreve o comportamento dinâmico do transdutor. (BATES, 2009)

Os transdutores de pressão e fluxo são parte importante do estudo de mecânica respiratória. Existem duas configurações principais para o transdutor de pressão: (i) gauge (utiliza pressão atmosférica como referência de pressão) e (ii) diferencial (compara duas pressões). Atualmente a tecnologia mais comum em transdutores de pressão utilizados no estudo de mecânica respiratória é o transdutor piezoresistivo. Este transdutor está baseado em um semicondutor cuja resistência é alterada conforme o mesmo é deformado por pressões externas. Este elemento é situado em um circuito eletrônico (ponte de Wheatstone) que transforma estas variações da resistência do elemento piezoresistivo em um sinal elétrico de saída. (BATES, 2009)

O dispositivo mais utilizado para medir fluxo de gás em aplicações respiratórias é o pneumotacógrafo. Este dispositivo gera uma diferença de pressão quando o fluxo de gás passa por uma resistência conhecida, a relação nominal entre

fluxo e diferença de pressão é conhecida, permitindo a medição indireta do fluxo. Esta diferença de pressão é transformada em um sinal elétrico através de um transdutor de pressão. (BATES, 2009)

O próximo passo no processo de medição de grandezas biomédicas, condicionamento de sinais (vide figura 10), será descrito a seguir.

2.4.3 Etapa de condicionamento

Usualmente a saída do transdutor não pode ser diretamente conectada ao computador. Condicionadores de sinais podem amplificar e filtrar o sinal, ou simplesmente realizar o casamento de impedância entre o sensor e algum dispositivo que mostra a grandeza medida (muitos instrumentos médicos apresentam as medições diretamente ao usuário, sem a necessidade de um computador) (WEBSTER, 2010).

Comumente, a etapa de condicionamento é composta pela amplificação e filtragem do sinal elétrico do transdutor. A amplificação do sinal tem duas finalidades: (i) compensar a perda de energia que ocorre durante a filtragem e (ii) compatibilizar a amplitude e offset do sinal elétrico de saída com a região de operação do conversor A/D. A filtragem do sinal elétrico visa remover a componente de ruído do sinal, permitindo avaliar somente as variações associadas ao fenômeno estudado e não as variações associadas a outros aspectos experimentais não controláveis. Além disso, a filtragem analógica deve preceder a conversão A/D com o intuito de se evitar o efeito de "*aliasing*", forçando-se que o o sinal seja limitado em frequência antes de ser amostrado.

Após o condicionamento de sinais, ocorre a conversão A/D no processo de medição. Esta etapa será descrita a seguir.

2.4.4 Etapa de conversão A/D

Durante a etapa de conversão A/D, a tensão instantânea é amostrada em intervalos de tempo constantes (frequência de amostragem). Em cada intervalo, a tensão instantânea lida é convertida em um conjunto de bits que representa, digitalmente, a tensão lida. A região de operação do conversor A/D é separada em 2^N sub-regiões (N é a quantidade de bits do conversor). Desta forma, um conversor A/D com região de operação de $[-V_L, +V_L]$ tem 2^N regiões, cada uma de amplitude $A=(2V_L/2^N)$. (BATES, 2009)

Os bits informados pelo conversor se referem a que sub-região a tensão lida pertence. Estes bits são armazenados para posterior processamento, conhecendo-se as características do conversor A/D (região de operação e número de bits), é possível obter os níveis de tensão a partir dos bits guardados. Outro importante parâmetro é a frequência de amostragem utilizada na conversão A/D. A frequência de amostragem deve ser escolhida obedecendo o teorema da amostragem para que seja evitado o fenômeno conhecido como "*aliasing*". (BATES, 2009)

Atualmente, a instrumentação virtual oferece algumas facilidades na implementação de um ambiente de medição, auxiliando as etapas de execução de experimentos e gravação de dados na memória do computador. Esta metodologia é introduzida a seguir.

2.4.5 Instrumentação virtual

As etapas intermediárias de obtenção das medições do fenômeno (condicionamento, conversão A/D e armazenamento) podem ser implementadas por circuitos eletrônicos individuais construídos especificamente para cada aplicação de mensuração. Estes circuitos dependem das especificações das variáveis medidas, dos transdutores e do ambiente de software (SW) que irá receber estes dados. Estes circuitos precisam ser construídos e o SW que irá gerenciar a coleta e armazenamento de informação também precisa ser criado de forma individual para cada aplicação. Além disto, todo o ambiente precisa ser testado de forma exaustiva

para garantir a integridade das medições. Estas etapas preliminares tem um impacto adverso em custo, tempo de construção e complexidade.

Uma alternativa a este processo é a utilização de instrumentação virtual. Na instrumentação virtual, utilizam-se circuitos eletrônicos de condicionamento de sinais específicos para cada tipo de sinal medido. O sinal condicionado pode ser conectado a uma plataforma de hardware (HW) de uso geral, o qual irá realizar a conversão A/D; todo o restante do processo de medição (gerenciamento da coleta e armazenamento da informação) pode ser executada através de rotinas de SW implementadas nesta plataforma de uso geral, as quais utilizam os dados já digitalizados pelo conversor A/D. O SW pode ser reutilizado e o ciclo de programação e teste da instrumentação é muito mais curto. Atualmente este SW é desenvolvido através de interfaces gráficas que facilitam o desenvolvimento de complexos ambientes de mensuração. Uma ferramenta padrão de mercado para o desenvolvimento de instrumentação virtual é o LabVIEW (National Instruments, EUA), utilizado em conjunto com um conversor A/D programável de uso geral (a National Instruments disponibiliza uma enorme gama de conversores, todos compatíveis com a plataforma de SW LabVIEW; além disto diversos outros fabricantes também disponibilizam conversores compatíveis com a plataforma LabVIEW).

2.5 Instrumentação via processamento de imagens

Neste item iremos introduzir os conceitos principais de instrumentação via processamento de imagens (2.5.1), com detalhamento das principais etapas deste tipo de instrumentação: segmentação (2.5.2) e quantificação / interpretação (2.5.3).

2.5.1 Introdução à instrumentação via processamento de imagens

Além da avaliação da atividade respiratória através das variáveis tradicionais (volume, pressão e fluxo), está se tornando cada vez mais comum a utilização de imagens para avaliação da atividade respiratória. Em casos de asma e DPOC, a resposta inflamatória gera diversas mudanças estruturais nas vias aéreas e no parênquima como (i) destruição das paredes alveolares resultando em enfisema e (ii) alteração nas paredes das vias aéreas, com seu engrossamento. Alterações estruturais do pulmão em doenças têm sido pesquisadas em animais e humanos através de tecidos obtidos via autópsia, biópsia, entre outros meios. Contudo, técnicas modernas de processamento de imagens permitem a análise destas alterações estruturais de forma não invasiva. Imagens de tomografia computadorizada permitem a avaliação de alterações na espessura de vias aéreas e bolsões de ar no pulmão gerados por enfisema (detectados através de regiões de baixa atenuação no pulmão). (QUTAYBA; JOANNE; JAMES, 2005)

Além dos exemplos acima, existem diversos usos de imagens médicas para pesquisar atividade respiratória. Os trabalhos de LaPrad et al. (2010) e Mitchell e Sparrow (1994), citados acima também estão baseados em análise de imagens (ultrassonografia em ambos casos). Os trabalhos de Belmino et al. (2009) estão baseados no processamento de imagens obtidas através de tomografia por impedância para avaliar o recrutamento alveolar.

O processo de aquisição de imagens digitais também segue os passos mostrados na figura 10, sendo que o transdutor é um charge-coupled device (CCD) instalado na câmera, o qual transforma a luz oriunda do objeto observado (fótons) em sinais elétricos, e a conversão A/D envolve um processo de decodificação do sinal elétrico para reconstituir digitalmente a imagem capturada. O processamento digital de imagens tem por objetivo a análise de imagens para a obtenção de informações relevantes sobre as estruturas existentes na imagem.

O processamento digital de imagens pode se estruturado conforme a figura 11 (anotações de aula)³. O processo inicia com a obtenção das imagens digitalizadas segundo o processo apresentado na figura 10 (formação). Depois as estruturas presentes na imagem devem ser identificadas, de forma a se definir o alvo

³ Prof.Dr. Sérgio S. Furuie, material apresentado na disciplina "Introdução a processamento de imagens médicas" em julho/2011.

da análise. Com as estruturas definidas, devem ser realizadas análises sobre as estruturas (quantificação de tamanho, luminosidade, contraste, textura, etc.). A esta etapa se segue a interpretação dos resultados obtidos.

Figura 11 - Etapas do processamento digital de sinais

A seguir detalhamos a etapa de segmentação, importante procedimento dentro da etapa de identificação de estruturas, peça chave do processamento de imagens.

2.5.2 Segmentação de figuras

Segmentação de imagens é o processo de identificar e delinear objetos em imagens. É a operação mais crucial realizada em processamento de imagens visto que as operações mais comuns realizadas em imagens (alinhamento, interpolação, filtragem, visualização 3D, etc) dependem de informações de localização de objetos para terem desempenho ótimo. (UDUPA et al., 2006)

Segmentação de imagens consiste em dois processos relacionados – identificação e delineamento. Identificação é o processo de determinação aproximada de um objeto de interesse dentro de uma imagem. Delineamento é o processo de determinar a extensão espacial e composição ponto a ponto de um objeto de forma precisa dentro de uma imagem. (UDUPA et al., 2006)

A segmentação de imagens deve ser iniciada por um pré-processamento que distingue imagem e pano de fundo, o algoritmo mais comum para esta tarefa é o algoritmo de identificação baseado na definição do limiar ótimo de Otsu. Um algoritmo comum de delineamento é a heurística de busca de bordas.

2.5.2.1 Algoritmo de limiar ótimo de Otsu

No algoritmo de limiar ótimo de Otsu (OTSU, 1979), a intensidade dos pixels é separada em duas classes: pano de fundo e objeto. O algoritmo busca o nível de intensidade que melhor separa as duas classes (limiar). Na figura 12 este algoritmo é exemplificado.

Figura 12 - Algoritmo de Otsu. (12.a) Histograma de intensidades; (12.b) Simulação de qualidade dos limiares; (12.c) Imagem antes algoritmo Otsu; (12.d) Imagem após algoritmo Otsu.

O algoritmo calcula, para cada intensidade presente na imagem, um parâmetro (*criterion measure*) que quantifica a qualidade da segmentação se a intensidade fosse selecionada como o limiar. Este parâmetro, obtido a partir do histograma de intensidades da imagem, é o quociente entre a variância entre classes e a variância intra classes. Quanto mais distantes estiverem as classes e menor for a variância interna das classes, maior é o valor deste parâmetro e maior é a qualidade da segmentação. O limiar é definido como a intensidade que apresenta o máximo valor do parâmetro.

2.5.2.2 Heurística de busca

Na heurística da busca de bordas, a partir do conhecimento sobre a imagem a ser processada, se desenvolve um algoritmo simples de delineamento. O algoritmo simplesmente busca alguma característica que defina os limites da imagem. Por exemplo, caso a imagem seja composta por duas curvas na horizontal, o algoritmo poderia simplesmente buscar dois pixels vizinhos na direção vertical da imagem que sejam de classes diferentes (após pré-processamento que separe pano de fundo e objeto). Este exemplo é ilustrado na figura 13.

Figura 13 - Heurística de busca de bordas. (13.a) Imagem com sentido de busca destacado e os pontos do contorno definidos para um corte vertical. (13.b) Contornos obtidos pela aplicação da heurística a todos os pontos da curva.

2.5.3 Quantificação e interpretação

Após a obtenção do contorno da figura, as etapas de quantificação e interpretação podem ser executadas sobre estes pontos. Estas etapas são executadas de maneira específica para cada aplicação sendo comum a medição de comprimentos, áreas e volumes para avaliar as imagens delineadas.

2.6 Avaliação de mecânica respiratória em modelos animais de doença

Mesmo levando-se em consideração que camundongos são os modelos mais comuns de mecânica respiratória utilizados em laboratório (BATES e IRVING, 2003), as reduzidas dimensões de suas vias aéreas dificultam a sua utilização nas pesquisas de via aérea isolada. Neste cenário, a literatura apresenta estudos realizados em ratos, bovinos e porcos. Para o experimento pretendido, serão utilizados ratos. Desta forma as características da mecânica respiratória de ratos são fundamentais para a definição das características dos equipamentos a serem utilizados nas medições de mecânica respiratória. É prática comum em laboratório a medição de capacidade pulmonar total (CPT) a pressões transpulmonares de 25-30 cmH₂O e medições de volume residual (VR) em pressões transpulmonares de -10 cmH₂O. (KRINKE, BULLOCK e BUNTON, 2000) Deste modo, para a avaliação de mecânica respiratória em ratos é importante utilizar um transdutor de pressão que tenha boa resolução no intervalo de -10 a 30 cmH₂O.

Em ratos não sedados (com peso próximo a 270 g) a frequência ventilatória é 110 ciclos/minuto, o volume corrente 1,7 mL e o volume-minuto 187 mL/minuto (aproximado). (KRINKE, BULLOCK e BUNTON, 2000) Desta forma, cada ciclo ventilatório dura 0,55 s (frequência de 1,8 Hz) e o fluxo médio (na inspiração e na expiração) é de 6,2 mL/s. Aproximando o fluxo ventilatório (a volume corrente) a uma senóide pode-se esperar valores de fluxo de até 9,8 mL/s. (vide figura 14) Sendo assim é importante que a região de operação do pneumotacógrafo contenha a região de -10mL/s a +10mL/s. Para animais maiores, esta região precisa ser maior.

Figura 14 - Aproximação senoidal do ciclo respiratório de ratos

De forma a poder captar as cinco primeiras harmônicas das variáveis de fluxo, volume e pressão, é necessário preservar o conteúdo espectral de 0 a 10 Hz; sendo necessário um filtro passa-baixas com frequência de corte mínima em 10 Hz. Da mesma forma, a mínima frequência de amostragem deve ser 20 Hz. Um número maior de harmônicas podem ser obtidas com frequências de corte do filtro e amostragem superiores, no entanto recomenda-se manter a frequência de corte inferior a 60Hz de modo a sempre se filtrar o ruído de rede elétrica (presente em várias instalações laboratoriais com deficiências na estrutura de isolamento elétrico).

3. Materiais e Métodos

Neste capítulo será introduzido o ambiente de medição e controle da mecânica de vias aéreas isoladas *in vitro* (3.1) e todos os seus subcomponentes serão detalhados (subitens 3.1.1-3.1.8). O ambiente foi construído de forma a minimizar o processamento executado durante os experimentos de forma a priorizar a obtenção de dados. Todo o processamento sobre os dados medidos é executado após os experimentos; este pós-processamento será detalhado no item 3.2. No item 3.3 o protocolo experimental é detalhado.

3.1 Ambiente de medição e controle da mecânica respiratória de vias aéreas isoladas *in vitro*

De forma a avaliar a mecânica respiratória de vias aéreas isoladas foi desenvolvido um ambiente capaz de medir as principais grandezas de quantificação de mecânica respiratória (pressão, fluxo e volume) e alterações na geometria externa da via aérea através da realização de medições de diâmetro externo de vias aéreas usando imagens. Este ambiente é introduzido na figura 15. Buscou-se a utilização de equipamentos já disponíveis nos laboratórios, integrando instrumentação existente e utilizando os recursos do ambiente de instrumentação virtual e pós-processamento das medições de modo a superar as eventuais limitações da instrumentação.

Figura 15 - Ambiente de avaliação de mecânica respiratória de vias aéreas.

O ventilador de pequenos animais gera um fluxo de ar de volume e frequência controláveis. Este fluxo passa através de um pneumotacógrafo conectado em série com o ventilador, o qual transforma o fluxo em uma diferença de pressão (relação fluxo-pressão é nominal e especificada pelo pneumotacógrafo), a qual é transformada em um sinal elétrico através do transdutor de pressão diferencial conectado com o pneumotacógrafo. Após passar pelo pneumotacógrafo, o fluxo passa por um transdutor de pressão (gauge) também conectado em série, o qual mede a queda de pressão através via aérea, também gerando um sinal elétrico. O sinal elétrico do transdutor diferencial é proporcional ao fluxo que passa pela via aérea e o sinal elétrico do transdutor gauge está relacionado à queda de pressão através da via aérea. Estes dois sinais permitem a medição da componente da R_{aw} gerada pela via aérea avaliada.

A via aérea é conectada a duas cânulas metálicas e esta montagem é condicionada em um recipiente (condicionador de vias áreas) que (i) mantém a via aérea fixa durante os experimentos e (ii) permite que a via aérea seja banhada em uma solução durante os experimentos. O condicionador de via aérea é conectado ao transdutor de pressão em série através de uma das cânulas metálicas. A parte superior do condicionador está aberta de modo a que seja possível obter imagens da via aérea.

O estereomicroscópio é posicionado sobre o condicionador de vias aéreas, com lentes que permitem ajustar o foco e o zoom da imagem da via aérea

observada. A câmera analógica é conectada ao estereomicroscópio permitindo a gravação da imagem da via aérea.

Os três sinais analógicos (pressão, fluxo e imagens capturadas) são digitalizadas através de conversores A/D. As informações digitais são gravadas, processadas e analisadas através de um computador. A seguir serão apresentados os componentes do ambiente de medição e controle.

