OTAVIO HENRIQUE FERREIRA LEDESMA

Dinâmica temporal da mecânica respiratória durante
teste de broncoprovocação com metacolina em *bolus*
para camundongos BALB/c e C57BL/6

São Paulo
2021

OTAVIO HENRIQUE FERREIRA LEDESMA

**Dinâmica temporal da mecânica respiratória durante
teste de broncoprovocação com metacolina em *bolus*
para camundongos BALB/c e C57BL/6**

Versão Corrigida

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

São Paulo
2021

OTAVIO HENRIQUE FERREIRA LEDESMA

**Dinâmica temporal da mecânica respiratória durante
teste de broncoprovocação com metacolina em *bolus*
para camundongos BALB/c e C57BL/6**

Versão Corrigida

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

Área de Concentração:
Engenharia Biomédica

Orientador:
Prof. Dr. Henrique Takachi Moriya

São Paulo
2021

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

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

São Paulo, 13 de julho de 2021

Assinatura do autor:

Assinatura do orientador:

Catálogo-na-publicação

Ledesma, Otavio Henrique Ferreira

Dinâmica temporal da mecânica respiratória durante teste de broncoprovocação com Metacolina em bolus para camundongos BALB/c e C57BL/6 / O. H. F. Ledesma -- versão corr. -- São Paulo, 2021.
120 p.

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

1.MODELOS ANIMAIS DE DOENÇAS 2.MODELAGEM DE DADOS
3.CURVAS DE DOSE-RESPOSTA I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia de Telecomunicações e Controle II.t.

Aos meus filhos Helena e Rodrigo.
Que mesmo sem compreender, per-
doaram minha ausência durante o
tempo em que me dediquei aos es-
tudos. Com amor e eterna gra-
tidão, dedico.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer ao professor Henrique pela oportunidade de regressar aos estudos acadêmicos e realizar sob sua excelente orientação, este trabalho científico. O qual me proporcionou grande desenvolvimento pessoal, acadêmico e profissional. Sua paciência e tranquilidade foram de suma importância na condução dos trabalhos. Assim, como foram enriquecedoras nossas conversas.

Agradeço aos meus pais, pelos incentivos e apoios constantes à minha formação, os quais fizeram com que este trabalho se tornasse realidade.

Aos meus filhos Helena e Rodrigo, pela paciência e compreensão, que me ajudaram a superar os obstáculos encontrados durante essa trajetória.

Ao professor Wothan Tavares de Lima por gentilmente disponibilizar espaço e equipamentos do Laboratório de Fisiopatologia da Inflamação Experimental do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP para realização dos experimentos.

A todos os integrantes do laboratório do professor Wothan, em especial a professora Maria Aparecida de Oliveira (*Cida*) pelo seu empenho na realização de grande parte dos experimentos e por toda a sua paciência e dedicação em fornecer dados fundamentais a este trabalho.

Aos professores da Escola Politécnica que, através das aulas ministradas de excelente qualidade, fizeram com que eu pudesse agregar conhecimento valioso à minha formação.

Também gostaria de agradecer, ao colega Renato de Lima Vitorasso pelas horas dedicadas me auxiliando e revisando meus textos científicos para publicações, que se constituíram na base deste trabalho. Suas sugestões e comentários foram enriquecedores além de conterem valiosos ensinamentos sobre diversos assuntos deste trabalho e seus conceitos.

A todos os colegas e amigos que de alguma forma me incentivaram a regressar aos estudos acadêmicos, foram poucos! Além do próprio professor Henrique agradeço em especial, ao amigo Luiz Eugênio Monteiro de Barros Júnior, que foi o grande encorajador dessa jornada! Sempre com palavras de incentivo e otimismo, mesmo quando todos diziam o contrário.

Por fim, a todos que trabalharam direta ou indiretamente para que este trabalho pudesse ser realizado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

“It is not the critic who counts; not the man who points out how the strong man stumbles, or where the doer of deeds could have done them better. The credit belongs to the man who is actually in the arena, whose face is marred by dust and sweat and blood; who strives valiantly; who errs, and comes short again and again, because there is no effort without error and shortcoming; but who does actually strive to do the deeds; who knows the great enthusiasms, the great devotions; who spends himself in a worthy cause; who at the best knows in the end the triumph of high achievement, and who at the worst, if he fails, at least fails while daring greatly, so that his place shall never be with those cold and timid souls who know neither victory nor defeat.”

(Theodore Roosevelt)

RESUMO

Em estudos experimentais de asma, os modelos murinos de doença inflamatória alérgica das vias aéreas têm sido utilizados para se elucidar os mecanismos subjacentes às respostas imunológicas da asma e para a identificação e investigação de novos meios para controlar a inflamação alérgica. No entanto, camundongos não desenvolvem asma espontaneamente. Para se investigar os processos relacionados a asma, uma reação artificial semelhante à asmática deve ser induzida nas vias aéreas. Neste estudo, o modelo de asma alérgica em camundongos empregado foi a partir do protocolo de sensibilização e desafio com uso da Ovalbumina (OVA) tanto em camundongos da linhagem *BALB/c* quanto *C57BL/6*. A avaliação da mecânica respiratória, foi realizada através da técnica de oscilações forçadas (FOT) com emprego de um ventilador mecânico para pequenos animais (SAV). O modelo ajustado para a impedância mecânica do sistema respiratório foi o modelo de fase constante (CPM), onde a impedância do sistema respiratório é descrita através de quatro parâmetros (R_n , I , G e H). O teste de broncoprovocação com Metacolina (MCh) é amplamente utilizado em ambientes clínicos e de pesquisa para medir a responsividade das vias aéreas. Para se descrever a magnitude da resposta do sistema respiratório em função da exposição ao estímulo ou agonista (MCh) após um determinado tempo de exposição, são utilizadas curvas dose-resposta. A literatura relacionada, geralmente apresenta um valor por dose, ou concentração, e avalia toda a curva com base nesses valores de pico (efeito máximo). Neste trabalho, buscou-se expandir o uso das curvas dose-resposta obtidas durante testes de broncoprovocação em camundongos para além do valor máximo dos parâmetros R_n e G . O comportamento de decaimento exponencial devido ao relaxamento do músculo liso das vias aéreas observados nos parâmetros R_n e G , após apresentarem picos iniciais que refletem a contração do músculo liso das vias aéreas induzida pelo agonista MCh, pode ser representado por curvas exponenciais decrescentes. Assim, regressões na forma de exponencial decrescente simples e curva de Richards inversa (decrescente) foram ajustadas às curvas dose-resposta dos parâmetros R_n e G para as seguintes doses de MCh: PBS, 30, 100, 300 e 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$. As regressões não lineares obtidas foram capazes de reproduzir os valores e o comportamento dos dados experimentais coletados para os parâmetros R_n e G , para as linhagens de camundongos *BALB/c* e *C57BL/6*. O modelo empregando a curva de Richards inversa resultou em um melhor ajuste aos dados experimentais para ambas as linhagens de camundongos em todas as doses do agonista MCh, sendo capaz de fornecer valores máximos de modo a distinguir entre os grupos Controle e OVA mesmo diante do descarte do valor máximo mensurado experimentalmente quando do ajuste do modelo. Constituindo-se em um método robusto e confiável. Evitando-se assim, o descarte do conjunto de dados a partir de procedimentos experimentais com camundongos, mitigando o desperdício de animais e outros recursos de acordo com os princípios dos 3Rs (do inglês: Refinement, Reduction and Replacement).

Palavras-Chave: MODELOS ANIMAIS DE DOENÇAS, MODELAGEM DE DADOS, CURVAS DE DOSE-RESPOSTA.

ABSTRACT

In experimental studies of asthma, murine models of allergic airway inflammatory disease have been used to elucidate the mechanisms underlying the immune responses of asthma and to identify and investigate new ways to control allergic inflammation. However, mice do not spontaneously develop asthma. To investigate asthma-related processes, an artificial asthma-like reaction must be induced in the mice airways. In this study, the model of allergic asthma used in mice was based on the sensitization and challenge protocol with the use of Ovalbumina (OVA) in both *BALB/c* and *C57BL/6* mice. The evaluation of respiratory mechanics was performed using forced oscillation technique (FOT) using a small animal ventilator (SAV). The model adjusted for the mechanical impedance of the respiratory system was the constant phase model (CPM), where the impedance of the respiratory system is described using four parameters (R_n , I , G and H). The bronchoprovocation challenge testing with Methacholine (MCh) is widely used in clinical and research environments to measure airway responsiveness. To describe the magnitude of the response of the respiratory system as a function of exposure to the stimulus or agonist (MCh) after a given exposure of time, dose-response curves are used. Related literature generally presents a value per dose, or concentration, and evaluates the entire curve based on these peak values (maximum effect). In this work, we sought to expand the use of dose-response curves obtained during brocoprovocation tests in mice beyond the maximum value of the parameters R_n and G . The exponential decay behavior due to airway smooth muscle relaxation observed in the parameters R_n and G , after presenting initial peaks that reflect the airway smooth muscle contraction induced by the agonist MCh, can be represented by decreasing exponential curves. Thus, regressions in the form of simple decreasing exponential and inverse Richards curve (descending) were fitted to the dose-response curves of the parameters R_n and G for the following doses of MCh: PBS, 30, 100, 300 and 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The nonlinear regressions obtained were able to reproduce the values and behavior of the experimental data collected for the parameters R_n and G , for the *BALB/c* and *C57BL/6*. The model using the inverse Richards curve resulted in a better fit to the experimental data for both strains of mice at all doses of the agonist MCh, being able to provide maximum values in order to distinguish between the Control and OVA groups even in the face of discarding the maximum value measured experimentally when adjusting the model. It is a robust and reliable method. Hence, avoiding the disposal of the dataset from experimental procedures with mice, mitigating the waste of animals and other resources according to the principles of the 3Rs (Refinement, Reduction and Replacement).

Keywords: ANIMAL DISEASE MODELS, DATA MODELING, DOSE-RESPONSE CURVES.