3.1.1 Ventilador de pequenos animais

Para a função do ventilador de pequenos animais foi utilizado um equipamento disponível comercialmente (683, Harvard Apparatus, EUA). O ventilador pode ser visto na figura 16.

Figura 16 - Ventilador automático para pequenos animais. (16.a) Equipamento; (16.b) Detalhe das válvulas. (adaptado do manual de usuário do Harvard 683).

Este ventilador é composto por um pistão ligado a um motor elétrico, com frequência do ciclo respiratório (30 a 150 respirações por minuto) e volume insuflado controláveis (0,5 a 5mL por respiração). Três válvulas estão conectadas ao pistão: (i) válvula de entrada de ar no pistão (Entrada Gás, na figura 16), pode ser deixada exposta ao ambiente (insuflar ar do ambiente) ou ser conectada a algum recipiente que contenha gás com características específicas (anestésico, ar com diferentes concentrações de poluentes, etc.); (ii) válvula de saída do pistão (Inspiração, na figura 16), permite a saída de ar do pistão para o animal durante a etapa de inspiração e (iii) válvula de expiração (Expiração, na figura 16), permite a saída de ar do animal para o ambiente durante a etapa de expiração.

3.1.2 Transdutores de pressão e fluxo

Para a função de transdução de pressão foi utilizado um transdutor de tipo gauge (FPM 07PG, Fujikura, Japão), o qual mede pressões de -500 a +500cm H₂O, com tensões de saída de -0,14 a +0,14V. Para o transdutor de fluxo foi utilizado um transdutor de pressão diferencial (HCXPM005D6V, Sensortech, EUA), o qual mede pressões de -5 a +5 cmH₂O com tensões de saída de -2 a +2V. O transdutor de pressão diferencial é acoplado a um pneumotacógrafo do tipo Fleisch (000, Hugo Sachs, Suíça), o qual mede fluxos de -27 a +27mL/s com pressões de saída de -1 a +1cmH₂O. O pneumotacógrafo do tipo Fleisch é composto por um conjunto de tubulações em paralelo em número suficiente para que o fluxo em cada tubulação seja reduzido, garantindo um número de Reynolds baixo (vide equação 5) e um fluxo laminar dentro do pneumotacógrafo.

A montagem do conjunto dos transdutores pode ser visto na figura 17. Cada transdutor precisa de um circuito elétrico de alimentação, o qual foi implementado no condicionador de sinais descrito a seguir. Tanto os transdutores quanto o condicionador são equipamentos já existentes no LEB.

Figura 17 - Transdutores de pressão e fluxo - (17.a) Transdutor de pressão gauge; (17.b) Pneumotacógrafo; (17.c) Transdutor de pressão diferencial.

3.1.3 Condicionador de sinais

Os transdutores de pressão e fluxo são conectados a um equipamento de condicionamento compatível com os sinais elétricos dos transdutores. Este sistema é alimentado diretamente pela rede elétrica e fornece as alimentações necessárias para os transdutores. O condicionador de sinais contém 3 entradas para transdutores de pressão, sendo duas delas para conexão de transdutores do tipo gauge e uma para o transdutor de pressão diferencial. O condicionador pode ser visto na figura 18.

Figura 18 - Condicionador de sinais

A alimentação do transdutor gauge é feita através de uma fonte de corrente e um retificador é utilizado para alimentação dos transdutores diferenciais. Os amplificadores são ajustados por controles manuais de ganho e offset.

Um filtro passa-baixas analógico do tipo Bessel de 6ª ordem (configuração Sallen-Key) foi implementado para cada canal. O canal 1 do transdutor gauge (utilizado no ambiente de medição – sinal de pressão) foi construído com frequência de corte de 50 Hz e o transdutor diferencial (usado no sinal de fluxo) foi construído com uma frequência de corte de 300 Hz. Como a frequência mínima de corte para aplicações de mecânica respiratória com ratos é de 20 Hz, conforme discutido anteriormente, os filtros do condicionador são compatíveis com a aplicação desejada. Os dados obtidos com este equipamento podem ser sujeitos a nova filtragem, dessa vez digital (no instrumento virtual ou no pós-processamento), de modo a eliminar as frequências acima de 20 Hz que foram mantidas pelos filtros do condicionador de sinais.

Os filtros do tipo Bessel são desenvolvidos de modo a se obter um atraso de grupo constante na banda passante, gerando mínima deformação na forma de onda do sinal filtrado. A desvantagem dos filtros do tipo Bessel é a que a taxa de atenuação na banda de transição é reduzida em relação a outros tipos de filtros (Butterworth e Chebyshev). (BAKER, 1999) A configuração Sallen-Key é uma topologia padrão de desenvolvimento de filtros, a qual usa elementos ativos e passivos para implementar um filtro analógico. Esta configuração está baseada em estágios, cada estágio implementando um par de polos conjugados na função de transferência do filtro. A obtenção de funções de transferência de ordens superiores é realizada através da conexão em série de estágios, cada um implementando um par de polos conjugados. A utilização de um filtro de ordem superior (6ª ordem), com os malefícios da dificuldade de implementação, se justifica de modo a incrementar a taxa de atenuação na banda de transição do filtro do tipo Bessel.

3.1.4 Conversão A/D

A conversão A/D dos sinais de pressão e fluxo foi feita utilizando-se uma plataforma de hardware de uso geral para aquisição de dados (NI USB6008 – National Instruments, EUA). Esta plataforma, doravante denominada sistema de aquisição de dados (SAD), permite digitalizar sinais na configuração diferencial ou de terminal único, na qual se utiliza o terminal de GND interno do conversor. O conversor trabalha com tensões de terminal único de -10V a 10V, permitindo medir sinais de -20V a +20V diferenciais. Ainda na configuração diferencial, a resolução do conversor é 12 bits e a máxima taxa de amostragem é 10kS/s (10.000 amostras por segundo) para o conjunto dos canais. O conversor ainda permite definir os valores máximos/mínimos do sinal analógico de forma a aumentar a resolução da conversão na região de interesse. No ambiente construído se utilizaram dois canais analógicos (fluxo e pressão), na configuração diferencial, região de interesse -10V a +10V (diferencial) e 1kS/s em cada canal.

3.1.5 Condicionador de vias aéreas

O condicionador de vias aéreas isoladas foi construído durante a execução do projeto. Antevendo a dificuldade em conectar vias aéreas de pequenos animais nos tubos, o condicionador foi projetado para ser desmontado. Assim as vias aéreas podem ser conectadas aos tubos em um local apropriado e depois a montagem inteira pode ser re-acoplada ao condicionador. O projeto do condicionador pode ser visto na figura 19, feito com um software de projeto gráfico (Sketchup, Google, EUA). Na figura 19.a podemos ver o projeto do condicionador e na figura 19.b são mostrados os detalhes do condicionador: (1) parede lateral com furo para entrada de solução fisiológica, (2) parede lateral com furo para saída de solução fisiológica, (3) parte inferior fixa das paredes frontal e traseira, (4) parte superior móvel das paredes frontal e traseira (removíveis para permitir a remoção e fixação do conjunto tubo-via aérea), (5) tubos para permitir a entrada/saída de ar. Na figura 20, podemos ver o condicionador utilizado nos experimentos. As medidas também são mostradas na figura 19.b, o condicionador ocupa uma área de 10 x 10 cm, com um altura de 3 cm. A região interna (abriga a solução fisiológica e a traqueia) tem uma área de 8 x 8cm, com uma altura de 3 cm.

a)

b)

Figura 19 - Projeto do condicionador de vias aéreas (19.a) Condicionador montado e (19.b) Detalhes do projeto do condicionador - (1) parede lateral com furo para entrada de solução fisiológica, (2) parede lateral com furo para saída de solução fisiológica, (3) parte inferior fixa das paredes frontal e traseira, (4) parte superior móvel das paredes frontal e traseira (removíveis para permitir a remoção e fixação do conjunto tubo-via aérea), (5) tubos para permitir a entrada/saída de ar.

O condicionador construído pode ser visto na figura 20.

Figura 20 - Condicionador de vias aéreas implementado.

3.1.6 Ambiente de processamento de imagens

Para o ambiente de processamento de imagens foi utilizado um estereomicroscópio (SZ61, Olympus, Japão), o qual apresenta magnificação de 6,7x a 45x e, utilizando observação por câmera, um campo de visão de 2,8mm x 2,1mm até 19,1mm x 14,3mm. Este estereomicroscópio foi acoplado a uma câmera (SDC 415, Samsung, Coréia), padrão NTSC (*National Television System Committee*) com 30 quadros por segundo, 752x582 pixels efetivos. O conjunto estereomicroscópio/câmera pertence ao Laboratório de Pesquisa em Cirurgia Torácica (LIM61) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e foi utilizado em cooperação de pesquisa. Os sinais de vídeo da câmera foram processados através de uma placa de aquisição e condicionamento de vídeo (PACV) padrão PCI (*Peripheral Component Interconnect*) (PCI 1405, National Instruments, EUA), a qual captura sinais padrão NTSC ou PAL (padrão *Phase Alternating Line*), (30/25 fps respectivamente) e converte em imagens preto e branco, com 256 níveis de cinza (8bits por pixel). A PACV é capaz de operar com trigger externo ou trigger interno, permitindo que este trigger interno seja lido externamente (sinal *Transistor Type Logic*, ou TTL). No ambiente, o trigger interno foi lido externamente de modo a sincronizar os sinais de pressão/fluxo medidos e as imagens capturadas. A leitura do trigger foi feita utilizando-se o SAD o qual, além de

conter um conversor A/D que utilizamos nos sinais de pressão e fluxo, também dispõe de um contador de pulsos. Este contador de pulsos detecta as bordas no sinal TTL de trigger, incrementando a sua contagem a cada borda (32 bits de resolução, permitindo contagem até 4 bilhões); este contador de pulsos funciona com pulsos de frequência máxima de 5 MHz e largura de pulso mínima de 100 ns. Assim como o SAD, a PACV também pode ser integrada ao ambiente de instrumentação virtual da National Instruments (LabVIEW).

O SAD, ao disponibilizar os valores lidos pelo conversor A/D ao ambiente de instrumentação virtual, também disponibiliza um vetor com os instantes nos quais ocorreram as leituras dos sinais elétricos referentes à pressão e fluxo. Para o contador de pulso a dinâmica é semelhante, ao disponibilizar os vetores com os valores lidos do contador de pulso, o SAD também disponibiliza o vetor com os instantes nos quais ocorreram as leituras do contador de pulsos. Através da análise do contador de pulso é possível descobrir o instante no qual cada imagem foi capturada (disparo do trigger). Desta forma é possível sincronizar as leituras de pressão / fluxo e as imagens capturadas.

3.1.7 Instrumento virtual

A integração dos elementos de medição descritos anteriormente (pressão, fluxo e imagens) é feita através de um ambiente de instrumentação virtual (LabVIEW 8.5, National Instruments, EUA), o qual é executado em um computador tipo PC (processador Pentium Dual Core de 2,7 GHz; memória RAM 2GB). Este ambiente permite a gravação simultânea dos dados de pressão, fluxo e contagem de pulsos do SAD e também as imagens da PACV. Foi desenvolvido um instrumento virtual em LabVIEW que permite (i) calibração dos transdutores de pressão e fluxo utilizados nos experimentos, (ii) execução dos experimentos de mecânica respiratória, com gravação simultânea dos dados lidos do SAD (armazenamento em arquivos de texto) e das imagens da PACV (armazenamento em arquivos de vídeo .avi) e (iii) análise preliminar dos dados lidos em tempo de execução, permitindo aos pesquisadores avaliar de forma preliminar os resultados obtidos e, caso vejam necessário, realizar alguns experimentos específicos ou mudanças no protocolo experimental.

O instrumento virtual é executado com realização de tarefas de forma sequencial. A primeira etapa (figura 21) verifica o funcionamento da obtenção dos dados de pressão e fluxo e permite a configuração do conversor A/D. Na segunda etapa (figura 22) é realizada a calibração dos transdutores de pressão. Na terceira etapa (figura 23), o experimento é executado.

3.1.7.1 Primeira Etapa - Configurações

Nesta etapa, são definidas as configurações base do conversor A/D: frequência de amostragem e quantidade de amostras a serem medidas. O SAD pode ser configurado para diversas formas de funcionamento: aquisição de amostras sob demanda, contínua, ou finita. Na aquisição sob demanda, o instrumento virtual solicita a leitura individual de amostras. Na aquisição finita, o instrumento virtual solicita a leitura de um conjunto de N amostras a uma dada taxa de amostragem. Na aquisição contínua, os dados são coletados pelo SAD continuamente na taxa de amostragem definida, quando a quantidade de amostras solicitada é medida, o instrumento virtual lê o vetor de amostras. No instrumento desenvolvido, utilizou-se o modo de funcionamento contínuo.

É importante notar que, nas aquisições finita e contínua, o instrumento virtual somente inicia o processo de coleta, a coleta dos dados individuais é executada de forma independente pelo SAD. O número de amostras definido é coletado na taxa de amostragem definida pelo SAD de forma autônoma, sendo devolvidas para o instrumento virtual quando solicitado. Desta forma, a coleta dos dados é imune as variações temporais na execução do instrumento virtual, visto que o mesmo é executado em um ambiente computacional multi-processado (computador pessoal).

Uma vez definida as configurações do conversor A/D, algumas medições são executadas para garantir o funcionamento dos transdutores. O painel para o usuário pode ser vista na figura 21. Neste painel, o usuário configura o conversor A/D através dos parâmetros *TaxaAquisição* e *Amostras* (caixas de texto no instrumento virtual). Após configurar o conversor, o usuário inicia a etapa utilizando o botão *Testar*. Durante o experimento, os dados de tensão do condicionador de sinais relacionados às medições dos transdutores são lidos e mostrados nos gráficos *Pressao* e *Fluxo*. O conteúdo espectral dos sinais é mostrado nos gráficos

RuidoPressao e *RuidoFluxo*; com os transdutores em estado de repouso (sem variação de pressão e fluxo) este gráfico permite avaliar a existência de fontes de ruído no ambiente de medição. A etapa é concluída através do botão *Finalizar*. O botão *Cancelar* gera o término da aplicação ao final da etapa, sendo utilizado para reiniciar o instrumento virtual.

Figura 21 - Instrumento Virtual: primeira etapa, testes de transdutores e configuração do conversor A/D. Caixas de texto para input dos parâmetros de configuração do conversor A/D; botões para controlar a execução da etapa (Testar, Finalizar e Cancelar) e gráficos temporais e espectrais dos sinais medidos dos transdutores (Pressao, Fluxo, RuidoPressao e RuidoFluxo).

3.1.7.2 Segunda Etapa - Calibração

Nesta etapa, os transdutores são calibrados. O painel mostrado na figura 22 é mostrado 4 vezes na calibração do transdutor gauge de pressão e 3 vezes na calibração do transdutor diferencial, em cada execução é solicitado o fornecimento de uma pressão conhecida aos transdutores. Ao final desta etapa temos 4 pares tensão-pressão para o transdutor gauge e 3 para o transdutor diferencial. O instrumento virtual executa uma regressão linear para encontrar a reta de calibração dos transdutores. A reta de calibração do transdutor diferencial é combinada com a reta de calibração do pneumotacógrafo (nominal, informada no chassi do pneumotacógrafo) para a obtenção da reta de calibração do fluxo (mL/s para volt). A

reta de calibração do transdutor gauge é utilizada diretamente para a obtenção da reta de calibração da pressão (cmH₂O para volt).

Figura 22 - Instrumento Virtual: segunda etapa, calibração dos conversores A/D. Caixas de texto mostram os valores em medição (Pressao, Tensao); gráficos mostram a evolução temporal e espectral do sinal medido (Dados Medidos e Perfil de Ruído); botões são usados para controlar a execução da calibração (Inicio Leitura Pressão, Termino Leitura Pressão e Cancelar) e displays auxiliam o operador (display Em execução e display vertical de tensão).

Durante a calibração é possível medir a evolução temporal dos valores medidos de pressão (gráfico *Dados Medidos*), além de avaliar o conteúdo espectral do sinal lido (gráfico *Perfil de Ruído*). Como a calibração é feita em níveis DC, o conteúdo espectral do sinal permite vislumbrar o perfil de ruído ambiental do sinal elétrico. Além disto, o painel mostra diversos indicadores gráficos que auxiliam os pesquisadores na avaliação dos níveis lidos. O usuário inicia a leitura dos dados através do botão *Início Leitura da Pressão* e conclui a leitura dos dados através do botão *Termino Leitura da Pressão*. Durante a execução da leitura dos dados de calibração, o display *Em execução* muda de cor para indicar ao operador que está ocorrendo a leitura de dados. As caixas de texto *Pressao* e *Tensao*, mostram o par tensão / pressão que está sendo medido. Além disto o *display* vertical mostra, em uma escala definida, qual é o valor de tensão atualmente lido. Quando o usuário conclui uma calibração, é utilizado na construção da reta de calibração o par tensão / pressão mostrado nas caixas de texto *Pressao* e *Tensao*. O botão *Cancelar* gera o

término da aplicação ao final da etapa, sendo utilizado para reiniciar o instrumento virtual.

3.1.7.3 Terceira Etapa – Execução Experimentos

A etapa de execução de experimentos foi construída de modo a permitir a execução serial de experimentos. O painel é mostrado na figura 23 abaixo.

Figura 23 - Instrumento Virtual: terceira etapa, execução de experimento. Caixas de texto permitem a configuração do experimento (SaveDir, Protocol, Fo); gráficos mostram a evolução temporal (Pressao – Historico e Fluxo – Historico); gráficos mostram os últimos 5 ciclos respiratórios (Pressao, Fluxo, Volume e Imped); gráfico mostra a imagem obtida pelo estereomicroscópio (Image Out) e a matriz $[Po, R, E, r2]$ mostra as relações entre Pressao, Fluxo e Volume para os últimos 5 ciclos respiratórios.

Após a configuração do experimento (definir o diretório que irá guardar os dados e o protocolo que identifica o experimento através das caixas de texto *SaveDir* e *Protocol*, respectivamente) o mesmo é iniciado ao clicar-se o botão *OK* e concluído ao clicar-se o botão *STOP*. Após a conclusão do experimento, o painel fica a disposição para a execução de outros experimentos (não é necessário executar novamente as etapas anteriores). O botão *VoltaMenu* conclui a etapa de experimento, reiniciando o instrumento virtual.

Durante a execução do experimento, o conjunto de dados de pressão e fluxo medidos é mostrado nos gráficos *Pressão Histórico* e *Fluxo Histórico*. As imagens da traqueia são mostradas no gráfico *Image-Out*. Estes dados são gravados em arquivos texto e, no caso das imagens da traqueia, gravados em um arquivo de vídeo .avi. O arquivo texto guarda as informações temporais, os sinais elétricos medidos, os valores de pressão do transdutor gauge e diferencial (obtidos via reta de calibração), os valores de fluxo (obtido via reta de calibração do pneumotacógrafo) e os valores temporais da captura de imagens (informações temporais, valores do contador de pulsos e frames associados aos valores do contador de pulsos). Além disto, um arquivo texto de registro guarda diversos parâmetros da execução do experimento (retas de calibração, diretório dos arquivos gerados, configuração do conversor A/D, data, etc.).

O instrumento virtual, usando o parâmetro dinâmico F_o (definido pelo usuário através da caixa de texto F_o), permite uma avaliação preliminar dos sinais medidos de pressão e fluxo durante o experimento. O parâmetro F_o define o limiar de fluxo, o valor de fluxo que indica a ocorrência do início do ciclo inspiratório do SAV. Usando este limiar, o instrumento armazena a curva de pressão-fluxo dos últimos cinco ciclos e os sobrepõem nos gráficos *Pressão*, *Fluxo* e *Volume* (o valor de fluxo de um ciclo é integrado para o cálculo do volume insuflado pelo SAV). Importante notar que o valor de volume está associado ao volume insuflado pelo SAV, e não o volume que está presente na via aérea. Além disto, usando a razão entre Pressão e Fluxo, o instrumento calcula a curva de resistência de via aérea dos últimos cinco ciclos e os mostra no gráfico *Imped*. A observação destes gráficos permite uma avaliação do comportamento mecânico da via aérea durante a execução do ciclo inspiração-expiração.

A matriz $[P_o, R, E, r^2]$ mostra a regressão linear multivariável das curvas no gráfico Pressão em relação as curvas nos gráficos Fluxo e Volume, a qual gera 4 indicadores: P_o (nível DC da pressão), R (relação linear entre Pressão e Fluxo), E (relação linear entre Pressão e Volume) e r^2 (coeficiente de determinação). Esta análise permite calcular os parâmetros do modelo linear de um compartimento (equações 2,3). Caso um experimento fosse feito com um pulmão de rato, com as vias aéreas e o parênquima, o volume no pulmão seria igual ao volume insuflado, e

a regressão linear multivariável iria calcular o parâmetro R_{aw} (indicador R) e o parâmetro C_T (o inverso do parâmetro E). Como não foram feitos experimentos desta natureza, esta matriz não é relevante para a análise dos dados medidos para vias aéreas isoladas.

3.1.8 Funcionamento do instrumento virtual

Na figura 24 abaixo, são mostradas as sub-rotinas executadas durante a etapa de experimento. As rotinas de processamento de dados do conversor A/D ocorrem em paralelo com as etapas do processamento de imagens e dados temporais de captura de imagens.

Figura 24- Diagrama de blocos do Instrumento Virtual, execução da etapa de experimento.

No ciclo de processamento de dados do conversor A/D, o SAD controla a medição de N amostras dos sinais do conversor A/D. Após a conclusão das medidas, o instrumento virtual coleta este vetor de amostras e o processa, como mostrado na figura 24, com a transformação dos sinais de tensão em sinais de fluxo e pressão. O vetor de amostras é acompanhado por um vetor temporal com os instantes das medições das amostras. Todos os dados coletados são agregados a um vetor que contém todos os vetores lidos desde o início do experimento. Este vetor agregado está guardado em memória RAM de modo a reduzir o atraso na execução (guardar dados em disco rígido apresenta uma lentidão muito maior). Os dados são processados para avaliação preliminar de pulsos detalhada anteriormente (sobreposição dos últimos 5 pulsos) e todos os gráficos do painel são atualizados com os novos dados. Os dados somente são gravados em arquivo texto no disco rígido ao final do experimento.

No ciclo de processamento de imagens, o instrumento virtual adquire a imagem digitalizada pela PACV e o vetor de amostras do contador de pulsos (obtido pelo SAD). O vetor de amostras do contador de pulsos é acompanhado por um vetor temporal com os instantes das medições das amostras, o qual pode ser sincronizado com o vetor temporal das amostras de pressão e fluxo para sincronizar imagens e medições dos transdutores. As informações do contador de pulsos também são inseridas em um vetor agregado em RAM. A imagem capturada é mostrada no painel e guardada no arquivo .avi no disco rígido. O atraso desta gravação em disco rígido não impacta a gravação dos dados do conversor A/D (multi-processamento das rotinas de forma paralela). Ao final do experimento, os dados do contador de pulsos são gravados em um arquivo texto no disco rígido e o arquivo .avi é fechado.

O processamento durante o experimento foi construído para minimizar a ocorrência de atrasos que possam gerar perda de medições. Pela configuração padrão do conversor A/D (aquisição contínua de blocos de 1000 amostras a 1kS/s), as sub-rotinas de leitura de novos vetores de dados ocorrem a cada 1s. A cada execução, são processadas somente as 1000 amostras do novo vetor, as amostras já inseridas no vetor agregado não são processadas. Durante os experimentos, não ocorreu perda de medições para esta configuração de leitura. Pela característica temporal da câmera utilizada (30 quadros por segundo), a rotina de leitura de novas imagens ocorre a cada 33ms. Foi definido um buffer de 5 imagens para absorver eventuais atrasos gerados pela gravação da imagem em um arquivo .avi no disco rígido. Durante os experimentos, não ocorreu perda de imagens para esta

configuração. Importante que, em situações que foram solicitadas a gravação de dados em dispositivos de memória externos (pen-drive, HD externo) os atrasos introduzidos pelo barramento USB acarretaram perda significativa de quadros (10% a 30% de quadros)

3.2 Pós-processamento de dados experimentais

A avaliação dos experimentos é feita via pós-processamento dos dados gravados, utilizando-se um ambiente de computação científica (Matlab, The Mathworks, EUA). Este ambiente permite o processamento dos dados utilizando-se um vasto conjunto de ferramentas científicas pré-construídas, evitando-se a necessidade de reconstruir soluções computacionais consagradas para cada aplicação específica. O ambiente também oferece uma linguagem específica que permite automatizar a execução das análises sobre os dados. Foram desenvolvidos duas rotinas para pós-processamento dos dados: (i) processamento de imagens e (ii) análise dados experimentais.

Na rotina de processamento de imagens, são informados o conjunto de arquivos .avi e a região de interesse de cada vídeo. O arquivo .avi é avaliado pela análise dos frames individuais do vídeo .avi. Inicialmente é aplicado o algoritmo de limiar ótimo de Otsu para separar imagem e pano de fundo, gerando assim uma imagem binária (cada pixel pode somente ter dois valores – 0 para pano de fundo e 1 para via aérea). Esta imagem binária é passada por filtragem para remover artefatos ruidosos (pequenos artefatos como bolhas e partículas presentes na imagem) e um filtro de mediana para remover ruído *salt and pepper* (pontilhado) presente na transição entre pano de fundo e imagem. Um algoritmo de contagem de pixels 1 é aplicado a imagem filtrada de forma a calcular a área da imagem (a área é dividida pelo comprimento longitudinal definido pelo usuário de forma a se calcular o diâmetro médio da via aérea no trecho analisado). Foram utilizadas as ferramentas já existentes no Matlab para realizar as etapas descritas anteriormente: (i) separação imagem e pano de fundo, (ii) filtragem de pequenos artefatos, (iii) filtragem de mediana e (iv) contagem de pixels 1. Este processamento é feito para cada frame, obtendo-se as informações da evolução temporal do diâmetro médio da via aérea. Na figura 25 são mostrados os passos intermediários da filtragem.

Figura 25 - Pós-processamento de imagem. (25.a) Imagem original, (25.b) Separação de imagem e pano de fundo com algoritmo de limiar ótimo, (25.c) Filtragem para remoção de artefatos (25.d) Filtragem para remoção do ruído salt and pepper.

Além de avaliar o diâmetro médio da via aérea, a rotina de processamento de imagens realiza uma análise espacial da traqueia. A traqueia é fatiada horizontalmente em trechos de 10 pixels e a evolução temporal do diâmetro médio de cada fatia é obtida (da mesma forma que o diâmetro médio da via aérea como um todo é obtida). Utilizando-se a heurística de busca, é avaliada a posição vertical dos contornos inferior e superior desta fatia, obtendo-se a evolução temporal dos contornos das fatias. A evolução temporal é avaliada em termos da variação percentual do valor da grandeza medida (diâmetro médio, posição contorno superior, posição contorno inferior) em relação ao mínimo valor no ciclo de insuflação. Este processamento pode ser visto na figura 26. Todos os vetores obtidos nesta análise são gravados em disco rígido. Para realização de análises espaciais sobre as traqueias, as fatias de cada traqueia foram agrupadas em 3 trechos de 23 fatias contíguas: proximal (fatias 1 - 23), medial (fatias 24 a 46) e distal (fatias 47 a 69), sendo o comportamento do trecho definido pelo comportamento médio das fatias.

Figura 26 - Análise espacial da traqueia, a qual é dividida em fatias de 10 pixels cada, sendo feita uma análise de diâmetro médio e contornos de cada fatia (26.a); sendo obtidas as curvas de evolução temporal destas grandezas espaciais com o tempo para cada fatia (26.b)

Na análise de dados experimentais, os dados obtidos via (i) processamento dos arquivos .avi no Matlab e (ii) gravação dos dados experimentais pelo instrumento virtual são processados de forma conjunta e sincronizada. Inicialmente se avalia o valor máximo atingido pelas grandezas de interesse (pressão, fluxo, variação percentual de diâmetro médio, variação percentual da posição do contorno superior e variação percentual da posição do contorno inferior) dentro do ciclo de insuflação. Ao final desta etapa, as curvas medidas são substituídas por um vetor com os máximos valores de cada ciclo (vetor de picos). Após a obtenção do vetor de picos, de modo a limitar o efeito de eventuais ruídos de medição e ainda observar a evolução temporal do vetor de picos (expectativa de efeitos transientes de duração de aproximadamente 1 minuto), se obtém uma média temporal móvel dos picos dos ciclos, de 15 segundos com sobreposição de 50% (vetor de análise). Para cada vetor de análise são obtidas medidas estatísticas (média do valor do vetor de análise, distância interquartil, etc.). Um exemplo pode ser visto na figura 27, com os subscritos P para o vetor de picos e A para o vetor de análise.

Figura 27 - Exemplo da obtenção dos vetores de análise, com o tratamento do vetor original (27.a), o vetor de picos obtido e aplicação da média temporal móvel (27.b) e o vetor de análise final (27.c).

Após a obtenção dos vetores de análise, os vetores de análise de traqueias distintas expostas ao mesmo protocolo experimental são agrupados de modo a se obter vetor de análise médio do protocolo experimental e outras medidas estatísticas do protocolo (valor médio global da grandeza, distância interquartil, etc.) as quais são agrupadas na tabela de análise. Um exemplo pode ser visto na figura 28.

Figura 28 - Exemplo de análise de um conjunto de vetores de análise (pertencentes a medições do mesmo protocolo experimental). (28.a) vetor de análise de diâmetro médio de 3 traqueias expostas ao mesmo procedimento experimental; (28.b) tabela de análise com a obtenção do valor médio global (μ_G) e da distância interquartil média (μ_{DIQ}) a partir da média e distância interquartil de cada vetor de análise (μ_D , DIQ respectivamente); (28.c) vetor de análise médio do protocolo experimental com dispersão.

Realizando-se a média das curvas de diâmetro e posição de contorno das fatias em cada trecho foi possível obter os vetores de análise dos trechos proximal, medial e distal de cada traqueia (na figura 28, teríamos a mesma análise, porém seriam de trechos da traqueia, havendo três análises para cada traqueia).

Com o conjunto de tabelas de análise para as diversas grandezas (pressão, fluxo, diâmetro médio) nos distintos protocolos experimentais foram realizados testes de significância estatística para avaliar se os protocolos haviam gerado variações no comportamento das distintas traqueias. Foi utilizado o teste t pareado para avaliar significância estatística das variações geradas pelos distintos protocolos experimentais. O teste t pareado foi escolhido por ser um modelo bastante utilizado em pesquisa para avaliar amostras dependentes, como é o caso de um conjunto de traqueias antes e depois de um protocolo.

Nas figuras abaixo será mostrado, para um dos experimentos, os pós-processamentos descritos acima. Inicialmente temos os dados medidos e sincronizados de pressão, fluxo e diâmetro médio, mostrado na figura 29.

Figura 29 - Sincronização entre as medições dos frames com as medições de fluxo e pressão através da medição do instante em que o frame foi capturado.

Desta forma obtemos as curvas sincronizadas de pressão, fluxo e variação de diâmetro médio para os ciclos de insuflação, conforme figura 30.

Figura 30 - Ciclos de pressão (30.a), fluxo (30.b) e Variação de Diâmetro (30.c).

São obtidos os vetores de picos de pressão, fluxo e variação de diâmetro ao se obter o máximo valor em cada ciclo de insuflação. Após a obtenção dos vetores de pico, os vetores de análise são obtidos ao se aplicar uma média móvel aos vetores de picos. Estes vetores são mostrados na figura 31.

Figura 31 - Vetor de picos de pressão (31.a) e vetor de análise de pressão (31.b)

Para um conjunto de vetores de análise semelhantes é obtida a tabela de análise e uma curva média dos vetores de análise com a dispersão das medições. Um exemplo de uma curva média de vetores de análise com a dispersão das medições é mostrada na figura 32. Importante detalhar o significado dos elementos gráficos da curva média com dispersão: círculo central (mediana), barra (região entre primeiro e terceiro quartis), linha (região entre mínimo e máximo). Além disto, um exemplo de uma tabela de análise é mostrada na tabela 1, com as médias (μ) e distância inter-quartil (DIQ) dos vetores de análise individuais e a média (μ_G) e distância interquartil (μ_{DIQ}) global da tabela de análise.

Figura 32 - Curva média de vetores de análise (32.a) e curva média de vetores de análise com dispersão (32.b) – círculo central (mediana), barra (região entre primeiro e terceiro quartis), linha (região entre mínimo e máximo).

Tabela 1 – Exemplo de tabela de análise, com os dados de pressão média (μ) e distância inter-quartil das pressões medidas para cada traqueia (DIQ)

Traqueia	μ (cmH ₂ O)	DIQ (cmH ₂ O)
1	70,6	0,79
2	72,5	0,61
3	72,0	0,30
4	69,7	0,61
5	74,2	0,87
Média	71,8	0,6
Desvio Padrão	1,77	

Em um dos experimentos executados (experimento 2) se usou uma versão preliminar da rotina de pós-processamento. Esta rotina de processamento preliminar isola a curva de pressão e fluxo para cada ciclo respiratório, e as sobrepõe de modo a obter a curva média de pressão e fluxo do ciclo respiratório. A partir destas curvas médias, a rotina calcula a curva média da resistência de via aérea do ciclo respiratório e a resistência média de via aérea. Na figura 33 são mostrados os passos desta análise, desde o sinal original medido até a obtenção da curva média.

Figura 33 - Versão preliminar da rotina de pós processamento o qual analisa uma curva periódica (33.a), isola e sobrepõe estas curvas (33.b) e obtém uma curva média e um valor médio (33.c)

3.3 Protocolo Experimental

O ambiente foi utilizado para diversas análises sobre a mecânica de traqueias. Inicialmente o ambiente foi testado em corpos de teste simulando traqueias; no segundo experimento uma versão rudimentar do ambiente foi utilizado para medições iniciais de mecânica respiratória de traqueias; no terceiro experimento, a versão final do ambiente foi utilizada para medição da mecânica

respiratória de traqueias expostas a diferentes níveis de pressão transmural; no quarto experimento foram realizadas medições de mecânica de traqueias normais e descelularizadas, quando expostas a metacolina (bronco-constritor).

3.3.1 Experimento 1: Corpos de teste

Inicialmente, o ambiente foi testado em cateteres com distintos diâmetros externos e comprimentos, de forma a se avaliar a dependência da resistência de tubos com estes parâmetros (diâmetro interno e comprimento).