LISTA DE FIGURAS

- 1 Representação diagramática de: (a) Trato respiratório humano e (b) Trato respiratório de camundongo. 29
- 2 Imagens reconstruídas de tomografia computadorizada da traqueia e vias aéreas de camundongos da linhagens *C57BL/6* e *BALB/c*. As vias aéreas dos camundongos possuem padrão de ramificação monopodial com um grande brônquio principal que dá origem a vias aéreas menores. As variações da linhagem podem produzir variações significativas no tamanho e forma das vias aéreas, conforme visto pelas grandes vias aéreas bulbosas de camundongos *C57BL/6* (à esquerda) em comparação com os camundongos *BALB/c* (à direita). 31
- 3 Arranjo pulmonar monopodial de camundongos em oposição ao arranjo dicotômico encontrado em pulmões humanos. 31
- 4 Inflamação crônica das vias aéreas com espessamento do músculo liso e secreção excessiva de muco. As vias aéreas apresentam lúmen reduzido, fechado parcialmente, com produção de mais muco nos indivíduos asmáticos. 32
- 5 Informações sobre a massa corporal da linhagem *BALB/cJ* conforme apresentado pelo Laboratório Jackson dos Estados Unidos da América. 37
- 6 Informações sobre a massa corporal da linhagem *C57BL/6J* conforme apresentado pelo Laboratório Jackson dos Estados Unidos da América. 38
- 7 Curva dose-resposta em humanos normais, hiperreativos e hipersensíveis. CP_{20} representa concentração provocativa que ocasiona queda de 20% no volume expiratório forçado em um segundo (VEF_1). 41

8	Diagrama de blocos do ventilador mecânico para pequenos animais (SAV), empregado durante técnica de oscilações forçadas (FOT). Nota-se, pistão em cilindro hermeticamente fechado, cujo deslocamento é responsável pelo fluxo de ar, sendo realizado por um motor linear. Duas válvulas controlam a direção do fluxo de ar durante a respiração do animal. A válvula inspiratória conecta a saída do cilindro à traqueia do animal durante a inspiração ou ao meio ambiente durante a fase de expiração, e a válvula expiratória conecta a traqueia do animal a uma câmara com pressão controlada (PEEP) durante a fase de expiração passiva do animal. O conversor analógico-digital (A/D), converte e transmite os sinais medidos para um controlador configurado via computador. Onde P_{cil} e V_{cil} representam a pressão e o volume de ar deslocado no cilindro, respectivamente. P_{ao} é a pressão na entrada das vias aéreas do animal. P_{tr} e V_{tr} representam a pressão e o volume de ar na traqueia do animal, respectivamente.	43
9	FOT com emprego de um ventilador de pistão controlado por computador para pequenos animais (<i>flexiVent</i> , SCIREQ, Canadá) capaz de aplicar pressão positiva ao final da expiração (PEEP) e gerar perturbações de volume. Também capaz de realizar análises de sinais gerados de pressão, volume e fluxo. Onde os sinais normalmente registrados são a pressão na abertura das vias aéreas (P_{ao}), a pressão no cilindro (P_{cil}) e o volume deslocado pelo pistão (V_{cil}).	45
10	Impedância do sistema respiratório, $Z_{sr}(f)$, e suas partes reais (superior - pontos vermelhos) e imaginárias (inferior - pontos azuis) obtidas com emprego do ventilador mecânico para pequenos animais (SAV) (<i>flexiVent</i> , SCIREQ, Canadá).	46
11	Exemplo de curvas com crescimento linear, a potenciação e exponencial. . .	51
12	Digitalização da imagem original da curva logística em contraste com uma curva logarítmica (exponencial nos termos de hoje) presente no artigo <i>Recherches mathématiques sur la loi d'accroissement de la population</i> de 1845 (VERHULST, 1845).	54
13	Efeito na curva logística generalizada, também denominada curva de Richards, para cada um dos parâmetros presentes na Equação 2.14.	55

14	Formação dos grupos OVA (A) e Controle (B) para camundongos <i>BALB/c</i> através do protocolo de indução de inflamação pulmonar desenvolvido no Laboratório de Fisiopatologia da Inflamação Experimental do Departamento de Farmacologia do ICB-USP.	58
15	Formação dos grupos OVA (A) e Controle (B) para camundongos <i>C57BL/6</i> através do protocolo de indução de inflamação pulmonar desenvolvido no Laboratório de Fisiopatologia da Inflamação Experimental do Departamento de Farmacologia do ICB-USP.	59
16	Exemplo de um camundongo <i>BALB/c</i> traqueostomizado, canulação por meio de cânula metálica 18G (BD Company, Brasil) e jugular direita dissecada e conectada ao tubo flexível de PVC (PTY, Critchley Electrical Products, Austrália).	60
17	SAV (<i>flexiVent</i> v5.2, SCIREQ, Canadá) utilizado na avaliação da mecânica respiratória de roedores. Em (A) tem-se uma visão geral do SAV. Em (B) tem-se os detalhes das válvulas e sua conexão ao camundongo (<i>C57BL/6</i>).	61
18	Exemplo de impedância do sistema respiratório (Z_{sr}) para camundongo <i>BALB/c</i> mensurada a partir do sinal composto por 13 senoides de diferentes frequências presentes na perturbação ventilatória. Z_{sr} é representada pela sua parte real (R), pontos em vermelho, e imaginária (X), pontos em ciano. Os 13 valores de Z_{sr} computados para cada frequência são utilizados para ajustar o CPM (linhas vermelha e ciano).	62
19	Protocolo Experimental.	62
20	Fluxograma simplificado da regressão não linear para parâmetro R_n . Mesmo procedimento foi utilizado para o parâmetro G . O procedimento apresentado foi empregado igualmente para as duas linhagens de camundongos, <i>BALB/c</i> e <i>C57BL/6</i>	66
21	Comparação de um <i>boxplot</i> para uma distribuição quase normal e uma função de densidade de probabilidade (PDF) para uma distribuição normal. Para distribuição normal, ou quase, os <i>outliers</i> correspondem a 0,7% dos dados amostrais.	70
22	Utilização de um <i>boxplot</i> para demonstrar os cálculos dos limites que permitem identificar os dados que se apresentam como <i>outliers</i>	71

23	Contagem total de células do lavado broncoalveolar (LBA) para animais submetidos ao protocolo de sensibilização por Ovalbumina (OVA) e solução salina, PBS (Controle) referente a linhagem de camundongos, <i>BALB/c</i> . Valores apresentados conforme formato média $\pm$ SEM.	73
24	Valores dos parâmetros CPM: R_n , G e H obtidos durante avaliação da mecânica respiratório via teste de broncoprovocação em camundongos da linhagem <i>BALB/c</i> . Notar que para cada valor da dose do agonista (MCh), temos 15 pontos na curva correspondente. São as 15 perturbações efetuadas durante procedimento de FOT. Valores apresentados conforme formato média $\pm$ SEM.	74
25	Valores dos parâmetros CPM: R_n , G e H obtidos durante avaliação da mecânica respiratório via teste de broncoprovocação em camundongos da linhagem <i>C57BL/6</i> . Notar que para cada valor da dose do agonista (MCh), temos 15 pontos na curva correspondente. São as 15 perturbações efetuadas durante procedimento de FOT. Valores apresentados conforme formato média $\pm$ SEM.	75
26	Curvas ajustadas através de regressões não lineares aos valores do parâmetro R_n , em um comportamento de decaimento para cada dose do agonista MCh durante um desafio brônquico realizado em camundongo da linhagem <i>BALB/c</i> e pertencente ao grupo Controle. Os pontos referem-se aos valores mensurados através do CPM (R_{n_mens}) e as linhas sólidas são valores conforme modelos ajustados. (a) R_{n_mExp0} : modelo Exponencial sem exclusão do ponto de máximo. (b) R_{n_mExp1} : modelo Exponencial com exclusão do ponto de máximo. (c) R_{n_mSig0} : modelo da curva de Richards (curva Sigmoidal) sem exclusão do ponto de máximo. (d) R_{n_mSig1} : modelo da curva de Richards (curva Sigmoidal) com exclusão do ponto de máximo.	77

- 27 Curvas ajustadas através de regressões não lineares aos valores do parâmetro G , em um comportamento de decaimento para cada dose do agonista MCh durante um desafio brônquico realizado em camundongo da linhagem *BALB/c* e pertencente ao grupo OVA. Os pontos referem-se aos valores mensurados através do CPM (G) e as linhas sólidas são valores conforme modelos ajustados. (a) G_{mExp0} : modelo Exponencial sem exclusão do ponto de máximo. (b) G_{mExp1} : modelo Exponencial com exclusão do ponto de máximo. (c) G_{mSig0} : modelo da curva de Richards (curva Sigmoidal) sem exclusão do ponto de máximo. (d) G_{mSig1} : modelo da curva de Richards (curva Sigmoidal) com exclusão do ponto de máximo. 78
- 28 Valores máximos do parâmetro R_n por dose do agonista MCh, para valores mensurados experimentalmente via modelo de fase constante (CPM) ($R_{n.mens}$) e predito com o uso das regressões não lineares obtidas. $R_{n.mExp0}$: modelo Exponencial sem exclusão do ponto de máximo. $R_{n.mExp1}$: modelo Exponencial com exclusão do ponto de máximo. $R_{n.mSig0}$: modelo da curva de Richards sem exclusão do ponto de máximo. $R_{n.mSig1}$: modelo da curva de Richards com exclusão do ponto de máximo. Valores apresentados conforme formato média $\pm$ SEM. Para cada grupo, dose de MCh e modelo ajustado, é apresentado o número de pontos válidos considerado durante o cálculo da média. (a) camundongos da linhagem *BALB/c*. (b) camundongos da linhagem *C57BL/6*. 80
- 29 Valores máximos do parâmetro G por dose do agonista MCh, para os valores mensurados experimentalmente via CPM (G_{mens}) e predito com o uso das regressões não lineares obtidas. G_{mExp0} : modelo Exponencial sem exclusão do ponto de máximo. G_{mExp1} : modelo Exponencial com exclusão do ponto de máximo. G_{mSig0} : modelo da curva de Richards sem exclusão do ponto de máximo. G_{mSig1} : modelo da curva de Richards com exclusão do ponto de máximo. Valores apresentados conforme formato média $\pm$ SEM. Para cada grupo, dose de MCh e modelo ajustado, é apresentado o número de pontos válidos considerado durante o cálculo da média. (a) camundongos da linhagem *BALB/c*. (b) camundongos da linhagem *C57BL/6*. 81

- 30 Valores de AUC por dose do agonista MCh tanto para os valores mensurados experimentalmente via CPM ($R_{n.mens}$), quanto predito com o uso das regressões não lineares obtidas. $R_{n.mExp0}$: modelo Exponencial sem exclusão do ponto de máximo. $R_{n.mExp1}$: modelo Exponencial com exclusão do ponto de máximo. $R_{n.mSig0}$: modelo da curva de Richards sem exclusão do ponto de máximo. $R_{n.mSig1}$: modelo da curva de Richards com exclusão do ponto de máximo. Valores apresentados conforme formato média $\pm$ SEM. Para cada grupo, dose de MCh e modelo ajustado, é apresentado o número de pontos válidos considerado durante o cálculo da média. (a) camundongos da linhagem *BALB/c*. (b) camundongos da linhagem *C57BL/6*. 82
- 31 Valores de AUC por dose do agonista MCh tanto para os valores mensurados experimentalmente via CPM (G_{mens}), quanto predito com o uso das regressões não lineares obtidas. G_{mExp0} : modelo Exponencial sem exclusão do ponto de máximo. G_{mExp1} : modelo Exponencial com exclusão do ponto de máximo. G_{mSig0} : modelo da curva de Richards sem exclusão do ponto de máximo. G_{mSig1} : modelo da curva de Richards com exclusão do ponto de máximo. Valores apresentados conforme formato média $\pm$ SEM. Para cada grupo, dose de MCh e modelo ajustado, é apresentado o número de pontos válidos considerado durante o cálculo da média. (a) camundongos da linhagem *BALB/c*. (b) camundongos da linhagem *C57BL/6*. 83
- 32 Visualização da função de densidade de probabilidade (PDF), representada pela área da curva, e respectiva média (linha tracejada), permitem verificar se os conjuntos de dados experimentais do parâmetro R_n seguem a distribuição normal. Camundongos da linhagem *BALB/c*. 85
- 33 Visualização da PDF, representada pela área da curva, e respectiva média (linha tracejada), permitem verificar se os conjuntos de dados experimentais do parâmetro R_n seguem a distribuição normal. Camundongos da linhagem *C57BL/6*. 86
- 34 Diagrama Q-Q para teste de normalidade (média=0 e desvio padrão (SD)=1) para parâmetro R_n e referente a camundongos da linhagem *BALB/c*. Juntamente com resultado do teste de normalidade Shapiro-Wilk, onde valor $p > 0,05$ para conjunto de dados conforme distribuição normal. 87

35	Diagrama Q-Q para teste de normalidade (média=0 e SD=1) para parâmetro R_n e referente a camundongos da linhagem <i>C57BL/6</i> . Juntamente com resultado do teste de normalidade Shapiro-Wilk, onde valor- $p > 0,05$ para conjunto de dados conforme distribuição normal.	88
36	Visualização da PDF, representada pela área da curva, e respectiva média (linha tracejada), permitem verificar se os conjuntos de dados experimentais do parâmetro G seguem a distribuição normal. Camundongos da linhagem <i>BALB/c</i>	89
37	Visualização da PDF, representada pela área da curva, e respectiva média (linha tracejada), permitem verificar se os conjuntos de dados experimentais do parâmetro G seguem a distribuição normal. Camundongos da linhagem <i>C57BL/6</i>	90
38	Diagrama Q-Q para teste de normalidade (média=0 e SD=1) para parâmetro G e referente a camundongos da linhagem <i>BALB/c</i> . Juntamente com resultado do teste de normalidade Shapiro-Wilk, onde valor- $p > 0,05$ para conjunto de dados conforme distribuição normal.	91
39	Diagrama Q-Q para teste de normalidade (média=0 e SD=1) para parâmetro G e referente a camundongos da linhagem <i>C57BL/6</i> . Juntamente com resultado do teste de normalidade Shapiro-Wilk, onde valor- $p > 0,05$ para conjunto de dados conforme distribuição normal.	92
40	Valores máximos do parâmetro R_n para camundongos da linhagem <i>BALB/c</i> por dose do agonista MCh, tanto para os valores mensurados experimentalmente via CPM ($R_{n.mens}$), quanto para valores preditos com o uso das regressões exponenciais ($R_{n.mExp0}$ e $R_{n.mExp1}$) e regressões com curva de Richards ($R_{n.mSig0}$ e $R_{n.mSig1}$). Valores apresentados conforme formato média $\pm$ SEM. Para cada grupo, dose de MCh e modelo ajustado, é apresentado o resultado das comparações múltiplas da significância estatística e pós teste de significância dos pares, com referência ao valor de R_n mensurado experimentalmente ($R_{n.mens}$). (<i>ns</i>) não significativo; (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$	95

- 41 Valores máximos do parâmetro R_n para camundongos da linhagem *C57BL/6* por dose do agonista MCh, tanto para os valores mensurados experimentalmente via CPM ($R_{n.mens}$), quanto valores preditos com o uso das regressões exponenciais ($R_{n.mExp0}$ e $R_{n.mExp1}$) e regressões para curva de Richards ($R_{n.mSig0}$ e $R_{n.mSig1}$). Valores apresentados conforme formato média $\pm$ SEM. Para cada grupo, dose de MCh e modelo ajustado, é apresentado o resultado das comparações múltiplas da significância estatística e pós teste de significância dos pares, com referência ao valor de R_n mensurado experimentalmente ($R_{n.mens}$). (*ns*) não significativo; (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$ 96
- 42 Valores máximos do parâmetro G para camundongos da linhagem *BALB/c* por dose do agonista MCh. tanto para os valores mensurados experimentalmente via CPM (G_{mens}), quanto valores preditos com o uso das regressões exponenciais (G_{mExp0} e G_{mExp1}), e regressões para curva de Richards (G_{mSig0} e G_{mSig1}). Valores apresentados conforme formato média $\pm$ SEM. Para cada grupo, dose de MCh e modelo ajustado, é apresentado o resultado das comparações múltiplas da significância estatística e pós teste de significância dos pares, com referência ao valor de G mensurado experimentalmente (G_{mens}). (*ns*) não significativo; (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$ 97
- 43 Valores máximos do parâmetro G para camundongos da linhagem *C57BL/6* por dose do agonista MCh, tanto para os valores mensurados experimentalmente via CPM (G_{mens}), quanto valores preditos com o uso das regressões exponenciais (G_{mExp0} e G_{mExp1}) e regressões para curva de Richards, G_{mSig0} e G_{mSig1} . Valores apresentados conforme formato média $\pm$ SEM. Para cada grupo, dose de MCh e modelo ajustado, é apresentado o resultado das comparações múltiplas da significância estatística e pós teste de significância dos pares, com referência ao valor de G mensurado experimentalmente (G_{mens}). (*ns*) não significativo; (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$. . 98

- 44 Valores da AUC para camundongos da linhagem *BALB/c* por dose do agonista MCh, tanto para os valores mensurados experimentalmente via CPM ($R_{n.mens}$), quanto valores preditos com o uso das regressões exponenciais ($R_{n.mExp0}$ e $R_{n.mExp1}$), e regressões para curva de Richards ($R_{n.mSig0}$ e $R_{n.mSig1}$). Valores apresentados conforme formato média $\pm$ SEM. Para cada grupo, dose de MCh e modelo ajustado, é apresentado o resultado das comparações múltiplas da significância estatística e pós teste de significância dos pares, com referência ao valor de AUC a partir dos dados mensurados experimentalmente ($R_{n.mens}$). (*ns*) não significativo; (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$ 99
- 45 Valores da AUC para camundongos da linhagem *C57BL/6* por dose do agonista MCh, tanto para os valores mensurados experimentalmente via CPM ($R_{n.mens}$), quanto valores preditos com o uso das regressões exponenciais ($R_{n.mExp0}$ e $R_{n.mExp1}$) e regressões para curva de Richards ($R_{n.mSig0}$ e $R_{n.mSig1}$). Valores apresentados conforme formato média $\pm$ SEM. Para cada grupo, dose de MCh e modelo ajustado, é apresentado o resultado das comparações múltiplas da significância estatística e pós teste de significância dos pares, com referência ao valor de AUC a partir dos dados mensurados experimentalmente ($R_{n.mens}$). (*ns*) não significativo; (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$ 100
- 46 Valores da AUC para camundongos da linhagem *BALB/c* por dose do agonista MCh, tanto para os valores mensurados experimentalmente via CPM (G_{mens}), quanto valores preditos com o uso das regressões exponenciais (G_{mExp0} e G_{mExp1}) e regressões para curva de Richards, (G_{mSig0} e G_{mSig1}). Valores apresentados conforme formato média $\pm$ SEM. Para cada grupo, dose de MCh e modelo ajustado, é apresentado o resultado das comparações múltiplas da significância estatística e pós teste de significância dos pares, com referência ao valor de AUC a partir dos dados mensurados experimentalmente (G_{mens}). (*ns*) não significativo; (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$ 101

- 47 Valores da AUC para camundongos da linhagem *C57BL/6* por dose do agonista MCh, tanto para os valores mensurados experimentalmente via CPM (G_{mens}), quanto valores preditos com o uso das regressões exponenciais (G_{mExp0} e G_{mExp1}) e regressões para curva de Richards (G_{mSig0} e G_{mSig1}). Valores apresentados conforme formato média $\pm$ SEM. Para cada grupo, dose de MCh e modelo ajustado, é apresentado o resultado das comparações múltiplas da significância estatística e pós teste de significância dos pares, com referência ao valor de AUC a partir dos dados mensurados experimentalmente (G_{mens}). (*ns*) *não significativo*; (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$ 102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α caracteriza as propriedades histeréticas dos tecidos respiratórios conforme modelo de fase constante

μg Micrograma

ACh Acetilcolina

$\text{Al}(\text{OH})_3$ Hidróxido de alumínio

AUC Área Sob a Curva (do inglês *Area Under the Curve*)

CEUA Comissão de Ética no Uso de Animais

COD Coeficiente de Determinação

CP₂₀ Concentração de provocação para queda de 20% no volume expiratório forçado em um segundo

CPM Modelo de Fase Constante (do inglês *Constant Phase Model*)

DP₂₀ Dose de provocação para queda de 20% no volume expiratório forçado em um segundo

FOT Técnica de Oscilações Forçadas (do inglês *Forced Oscillation Technique*)

G Viscância do tecido pulmonar no modelo de fase constante

G_s α Subunidade alfa da proteína G estimulatória

g Grama

H Elastância do tecido pulmonar no modelo de fase constante

HRB Hiperresponsividade Brônquica

I Inertância dos gases nas vias aéreas no modelo de fase constante

ICB-USP Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

I_gE Imunoglobulina E

IQR Intervalo Interquartil (do inglês *Interquartile Range*)

i.p. Intraperitoneal

kg Quilograma

LBA Lavado Broncoalveolar (do inglês *Bronchoalveolar Lavage*)