O ambiente foi testado usando-se dois grupos de quatro cateteres IV (poliuretano) com distintos diâmetros internos. Cada grupo continha cateteres 14G, 18G, 20G, 22G (calibre conforme diâmetro externo) e diferiam entre si no comprimento dos cateteres, sendo definido o grupo LONGO e o grupo CURTO. As cânulas do condicionador de vias aéreas não foram utilizadas, sendo os cateteres posicionados diretamente na saída do transdutor de pressão gauge. Neste teste, o ventilador foi configurado para 3mL de volume corrente e frequências de ventilação de 80 ciclos por minuto.

3.3.2 Experimento 2: Medições preliminares de mecânica de traqueias

Neste experimento, foram utilizadas traqueias extraídas de 6 ratos machos, não SPF (do inglês *specific pathogen free*), linhagem Wistar com pesos de 462 ± 22 g, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 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. Este protocolo com animais foi aprovado no projeto de pesquisa número CAPPesq 0908/07, aprovado pela CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da FMUSP.

Os animais foram pesados e anestesiados por via intraperitoneal com xilazina 2% (0,5 mL/kg) e ketamina 10% (0,9mL/kg). Após o efeito da anestesia foram exsanguinados pela secção dos grandes vasos abdominais, através de incisão longitudinal no abdômen. Em seguida foi feita a traqueostomia por incisão no pescoço do animal para exteriorização da traqueia, nela foram feitos dois cortes em seus pontos extremos para sua remoção. Após a extração, as traqueias foram fixadas nas cânulas, que apresentavam distintos calibres (diâmetro externo): cânula proximal 2,0mm; distal 1,65mm.

No condicionador de vias aéreas, o conjunto traqueia-cânulas é banhado em solução salina a temperatura ambiente (sem aquecimento) para prevenir o ressecamento do tecido. A montagem experimental pode ser observada na figura 34.

a)

b)

Figura 34 - Montagem experimental, (34.a) Detalhe da fixação do conjunto traqueia-cânulas no condicionador (1 – traqueia, 2 – cânula proximal, 3 – cânula distal) e (34.b) e visão geral do ambiente com estereomicroscópio, transdutores e ventilador (1 – ventilador, 2 – conjunto pneumotácografo-transdutor diferencial, 3 – transdutor gauge, 4 – condicionador vias aéreas, 5 – estereomicroscópio).

Na prova de conceito, o ventilador para pequenos animais foi configurado para um ciclo respiratório condizente com o peso dos animais, com volume corrente de 5mL e frequência de ventilação de 90 ciclos por minuto. O pós-processamento utilizado neste experimento é uma versão preliminar, o qual trabalha com a média do ciclo de insuflação, conforme discutido acima.

3.3.3 Experimento 3: Mecânica respiratória de traqueias expostas a distintas pressões transmuralis

Neste experimento, foram utilizadas traqueias extraídas de 10 ratos machos, não SPF (do inglês specific pathogen free), linhagem Wistar com pesos de 302 ± 12 g, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 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.

Os animais foram pesados e anestesiados por via intraperitoneal com xilazina 2% (0,5 mL/kg) e ketamina 10% (0,9mL/kg). Após o efeito da anestesia foram exsanguinados pela secção dos grandes vasos abdominais, através de incisão longitudinal no abdômen. Em seguida foi feita a traqueostomia por incisão no pescoço do animal para exteriorização da traqueia, nela foram feitos dois cortes em seus pontos extremos para sua remoção. Após a extração, as traqueias foram fixadas nas cânulas com o mesmo calibre: 2,0mm.

Uma condição importante no comportamento mecânico de vias aéreas isoladas é a tensão mecânica a qual o tecido está submetido. Desta forma foi necessário criar um procedimento para garantir que todas as traqueias estão sujeitas à mesma tensão mecânica, o qual é explicado abaixo.

As cânulas metálicas do condicionador de vias áreas são inseridas nas duas pontas da traqueia. Uma das cânulas apresenta um chanfro e é denominada contrapeso e a outra é denominada de suporte. Antes do experimento esta cânula contrapeso é pesada, obtendo-se o valor m_c (em kg). Uma vez fixada, a traqueia é suspensa verticalmente por um gancho preso a cânula suporte. Desta forma, a

cânula contrapeso, por gravidade exerce uma tensão de ($m_c \cdot 9,8$ newtons) na traqueia que se encontra suspensa. Nesta configuração, o comprimento da traqueia é medido (L_e). Quando o conjunto traqueia-cânulas é fixado no condicionador, a traqueia é esticada até apresentar o comprimento L_e , garantindo que todas as traqueias estão tensionadas em $9,8m_c$ newtons. No condicionador de vias aéreas, o conjunto traqueia-cânulas é banhado em solução salina para prevenir o ressecamento do tecido. A montagem para calibração da tensão nas traqueias pode ser vista na figura 35.

Figura 35 - Esquema da montagem para calibração de tensão nas traqueias

Neste experimento foi avaliada a mecânica respiratória da traqueia em diversas condições de pressão transmural. Para avaliar distintas condições de pressão transmural, foram inseridos cateteres de diferentes diâmetros na cânula (23G, 21G, 18G) com saída exposta ao ambiente assim restringindo o fluxo e aumentando a pressão dentro da traqueia. O ventilador para pequenos animais foi configurado para um ciclo respiratório próximo ao de ratos Wistar (3mL, 80 ciclos por minuto), distinto ao utilizado no experimento 2 devido a diferença nos pesos dos ratos de cada experimento (média de 462g no experimento 2 e 302g no experimento 3). Para cada traqueia foram feitas as seguintes medições: (i) sem cateter, (ii) cateter 23G, (iii) cateter 21G, (iv) cateter 18G. A ordem de execução das medições com cateter foi feita de forma aleatória para inibir viés de histórico de ventilação.

3.3.4 Experimento 4: Mecânica respiratória em presença de bronco-constritores de traqueias normais / descelularizadas.

O experimento foi realizado em dois grupos: CONTROLE e DESCELULARIZADO.

No grupo CONTROLE traqueias de 5 ratos Sprague-Dawley foram extraídas e condicionadas no ambiente da forma descrita no capítulo 3.3.3 (inclusive com a etapa de calibração de tensão de estiramento da traqueia).

No grupo DESCELULARIZADO, 5 ratos Wistar (300 a 350g) provenientes do Biotério Central da UNESP-BOTUCATU foram anestesiados com ketamina (50 a 75mg/kg IP) e xilazina (5 a 10mg/kg IP), colocados em posição supina sem intubação endotraqueal. Após tricotomia, antissepsia e isolamento por campos estéreis da região anterior do pescoço, foi realizada uma cervico-esternotomia mediana, com exposição da traqueia e anticoagulação do animal por punção ventricular direita (heparina 1500UI). O segmento traqueal foi imediatamente colocado em recipiente contendo solução para preservação (HEPES) e antibiótico-antimicótico. As traqueias foram descelularizadas por remoção das células e dos antígenos HLA das matrizes doadoras. O método de descelularização utilizado foi validado anteriormente (EVARISTO et al., 2011), consistindo de: (i) congelamento / descongelamento; (ii) agitação 180 rpm no C24 Incubator shaker (New Brunswick Scientific, EUA); (iii) irradiação do LED com comprimento de onda de 475nm +/- 20 nm na dose de 90 J/cm² totalizando 30 minutos de exposição e (iv) banho com detergente deoxicolato de sódio 4% durante 48 horas. Feito isso, as traqueias foram conservadas sob refrigeração (4-7°C) imersas em álcool 70% até sua utilização nos experimentos. Todos esses procedimentos foram realizados na UNESP-Botucatu. As traqueias conservadas foram enviadas para a FMUSP e utilizadas.

Logo antes do início dos experimentos, as traqueias foram colocadas em descanso num banho de solução Krebs-Henseleit por um período de aproximadamente 40 minutos à temperatura ao redor de 35°C. A traqueia foi depois condicionada no ambiente da forma descrita no capítulo 3.3.3 (inclusive com a etapa de calibração de tensão de estiramento da traqueia).

Após o condicionamento da traqueia (traqueia em um banho de solução Krebs-Henseleit com temperatura próxima a 35%), ao final da cânula distal foi colocada uma restrição com resistência ao fluxo de ar conhecida (cateter 21G) de

modo a avaliar a mecânica da traqueia, ou seja, como o diâmetro da mesma se altera com o incremento da pressão interna da traqueia. O aparelho Harvard foi ajustado para realizar 80 batimentos por minuto, com um volume de 3 mL. O aparelho Harvard foi ligado e a primeira gravação realizada. Esta consistiu em obter os dados de mecânica durante 3 minutos sem qualquer tratamento no interior da traqueia (protocolo experimental A). Em seguida o ventilador foi desligado e inseriu-se, por meio de um pequeno tubo, solução Krebs-Henseleit suficiente para preencher o interior da traqueia. Esperou-se cerca de 60 segundos, e o líquido foi retirado. Após a extração do líquido, o ventilador foi ligado e as medições de mecânica foram executadas durante 3 minutos (protocolo experimental K). Então o ventilador foi novamente desligado e inseriu-se solução Krebs-Henseleit com concentração 0,1M de metacolina na traqueia, a qual também permaneceu na traqueia por 60 segundos, sendo retirada ao final do período. Após a extração do líquido, o ventilador foi novamente ligado e as medições de mecânica foram executadas durante 3 minutos (protocolo experimental KMCh). No caso das traqueias do grupo DECELULARIZADO, as medições de mecânica nos protocolos A, K e KMCh foram realizados por aproximadamente 1 minuto.

4. Resultados

Neste capítulo serão apresentados os resultados das análises de mecânica respiratória de vias aéreas isoladas. Inicialmente, o ambiente é testado para se avaliar a sua capacidade de realizar medições de corpos de prova (cateteres) com distintos diâmetros internos e externos. Neste caso, os diâmetros são nominais, o que permite comprovar a sensibilidade do ambiente nas medições de diâmetro interno (indiretamente) e externo (diretamente). Após o teste do ambiente é feita uma prova de conceito, com medições de mecânica respiratória de um conjunto de traqueias de ratos. No terceiro experimento se aprofunda o estudo na mecânica respiratória de traqueias de ratos, avaliando o seu comportamento em condições de distintas pressões transmuralis. No quarto experimento se avaliam como as traqueias descelularizadas de ratos se comportam em relação as traqueias normais de ratos quando há presença de drogas broncoconstritoras.

4.1 Experimento 1: Corpos de teste

Inicialmente, os cateteres dos grupos CURTO e LONGO foram caracterizados, conforme pode ser observado na tabela 2.

Tabela 2 – Caracterização dos corpos de teste

Grupo	Cateter	Comprimento (mm)	Diâmetro (mm)
Curto	Amarelo – 22G	15,35	0,8
	Azul – 20G	15,35	0,9
	Verde – 18G	15,35	1,3
	Laranja – 14G	15,35	2,2
Longo	Amarelo – 22G	27,35	0,8
	Azul – 20G	27,35	0,9
	Verde – 18G	27,35	1,3
	Laranja – 14G	27,35	2,2

Após a aplicação do pós-processamento obtemos os dados da tabela 3 para os corpos de prova. Os valores apresentados são as médias (μ) e as distâncias interquartis (DIQ) dos vetores de análise das grandezas de fluxo, pressão e diâmetro. A resistência é obtida pela divisão entre a média da pressão e fluxo.

Tabela 3 – Tabela de análise dos corpos de prova

Grupo	Cateter	Fluxo μ (mL/s)	Fluxo DIQ (mL/s)	Pressão μ (cmH ₂ O)	Pressão DIQ (cmH ₂ O)	Diâmetro μ (pixels)	Diâmetro DIQ (pixels)	Resistência (cmH ₂ O/mL/s)
Curto	Amarelo	10,7	0,6	45,3	0,6	33,0	0	4,24
	Azul	11,0	0,9	25,0	0,2	38,4	2	2,27
	Verde	12,2	0,8	5,7	0,1	54,9	1	0,47
	Laranja	12,4	1,0	0,6	0,1	99,1	1	0,05
Longo	Amarelo	9,1	1,1	64,7	0,6	33,1	0	7,12
	Azul	10,9	0,7	31,0	0,4	39,9	0	2,84
	Verde	11,8	0,8	7,8	0,4	55,5	1	0,66
	Laranja	13,6	3,1	1,0	0,3	98,9	2	0,07

A figura 36 mostra a relação entre o diâmetro medido via processamento de imagens (tabela 3) e o diâmetro da caracterização dos cateteres (tabela 2), obtendo-se assim uma reta de calibração pixels-distância (mm). A reta de calibração apresenta um valor de coeficiente de determinação próximo à 1, mostrando uma relação linear entre o diâmetro em pixels e o diâmetro do objeto.

Figura 36 - Calibração diâmetro dos cateteres em mm (medição paquímetro) e pixels (imagens capturadas), com detalhe da reta de calibração e R^2 .

A figura 37 mostra a relação entre resistência e diâmetro para os dois grupos. A regressão polinomial dos valores de resistência e diâmetro (prevista pela equação de Poiseuille, equação 4), mostra uma relação de potência de $x^{-4,2}$, para os dados do grupo CURTO e LONGO. A relação entre a regressão polinomial da resistência do grupo CURTO e LONGO é constante (independe do diâmetro), sendo igual a 45% (coeficiente de 1,98 vs. 1,37 na figura 37).

Figura 37 - Regressão polinomial entre resistência e diâmetro para os cateteres do grupo LONGO e CURTO.

4.2 Experimento 2: Medições preliminares de mecânica de traqueias de ratos

O resultado da caracterização das traqueias de ratos pode ser vista na tabela 4. O diâmetro é aproximado, tendo-se em vista o propósito de tocar as traqueias o mínimo possível.

Tabela 4 - Caracterização das traqueias usadas no experimento 2

Traqueia	Comprimento (mm)	Diâmetro (mm)
1	25	3
2	15	3
3	14	3
4	13	3
5	16	3
6	19	3

Usando-se a versão preliminar do pós-processamento se obtém os seguintes gráficos de dispersão das curvas médias das 5 traqueias, os quais podem ser vistos na figura 38..

Figura 38 - Gráfico de dispersão dos valores de pressão (cmH₂O), fluxo (mL/s), resistência (cmH₂O/mL.s⁻¹) e volume insuflado pelo SAV (mL) do ciclo inspiratório para experimentos com traqueias. Círculo central (mediana), barra (região entre primeiro e terceiro quartis), linha (região entre mínimo e máximo).

Os dados de resistência total e das cânulas do ambiente de medição estão na tabela 5 (contém μ - média e DIQ – distância entre quartis 1 e 3). Estes dados foram obtidos como o média da curva de resistência, desconsiderando os valores limite (5% menores e 5% maiores). Na tabela se mostram as resistências (i) total medida, (ii) do ambiente de medição (Instrum.), (iii) da cânula distal (C. Distal) e (iv) da cânula proximal (C. Proximal).

Tabela 5 - Dados de R_{aw} ($\text{cmH}_2\text{O}/\text{mL.s}^{-1}$) do ciclo inspiratório para distintas traqueias.

Traqueia	Total R_{aw} (μ)	Total R_{aw} (DIQ)	Instrum. R_{aw} (μ)	Instrum. R_{aw} (DIQ)	C. Distal R_{aw} (μ)	C. Distal R_{aw} (DIQ)	C. Proximal R_{aw} (μ)	C. Proximal R_{aw} (DIQ)
1	0,68	0,20	0,35	0,15	0,27	0,07	0,08	0,08
2	0,74	0,15	0,35	0,15	0,27	0,07	0,08	0,08
3	0,60	0,11	0,35	0,15	0,27	0,07	0,08	0,08
4	0,65	0,10	0,35	0,15	0,27	0,07	0,08	0,08
5	0,84	0,14	0,35	0,15	0,27	0,07	0,08	0,08
6	0,59	0,12	0,35	0,15	0,27	0,07	0,08	0,08
Média	0,68	0,14	0,35	0,15	0,27	0,07	0,08	0,08

Avaliando a variação percentual do diâmetro médio da traqueia durante o ciclo respiratório, é possível quantificar a pulsação da mesma. A figura 39 mostra as imagens obtidas no momento de máximo e mínimo diâmetro médio, a olho nu não se observam diferenças significativas.

Figura 39 - Imagem de uma traqueia no momento de diâmetro externo mínimo (39.a) e máximo (39.b)

A variação do diâmetro, pouco perceptível nas imagens, pode ser observada com maior riqueza de detalhes com a análise temporal da variação do diâmetro médio da traqueia, obtido pelo processamento das imagens obtidas da mesma. Esta variação temporal é mostrada na figura 40 abaixo. As variações de diâmetro médio (variação percentual entre o máximo e o mínimo diâmetro da traqueia no ciclo insuflatório) são mostradas na tabela 6.

Figura 40 - Análise temporal da variação do diâmetro médio da traqueia

Tabela 6 - Variação de diâmetro médio para as traqueias avaliadas

Traqueia	Variação Diâmetro μ (%)	Variação Diâmetro DIQ (%)
1	1,8%	0,2%
2	9,9%	1,4%
3	5,0%	0,5%
4	1,6%	0,1%
5	3,3%	0,2%
6	2,3%	0,1%

4.3 Experimento 3: Mecânica respiratória de traqueias expostas a distintas pressões transmuralis

O resultado da caracterização dos animais e traqueias pode ser visto na tabela 7.