MCh Metacolina

mg Miligrama

mL Mililitro

OVA Ovalbumina

P_{ao} Pressão na abertura/entrada das vias aéreas do animal

PBS Solução Salina Tampão Fosfato (do inglês *Phosphate-Buffered Saline*)

P_{cil} Pressão do ar no cilindro do ventilador mecânico para pequenos animais

PDF Função de Densidade de Probabilidade (do inglês *Probability Density Function*)

PEEP Pressão Positiva ao Final da Expiração (do inglês *Positive End-Expiratory Pressure*)

PPGEE Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica

P_{tr} Pressão do ar na traqueia do animal

R_n Resistência Newtoniana das vias aéreas no modelo de fase constante

SAV Ventilador Mecânico para Pequenos Animais (do inglês *Small Animal Ventilator*)

SBCAL Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório

SD Desvio Padrão (do inglês *Standard Deviation*)

SEM Erro Padrão da Média (do inglês *Standard Error of Mean*)

SSR Soma dos Resíduos Quadrados (do inglês *Sum of the Squared Residuals*)

SST Soma Total dos Quadrados (do inglês *Total Sum of Squares*)

s.c. Subcutânea

T_H1 Células T Auxiliares (helper) tipo 1

T_H2 Células T Auxiliares (helper) tipo 2

USP Universidade de São Paulo

V_{cil} Volume do ar deslocado no cilindro do ventilador mecânico para pequenos animais

VEF₁ Volume expiratório forçado em um segundo

V_{tr} Volume do ar na traqueia do animal

Z Impedância

Z_{sr} Impedância do sistema respiratório

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	Objetivos	24
1.1.1	Objetivo principal	24
1.1.2	Objetivos secundários	24
1.2	Justificativas	24
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1	Mecânica respiratória	27
2.2	Modelo animal de asma	32
2.2.1	Camundongos <i>BALB/c</i>	35
2.2.2	Camundongos <i>C57BL/6</i>	37
2.3	Broncoprovocação com Metacolina (MCh)	38
2.3.1	Dose-resposta	40
2.3.2	Asma e Hiperreatividade Brônquica	40
2.4	Técnica de oscilações forçadas (FOT)	41
2.5	Modelo de fase constante (CPM)	46
2.6	Decaimento exponencial	49
3	MATERIAL E MÉTODOS	56
3.1	Procedimento Experimental	56
3.1.1	Animais de experimentação	56
3.1.2	Indução da inflamação pulmonar crônica com sensibilização por Ovalbumina (OVA)	57
3.1.3	Preparação dos animais	59

3.1.4	Avaliação da mecânica respiratória	60
3.1.5	Lavado broncoalveolar (LBA)	63
3.2	Coeficiente de Determinação (<i>COD</i>)	63
3.3	Regressão não linear	64
3.4	Análise dos dados	68
3.4.1	Área Sob a Curva (AUC)	68
3.4.2	Análise de <i>outliers</i>	69
4	RESULTADOS	72
4.1	Caracterização dos grupos de camundongos	72
4.2	Dinâmica da mecânica respiratória	73
4.3	Regressões não lineares	76
4.3.1	Valores máximos dos parâmetros R_n e G	79
4.3.2	Área Sob a Curva (AUC) dos parâmetros R_n e G	79
4.4	Estudo de normalidade dos valores experimentais	84
4.4.1	Resistência Newtoniana (R_n)	84
4.4.2	Viscância (G)	84
4.5	Testes estatísticos não paramétricos	93
4.5.1	Teste não paramétrico para valores máximos dos parâmetros R_n e G	93
4.5.2	Teste não paramétrico para AUC dos parâmetros R_n e G	94
5	DISCUSSÃO	103
6	CONCLUSÃO	112
	REFERÊNCIAS¹	114

1 INTRODUÇÃO

Este manuscrito apresenta os estudos realizados como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências na área de concentração em Engenharia Biomédica do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica (PPGEE) da Universidade de São Paulo (USP). Esta dissertação baseia-se na avaliação das propriedades mecânicas do sistema respiratório de camundongos das linhagens *BALB/c* e *C57BL/6*.

A avaliação das anomalias da mecânica pulmonar permite o diagnóstico de doenças pulmonares. Também é de capital importância para áreas da ciência básica como a farmacologia e imunologia pulmonar (BATES, 2009).

Estudos utilizando animais contribuem para a compreensão atual do funcionamento do pulmão saudável e dos mecanismos de doença pulmonar. As vantagens do uso de camundongos incluem um sistema imunológico bem conhecido, um ciclo reprodutivo curto, um genoma bem caracterizado, a vasta gama de reagentes disponíveis, o advento da tecnologia transgênica e fatores econômicos (MARQUÉS-GARCÍA; MARCOS-VADILLO, 2016; NIALS; UDDIN, 2008; DAUBEUF; FROSSARD, 2013).

Uma prática muito comum na literatura associada à avaliação da mecânica respiratória é o desafio do sistema, a fim de evidenciar diferenças potenciais. O teste de broncoprovocação com agonista Metacolina (MCh) é amplamente utilizado em ambientes clínicos e de pesquisa para medir a responsividade direta das vias aéreas (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 1999; BROOKS et al., 1990; HOPP et al., 1987).

A MCh assim como a Acetilcolina (ACh) atua diretamente nos receptores muscarínicos no músculo liso das vias aéreas. A contração do músculo liso das vias aéreas estreita as vias aéreas condutoras, resultando em broncoconstrição, o que diminui o volume das vias aéreas condutoras e aumenta a resistência ao fluxo de ar. Além disso, as glândulas da mucosa traqueobrônquica são estimuladas à secreção de muco (FRYER; CHRISTOPOULOS; NATHANSON, 2012).

Logo, a MCh é muito utilizada para se diagnosticar hiper-reatividade brônquica, que

é a principal característica da asma (BORGES; FERRAZ; VIANNA, 2011). Quando este agonista é administrado no aparelho respiratório, por via inalatória ou intravenosa, leva à contração da musculatura lisa dos brônquios e bronquíolos, ou seja, broncoconstrição (PETÁK et al., 1997; JONASSON et al., 2009), aumentando assim os valores da impedância das vias aéreas do sistema respiratório.

Neste trabalho, a mecânica respiratória foi avaliada através da impedância de entrada apresentada pelo sistema respiratório, a qual relaciona a pressão de ar na entrada das vias aéreas com o fluxo de ar imposto ao animal proveniente de um ventilador mecânico para pequenos animais (SAV) (legacy *flexiVent*, SCIREQ, Canadá), durante perturbações volumétricas realizadas sob ventilação mecânica deste mesmo SAV.

Modelos matemáticos são amplamente utilizados na caracterização das propriedades mecânicas do sistema respiratório. Um desses modelos, conhecido por modelo de fase constante (CPM) (HANTOS et al., 1987; BATES, 2009) representa a impedância do sistema respiratório através de quatro parâmetros (R_n , I , G e H), sendo que dois deles (R_n e G) foram objeto de estudos detalhados nesta dissertação.

Para se descrever a magnitude da resposta do sistema respiratório do camundongo em função da exposição ao estímulo ou agonista (MCh) após um determinado intervalo de tempo de exposição, são utilizadas curvas dose-resposta. As curvas dose-resposta são, basicamente, a avaliação da resposta a um fármaco, após a aplicação de várias concentrações do mesmo. Essa avaliação é comum em farmacologia (HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 2005; KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2012). Constituindo-se em importante ferramenta nos estudos da mecânica respiratória (MCGOVERN et al., 2013).

São algumas das características que podem ser estudadas sob tal abordagem, a modelagem do efeito; o efeito máximo; a inclinação da curva; a concentração relacionada à metade do efeito (EC_{50}) (HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 2005; KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2012). A literatura relacionada a esse assunto geralmente apresenta um valor por dose, ou concentração, e avalia toda a curva com base nesses valores de pico (LEIGH et al., 2002; LÖTVALL; INMAN; O'BYRNE, 1998). Dessa forma, neste trabalho se busca expandir o uso das curvas dose-resposta obtidas durante testes de broncoprovocação em camundongos para além do valor máximo ou (efeito máximo) dos parâmetros CPM: R_n e G .

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo principal

O presente trabalho tem como objetivo ampliar a avaliação da mecânica respiratória para além das análises usuais realizadas apenas com valores médios ou de pico dos parâmetros que modelam a impedância do sistema respiratório. Para tanto, curvas exponenciais em decaimento foram ajustados às curvas dose-resposta de dois dos principais parâmetros da impedância de entrada do sistema respiratório (R_n e G) quando modelados pelo CPM. Com isso, os valores de máximo ou pico podem ser estimados mesmo no descarte do valor de pico por baixa qualidade do ajuste do CPM.

1.1.2 Objetivos secundários

Mitigar o desperdício de animais e outros recursos no curso de procedimentos experimentais de acordo com os princípios 3Rs (do inglês: Refinement, Reduction and Replacement) (GUHAD, 2005; HOVELL, 2013).

1.2 Justificativas

Dado que medições referentes a mecânica respiratória em humanos são importantes para a avaliação e diagnóstico de asma. A otimização e aperfeiçoamento de medições em camundongos pode ser benéfica. Uma vez que, pode propiciar uma melhor tradução clínica em humanos. Apesar das diferenças nas técnicas de medição, a avaliação da mecânica respiratória é baseada em princípios fisiológicos que se aplicam a todas as espécies. Assim, a avaliação da mecânica respiratória em camundongos é traduzível para humanos, apesar da incapacidade de se comparar quantitativamente as duas (WALKER; KRAFT; FISHER, 2013).

A avaliação das funções do sistema respiratório, especialmente a avaliação da mecânica respiratória, é tipicamente feita no contexto de um modelo de impedância mecânica do sistema respiratório (IRVIN; BATES, 2003).

A impedância respiratória pode ser modelada de acordo com o CPM, proposto pela primeira vez em 1987 (HANTOS et al., 1987). O modelo proposto é ajustado para a impedância de entrada do sistema respiratório, calculada por meio de regressão linear múltipla (BATES, 2009; MORIYA; MORAES; BATES, 2003).

A impedância de entrada do sistema respiratório dada pelo CPM é ajustado por meio de quatro parâmetros (Equação 2.8): R_n (Resistência Newtoniana das vias aéreas que dissipa energia em fase com fluxo), I (Inertância das vias aéreas), H (Elastância, relacionada à energia armazenada no tecido) e G (Viscância, relacionada à dissipação de energia do tecido).

O modelo ajustado está sujeito a um critério de aceitação que indica a qualidade do ajuste do modelo aos dados mensurados experimentalmente. Portanto, este coeficiente de determinação (COD), que pode ser obtido para cada valor do conjunto de dados experimentais, assume grande importância na avaliação do modelo.

O uso do COD como método de avaliação do ajuste do modelo CPM implica que valores dos principais parâmetros CPM podem ser invalidados ou rejeitados devido a um valor baixo ou insuficiente de COD . Pois, isso indica um ajuste inadequado do modelo (BATES, 2009).

A avaliação do decaimento ou do comportamento exponencial da curva dose-resposta (PELEG, 1997) e do ajuste exponencial a uma curva pressão-volume (SALAZAR; KNOWLES, 1964) são tópicos bem descritos na literatura. Portanto, o comportamento de decaimento exponencial devido ao relaxamento do músculo liso das vias aéreas observados nos parâmetros R_n e G , após apresentarem picos iniciais que refletem a contração do músculo liso das vias aéreas induzida pelo agonista MCh (BATES, 2009; GUYTON; HALL, 2011), pode ser representado por curvas exponenciais decrescentes.

Assim, regressões não lineares na forma de exponencial decrescente simples e curva de Richards inversa (decrescente) foram ajustadas as curvas dose-resposta dos parâmetros R_n e G durante o teste de broncoprovocação. Com isso os valores dos parâmetros R_n e G podem ser estimados através dos modelos obtidos com uso de regressões não lineares. Consequentemente, os valores de pico destes parâmetros, R_n e G , podem ser estimados mesmo na presença de eventuais imprecisões em suas medições, como um ajuste insatisfatório do CPM com baixo valor de COD .

A existência de uma metodologia eficiente e confiável na análise dos parâmetros R_n e G contribui para melhoria da avaliação da mecânica respiratória em camundongos e reduz o desperdício de animais e outros recursos de acordo com os princípios 3Rs (do inglês: Refinement, Reduction and Replacement), Refinamento, Redução e Substituição.

Dado que sob a filosofia 3Rs, pesquisadores biomédicos estabeleceram metas para desenvolver um código de ética que atinja seus objetivos científicos, ao mesmo tempo em que minimiza o desconforto animal por meio de procedimentos humanos e cuidados com

os animais, reduzindo o número de animais usados e, em alguns casos, não usando animais em pesquisa (GUHAD, 2005; HOVELL, 2013).

2 REVISÃO DE LITERATURA

Neste capítulo são apresentados os principais tópicos que embasam não só a metodologia utilizada durante este trabalho, mas também que fundamentam as construções teóricas utilizadas na análise e na validação dos resultados contidos neste trabalho. Inicialmente, são apresentados os tópicos pertinentes a mecânica respiratória com um breve comparativo da anatomia e da fisiologia do sistema respiratório de camundongos e humanos. A seguir, são apresentados os tópicos referentes ao modelo de inflamação pulmonar em murinos, com foco nos camundongos *BALB/c* e *C57BL/6*, tópicos de farmacologia tais como broncoconstritores e curvas dose-resposta, avaliação da mecânica respiratória com emprego do ventilador mecânico para pequenos animais (SAV) como instrumento para técnica de oscilações forçadas (FOT). Por fim, modelos matemáticos como o modelo de fase constante (CPM) e regressões não lineares.

2.1 Mecânica respiratória

Energia é essencial para sustentar as atividades celulares de suporte à vida, as células do corpo precisam de um suprimento contínuo de oxigênio (O_2) para manter suas reações químicas geradoras de energia (SHERWOOD, 2013). Assim, a atividade mais básica do sistema respiratório é fornecer oxigênio para as necessidades metabólicas e remover o dióxido de carbono (WAITE; FINE, 2007).

A respiração é essencialmente um processo mecânico em que os músculos do tórax e do abdômen, trabalhando juntos sob o controle do cérebro, produzem as pressões necessárias para expandir o pulmão de modo que o ar do ambiente seja sugado para ele (BATES, 2009). Assim, o ar entra no pulmão em resposta à geração de uma pressão intratorácica negativa na ventilação normal (MACKENZIE, 2008). Todas as pressões no sistema respiratório são relativas à pressão atmosférica.

Existem duas fases na ventilação, inspiração e expiração. Durante cada fase, o corpo muda as dimensões dos pulmões para produzir um fluxo de ar para dentro ou para fora

dos pulmões. As propriedades mecânicas do sistema respiratório determinam, portanto, como as pressões musculares, os fluxos das vias aéreas e os volumes pulmonares estão relacionados.

Durante a expiração não forçada, a elasticidade dos pulmões e da parede torácica ajuda a fornecer a energia armazenada de forma que o trabalho do diafragma não seja necessário. A energia armazenada nesses tecidos elásticos pode ser parcialmente recuperada durante a expiração. No entanto, o trabalho realizado para superar a resistência ao fluxo de ar não pode ser recuperado (WAITE; FINE, 2007). Trata-se portanto, de energia dissipada.

Em humanos, o ritmo da ventilação é controlado pelo centro respiratório, que está localizado principalmente na medula oblonga do tronco encefálico. Isso faz parte do sistema autônomo e, como tal, não é controlado voluntariamente. Embora se possa aumentar ou diminuir a taxa de respiração voluntariamente, isso envolve uma parte diferente do cérebro.

Humanos e camundongos apresentam diferenças anatômicas e fisiológicas em seus sistemas respiratórios. No entanto, ambos apresentam o mesmo propósito e, portanto, algumas semelhanças. O sistema respiratório humano, assim como o do camundongo, inclui dois pulmões, traqueia, brônquios, bronquíolos, alvéolos e seus vasos sanguíneos associados. Esses componentes são mostrados na Figura 1.

Em ambas as espécies, humanos e camundongos, a traqueia é uma estrutura de anéis cartilagosos incompletos, semelhantes em número: entre 15 a 18 em camundongos e 15 a 20 em humanos. Anéis cartilagosos em forma de *U* sustentam a traqueia humana. Para os camundongos, os anéis da traqueia apresentam um aspecto mais aberto em formato de *C*. Nessas espécies, a traqueia termina acima do coração na carina, onde se bifurca e dá origem aos brônquios principais direito e esquerdo (TREUTING; DINTZIS; MONTINE, 2018).

Em humanos o ar entra no sistema respiratório pela boca ou nariz. Os camundongos são respiradores nasais obrigatórios. A respiração nasal possui prevalência em humanos, pois está associada à maior remoção de partículas (pelos pêlos nasais e conchas cheias de muco) (MACKENZIE, 2008). Depois de filtrado e aquecido, o ar passa pela faringe e laringe. Em seguida, ele entra na traqueia de onde passa para a árvore brônquica.

Em humanos, existem três gerações de brônquios e aproximadamente treze gerações de bronquíolos, sendo a última geração conhecida como bronquíolos terminais (WAITE; FINE, 2007). Agrupados nas extremidades dos bronquíolos terminais estão os alvéolos. Além disso, é nessa região alveolada do pulmão que ocorre a troca gasosa. Já as vias

Figura 1 – Representação diagramática de: (a) Trato respiratório humano e (b) Trato respiratório de camundongo.

Fonte: Adaptado de (HARKEMA; NIKULA; HASCHEK, 2015)

aéreas condutoras não contêm alvéolos e, portanto, não participam das trocas gasosas.

Como em humanos, existem cinco lóbulos no pulmão direito do camundongo, mas, ao contrário do humano, o camundongo tem apenas um único lobo no pulmão esquerdo. Os alvéolos do pulmão do camundongo são proporcionalmente menores que os do humano. Duas outras características significativas do pulmão de camundongo são a espessura do epitélio respiratório e o lúmen das vias aéreas relativamente grande. Especula-se que esse grande calibre das vias aéreas reduza a carga resistiva ao fluxo que resultaria da taxa respiratória rápida (250–350 bpm) exigida pelo camundongo para manter a temperatura corporal (IRVIN; BATES, 2003).

As vias aéreas dos camundongos possuem padrão de ramificação monopodial com um grande brônquio principal que dá origem a vias aéreas menores (Figura 2), enquanto os humanos têm ramificações dicotômicas (Figura 3). As vias aéreas intrapulmonares em camundongos não têm cartilagem e glândulas submucosas e, portanto, são estrutural e funcionalmente semelhantes aos bronquíolos humanos. No entanto, em camundongos, o bronquíolo respiratório não está bem desenvolvido. Assim, o segmento anatômico inicial do ácino de camundongo é o ducto alveolar ou um bronquíolo respiratório diminuto. Em humanos, os bronquíolos terminais tornam-se bronquíolos respiratórios que dão origem a 2–11 ductos alveolares, dos quais derivam aproximadamente seis sacos alveolares. Os alvéolos revestem a parede dos sacos alveolares e representam a extremidade terminal do sistema respiratório.

Figura 2 – Imagens reconstruídas de tomografia computadorizada da traqueia e vias aéreas de camundongos da linhagem *C57BL/6* e *BALB/c*. As vias aéreas dos camundongos possuem padrão de ramificação monopodial com um grande brônquio principal que dá origem a vias aéreas menores. As variações da linhagem podem produzir variações significativas no tamanho e forma das vias aéreas, conforme visto pelas grandes vias aéreas bulbosas de camundongos *C57BL/6* (à esquerda) em comparação com os camundongos *BALB/c* (à direita).

Fonte: Adaptado de (TREUTING; DINTZIS; MONTINE, 2018).

Figura 3 – Arranjo pulmonar monopodial de camundongos em oposição ao arranjo dicotômico encontrado em pulmões humanos.

Fonte: Adaptado de (WYLIE et al., 2018)

2.2 Modelo animal de asma

A asma é uma doença complexa e heterogênea, caracterizada por inflamação crônica das vias aéreas, hiper-responsividade e sintomas recorrentes, como espirros, tosse e dificuldade respiratória. Além disso, são observadas alterações estruturais nas vias aéreas, incluindo fibrose subepitelial e da parede das vias aéreas, hiperplasia e/ou metaplasia de células caliciformes, espessamento do músculo liso, secreção excessiva de muco e aumento da vascularização (Figura 4) (MARQUÉS-GARCÍA; MARCOS-VADILLO, 2016; NIALS; UDDIN, 2008; DAUBEUF; FROSSARD, 2013).