Tabela 7 - Caracterização das traqueias usadas no experimento 3

Animal	Peso Animal (g)	Comprimento Traqueia (mm)
1*	N/A	N/A
2	310	16,6
3	310	18
4	302	14,5
5	280	15,3
6	316	16,6
7	298	16,3
8	300	15,2
9	284	14,7
10	312	13,7

* Resultados animal 1 descartados por problemas no experimento

As diferentes pressões transmuralis foram geradas por distintas restrições ao fluxo na cânula distal (cateteres 18G, 21G e 23G). Conforme a restrição aumenta, também aumenta a pressão dentro da traqueia pelo acúmulo de volume. Na tabela 8 as restrições são caracterizadas (valores de resistência obtidos após pós-processamento de medições de pressão e fluxo dos cateteres).

Tabela 8 - Caracterização das restrições utilizadas no experimento

Cateter	Comprimento (mm)	Largura (mm)	Resistência Ambiente + Cateter (cm H ₂ O/mL.s ⁻¹)
18G	46,1	1,3	0,80 ± 0,02
21G	35,7	0,8	4,30 ± 0,17
23G	33,1	0,65	12,00 ± 0,54

Após a aplicação do pós-processamento obtemos os dados das tabelas 9, 10, 11 para as traqueias com as distintas restrições. Os valores apresentados são as médias (μ) e as distâncias interquartis (DIQ) dos vetores de análise das grandezas de fluxo, pressão e diâmetro.

Tabela 9 - Tabela de análise das traqueias com restrição de cateter 18G

Traqueia	Fluxo μ (mL/s)	Fluxo DIQ (mL/s)	Pressão μ (cmH ₂ O)	Pressão DIQ (cmH ₂ O)	Variação Diâmetro μ (%)	Variação Diâmetro DIQ (%)	Resistência (cmH ₂ O/mL/s)
2	17,5	0,6	14,2	0,3	1,1%	0,1%	0,8
3	17,3	0,9	16,2	0,4	0,6%	0,1%	0,9
4	17,2	0,9	16,1	0,2	0,7%	0,2%	0,9
5	17,9	0,8	17,6	0,1	0,4%	0,1%	1,0
6	18,0	1,1	14,3	0,2	0,8%	0,1%	0,8
7	18,1	1,2	15,3	0,3	0,9%	0,1%	0,8
8	18,5	1,0	15,5	0,3	1,3%	0,1%	0,8
9	19,6	1,0	15,5	0,3	0,6%	0,1%	0,8
10	18,1	1,0	23,3	0,3	0,5%	0,1%	1,3
Média	18,0	0,9	16,4	0,2	0,8%	0,1%	0,9
DP	0,68		2,61		0,3%		0,2

Tabela 10 - Tabela de análise das traqueias com restrição de cateter 21G

Traqueia	Fluxo μ (mL/s)	Fluxo DIQ (mL/s)	Pressão μ (cmH ₂ O)	Pressão DIQ (cmH ₂ O)	Variação Diâmetro μ (%)	Variação Diâmetro DIQ (%)	Resistência (cmH ₂ O/mL/s)
2	15,5	1,6	59,2	1,6	3,6%	0,3%	3,8
3	15,1	1,5	65,9	0,6	1,3%	0,1%	4,4
4	14,3	1,2	61,0	1,5	1,5%	0,1%	4,3
5	13,7	0,7	58,6	0,6	1,2%	0,2%	4,3
6	15,0	1,3	65,3	0,8	2,2%	0,1%	4,4
7	14,5	0,6	66,2	0,4	2,4%	0,1%	4,6
8	15,5	1,1	66,1	0,4	3,0%	0,1%	4,3
9	15,7	1,1	62,9	0,4	2,1%	0,1%	4,0
10	16,1	1,1	62,0	0,4	1,2%	0,1%	3,9
Média	15,0	1,1	63,0	0,7	2,1%	0,1%	4,2
DP	0,72		2,84		0,8%		0,3

Tabela 11 - Tabela de análise das traqueias com restrição de cateter 23G

Traqueia	Fluxo μ (mL/s)	Fluxo DIQ (mL/s)	Pressão μ (cmH ₂ O)	Pressão DIQ (cmH ₂ O)	Variação Diâmetro μ (%)	Variação Diâmetro DIQ (%)	Resistência (cmH ₂ O/mL/s)
2	10,0	1,1	129,2	1,1	4,4%	0,3%	12,9
3	16,5	6,0	136,3	5,6	2,1%	0,2%	8,3
4	10,5	1,7	115,3	2,8	2,4%	0,2%	11,0
5	11,0	2,0	125,3	5,4	1,2%	0,1%	11,4
6	12,5	3,2	120,4	3,5	3,0%	0,1%	9,6
7	10,1	1,0	133,5	2,2	3,3%	0,2%	13,2
8	11,9	2,7	128,6	1,1	4,5%	0,4%	10,8
9	11,4	2,7	137,7	1,1	3,1%	0,4%	12,1
10	10,4	2,7	111,7	1,1	1,5%	0,4%	10,7
Média	11,6	2,6	126,4	2,7	2,9%	0,2%	10,9
DP	1,91		8,6		1,1%		1,5

A seguir, comparamos a resistência das traqueias com as diversas restrições e a resistência do ambiente de medição para as diversas restrições.

Tabela 12 - Resistência ambiente (tabela 8) vs. resistência das traqueias expostas a distintas restrições (tabelas 9, 10 e 11)

Cateter	Resistência Ambiente (cmH ₂ O/mL.s ⁻¹)	Resistência Traqueia (cmH ₂ O/mL.s ⁻¹)
18G	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,2
21G	4,3 ± 0,2	4,2 ± 0,3
23G	12,0 ± 0,5	10,9 ± 1,5

Nas figuras a seguir são apresentados os vetores de análise de pressão (figura 41), fluxo (figura 42) e variação de diâmetro (figura 43) juntos com seus respectivos gráficos de dispersão para as 3 restrições (figura 44, 45 e 46). Também são apresentados os vetores de análise da variação de diâmetro para os trechos distal (figura 47), medial (figura 48) e proximal (figura 49) juntos com seus respectivos gráficos de dispersão para as 3 restrições (figuras 50, 51 e 52).

Figura 41 - Vetor de análise de pressão para as 3 restrições (18G, 21G, 23G)

Figura 42 - Vetor de análise de fluxo para as 3 restrições (18G, 21G, 23G)

Figura 43 - Vetor de análise de variação de diâmetro para as 3 restrições (18G, 21G, 23G).

Figura 44 – Dispersão do vetor de análise de pressão para as 3 restrições

Figura 45 – Dispersão do vetor de análise de fluxo para as 3 restrições

Figura 46 – Dpersão do vetor de análise de variação de diâmetro para as 3 restrições

Figura 47 - Vetor de análise de variação de diâmetro (trecho distal) para as 3 restrições.

Figura 48 - Vetor de análise de variação de diâmetro (trecho medial) para as 3 restrições.

Figura 49 - Vetor de análise de variação de diâmetro (trecho proximal) para as 3 restrições.

Figura 50 – Dispersão do vetor de análise de variação de diâmetro (trecho distal) para as 3 restrições.

Figura 51 - Dispersão do vetor de análise de variação de diâmetro (trecho medial) para as 3 restrições.

Figura 52 - Dispersão do vetor de análise de variação de diâmetro (trecho proximal) para as 3 restrições.

De forma a avaliar se a variação de diâmetro (deformação da traqueia) é uniforme em todos os trechos, nas tabelas 13 (18G), 14 (21G) e 15 (23G) são apresentadas as variações médias de diâmetro nos trechos (distal, medial, proximal) para as 3 condições de restrição (18G, 21G, 23G).

Tabela 13 - Tabela de análise das variações de diâmetro dos trechos longitudinais da traqueia com restrição de cateter 18G

Traqueia	Variação Diâmetro μ Distal (%)	Variação Diâmetro μ Medial (%)	Variação Diâmetro μ Proximal (%)
2	2,4%	0,8%	0,7%
3	0,8%	0,8%	0,6%
4	1,4%	1,0%	0,3%
5	0,5%	0,6%	0,5%
6	1,6%	0,6%	0,5%
7	1,6%	0,7%	0,5%
8	2,6%	1,5%	0,8%
9	1,1%	0,5%	0,5%
10	0,9%	0,5%	0,3%
Média	1,5%	0,8%	0,5%

Tabela 14 - Tabela de análise das variações de diâmetro dos trechos longitudinais da traqueia com restrição de cateter 21G

Traqueia	Variação Diâmetro μ Distal (%)	Variação Diâmetro μ Medial (%)	Variação Diâmetro μ Proximal (%)
2	6,9%	2,3%	3,1%
3	0,7%	1,5%	3,2%
4	3,0%	1,7%	0,7%
5	1,6%	1,7%	0,8%
6	4,8%	1,8%	0,8%
7	4,5%	1,6%	1,5%
8	5,8%	3,3%	1,6%
9	3,8%	1,8%	1,6%
10	2,4%	1,1%	0,7%
Média	3,7%	1,9%	1,6%

Tabela 15 - Tabela de análise das variações de diâmetro dos trechos longitudinais da traqueia com restrição de cateter 23G

Traqueia	Variação Diâmetro μ Distal (%)	Variação Diâmetro μ Medial (%)	Variação Diâmetro μ Proximal (%)
2	7,5%	2,6%	4,7%
3	1,4%	2,5%	4,5%
4	4,2%	2,9%	1,3%
5	1,7%	1,8%	0,6%
6	6,6%	2,6%	1,0%
7	6,6%	2,4%	2,0%
8	9,0%	4,3%	2,6%
9	5,9%	2,6%	2,3%
10	3,4%	1,2%	0,6%
Média	5,2%	2,5%	2,2%

A seguir é mostrada a evolução da variação do diâmetro com o incremento da restrição dos cateteres, mostrando que a variação do diâmetro tem evoluções parecidas com o incremento da restrição tanto na traqueia como um todo quanto nos trechos vistos de forma individual.

Tabela 16 - Variação de diâmetro para as três restrições para traqueia completa, trecho distal, trecho medial e trecho proximal. Também evolução percentual da variação de diâmetro entre as restrições (21G vs. 18G e 23G vs. 21G).

Trecho	Var Diam μ 18G	Var Diam μ 21G	Evolução 21G/18G	Var Diam μ 23G	Evolução 23G/21G
Completa	0,8%	2,1%	163%	2,9%	38%
Distal	1,5%	3,7%	147%	5,2%	41%
Medial	0,8%	1,9%	138%	2,5%	32%
Proximal	0,5%	1,6%	220%	2,2%	38%
Média			160%		37%

De forma a isolar o efeito da evolução da variação de diâmetro, foi calculado a evolução na variação de diâmetro para cada traqueia (média traqueia e valor nos trechos). Na figura 53 a seguir é mostrado o histograma da evolução percentual entre as restrições 21G/18G e 23G/21G para as nove traqueias avaliadas de forma completa e por trechos (distal, medial, proximal).

Figura 53- Histograma da evolução percentual da variação de diâmetro entre as restrições 21G/18G (53.a) e 23G/21G (53.b)

4.4 Experimento 4: Mecânica respiratória em presença de bronco-constritores de traqueias normais / descelularizadas

O resultado da caracterização das traqueias do grupo CONTROLE e DESCELULARIZADO podem ser vistas nas tabelas 17, 18. Durante os experimentos

com o grupo CONTROLE, a resistência medida do ambiente de medição é $5,5 \text{ cmH}_2\text{O/mL.s}^{-1}$. Durante os experimentos com o grupo DESCELULARIZADO, a resistência medida do ambiente de medição é $4,4 \text{ cmH}_2\text{O/mL.s}^{-1}$. Nas tabelas 17, 18 são mostrados diversos comprimentos das traqueias: (i) comprimento medido antes da calibração da tensão (L relaxado), (ii) comprimento medido com a traqueia exposta a tensão mecânica (L tensionado) e (iii) comprimento da traqueia após fixação no condicionador de vias aéreas (L usado). Em um dos casos, devido a limitações do condicionador, o comprimento usado foi diferente ao calibrado (traqueia 5 – grupo DESCELULARIZADO, com um comprimento 20% acima do calibrado)

Tabela 17 - Caracterização das traqueias do grupo CONTROLE utilizadas no experimento 4. (L se refere a comprimento da traqueia)

Traqueia	Massa Traqueia (mg)	L Relaxado (mm)	L Tensionado (mm)	L usado (mm)	Sobre Tensão (%)
1	116	16,2	27,2	27,2	0
2	89	16,5	25,4	25,4	0
3	70	13,1	19,0	19,0	0
4	111	13,7	21,2	21,2	0
5	83	14,8	23,4	23,4	0
Média	94	15,0	23,0	23,0	0

Tabela 18 - Caracterização das traqueias do grupo DESCELULARIZADO utilizadas no experimento 4. (L se refere a comprimento da traqueia)

Traqueia	Massa Traqueia (mg)	L Relaxado (mm)	L Tensionado (mm)	L usado (mm)	Sobre Tensão (%)
1	66	11,1	14,0	14,0	0
2	83	12,2	16,2	16,2	0
3	75	10,1	12,8	12,8	0
4	57	14,3	16,4	16,4	0
5	54	9,7	11,3	13,0	20%
Média	67	11,0	14,0	14,0	4%

A restrição utilizada neste experimento é o cateter 21G, já caracterizado durante o experimento 3. Após a aplicação do pós-processamento obtemos os dados das tabelas 19 a 24 para as os dois grupos expostos aos 3 protocolos experimentais (A – sem estímulo, K – estímulo com solução fisiológica e KMCh – estímulo com metacolina).

As tabelas 19 a 21 são as tabelas de análise com médias (μ) e distâncias interquartis (DIQ) dos vetores de análise das grandezas de fluxo, pressão e diâmetro para o grupo CONTROLE nos protocolos experimentais A, K e KMCh.

Tabela 19 - Tabela de análise do grupo CONTROLE no protocolo experimental A

Traqueia	Fluxo μ (mL/s)	Fluxo DIQ (mL/s)	Pressão μ (cmH ₂ O)	Pressão DIQ (cmH ₂ O)	Variação Diâmetro μ (%)	Variação Diâmetro DIQ (%)	Resistência (cmH ₂ O/ mL/s)
1	12,9	0,24	70,6	0,79	1,7%	0,3%	5,5
2	13,4	0,47	72,5	0,61	1,5%	0,1%	5,4
3	13,0	0,30	72,0	0,30	1,9%	0,6%	5,5
4	13,2	0,29	69,7	0,61	3,3%	0,2%	5,3
5	13,0	0,37	74,2	0,87	0,6%	0,4%	5,7
Média	13,1	0,3	71,8	0,6	1,8%	0,3%	5,5
DP	0,17		1,77		1,0%		

Tabela 20 - Tabela de análise do grupo CONTROLE no protocolo experimental K

Traqueia	Fluxo μ (mL/s)	Fluxo DIQ (mL/s)	Pressão μ (cmH ₂ O)	Pressão DIQ (cmH ₂ O)	Variação Diâmetro μ (%)	Variação Diâmetro DIQ (%)	Resistência (cmH ₂ O/ mL/s)
1	13,2	0,34	72,6	0,85	3,0%	0,3%	5,5
2	12,9	0,24	73,1	0,77	2,8%	0,4%	5,7
3	12,8	0,27	74,5	0,27	3,0%	0,3%	5,8
4	13,1	0,27	69,7	0,61	2,9%	0,2%	5,3
5	12,8	0,29	72,8	1,14	1,1%	0,7%	5,7
Média	13,0	0,3	72,5	0,7	2,6%	0,4%	5,6
DP	0,14		1,76		0,8%		

Tabela 21 - Tabela de análise do grupo CONTROLE no protocolo experimental KMCh

Traqueia	Fluxo μ (mL/s)	Fluxo DIQ (mL/s)	Pressão μ (cmH ₂ O)	Pressão DIQ (cmH ₂ O)	Variação Diâmetro μ (%)	Variação Diâmetro DIQ (%)	Resistência (cmH ₂ O/ mL/s)
1	13,1	0,34	73,4	0,44	3,7%	0,9%	5,6
2	13,2	0,37	72,6	0,70	2,9%	0,1%	5,5
3	12,9	0,34	75,5	0,34	3,2%	0,1%	5,9
4	13,0	0,33	71,5	0,96	2,6%	0,4%	5,5
5	12,7	0,30	74,0	1,49	1,8%	0,2%	5,8
Média	13,0	0,3	73,4	0,8	2,8%	0,3%	5,6
DP	0,18		1,51		0,7%		

As tabelas 22 a 24 constituem as tabelas de análise com médias (μ) e distâncias interquartis (DIQ) dos vetores de análise das grandezas de fluxo, pressão e diâmetro para o grupo DESCELULARIZADO nos protocolos experimentais A, K e KMCh.