Figura 4 – Inflamação crônica das vias aéreas com espessamento do músculo liso e secreção excessiva de muco. As vias aéreas apresentam lúmen reduzido, fechado parcialmente, com produção de mais muco nos indivíduos asmáticos.

Fonte: Adaptado de (GANDY; GRAYSON; KODAT, 2017)

Apesar de essencialmente observada em seres humanos, os processos celulares e bioquímicos exatos subjacentes à inflamação crônica e às alterações estruturais nas vias aéreas ainda não são totalmente compreendidos (MARQUÉS-GARCÍA; MARCOS-VADILLO, 2016; NIALS; UDDIN, 2008). Logo, os modelos animais fornecem uma alternativa para se investigar os mecanismos e progressão da doença (NIALS; UDDIN, 2008), assim como permitem o estudo de novas terapias medicamentosas.

Como a asma é uma doença multifatorial complexa, é improvável que um único modelo animal de asma replique todas as características morfológicas e funcionais da doença em humanos venha a ser desenvolvido. No entanto, usa-se animais para modelar características específicas da doença, e muito do conhecimento atual dos processos da doença (asma), e em particular a resposta aos alérgenos, vem de estudos em animais

de laboratório, como ratos, camundongos e porquinhos-da-índia (MARQUÉS-GARCÍA; MARCOS-VADILLO, 2016; NIALS; UDDIN, 2008).

O camundongo é hoje a espécie mais utilizada. Não só por razões científicas, mas econômicas também. Existem camundongos disponíveis comercialmente que permitem a realização de estudos referente à inflamação alérgica. Além disso, devido ao seu pequeno tamanho e fácil manuseio, muitos camundongos podem ser mantidos em áreas também pequenas (MARQUÉS-GARCÍA; MARCOS-VADILLO, 2016).

Camundongos possuem um ciclo de vida curto. Seu período de gestação é de 21 dias que facilita a aquisição rápida de animais para experimentos. Neste curto período, tem ninhadas grandes (6-8 camundongos) que rapidamente fornecem muitos animais. Possui a vantagem de atingir a maturidade sexual em um período de tempo relativamente curto (6–8 semanas) (MARQUÉS-GARCÍA; MARCOS-VADILLO, 2016).

Além das razões econômicas elencadas acima, o emprego de camundongos em modelos animais de asma se dá também pelo amplo conhecimento que se possui de múltiplos estudos genéticos realizados anteriormente com camundongos, bem como à facilidade de manuseio para a geração de animais transgênicos. Camundongos são o modelo mais usado em várias doenças humanas. Com relação às doenças alérgicas, esses animais são facilmente sensibilizados (NIALS; UDDIN, 2008; MARQUÉS-GARCÍA; MARCOS-VADILLO, 2016).

Os camundongos não desenvolvem asma espontaneamente. Portanto, para investigar os processos subjacentes a essa doença, uma reação artificial semelhante à asmática deve ser induzida nas vias aéreas. Modelos de camundongo para resposta alérgica aguda a alérgenos inalados têm sido amplamente usados para elucidar os mecanismos subjacentes às respostas imunológicas e inflamatórias na asma e para a identificação e investigação de novos meios para controlar a inflamação alérgica (MARQUÉS-GARCÍA; MARCOS-VADILLO, 2016; NIALS; UDDIN, 2008; DAUBEUF; FROSSARD, 2013).

Uma variedade de diferentes modelos de asma alérgica aguda foi desenvolvida em camundongos e uma série de protocolos de sensibilização e desafio foram empregados. Ovalbumina (OVA) derivada de ovo de galinha é o alérgeno usado com mais frequência, uma vez que induz inflamação brônquica alérgica, particularmente no que se refere a uma resposta alérgica aguda. Modelos de inflamação brônquica alérgica a partir da sensibilização por OVA reproduzem muitas características da asma clínica e são úteis para identificar novos agentes terapêuticos (MARQUÉS-GARCÍA; MARCOS-VADILLO, 2016; NIALS; UDDIN, 2008; DAUBEUF; FROSSARD, 2013).

Em geral, os protocolos de sensibilização aguda requerem administração sistêmica múltipla do alérgeno na presença de um adjuvante. Adjuvantes como o hidróxido de alumínio, $Al(OH)_3$, são conhecidos por promover o desenvolvimento de fenótipo T_H2 pelo sistema imunológico quando exposto a um antígeno, que é necessário para um modelo de asma aguda. Além disso, esses protocolos requerem vários desafios de OVA das vias aéreas administrados por aerossol ou por via intranasal (DAUBEUF; FROSSARD, 2013; MARQUÉS-GARCÍA; MARCOS-VADILLO, 2016; NIALS; UDDIN, 2008).

Modelos de asma alérgica aguda são geralmente aplicados nas linhagens *BALB/c*, *C57BL/6* e *A/J* com sucesso para estudos de desafio de alérgeno e desenvolvimento de características de asma. As linhagens de camundongos mais comumente utilizadas para inflamação brônquica alérgica são as linhagens *BALB/c* e *C57BL/6*, pois a resposta imune é bem caracterizada. A resposta *BALB/c* ocorre via células T auxiliares (helper) tipo 2 (T_H2), que normalmente induz parâmetros alérgicos, como produção de imunoglobulina E (I_gE), hiperresponsividade brônquica (HRB) e inflamação eosinofílica das vias aéreas. No entanto, a linhagem *C57BL/6* apresenta certa limitação no desenvolvimento de resposta alérgica das vias aéreas porque a resposta imune ocorre via células T auxiliares (helper) tipo 1 (T_H1) (NIALS; UDDIN, 2008; MARQUÉS-GARCÍA; MARCOS-VADILLO, 2016; DAUBEUF; FROSSARD, 2013).

Modelos de asma alérgica aguda têm sido usados com sucesso para investigar processos de doenças, em particular a relação entre células e mediadores inflamatórios, e como eles orquestram os processos inflamatórios no pulmão. As evidências que sustentam a hipótese de que a asma é uma doença mediada por T_H2 , o papel das células *T* na resposta alérgica e o papel dos eosinófilos e seu envolvimento no desenvolvimento de HRB vieram de estudos em modelos de asma alérgica aguda em animais (NIALS; UDDIN, 2008).

Porém, embora os modelos de asma alérgica aguda tenham sido úteis para se investigar o processo subjacente à inflamação aguda das vias aéreas e HRB, há preocupações relacionadas à adequação dos modelos de asma alérgica aguda para a investigação de processos de doença associados à asma crônica e avaliação de novos tratamentos potenciais que podem desacelerar ou reverter as alterações da inflamação e remodelação das vias aéreas e seu efeito na função pulmonar (NIALS; UDDIN, 2008).

Com o intuito de se abordar algumas das questões associadas aos modelos de asma alérgica, grupos de pesquisa investigaram a exposição crônica a alérgenos em camundongos. Os objetivos principais foram os de se reproduzir mais características da asma clínica, como remodelação das vias aéreas e HRB persistente, e permitir que novas terapias fossem

avaliadas em um ambiente terapêutico em vez de profilático (NIALS; UDDIN, 2008).

Os modelos de asma crônica de alérgeno envolvem a exposição repetida das vias aéreas a baixos níveis de alérgeno por períodos de até 12 semanas. Diferentes alérgenos têm sido empregados e a co-administração de um adjuvante nem sempre é necessária. A maioria dos estudos referentes aos modelos de asma crônica são realizados com camundongos da linhagem *BALB/c* (NIALS; UDDIN, 2008).

A exposição crônica ao alérgeno em camundongos demonstrou reproduzir algumas das características da asma humana, incluindo a sensibilização dependente de alérgeno, uma inflamação alérgica dependente de T_H2 caracterizada por influxo eosinofílico na mucosa das vias aéreas e HRB. Além disso, em alguns modelos, há evidências de remodelamento das vias aéreas com hiperplasia de células caliciformes, hipertrofia epitelial e fibrose subepitelial ou peribronquiolar (NIALS; UDDIN, 2008).

Existem limitações associadas aos modelos crônicos. Em alguns casos, são observadas características peculiares ao camundongo que não são vistas na asma humana. Por exemplo, no camundongo, a inflamação não se restringe às vias aéreas condutoras, ao passo que em humanos sim, e são observadas inflamação e/ou remodelação do parênquima pulmonar e vascular (NIALS; UDDIN, 2008).

Apesar das vantagens dos modelos animais para o estudo da asma, eles também apresentam limitações que não devem ser esquecidas. Essas limitações devem ser sempre levadas em consideração antes da escolha do modelo devido à influência que pode ter nos resultados obtidos. As limitações referem-se à extrapolação de dados para humanos, adjuvantes utilizados, cronicidade da doença ou diferenças anatômicas, entre outros (MARQUÉS-GARCÍA; MARCOS-VADILLO, 2016; NIALS; UDDIN, 2008).

2.2.1 Camundongos *BALB/c*

O camundongo foi usado pela primeira vez em pesquisas imunológicas por Paul Ehrlich em 1891, em uma série de experimentos sobre a transferência materna de imunidade antitóxica. Mais tarde, em 1913, Halsey Bagg adquiriu um estoque de camundongos albinos de um distribuidor comercial e os usou em uma série de experimentos de aprendizagem. Halsey Bagg começou a criar uma linhagem com *pedigree* desses camundongos que foram posteriormente denominados Bagg Albino. Embora Halsey Bagg não seja considerado o iniciador das linhagens consanguíneas de camundongos, seu estoque desempenhou um papel indiscutivelmente importante. Os Bagg Albinos foram progenitores da atual família

de linhagens *BALB/c*. Eles também foram usados como um dos progenitores no desenvolvimento de três outras linhagens consanguíneas importantes, A, CBA e C3H (POTTER, 1985).

Atualmente, o camundongo da linhagem *BALB/c* está entre as cinco linhagens consanguíneas mais amplamente utilizadas na pesquisa biomédica e com destaque nas pesquisas de imunologia e doenças infecciosas. A característica marcante desta linhagem é a resposta a infecções e a suscetibilidade (às vezes uma suscetibilidade exagerada). Mas, isso paradoxalmente não está associado à imunodeficiência, pois o *BALB/c* possui excelente resposta à imunização. Essas características tornaram o camundongo *BALB/c* um modelo para a identificação de genes que determinam a suscetibilidade a doenças infecciosas e neoplásicas (POTTER, 1985; The Jackson Laboratory, 2021b).

Apesar de inicialmente, a linhagem *BALB/c* ter sido utilizada no estudo do câncer relacionado ao vírus da leucemia murina (POTTER, 1985; The Jackson Laboratory, 2021b), ao longo das décadas esses camundongos se tornaram um modelo animal de propósito geral e muito utilizado em diversas áreas da pesquisa de base como genética, cardiovascular, respiratória e imunológica (MARQUÉS-GARCÍA; MARCOS-VADILLO, 2016; NIALS; UDDIN, 2008; JOHNSON, 2012; The Jackson Laboratory, 2021b).

Camundongos *BALB/c* possuem características de fácil procriação e variações mínimas de peso entre machos e fêmeas. Atualmente, a linhagem *BALB/c* é a mais comumente usada para modelos de desafio de antígeno como inflamação pulmonar no modelo animal de asma, pois desenvolvem uma boa resposta imunológica via T_H2 (MARQUÉS-GARCÍA; MARCOS-VADILLO, 2016; NIALS; UDDIN, 2008; JOHNSON, 2012).

Figura 5 – Informações sobre a massa corporal da linhagem *BALB/cJ* conforme apresentado pelo Laboratório Jackson dos Estados Unidos da América.

Fonte: Adaptado de (The Jackson Laboratory, 2021b).

2.2.2 Camundongos *C57BL/6*

A linhagem de camundongos *C57BL/6* é amplamente utilizada e a primeira a ter seu genoma sequenciado em 2002. Apesar desta amostra ser refratária a alguns tumores, é permissiva para a expressão máxima da maioria das mutações (JOHNSON, 2012).

Camundongos *C57BL/6* reproduzem-se bem e tem uma baixa susceptibilidade a tumores. As células tronco hematopoiéticas primitivas dos camundongos *C57BL/6* mostram senescência muito atrasadas em relação a linhagem *BALB/c* (JOHNSON, 2012; The Jackson Laboratory, 2021a). Os camundongos *C57BL/6* quando alimentados com dieta rica em gordura, desenvolvem obesidade, hiperglicemia de leve a moderada e hiperinsulinemia.

Os camundongos *C57BL/6* são usados em uma ampla variedade de áreas de pesquisa incluindo biologia cardiovascular, biologia do desenvolvimento, diabetes e obesidade, pesquisas genéticas, imunológica, neurobiológica e sensorial. Camundongos *C57BL/6* são também comumente usados na produção de camundongos transgênicos (JOHNSON, 2012; The Jackson Laboratory, 2021a) e usados em estudos de desafio de alérgenos (NIALS; UDDIN, 2008).

Figura 6 – Informações sobre a massa corporal da linhagem *C57BL/6J* conforme apresentado pelo Laboratório Jackson dos Estados Unidos da América.

Fonte: Adaptado de (The Jackson Laboratory, 2021b).

2.3 Broncoprovocação com Metacolina (MCh)

No sentido mais geral, uma droga pode ser definida como qualquer substância que provoca uma mudança na função biológica por meio de suas ações químicas. Na maioria dos casos, a molécula do fármaco interage como agonista (ativador) ou antagonista (inibidor) com uma molécula específica do sistema biológico que desempenha um papel regulador. Essa molécula alvo é chamada de receptor. Por conta disso, os receptores tornaram-se o foco central da investigação dos efeitos das drogas e seus mecanismos de ação (LEVICK, 1991).

Como muitas outras substâncias biologicamente ativas, a MCh, como a ACh, exerce seus efeitos ligando-se e ativando receptores localizados na superfície das células. Existem duas classes principais de receptores de ACh: nicotínico e muscarínico.

A ACh é hidrolisada muito rapidamente, grandes quantidades devem ser infundidas por via intravenosa para atingir concentrações suficientes para produzir efeitos detectáveis. A injeção intravenosa em *bolus* tem um efeito breve, normalmente de 5 a 20 segundos, enquanto as injeções intramusculares e subcutâneas produzem apenas efeitos locais. A MCh é mais resistente à hidrólise, e têm ação correspondentemente mais longa, por até vários minutos.

Ao contrário da ACh, a MCh é hidrolisada apenas pela acetilcolinesterase e a taxa de hidrólise é significativamente menor do que a da ACh. Assim, a ação da MCh é significativamente mais duradoura do que a ACh (GUYTON; HALL, 2011).

Quando presente nos pulmões, por inalação ou aplicação intravenosa, a MCh causa broncoconstrição por meio da contração do músculo liso. A presença de receptores M_2 e M_3 no músculo liso das vias aéreas é suportada por dados de ligação de radioligantes, autorradiografia, hibridização *in situ* e deleção genética em humanos, vacas, porquinhos-da índia, cães e camundongos (FRYER; CHRISTOPOULOS; NATHANSON, 2012).

Experimentos demonstram que a contração induzida por ligantes muscarínicos na traqueia e brônquios isolados é mediada por receptores M_3 em todas as espécies, incluindo humanos. Além disso, experimentos *in vivo* em camundongos com deficiência de gene do receptor muscarínico demonstram que apenas os receptores M_3 contribuem para a broncoconstrição induzida por estimulação elétrica dos nervos vago ou MCh intravenosa (FRYER; CHRISTOPOULOS; NATHANSON, 2012).

Os receptores M_2 geralmente superam em número os receptores M_3 , mas têm um papel indireto na contração do músculo liso das vias aéreas. Os receptores M_2 no músculo liso das vias aéreas inibem o relaxamento induzido tanto pelos agonistas β -adrenoreceptores quanto pela ativação da adenilil ciclase com forskolina. Assim, os receptores M_2 contribuem para a contração do músculo liso, antagonizando funcionalmente o relaxamento induzido por $G_s\alpha$. Em traqueia isolada de camundongos com deficiência de receptores M_2 , a potência do agonista muscarínico é reduzida, porém a contração máxima ainda é alcançada. Isso sugere que os receptores M_2 contribuem para a contração do músculo liso induzida pela ACh, mas que os receptores M_3 sozinhos são suficientes para a contração do músculo liso (FRYER; CHRISTOPOULOS; NATHANSON, 2012).

A ação da MCh nos pulmões, assim como da ACh, fornece o controle dominante sobre o tônus do músculo liso das vias aéreas. Os receptores muscarínicos encontrados nas glândulas, no músculo liso das vias aéreas e nos nervos controlam o tônus das vias aéreas e a secreção de muco. Além disso, a MCh como ACh estimula os receptores muscarínicos nas células epiteliais e endoteliais para aumentar a frequência do batimento ciliar e causar vasodilatação (FRYER; CHRISTOPOULOS; NATHANSON, 2012).

2.3.1 Dose-resposta

Para que os medicamentos produzam seus efeitos, eles devem interagir com o corpo. Isso pode acontecer de várias maneiras e depende das propriedades do medicamento. Portanto, é muito importante entender a relação entre dose, concentração do medicamento e seus efeitos.

Para descrever a magnitude da resposta de um organismo, em função da exposição (ou doses) a um estímulo ou estressor (geralmente um químico) após um determinado tempo de exposição, são utilizadas curvas de dose-resposta. Portanto, para descrever a relação efeito-dose, relação dose-resposta ou relação exposição-resposta como um todo, são utilizadas curvas dose-resposta.

No entanto, deve-se ter em mente que as relações dose-resposta geralmente dependem não apenas do tempo de exposição, mas também da via de exposição (por exemplo, intravenosa). Uma rota diferente leva a uma relação diferente e possivelmente a conclusões diferentes sobre os efeitos do estressor em consideração.

A MCh é uma droga colinérgica muito comum na literatura, e seu uso é desenvolvido e padronizado, com procedimentos seguros e precisos que podem ser reproduzidos (RUBIN et al., 2002). Portanto, a MCh é empregada durante o teste de broncoprovocação que por sua vez é utilizado para auxiliar no diagnóstico de asma. Portanto, o teste também pode ser chamado de teste de desafio com MCh.

Dois conceitos associados ao estudo da curva concentração-efeito são responsividade e reatividade. Nas curvas de dose-resposta, a responsividade está associada a um aumento na facilidade de estreitamento das vias aéreas em resposta a estímulos broncoconstritores *in vivo*. Além disso, a reatividade está associada à intensidade da resposta ao estímulo e pode ser entendida como a inclinação da curva quando a broncoconstrição é avaliada através do volume expiratório forçado em um segundo (VEF_1) (Figura 7).

2.3.2 Asma e Hiperreatividade Brônquica

As doenças pulmonares são caracterizadas por obstrução do fluxo de ar e inflamação das vias aéreas. No caso específico da asma, a limitação do fluxo aéreo geralmente é reversível e causada por broncoconstrição. Na asma mais grave, edema devido à hipersecreção de muco também contribui para a limitação do fluxo aéreo. As vias aéreas são hiper-responsivas e as respostas broncoconstritoras são exageradas. Indivíduos com hiperresponsividade das vias aéreas requerem estímulos (doses) muito menores para ter

Figura 7 – Curva dose-resposta em humanos normais, hiperreativos e hipersensíveis. CP_{20} representa concentração provocativa que ocasiona queda de 20% no volume expiratório forçado em um segundo (VEF_1).

Fonte: Adaptado de (LÖTVALL; INMAN; O'BYRNE, 1998)

broncoconstrição significativa em comparação com aqueles com responsividade normal (FRYER; CHRISTOPOULOS; NATHANSON, 2012).

Portanto, a inalação de MCh ou teste de desafio intravenoso é amplamente utilizado em ambientes clínicos e de pesquisa para medir a responsividade das vias aéreas. Os resultados são expressos como a dose de provocação (DP_{20}) ou concentração provocativa (CP_{20}) que resulta em uma queda de 20% no VEF_1 (DAVIS; BLAIS; COCKCROFT, 2018).

2.4 Técnica de oscilações forçadas (FOT)

A respiração é essencialmente um processo mecânico. Portanto, a análise da mecânica respiratória é sobretudo o estudo do movimento, das variações de energia e as forças que atuam sobre os pulmões e do sistema respiratório.

Dois métodos são amplamente aceitos para avaliar a função respiratória de camundongos e podem ser categorizados em técnicas invasivas e não invasivas. As técnicas invasivas, usadas neste estudo, medem diretamente a mecânica do sistema respiratório (incluindo a parede torácica) ou pulmonar (apenas pulmões) e normalmente contam com canulação traqueal ou intubação orotraqueal para medir o fluxo de ar e a pressão através do sistema respiratório ou através dos pulmões.