Tabela 22 - Tabela de análise do grupo DESCELULARIZADO no protocolo experimental A

Traqueia	Fluxo μ (mL/s)	Fluxo DIQ (mL/s)	Pressão μ (cmH ₂ O)	Pressão DIQ (cmH ₂ O)	Variação Diâmetro μ (%)	Variação Diâmetro DIQ (%)	Resistência (cmH ₂ O/ mL/s)
1	12,3	1,15	58,2	3,38	0,9%	0,2%	4,7
2	15,0	4,92	64,2	4,77	3,1%	0,1%	4,3
3	12,9	2,57	63,5	3,66	4,8%	0,7%	4,9
4	12,9	0,98	66,6	1,83	0,9%	0,9%	5,2
5	12,2	0,87	60,3	3,03	2,0%	0,1%	4,9
Média	13,1	2,10	62,6	3,3	2,4%	0,4%	4,8
DP	1,1		3,3		1,6%		

Tabela 23 - Tabela de análise do grupo DESCELULARIZADO no protocolo experimental K

Traqueia	Fluxo μ (mL/s)	Fluxo DIQ (mL/s)	Pressão μ (cmH ₂ O)	Pressão DIQ (cmH ₂ O)	Variação Diâmetro μ (%)	Variação Diâmetro DIQ (%)	Resistência (cmH ₂ O/ mL/s)
1	13,2	1,40	61,7	0,87	1,0%	0,2%	4,7
2	13,1	1,67	68,5	1,39	3,2%	0,1%	5,2
3	13,0	2,46	65,8	6,51	4,0%	2,8%	5,1
4	13,4	3,14	63,5	2,18	0,8%	0,5%	4,7
5	12,1	0,47	60,8	1,13	2,0%	0,1%	5,0
Média	13,0	1,80	64,1	2,4	2,2%	0,7%	4,9
DP	0,5		3,1		1,4%		

Tabela 24 - Tabela de análise do grupo DESCELULARIZADO no protocolo experimental KMCh

Traqueia	Fluxo μ (mL/s)	Fluxo DIQ (mL/s)	Pressão μ (cmH ₂ O)	Pressão DIQ (cmH ₂ O)	Variação Diâmetro μ (%)	Variação Diâmetro DIQ (%)	Resistência (cmH ₂ O/ mL/s)
1	13,5	2,05	60,4	1,39	0,9%	0,1%	4,5
2	13,7	3,35	63,7	2,27	2,8%	0,1%	4,6
3	11,9	0,80	60,7	3,55	4,6%	2,7%	5,1
4	11,7	0,80	54,6	1,74	0,6%	0,2%	4,7
5	12,3	0,54	64,0	5,05	1,9%	0,1%	5,2
Média	12,6	1,50	60,7	2,80	2,1%	0,7%	4,8
DP	0,9		3,8		1,6%		

Nas figuras a seguir são apresentados os vetores de análise de pressão (figura 54), fluxo (figura 55) e variação de diâmetro (figura 56) juntos com seus respectivos gráficos de dispersão para os 3 protocolos (A, K, KMCh) aplicados ao grupo CONTROLE (figuras 57,58 e 59). Também são apresentados os vetores de análise da variação de diâmetro para os trechos distal (figura 60), medial (figura 61) e proximal (figura 62) juntos com seus respectivos gráficos de dispersão para os 3 protocolos (A, K, KMCh) aplicados ao grupo CONTROLE (figuras 63, 64 e 65).

Figura 54 - Vetor de análise de pressão para as 3 protocolos do grupo CONTROLE (A, K, KMCh).

Figura 55 - Vetor de análise de fluxo para as 3 protocolos do grupo CONTROLE (A, K, KMCh).

Figura 56 - Vetor de análise de variação do diâmetro para as 3 protocolos do grupo CONTROLE (A, K, KMCh).

Figura 57 – Dispersão do vetor de análise de pressão para as 3 protocolos do grupo CONTROLE (A, K, KMCh).

Figura 58 – Dispersão do vetor de análise de fluxo para as 3 protocolos do grupo CONTROLE (A, K, KMCh).

Figura 59 - Dispersão do vetor de análise de variação do diâmetro para as 3 protocolos do grupo CONTROLE (A, K, KMCh).

Figura 60 - Vetor de análise de variação de diâmetro (trecho distal) para os 3 protocolos do grupo CONTROLE (A, K, KMCh).

Figura 61 - Vetor de análise de variação de diâmetro (trecho medial) para os 3 protocolos do grupo CONTROLE (A, K, KMCh).

Figura 62 - Vetor de análise de variação de diâmetro (trecho proximal) para os 3 protocolos do grupo CONTROLE (A, K, KMCh) .

Figura 63 – Dispersão do vetor de análise de variação de diâmetro (trecho distal) para os 3 protocolos do grupo CONTROLE (A, K, KMCh).

Figura 64 - Dispersão do vetor de análise de variação de diâmetro (trecho medial) para os 3 protocolos do grupo CONTROLE (A, K, KMCh).

Figura 65 - Dispersão do vetor de análise de variação de diâmetro (trecho proximal) para os 3 protocolos do grupo CONTROLE (A, K, KMCh) .

Nas figuras a seguir são apresentados os vetores de análise de pressão (figura 66), fluxo (figura 67) e variação de diâmetro (figura 68) juntos com seus respectivos gráficos de dispersão para os 3 protocolos (A, K, KMCh) aplicados ao grupo DESCELULARIZADO (figuras 69, 70 e 71). Também são apresentados os vetores de análise da variação de diâmetro para os trechos distal (figura 72), medial (figura 73) e proximal (figura 74) juntos com seus respectivos gráficos de dispersão para os 3 protocolos (A, K, KMCh) aplicados ao grupo DESCELULARIZADO (figuras 75, 76 e 77).

Figura 66 - Vetor de análise de pressão para as 3 protocolos do grupo DESCULARIZADO (A, K, KMCh).

Figura 67 - Vetor de análise de fluxo para as 3 protocolos do grupo DESCULARIZADO (A, K, KMCh).

Figura 68 - Vetor de análise de variação do diâmetro para as 3 protocolos do grupo DESCULARIZADO (A, K, KMCh).

Figura 69 – Dispersão do vetor de análise de pressão para as 3 protocolos do grupo DESCELULARIZADO (A, K, KMCh).

Figura 70 - Dispersão do vetor de análise de fluxo para as 3 protocolos do grupo DESCELULARIZADO (A, K, KMCh).

Figura 71 - Dispersão do vetor de análise de variação do diâmetro para as 3 protocolos do grupo DESCELULARIZADO (A, K, KMCh).

Figura 72 - Vetor de análise de variação de diâmetro (trecho distal) para os 3 protocolos do grupo DESCELULARIZADO (A, K, KMCh).

Figura 73 - Vetor de análise de variação de diâmetro (trecho medial) para os 3 protocolos do grupo DESCELULARIZADO (A, K, KMCh).

Figura 74 - Vetor de análise de variação de diâmetro (trecho proximal) para os 3 protocolos do grupo DESCELULARIZADO (A, K, KMCh).

Figura 75 – Dispersão do vetor de análise de variação de diâmetro (trecho distal) para os 3 protocolos do grupo DESCCELULARIZADO (A, K, KMCh).

Figura 76 - Dispersão do vetor de análise de variação de diâmetro (trecho medial) para os 3 protocolos do grupo DESCCELULARIZADO (A, K, KMCh).

Figura 77 - Dispersão do vetor de análise de variação de diâmetro (trecho proximal) para os 3 protocolos do grupo DESCCELULARIZADO (A, K, KMCh).

Nas tabelas a seguir são mostradas as variações de diâmetro para os distintos trechos das traqueias do grupo CONTROLE para os 3 protocolos experimentais: A (tabela 25), K (tabela 26) e KMCh (tabela 27).

Tabela 25 - Tabela de análise das variações de diâmetro dos trechos longitudinais da traqueia CONTROLE no protocolo experimental A.

Traqueia	Variação Diâmetro μ Distal (%)	Variação Diâmetro μ Medial (%)	Variação Diâmetro μ Proximal (%)
1	6,0%	1,5%	0,7%
2	4,4%	0,6%	0,3%
3	4,6%	1,6%	0,7%
4	7,9%	3,2%	0,5%
5	2,1%	0,5%	0,8%
Média	5,0%	1,5%	0,6%

Tabela 26 - Tabela de análise das variações de diâmetro dos trechos longitudinais da traqueia CONTROLE no protocolo experimental K.

Traqueia	Variação Diâmetro μ Distal (%)	Variação Diâmetro μ Medial (%)	Variação Diâmetro μ Proximal (%)
1	5,0%	3,0%	2,2%
2	6,0%	2,2%	1,1%
3	5,8%	2,6%	1,8%
4	7,9%	2,6%	0,7%
5	2,2%	1,0%	1,3%
Média	5,4%	2,3%	1,4%

Tabela 27 - Tabela de análise das variações de diâmetro dos trechos longitudinais da traqueia CONTROLE no protocolo experimental KMCh.

Traqueia	Variação Diâmetro μ Distal (%)	Variação Diâmetro μ Medial (%)	Variação Diâmetro μ Proximal (%)
1	5,8%	3,8%	2,6%
2	6,4%	2,0%	1,4%
3	5,8%	2,9%	2,1%
4	7,8%	2,1%	0,7%
5	2,9%	1,1%	2,8%
Média	5,7%	2,4%	1,9%

Nas tabelas a seguir são mostradas as variações de diâmetro para os distintos trechos das traqueias do grupo DESCCELULARIZADO para os 3 protocolos experimentais: A (tabela 28), K (tabela 29) e KMCh (tabela 30).

Tabela 28 - Tabela de análise das variações de diâmetro dos trechos longitudinais da traqueia DESCCELULARIZADO no protocolo experimental A.

Traqueia	Variação Diâmetro μ Distal (%)	Variação Diâmetro μ Medial (%)	Variação Diâmetro μ Proximal (%)
1	4,5%	1,7%	1,0%
2	6,3%	1,7%	1,0%
3	5,2%	3,5%	5,7%
4	4,2%	5,5%	1,4%
5	1,6%	3,1%	2,1%
Média	4,4%	3,1%	2,2%

Tabela 29 - Tabela de análise das variações de diâmetro dos trechos longitudinais da traqueia DESCCELULARIZADO no protocolo experimental K.

Traqueia	Variação Diâmetro μ Distal (%)	Variação Diâmetro μ Medial (%)	Variação Diâmetro μ Proximal (%)
1	4,7%	1,9%	1,1%
2	6,4%	1,8%	0,7%
3	4,8%	0,9%	3,9%
4	3,8%	5,5%	1,9%
5	1,5%	2,8%	2,1%
Média	4,2%	2,6%	1,9%

Tabela 30 - Tabela de análise das variações de diâmetro dos trechos longitudinais da traqueia DESCCELULARIZADO no protocolo experimental KMCh.

Traqueia	Variação Diâmetro μ Distal (%)	Variação Diâmetro μ Medial (%)	Variação Diâmetro μ Proximal (%)
1	4,9%	1,8%	1,0%
2	6,2%	1,5%	0,6%
3	4,6%	1,6%	4,3%
4	4,1%	4,8%	2,9%
5	1,6%	2,7%	2,0%
Média	4,3%	2,5%	2,2%

Na tabela 31 são mostrados os valores médios para as grandezas avaliadas no experimento para cada grupo. Na tabela 32 é mostrado o resultado do teste t pareado aplicado para avaliar a significância estatística das variações presentes na tabela 31. O teste de significância estatística nos dados de pressão de 0 a 60s é motivado por um possível comportamento transitório da metacolina neste período. A normalidade das medições dos vetores de análise de cada protocolo experimental foi avaliada com o teste de normalidade lilliefors (validade limitada pelo reduzido

número de amostras). Para os casos em que este teste rejeitou a hipótese de normalidade, foi acrescentado um asterisco ao valor de p dos testes t pareados que dependem de uma variável que apresenta distribuição não normal.

Tabela 31 - Valores médios para as grandezas avaliadas nos experimentos para os grupos CONTROLE e DESCELULARIZADO nos três protocolos experimentais (A, K, KMCh)

Grupo	Grandeza	A	K	KMCh
CONTROLE	Fluxo	13,1	13,0	13,0
	Pressão (0 a 60s)	71,8	72,7	73,7
	Pressão	71,8	72,5	73,4
	Resistência	5,5	5,6	5,6
	Variação Diâmetro (médio)	1,8%	2,6%	2,8%
	Variação Diâmetro (distal)	5,0%	5,4%	5,7%
	Variação Diâmetro (medial)	1,5%	2,3%	2,4%
	Variação Diâmetro (proximal)	0,6%	1,4%	1,9%
DESCELULARIZADO	Fluxo	13,1	13,0	12,6
	Pressão (0 a 60s)	63,5	64,7	60,5
	Pressão	62,6	64,1	60,7
	Resistência	4,8	4,9	4,8
	Variação Diâmetro (médio)	2,4%	2,2%	2,1%
	Variação Diâmetro (distal)	4,4%	4,2%	4,3%
	Variação Diâmetro (medial)	3,1%	2,6%	2,5%
	Variação Diâmetro (proximal)	2,2%	1,9%	2,2%

Tabela 32 – Testes de significância estatística (valores de p – teste t pareado, com teste de normalidade lilliefors) das variações nas grandezas avaliadas entre os vários protocolos experimentais.

Grupo	Grandeza	Normal	K vs. A (%)	KMCh vs. K (%)	KMCH vs. A (%)
CONTROLE	Pressão	Sim	35	9,2	9,5
	Pressão (0 a 60s)	Sim	11	21	8,4
	Fluxo	Sim	21	51	29
	Variação Diâmetro (médio)	Sim*	8,2*	24*	9,0
	Variação Diâmetro (distal)	Sim	51	7,7	15
	Variação Diâmetro (medial)	Sim	13	59	18
	Variação Diâmetro (proximal)	Sim	2,3	12	1,5
DESCELULARIZADO	Pressão	Sim	32	17	52
	Pressão (0 a 60s)	Sim*	29	13%*	36*
	Fluxo	Sim	87	48	42
	Variação Diâmetro (médio)	Sim	38	82	9
	Variação Diâmetro (distal)	Sim	46	67	79
	Variação Diâmetro (medial)	Sim	41	59	14
	Variação Diâmetro (proximal)	Sim	45	35	84

Para o grupo CONTROLE é observada variação da pressão média entre os diversos protocolos experimentais, o que é suportado pelas figuras 54, 57. Os valores de significância estatística para o protocolo KMCh (estímulo com metacolina) em relação a ausência de estímulo (A), e estímulo com solução de Krebs (K) estão abaixo de 10% conforme tabela 32 (9,2% e 9,5% relativo ao protocolo A e K, respectivamente). As figuras 54 e 57 mostram uma diferença maior entre os protocolos no período de 0 a 60s do início das medições. Analisando a pressão média neste período (tabela 31), também se observa esta variação na pressão média, com alta significância estatística para a diferença entre o protocolo KMCh e a ausência de estímulo (A) ($p=8,4\%$).

Os estímulos aplicados no grupo CONTROLE (solução de Krebs e solução metacolina) causam um aumento na variação do diâmetro da traqueia, denotando um comportamento mais pulsátil da mesma (vide figuras 56 e 59). A variação do diâmetro média é 1,8% na ausência de estímulos (A), 2,6% após aplicação de solução de Krebs (K) e 2,8% após aplicação de solução de metacolina (KMCh). Observamos significância estatística (p) de 9,0% no protocolo KMCh em relação ao protocolo A (o método lilliefors rejeita a hipótese de normalidade no protocolo K, desta forma não consideramos o resultado dos testes t pareado que analisam o protocolo K).

Realizando a análise espacial da traqueia no grupo CONTROLE (figuras 60 a 65), se observa que o efeito dos protocolos experimentais na variação do diâmetro médio se torna mais significativo nos trechos mediais e proximais. Na região distal (maior pulsação), a aplicação de estímulos não gera incremento significativo na pulsação da traqueia (5% antes dos estímulos, 5,4% após aplicação de solução de Krebs e 5,5% após aplicação de metacolina); além disto a significância estatística das diferenças entre os estímulos e a ausência dos mesmos é baixa ($p=51\%$ e $p=15\%$, dos protocolos K e KMCh em relação ao protocolo A respectivamente). Na região medial (variações de diâmetro de 1,5% A, 2,3% K e 2,4% KMCh), a significância estatística dos protocolos experimentais aumenta ($p=18\%$ e $p=13\%$ dos protocolos K e KMCH em relação ao protocolo A respectivamente), o que é suportado pelas figuras 61 e 64. Na região proximal (variações de diâmetro de 0,6% A, 1,4% K e 1,9% KMCh), temos alta significância estatística ($p=2,3\%$ e $p=1,5\%$ dos protocolos K e KMCH em relação ao protocolo A respectivamente), o que é suportado pelas figura 62 e 65.

Não se observaram, de forma consistente, alterações geradas pelo estímulo com metacolina em relação ao estímulo com solução de Krebs. Nos cenários onde se poderia esperar maior efeito da metacolina (tendo-se em vista os resultados do grupo CONTROLE): pressão (0 a 60s) e variação de diâmetro no trecho proximal, a significância estatística do efeito da metacolina em relação a solução de Krebs é baixa ($p=21\%$ na pressão e $p=12\%$ na variação de diâmetro proximal), conforme mostrado na tabela 32. O valor de $p=7,7\%$ na relação entre os protocolos KMCh e K para a variação do diâmetro distal está associada a uma pequena diferença entre as medições obtidas dos efeitos dos dois protocolos aplicados ao grupo CONTROLE (vide figuras 60 e 63) No entanto, as figuras 54, 57 e 56, 59 sinalizam uma tendência de o estímulo com metacolina apresentar maiores respostas em pressão e variação de diâmetro que o estímulo com solução de Krebs.

5. Discussão

O experimento 1 com corpos de teste mostra que o ambiente é capaz de realizar medições de diâmetro externo, obtendo uma reta de calibração entre pixels e milímetros, conforme mostrado na figura 36. Além disto, as medições de mecânica respiratória mostram a grande dependência da resistência com o diâmetro do corpo de teste. A regressão polinomial da relação entre resistência e diâmetro ($x^{-4,2}$, conforme figura 37) é semelhante a equação de Poiseuille (relação de x^{-4} entre resistência e diâmetro, conforme equação 4). A equação de Poiseuille sinaliza uma relação linear entre resistência e comprimento, desta forma a relação entre as regressões polinomiais do grupo CURTO e LONGO (45% - coeficiente de 1,98 vs. 1,37 na figura 37) deveria ser aproximadamente a relação entre os comprimentos do grupo CURTO e LONGO (78% conforme tabela 2), o que não é observado nas medições. As características do fluxo analisado (fluxo pulsátil e traqueia não rígida) diferem bastante das premissas da equação de Poiseuille (fluxo laminar e condutor rígido) o que explica o desvio da formulação de Poiseuille.

O experimento 2 demonstra que o ambiente é capaz de realizar medições de mecânica de traqueia. Avaliando a tabela 5, se observa que a traqueia apresentou uma resistência mensurável visto que a resistência total ($0,68 \text{ cmH}_2\text{O/mL.s}^{-1}$) é superior a resistência do ambiente de instrumentação ($0,35 \text{ cmH}_2\text{O/mL.s}^{-1}$), desta forma o valor da resistência gerada pela traqueia atingiu $0,33 \text{ cmH}_2\text{O/mL.s}^{-1}$. Além disto, foi possível medir variações de diâmetro externo médio da traqueia nas condições experimentais (figura 40 e tabela 6). Este experimento apresenta uma visão preliminar do ambiente visto que apresentava algumas limitações como (i) tensão das traqueias não foi calibrada e (ii) cânulas de suporte da traqueia tinham diâmetro distintos. A não calibração da tensão das traqueias pode ser responsável pela disparidade nos valores de variação de diâmetro observada na tabela 6 e o afunilamento da traqueia devido a disparidade de diâmetros das cânulas de suporte pode ter gerado este valor significativo de resistência de traqueia (de $0,33 \text{ cmH}_2\text{O/mL.s}^{-1}$). Estes comportamentos (disparidade de 10x nos valores de variação de diâmetro) e $0,33 \text{ cmH}_2\text{O/mL.s}^{-1}$ de resistência gerada pela traqueia não foram observados na versão final do ambiente.

No experimento 3 se avalia a mecânica respiratória de traqueias expostas a distintas pressões transmuralis. Comparando os valores de resistência do ambiente (tabela 8) com os valores de resistência obtidos nas análises com as traqueias (tabelas 9, 10 e 11), se observa que a resistência medida é igual à resistência do ambiente, o que pode ser visto na tabela 12. Este comportamento pode ser explicado pelo fato de que a traqueia (comprimento médio das traqueias: $15,7 \pm 1,3\text{mm}$) ocupa uma parcela reduzida do comprimento total percorrido pelo fluxo de ar gerado pelo ventilador de pequenos animais (15% dos 105,1 mm total, contabilizando cânulas de suporte e traqueia). Além disto, ao estarem fixadas às cânulas do condicionador, as traqueias apresentam um diâmetro interno semelhante ao das cânulas de suporte, visto que as paredes da traqueia apresentam um arcabouço de suporte com suficiente rigidez para diminuir o colapso das paredes superiores sobre as inferiores devido a seu próprio peso. Esta rigidez adicional é devida ao elevado percentual de tecido cartilaginoso presente nas traqueias. Em comparação ao experimento 2, a cânula distal tem o mesmo calibre que a proximal (2,0mm), evitando o afunilamento e mantendo os diâmetros das traqueias no experimento 3 maiores do que no experimento 2 (cânula distal apresenta o calibre de 1,65mm).

Avaliando-se os dados de variação de diâmetro do experimento 3, observa-se que o incremento de pressão transmural gera um aumento da variação de diâmetro médio da traqueia, sinalizando que a mesma se torna mais pulsátil (vide tabelas 9, 10 e 11). Avaliando-se a evolução da variação de diâmetro com o crescimento da restrição, tanto valores da traqueia como um todo como os valores dos trechos individualmente (distal, medial e proximal), se analisa que a evolução é semelhante (vide tabela 16). Outra observação pertinente da tabela 16 é que a variação do diâmetro é maior no trecho distal da traqueia, o que também pode ser observado na comparação entre as figuras 47, 48 e 49 (e as respectivas dispersões nas figuras 50 a 52). Durante a insuflação há um acúmulo de volume de gás neste segmento porque o fluxo de ar que entra neste trecho (oriundo do ventilador) é maior do que o fluxo que sai (devido à existência da restrição externa). Este volume de gás expande as paredes da traqueia, gerando maior variação de diâmetro. Nos outros segmentos este fenômeno ocorre de forma mais atenuada.

Nas figuras 46, 50, 51 e 52 há uma dispersão relevante nos valores obtidos de variação de diâmetro, que acaba por aproximar os valores das restrições 23G/21G. No entanto, analisando-se as tabelas 9 a 11 e 13 a 15 se observa que,

individualmente, as traqueias apresentam dispersão nas suas médias de variação de diâmetro (aproximando o valor médio). Isolando a evolução na variação de diâmetro da traqueia, observamos que a evolução ocorre de maneira similar em todas quando se varia a restrição, como pode ser visto no histograma da figura 53.

No experimento 4, conforme mostrado na tabela 31, se observam variações nos valores médios de pressão entre o grupo CONTROLE e DESCELULARIZADO e uma leve alteração na pressão entre os 3 protocolos experimentais associados ao grupo CONTROLE. Além disto, se observa uma variação nos valores médios de variação de diâmetro entre os protocolos A, K e KMCh para o grupo CONTROLE, os quais se tornam mais significativos nos trechos da traqueia (atingindo a máxima variação no segmento proximal).

A variação dos valores de pressão média estão associadas a variação na resistência do ambiente experimental para o grupo CONTROLE e DESCELULARIZADO (vide tabela 31). A alteração na pressão no grupo CONTROLE gerada pelo estímulo com metacolina em relação a ausência de estímulos e estimulação com solução de Krebs apresenta significância estatística alta (p entre 5% e 10%, vide tabela 32). No período de 0 a 60s estes efeitos se potencializam, o que pode ser motivado pelo efeito temporal da metacolina.

No grupo CONTROLE a evolução da variação de diâmetro com os protocolos KMCH e K em relação a ausência de estímulos apresenta alta significância estatística (vide tabela 32), sinalizando que a mesma se torna mais pulsátil com os estímulos. Analisando-se os trechos da traqueia, a evolução da variação de diâmetro com os protocolos aumenta, sendo mínima no trecho distal e máxima no trecho proximal. No trecho proximal, a diferença estatística é confirmada (p inferior a 5%, vide tabela 32).

Avaliando os dados do grupo DESCELULARIZADO nas figuras 66 a 77 e tabelas 22 a 24 e os dados de significância estatística na tabela 32, não se observou nenhum efeito dos protocolos experimentais sobre a mecânica das traqueias descelularizadas.

Uma possível explicação para os efeitos observados nas traqueias do grupo CONTROLE e não observados no grupo DESCELULARIZADAS, é que os estímulos com solução de Krebs e metacolina, ativaram o MLVA presente na traqueia do grupo CONTROLE (e ausente no grupo DESCELULARIZADAS), tornando a traqueia mais contrátil, incrementando a contração da traqueia após a expansão gerada pela insuflação, o que diminui o diâmetro mínimo (OLSEN et al., 1967), incrementando o

valor de variação do diâmetro. É importante sinalizar que, além deste diâmetro mínimo reduzido, Olsen et al. (1967) sinaliza que a compressibilidade da traqueia é reduzida devido a aproximação dos anéis cartilagosos. Além disto, uma traqueia mais contrátil apresenta menor distensibilidade (OLSEN; STEVENS; McILROY, 1967), gerando incremento na pressão interna para os mesmos valores de volumes internos, assim incrementando a pressão de pico do ciclo, conforme observado nos experimentos do grupo CONTROLE.

Poderia ser esperado que o estímulo com metacolina causasse uma broncoconstrição da traqueia, gerando alterações detectáveis na mecânica respiratória da traqueia após este estímulo. No entanto, nos experimentos executados não se observaram alterações na mecânica da traqueia exposta a metacolina em relação a traqueia exposta a solução de Krebs.

Tendo-se em vista a grande sensibilidade do ambiente à redução no diâmetro interno, é possível conjecturar que o ambiente tenha a capacidade de detectar a redução de diâmetro interno em resposta a broncoconstritor demonstrada em LaPrad et al. (2010) sem necessidade de preencher o lúmen com líquido, sendo esta uma condição mais próxima a *in situ*. A resposta a broncoconstritor observada em LaPrad et al. (2010) é bem superior a uma resposta observada na configuração experimental descrita acima, tendo em vista que não foi possível observar alterações na mecânica da traqueia pelo estímulo com metacolina. Esta diferença ocorre visto que em LaPrad se utilizam bronquíolos, os quais apresentam um percentual inferior de tecido cartilaginoso em relação as traqueias utilizadas na configuração experimental utilizada neste trabalho, desta forma a traqueia apresenta uma menor contratibilidade em relação aos bronquíolos utilizados em LaPrad et al. (2010).

As medições iniciais de vias aéreas realizadas, apresentam diferenças importantes no protocolo experimental em relação a literatura atual de mecânica respiratória em vias aéreas. Nos experimentos atuais (LaPrad et al, 2010), as vias aéreas são mantidas em uma solução de Krebs com temperatura controlada e reciclagem constante de modo a manter a viabilidade do tecido; nos protocolos experimentais utilizados no ambiente final não foi utilizado controle de temperatura (temperatura mantida aproximadamente acima de 30° de forma manual) e não houve reciclagem constante da solução de Krebs. Nos experimentos atuais (LaPrad et al, 2010), se realizam testes de viabilidade de tecido por excitação elétrica, testes que não realizamos.

O ambiente desenvolvido também pode receber melhorias futuras. O condicionador de vias aéreas apresenta limitações no trabalho com traqueias pequenas e desvios de tensão na traqueia por torção também podem ocorrer (mesmo com o controle da tensão por estiramento). Outra limitação foi a não utilização de calibração de imagem (obtenção da reta pixel por milímetro antes dos experimentos).

Consideramos que novas pesquisas sobre traqueias recelularizadas, novos estímulos (ventilação com metacolina) e diferentes vias aéreas (bronquíolos) são possíveis com o ambiente e podem auxiliar a evolução na compreensão da mecânica respiratória de vias aéreas.

6. Conclusão

Em linha com a proposta do trabalho, realizaram-se diversas análises de mecânica respiratória de vias aéreas isoladas. Foi construído um ambiente através da integração de instrumentação de processamento de imagens e transdução de pressão e fluxo, com gestão da execução de experimentos e gravação de dados sendo executada em um ambiente de instrumentação virtual desenvolvido especificamente para este trabalho.

Os testes em corpos de prova demonstraram a capacidade do ambiente em executar as medidas de interesse, com medições de diâmetro externo consistentes com os valores conhecidos e valores de resistência ao fluxo de ar coerentes com as formulações existentes (alta dependência do diâmetro interno e dependência com comprimento). Os estudos com pressão transmural quantificaram a expansão das paredes da traqueia com o incremento da pressão interna e permitiram avaliar que a variação de diâmetro não é homogênea nos trechos longitudinais da traqueia. Os estudos com traqueias decelularizadas mostram que as mesmas não respondem a bronco-constritores, ao contrário de traqueias normais que apresentaram indícios de contração. Estes indícios de contração puderam ser observados na evolução das medições de pressão e pulsação da traqueia (variação de diâmetro externo) geradas pelos estímulos com solução de Krebs e metacolina.

O ambiente desenvolvido viabilizou a execução de um conjunto de análises de mecânica respiratória de traqueias isoladas, gerando a base de conhecimento para futuras pesquisas sobre o tema. As análises realizadas também mostraram as limitações do ambiente, tanto na instrumentação quanto nos protocolos experimentais, o que mostra que ainda é possível melhorar ambos os aspectos do ambiente.

7. Referências

BAKER, B. - **AN699 Anti-aliasing, analog filters for data acquisition systems**. [S.l.]: Microchip Technology Inc, 1999. Disponível em: <<http://ww1.microchip.com/downloads/en/AppNotes/00699b.pdf>>. Acesso em 22 abril 2012.

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, pp. 55-62, 1997.

BATES, J.H.; IRVING, C.G. Measuring lung function in mice: the phenotyping uncertainty principle. **Journal of Applied Physiology**, v. 94, n. 4, pp. 1297-1306, 2003.

BATES, J.H. **Lung Mechanics**: An inverse modeling approach. 1st ed. New York: Cambridge University Press, 2009.

BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. **Neuroscience: Exploring the Brain**. 3rd ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.

BELMINO, R.; GOMES, S.; HIROTA, A.; VALENGA, M. H.; NOHAMA, P.; MORIYA, H. T.; AMATO, M. B. P.; ALENCAR, A. M. Tidal recruitment detected by electrical impedance tomography (eit) and crackling sounds in ards model. In: AMERICAN THORACIC SOCIETY INTERNATIONAL CONFERENCE, 2009, San Diego, EUA. **Resumos**. San Diego: ATS, 2009.

BLACK, L.D.; HENDERSON, A.C.; ATILEH, H.; ISRAEL, E.; INGENITO, E.P.; LUTCHEN, K.R. Relating maximum airway dilation and subsequent reconstriction to reactivity in human lungs. **Journal of Applied Physiology**, v. 96, n. 5, pp. 1808-1814, 2004.

CHENYANG, X. Snakes, Shapes and Gradient Vector Flow. **IEEE Transactions on Image Processing**, v. 7, n. 3, pp. 359-369. 1998.

CRIMI, E.; PELLEGRINO, R.; MILANESE, M.; BRUSASCO, V. Deep breaths, methacholine, and airway narrowing in healthy and mild asthmatic subjects. **Journal of Applied Physiology**, v. 93, n. 4, pp. 1384-1390, 2002.

DELAERE, P.; VRANCKX, J.; VERLEDEN, G.; LEYN, P.D.; RAEMDONCK, D.V. Tracheal allotransplantation after withdrawal of immunosuppressive therapy. **The New England Journal of Medicine**, v. 362, n.2, pp. 138-145, 2010.

DUBOIS, A.B.; BOTELHO, S.Y.; COMROE, J.H. A new method for measuring airway resistance in man using a body plethysmograph: values in normal subjects and in patients with respiratory disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 35, n. 3, pp. 327-335, 1956.

EVARISTO, T.C.; ALVES, F.C.M.C.; ACORCI-VALÉRIO, M.J.; MION, W.; MOROZ, A.; FELISBINO, S.L.; FERREIRA, R.R.; RUIZ, R.L.; DEFFUNE, E. Experimental model of neotrachea in rabbits using tissue engineering techniques. In: International Conference on Tissue Engineering, II, 2011, Lisboa, Portugal. **ICTE 2011 II International Conference on Tissue Engineering**. Lisboa: IST Press, 2011. p. 257-264.

FREDBERG, J.J.; INOUE, D.; MILLER, B.; NATHAN, M.; JAFARI, S.; RABOUDI, S.H.; BUTLER, J.P.; SHORE, S.A. Airway smooth muscle, tidal stretches, and dynamically determined contractile states. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 156, n. 6, pp. 1752-1759, 1997.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. Tradução de Charles Alfred Esbérard et al. Revisão técnica de Charles Alfred Esbérard. 9ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1997.

HAN, S.; EL-ABBADI, N.H.; HANNA, N.; MAHMOOD, U.; MINA-ARAGHI, R.; JUNG, W.G.; CHEN, Z.; COLT, H.; BRENNER, M. Evaluation of Tracheal Imaging by Optical Coherence Tomography. **Respiration**, v. 72, n.5, pp. 537-541, 2004.

JACKSON, A.C.; MURPHY, M.M.; RASSULO, J.; CELLI, B.R.; INGRAM, R.H.J. Deep breath reversal and exponential return of methacholine-induced obstruction in asthmatic and nonasthmatic subjects. **Journal of Applied Physiology**, v. 96, n. 1, pp. 137-142, 2004.

JENSEN, A.; ATILEH, H.; SUKI, B.; INGENITO, E.P.; LUTCHEN, K.R. Selected contribution: airway caliber in healthy and asthmatic subjects: effects of bronchial challenge and deep inspirations. **Journal of Applied Physiology**, v. 91, n. 1, pp. 506-515, 2001.

KAPSALI, T.; PERMUTT, S.; LAUBE, B.; SCICHILONE, N.; TOGIAS, A. Potent bronchoprotective effect of deep inspiration and its absence in asthma. **Journal of Applied Physiology**, v. 89, n. 2, pp. 711-720, 2000.

KRINKE, G.J.; BULLOCK, G.R.; BUNTON, T. **The Laboratory Rat**: Handbook of Experimental Animals. 1st Edition. Scotland, UK: Academic Press, 2000.

LAPRAD, A.S.; WEST, A.R.; NOBLE, P.B.; LUTCHEN, K.R.; MITCHELL, H.W. Maintenance of airway caliber in isolated airways by deep inspiration and tidal strains. **Journal of Applied Physiology**, v. 105, n. 2, pp. 479-485, 2008.

LAPRAD, A.S.; SZABO, T.L.; SUKI, B.; LUTCHEN, K.R. Tidal stretch does not modulate responsiveness of intact airways in-vitro. **Journal of Applied Physiology**, v. 109, n. 2, pp. 295 - 304, 2010.

LATOURELLE, J.; FABRY, B.; FREDBERG, J.J. Dynamic equilibration of airway smooth muscle contraction during physiological loading. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, n. 2, pp. 771-779, 2002.

MACCHIARINI, P.; JUNGEBLUTH, P.; TETSUHIKO, G.; ASNAGHI, M.A.; REES, L.E.; COGAN, T.A.; DODSON, A.; MARTORELL, J.; BELLINI, S.; PARNIGOTTO, P.P.; DICKINSON, S.C.; HOLLANDER, A.P.; MANTERO, S.; CONCONI, M.T.; BIRCHALL, M.A. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. **The Lancet**, v. 372, pp 2023-2030, 2008.

MITCHELL, H.W.; SPARROW, M.P. Video-imaging of lumen narrowing; muscle shortening and flow responsiveness in isolated bronchial segments of the pig. **European Respiratory Journal**, v. 7, n. 7, pp. 1317-1325, 1994.

NOBLE, P.B.; JONES, R.L.; NEEDI, E.T.; CAIRNCROSS, A.; MITCHELL, H.W.; JAMES, A.L.; McFAWN, P.K. Responsiveness of the human airway in vitro during deep inspiration and tidal oscillation. . **Journal of Applied Physiology**, v. 110, n. 6, pp. 1510-1518, 2011.

NOBLE, P.B.; TURNER, D.J.; MITCHELL, H.W. Relationship of airway narrowing, compliance, and cartilage in isolated bronchial segments. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, n. 3, pp. 1119-1124, 2002.

OLIVER, M.N.; FABRY, B.; MARINKOVIC, A.; MIJAILOVICH, S.M.; BUTLER, J.P.; FREDBERG, J.J. Airway hyperresponsiveness, remodeling, and smooth muscle mass: right answer, wrong reason? **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 37, n. 3, pp. 264-272, 2007.

OLSEN, C.R.; STEVENS, A.E.; McILROY, M.B. Rigidity of tracheae and bronchi during muscular constriction. **Journal of Applied Physiology**, v.23, n.1, pp. 27-34, 1967.

OLSEN, C.R.; STEVENS, A.E.; PRIDE, N.B; STAUB, N.C. Structural basis for decreased compressibility of constricted tracheae and bronchi. **Journal of Applied Physiology**, v.23, n.1, pp. 35-39, 1967.

OTSU, N. Threshold selection method from gray level histograms. **IEEE Transactions On Systems Man And Cybernetics**, v. 9, n. 1, pp. 62-66, 1979.

QUTAYBA, H.; JOANNE, S.; JAMES. M. **Physiologic Basis of Respiratory Disease**. Hamilton, Ontario, Canada: BC Decker Inc, 2005.

RAINS, J.K; BERT, J.L.; ROBERTS, C.R.; PARE, P.D. Mechanical properties of human tracheal cartilage. **Journal of Applied Physiology**, v.72, n. 1, pp. 219-225, 1992.

RODGER, I.W. Airway Smooth Muscle. **British Medical Bulletin**, v. 48, n. 1, pp. 97-107, 1992.

ROSE, K.G; SESTERHENN, K.; WUSTROW, F. Tracheal allotransplantation in man. **The Lancet**, v. 313, n. 1, pp. 433, 1979.

SCICHLONE, N.; PERMUTT, S.; TOGIAS, A. The lack of the bronchoprotective and not the bronchodilatory ability of deep inspiration is associated with airway hyperresponsiveness. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 163, n. 2, pp. 413-419, 2001.

SHEN, X.; GUNST, S.J.; TEPPER, R.S. Effect of tidal volume and frequency on airway responsiveness in mechanically ventilated rabbits. **Journal of Applied Physiology**, v. 83, n. 4, pp. 1202-1208, 1997.

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. In: European Conference of IFMBE, 5th, 2011, Budapeste, Hungria. **IFMBE Proceedings**, 2011, v. 37, pp. 137-140.

SKLOOT, G.; PERMUTT, S.; TOGIAS, A. Airway hyperresponsiveness in asthma: a problem of limited smooth muscle relaxation with inspiration. **Journal of Clinical Investigation**, v. 96, n. 5, pp. 2393- 2403, 1995.

UDUPA, J.K.; LEBLANC, V.R.; ZHUGE, Y.; IMIELINSKA, C.; SCHMIDT, H.; CURRIE, L.M.; HIRSCH, B.E.; WOODBURN, J. A framework for evaluating image segmentation algorithms. **Computerized Medical Imaging and Graphics**, v. 30, n. 2, pp. 75-87, 2006.

WANG, L.; PARE, P.D.; SEOW, C.Y. Effects of length oscillation on the subsequent force development in swine tracheal smooth muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 88, n. 6, pp. 2246-2250, 2000.

WEBSTER, J.G. **Medical Instrumentation: application and design**. 4th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 2010.

WEST, J.B. **Respiratory physiology, the essentials**. 3rd ed. United States: John Wiley & Sons, 1985.

APÊNDICE A - A non-invasive method for assessing airway narrowing of isolated airways in vitro

T. H. G. Silva¹, M. Z. J. Ferreira², A. M. Alencar³, H. T. Moriya¹

¹ Biomedical Engineering Laboratory, Escola Politécnica - University of São Paulo, São Paulo, Brazil

² School of Electrical and Computer Engineering - UNICAMP, Campinas, Brazil

³ Institute of Physics - University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Abstract— In this paper a method for measuring the inner and outer diameter of isolated airways in vitro is introduced. This method relies on images to measure outer diameter and on pressure-flow systemic response to measure inner diameter. The hardware/software environment used is introduced and initial experiments are performed as a proof of concept. The authors believe this method can be used to perform experiments in isolated airways that better mimic in-vivo conditions.

Keywords— airway responsiveness, airway wall mechanics, image processing

I. INTRODUCTION

Asthma is characterized by contractive spasm (or airway hyperresponsiveness - AHR) of bronchial smooth muscle causing extreme breathing difficulty. In Kapsali et al. (1), a potent bronchoprotective (reduced airway responsiveness - AR) effect of deep inspiration in healthy subjects (and its absence in asthmatic subjects) is assessed. As discussed by LaPrad et al. (2), this modulation of AR by external stimuli has been studied on many levels: (i) patients subject do methacholine challenges; (ii) lung systemic response on mice; (iii) bovine/porcine isolated airways in vitro and (iv) bovine/sheep/porcine isolated airway smooth muscle.

In isolated airways experiments; ultrasound imaging (2) and endoscope imaging (3,4) have been used to measure airway (external diameter) and lumen (internal diameter) narrowing, which are used to quantify AR. Both approaches are invasive (implying filling the airways with liquid or inserting an endoscope), which is a condition that is different from in-vivo conditions.

We proposed a method that is non-invasive. Using a stereomicroscope, we proposed to measure external airway diameter through image acquisition and processing. Based on fluid mechanics, we proposed to measure lumen narrowing through the pressure-flow (P-F) response of the isolated airway using pressure/flow transducers.

Flow is characterized by the Reynolds number (R_e), where V^* (0-25mL/s in this study) is the flow, ρ is the density (1.2×10^{-3} g/mL for air), r is the radius (0.3-1.1mm in this study) and μ is the viscosity (2×10^{-5} g/mm.s for air). The maximum Reynolds number in the measurement environment is approximately 3200 ($R_e > 2300$), which characterizes transitional flow

For steady, incompressible, laminar flow, Pouseille's law describes the P-F ($\Delta P/V^*$) response of a linear conductor, where R is the resistance, μ (2.04×10^{-7} cmH₂O.s for air) is the viscosity, L (150mm approximately in this study) is the length, r (0.3-1.1mm in this study) is the radius and V^* (0-25000mm/s in this study) is the flow.

$$R = \frac{\Delta P}{V^*} = \frac{8\mu L}{\pi r^4} \quad (2)$$

In this study, Pouseille's law is not directly applicable because of the pulsatile, transitional and unsteady nature of the flow challenge used to stimulate the airway tissue. Although oversimplified, Pouseuille's equation indicates a large dependence of the P-F response on the internal diameter of the linear conductor. Hence we expect that lumen narrowing will have a measurable effect on the P-F response of the airway tissue exposed to a flow challenge. This change in the P-F response due to changes in internal diameter will be used to assess lumen narrowing.

II. METHODS AND MATERIALS

A. Measurement Environment

The measurement environment is schematically introduced in Figure 1:

Figure 1: Measurement Environment

$$R_e = \frac{2\rho V^*}{\pi \mu r} \quad (1)$$

The measurement environment consists of: (i) a small animal ventilator to supply the flow challenge; (ii) pressure/flow transducers; (iii) tubes to connect the SAV and the airway tissue; (iv) a container to hold the solution that bathes the airway tissue; (v) the imaging system and (vi) the A/D converter.

Foreseeing the difficulties in connecting small animals' airways to the metallic tubes, the airways/solution container is projected to be disassembled. The metallic tubes (as well as the walls) can be separated, so that they can be connected to the airways in a more suitable place. Then, the entire setup can be reassembled for the execution of experiments. The container's experimental setup is shown in Figure 2.

The inward metallic tube is a cannula. The outward metallic tube is a 24G needle taken from I.V. Catheters (Braun, Germany) adapted to have a length of 65.6mm.

A small animal ventilator (SAV) (683, Harvard Apparatus, USA) was used. The volume (0-5mL) and the rate (0-90 strokes/min) can be adjusted to control flow characteristics. The P-F response analysis will be made to the data related to the ventilating phase of the SAV's respiratory cycle.

A gauge pressure transducer (FPM 07PG, Fujikura, Japan) was used to measure pressure. The flow transducer consists of a Fleisch pneumotachometer (000, Hugo Sachs, Switzerland) connected to a differential pressure transducer (HCXPM005-D6V, SensorTechnics, USA). The transducers' signals, after being conditioned by auxiliary circuit, are feed into the USB-6008 analog-digital converter (National Instruments, USA), sampling at a rate of 1kHz.

Figure 2: Experimental setup (2.a airway/solution container, 2.b overview of the measurement environment)

The imaging system consists of a stereomicroscope (SZ61, Olympus, Japan) connected to a camera (SDC415, Samsung, South Korea). The camera's signal is feed into the PCI-1405 (National Instruments, USA) image acquisition board. The image acquisition board is configured to output its internal trigger signal which is feed into the NI USB-6008 bit counter so that each frame acquisition instant can be obtained.

The platform for the creation of the signal processing/analysis software was LabVIEW (National Instruments, USA). LabVIEW integrates with the USB-6008 and the PCI-1405, allowing the software to obtain: (i) the conditioned pressure transducer signal feed to the USB-6008; (ii) the images obtained from the camera and feed to the PCI-1405; (iii) the PCI-1405 trigger signal feed to the USB-6008 and (iv) the conditioned flow transducer signal feed to the USB-6008.

The software developed for this study consists of a preliminary calibration phase and a execution/recording phase.

Using a manual manometer, the user performs a four point calibration on the gauge pressure transducer and a three point calibration on the differential pressure transducer. The software performs a linear regression to obtain the parameters of the pressure-tension calibration line for both pressure transducers. To establish the tension-flow calibration line, the pressure-tension calibration line of the differential pressure transducer is combined with the nominal flow-pressure transducer of the Fleisch pneumotachometer.

In the execution/recording phase, pressure and flow measurements are obtained and kept and images are recorded. Acquired frames, measured signals and preliminary estimates of P-F response and diameter are displayed in the software frontend. All these tasks run in parallel. The obtained measurements are stored in a text file and the recorded frames are kept in a .avi video file.

For refined estimates of P-F response and image diameter, the P-F measurements and images were post-processed using Matlab (The Mathworks, USA).

B. Experiments

The measurement environment was tested by using 4 IV Catheters (polyurethane) with nominal different inner/outer diameters. The dimensions of the inner diameters of the catheters were taken as the outer diameter of the needles housed inside the catheters. The tubes (inward, outward) were not used for these tests, with the catheters being placed directly on the Fleisch pneumotachometer output.

The measurement environment was also tested in tracheal tissue of 6 non-SPF Wistar, male rats (462 ± 22 g). For this experiment, the inward/outward tubes were used, and their P-F response was measured separately to assess their effect on the experiment's measurements. The tracheal experiments were performed as proof of concept with a saline bath replacing the Krebs solution commonly used for isolated airways experiments.

The SAV's volume was set to 5mL to expand the ventilation interval, thus generating a condition closer to steady flow. The rate was adjusted to 40 strokes/min in the catheter experiments. The rate was adjusted to 90 strokes/min in order to mimic the respiratory mechanics of rats in the tracheal experiments.

All the animals received care in compliance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animal* (Institute of Laboratory Animal Resources National Academy of Sciences, Washington, D.C., 1996).

III. RESULTS

A. Pressure-Flow systemic response

The mean, post-processed, P-F response to cycles of ventilation for the various catheters is shown in Figure 3. As shown, there is a significant change of the P-F response for the different values of internal diameter.

Figure 3: Pressure-flow response for the various catheters (3.a Flow, 3.b Pressure, 3.c Resistance, 3.d Volume)

The mean P-F response cycle was post-processed in order to establish the mean P-F response of every catheter. The variation of resistance with internal diameter was calculated and compared with Pouseuille's law. The results are shown in Table 1 and Figure 4.

Table 1: Catheter characterization

Catheter	Length (mm)	Outer Diameter (mm)	Inner Diameter (mm)	Exp. Resistance (cmH ₂ O/mL.s ⁻¹)	Pouseuille Resistance (cmH ₂ O/mL.s ⁻¹)
14G	17	2,65	2,11	0,03	0,01
18G	19	1,35	1,27	0,34	0,06
22G	15	0,95	0,72	1,42	0,44
24G	15	0,70	0,57	3,04	1,14

Figure 4: Resistance Variation for pairs of catheters

A similar analysis was performed for the tracheal tissue. The results can be seen in Figure 5, and Table 2.

Figure 5: Mean P-F response for tracheal tissue 1-6 (5.a Flow, 5.b Pressure, 5.c Resistance, 5.d Volume)

Table 2 – Tracheal characterization and experimental resistances (R)

Trachea	Systemic Resistance (cmH ₂ O/mL.s ⁻¹)	Tube Resistance (cmH ₂ O/mL.s ⁻¹)	Length (mm)	Diameter (mm)
1	0,68	0,17	15	3
2	0,74	0,17	15	3
3	0,60	0,17	14	3
4	0,65	0,17	13	3
5	0,84	0,17	16	3
6	0,59	0,17	19	3

B. Imaging of the outer diameter

The images obtained from the four catheters are shown in Figure 6 below. The mean, post-processed, values of the measured diameter were taken from the experiment's rec-orded data and were compared with the measured outer diameters. This comparison is shown in Figure 7 below.

Figure 6: Images taken from the catheters

Figure 7: Results of the measurement of outer diameter through segmentation

A similar analysis was performed for the tracheal tissue. Results can be seen in Figures 8, 9.

Figure 8: Example of dynamic diameter variation for tracheal tissue (8.a Maximum Diameter, 8.b Minimum Diameter)

Figure 9: Measured diameter variation for tracheal tissue

IV. DISCUSSION

The environment, through its imaging and segmentation system, has been able to measure the catheters' outside diameter with great precision (Figure 6, 7) and record and measure the dynamic changes in tracheal tissue (Figure 8,9). The analysis of the P-F response of the system has shown the ability to detect changes in the inner diameter of the catheters (Figure 3). The P-F analysis also allowed for the measurement of tracheal tissue resistance in a saline bath (Figure 5, Table 2). The catheter's P-F response differs significantly from Poiseuille's formulation (Table 1) as expected (6), however the variation of resistance with the variation of internal diameter is consistent with Poiseuille's formulation (Figure 4).

V. CONCLUSIONS

The experiments with isolated airways (2) usually involve comparing the evolution of lumen/airway narrowing in different conditions. The outer diameter can be obtained through the imaging system, allowing the user to analyze changes in outer diameter. Although there are difficulties in using the P-F response to calculate inner diameter, variation of the P-F response with the variation of inner diameter can be detected and measured. Given these characteristics, the authors believe that this method can be of great assistance in assessing airway narrowing in isolated airways in vitro.

ACKNOWLEDGMENT

The authors wish to thank FAPESP (2006/06996-7).

REFERENCES

1. Kapsali T, Permutt S, Laube B, Scichilone N, and Togias A. Potent bronchoprotective effect of deep inspiration and its absence in asthma. *J Appl Physiol* 89: 711-720, 2000.
2. Adam S, LaPrad, Thomas L, Szabo, Béla Suki, and Kenneth R. Lutchen. Tidal stretches do not modulate responsiveness of intact airways in-vitro. *J Appl Physiol* (April 29, 2010). doi:10.1152/japplphysiol.00107.2010
3. Mitchell HW, and Sparrow MP. Video-imaging of lumen narrowing; muscle shortening and flow responsiveness in isolated bronchial segments of the pig. *Eur Respir J* 7: 1317-1325, 1994.
4. Noble PB, Turner DJ, and Mitchell HW. Relationship of airway narrowing, compliance, and cartilage in isolated bronchial segments. *J Appl Physiol* 92: 1119-1124, 2002.
5. Otsu N; A threshold selection method from gray-level histograms; *IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics* 9; 62-66; 1979.
6. Bates JH; *Lung Mechanics - An Inverse Modeling Approach*; Cambridge University Press; 2009; 62-68

Author: Henrique Takachi Moriya
 Institute: Biomedical Engineering Lab. - University of São Paul
 Street: Av. Prof. Luciano Gualberto, trav.3, 158 - office D2-01
 City: São Paulo
 Country: Brazil
 Email: htmoriya@leb.usp.br