As técnicas não invasivas que avaliam indiretamente a função pulmonar em camundongos geram resultados menos precisos e menos reprodutíveis do que as medidas invasivas, muito em função da menor sensibilidade nas medidas efetuadas e consequente menor precisão dos resultados obtidos (WALKER; KRAFT; FISHER, 2013).

O método invasivo, por outro lado, fornece dados reprodutíveis e consistentes com relação à resistência das vias aéreas. No entanto, requer anestesia. A desvantagem em relação ao uso de anestesia é o impacto no sistema nervoso autônomo, levando ao declínio do volume pulmonar expiratório final em camundongos.

O uso de sedativos, anestésicos ou analgésicos potentes em camundongos causa depressão da ventilação espontânea. Por outro lado, o uso de tais drogas pode diminuir as necessidades ventilatórias por redução do metabolismo. No entanto, essa redução do metabolismo não compensa a depressão da ventilação espontânea. Esse descompasso entre o metabolismo e a ventilação pode levar à hipóxia, hipercapnia, acidose e distúrbios consecutivos da homeostase (SCHWARTE; ZUURBIER; INCE, 2000).

Por conta disso, um pequeno ventilador mecânico, mais precisamente um ventilador mecânico para pequenos animais (SAV) capaz de fornecer ventilação mecânica e pressão positiva ao final da expiração (PEEP) é empregado com o objetivo de manter o animal vivo e aplicar a PEEP para restaurar o volume pulmonar expiratório final para níveis próximos do consciente (WALKER; KRAFT; FISHER, 2013).

Apesar da ventilação espontânea ser o modo respiratório mais fisiológico, apenas a ventilação mecânica com PEEP mantém a homeostase animal em situações de respiração espontânea prejudicada, como ocorre durante anestesia e/ou cirurgia (SCHWARTE; ZUURBIER; INCE, 2000).

Porém, os efeitos colaterais da ventilação mecânica em camundongos com PEEP devem ser considerados. Os volumes pulmonares dos camundongos são sensíveis à PEEP. Quando grandes volumes correntes ou altas pressões das vias aéreas são aplicados ao pulmão animal, são induzidos danos histológicos nas estruturas pulmonares dos camundongos. Além disso, fases prolongadas de ventilação mecânica com PEEP podem levar

a comprometimento do retorno venoso ao coração (SCHWARTE; ZUURBIER; INCE, 2000).

Soma-se a isso, alterações no balanço de fluidos pulmonar, aumento na permeabilidade endotelial e epitelial e graves danos teciduais observados após ventilação mecânica com PEEP em camundongos (BAILEY et al., 2008; DREYFUSS; SAUMON, 1998).

O SAV (Figura 8) foi inicialmente proposto por Schuessler e Bates em 1995 devido a dificuldade em se trabalhar com pequenos volumes de ar e ao mesmo tempo se obter um grande valor da razão sinal por ruído (*SNR* do inglês Signal to Noise Ratio) do sinal de fluxo aplicado. Atualmente o SAV encontra-se disponível comercialmente (*flexiVent*, SCIREQ, Canadá).

Figura 8 – Diagrama de blocos do ventilador mecânico para pequenos animais (SAV), empregado durante técnica de oscilações forçadas (FOT). Nota-se, pistão em cilindro hermeticamente fechado, cujo deslocamento é responsável pelo fluxo de ar, sendo realizado por um motor linear. Duas válvulas controlam a direção do fluxo de ar durante a respiração do animal. A válvula inspiratória conecta a saída do cilindro à traqueia do animal durante a inspiração ou ao meio ambiente durante a fase de expiração, e a válvula expiratória conecta a traqueia do animal a uma câmara com pressão controlada (PEEP) durante a fase de expiração passiva do animal. O conversor analógico-digital (A/D), converte e transmite os sinais medidos para um controlador configurado via computador. Onde P_{cil} e V_{cil} representam a pressão e o volume de ar deslocado no cilindro, respectivamente. P_{ao} é a pressão na entrada das vias aéreas do animal. P_{tr} e V_{tr} representam a pressão e o volume de ar na traqueia do animal, respectivamente.

Fonte: (SANTANA, 2019)

A avaliação da mecânica respiratória de camundongos com emprego do SAV é possível graças a teoria de sistemas, onde um sistema linear invariante no tempo pode ser caracterizado por sua função de transferência (LATHI; GREEN, 2005). Assim, o fluxo de ar (sinal de entrada) que é conhecido, é aplicado ao sistema respiratório. A pressão de ar na

traqueia (sinal de saída) é mensurado, então o comportamento mecânico do sistema pode ser avaliado.

Embora o ar que flui pela traquéia não seja muito maciço ou muito viscoso, há uma resistência hidráulica perceptível ao fluxo. Portanto, a impedância respiratória pode ser interpretada como a carga mecânica do sistema respiratório para a ventilação (NAVAJAS; FARRE; ROTGER, 1991).

Essa impedância respiratória resulta em uma queda de pressão ao longo das vias aéreas. Essa pressão diminui ao longo das vias aéreas na direção do fluxo. Essa queda de pressão também depende da taxa de fluxo no tubo, da viscosidade do fluido e do padrão de fluxo. Não pode haver fluxo ao longo de um tubo a menos que haja uma diferença de pressão, ou gradiente de pressão, ao longo do tubo (WAITE; FINE, 2007; WEST, 2012).

Portanto, a avaliação da mecânica respiratória envolve relações entre pressões, fluxos e volumes medidos em locais apropriados do sistema respiratório (BATES, 2009). Essas medições podem ser obtidas analisando os sinais de pressão e volume adquiridos em reação a uma forma de onda de fluxo de ar oscilatório predefinida, de pequena amplitude, ou perturbação, aplicada na abertura das vias aéreas do camundongo.

Conhecida como técnica de oscilações forçadas (FOT), permite a avaliação da mecânica das vias aéreas em humanos ou animais, em indivíduos de qualquer idade com o mínimo de cooperação (OOSTVEEN et al., 2003). Assim, a FOT consiste na aplicação de pequeno fluxo senoidal $\dot{v}(t)$ para estimular o sistema respiratório em frequências mais altas do que a respiração normal e medir as oscilações de pressão sobrepostas à resposta respiratória normal $p(t)$, como pode ser visto na Figura 9.

Logo, FOT é um termo geral para qualquer abordagem que aplique um sinal de banda larga $\dot{v}(t)$ ao pulmão para fins de medição da impedância $Z_{sr}(f)$. Na mecânica respiratória, a impedância mecânica relevante é aquela entre o fluxo e a pressão (BATES, 2009). No caso do sistema respiratório a impedância origina-se, principalmente, das forças resistivas, elásticas e inertivas que se opõem aos movimentos respiratórios (BATES, 2009; CARVALHO; ZIN, 2011), e é dada pela Equação 2.1.

$$Z_{sr}(f) = \frac{\mathfrak{F}[p_{tr}(t)]}{\mathfrak{F}[\dot{v}_{tr}(t)]} \quad (2.1)$$

Onde: $\mathfrak{F}[p_{tr}(t)]$ representa a Transformada de Fourier da pressão na traqueia do camundongo e $\mathfrak{F}[\dot{v}_{tr}(t)]$ a Transformada de Fourier do fluxo de ar imposto pelo SAV, determinado a partir do deslocamento do volume de ar $v_{tr}(t)$ na traqueia do animal.

Figura 9 – FOT com emprego de um ventilador de pistão controlado por computador para pequenos animais (*flexiVent*, SCIREQ, Canadá) capaz de aplicar PEEP e gerar perturbações de volume. Também capaz de realizar análises de sinais gerados de pressão, volume e fluxo. Onde os sinais normalmente registrados são a pressão na abertura das vias aéreas (P_{ao}), a pressão no cilindro (P_{cil}) e o volume deslocado pelo pistão (V_{cil}).

Fonte: Adaptado de (WALKER; KRAFT; FISHER, 2013)

O conceito chave da FOT para a mecânica respiratória é a impedância do sistema respiratório, $Z_{sr}(f)$, relação espectral (domínio da frequência) entre a pressão $\mathfrak{F}[p_{tr}(t)]$ e o fluxo de ar $\mathfrak{F}[\dot{v}_{tr}(t)]$. Em termos simples, $Z_{sr}(f)$ pode ser concebido como uma generalização da resistência, uma vez que incorpora as relações em fase e fora de fase entre $\mathfrak{F}[p_{tr}(t)]$ e $\mathfrak{F}[\dot{v}_{tr}(t)]$ (Equação 2.2).

$$Z_{sr}(f) = R + j \cdot X \quad (2.2)$$

Onde: j é a unidade imaginária, R é a resistência e X a reatância.

O componente em fase é chamado de parte real de $Z_{sr}(f)$ (ou resistência R), enquanto a relação fora de fase é expressa pela parte imaginária (ou reatância X), e ambos aparecem como funções da frequência de oscilação (f), como pode ser visto na Figura 10. Em outras palavras, R descreve as propriedades mecânicas dissipativas do sistema respiratório, enquanto X está relacionado à capacidade de armazenamento de energia e, portanto, determinado em conjunto pelas propriedades elásticas dominantes em baixas frequências de oscilações (f) e as propriedades inertivas, que se tornam progressivamente mais importantes com o aumento da frequência (OOSTVEEN et al., 2003).

Apesar da resistência ao fluxo de ar das vias aéreas estar inversamente relacionada à quarta potência do raio da seção do mesmo, a contribuição para resistência das vias aéreas não é predominantemente nas vias aéreas de menor diâmetro, pois à medida que os

Figura 10 – Impedância do sistema respiratório, $Z_{sr}(f)$, e suas partes reais (superior - pontos vermelhos) e imaginárias (inferior - pontos azuis) obtidas com emprego do SAV (*flexiVent*, SCIREQ, Canadá).

Fonte: Próprio autor.

ramos das vias aéreas se tornam mais estreitos, eles também se tornam mais numerosos. A principal contribuição para resistência das vias aéreas são os brônquios de tamanho médio. Os bronquíolos pequenos contribuem relativamente pouco para a resistência devido ao seu número elevado (WAITE; FINE, 2007).

2.5 Modelo de fase constante (CPM)

Uma forma de se avaliar a mecânica respiratória é por meio de modelos matemáticos e computacionais. Ao fazer isso, algumas características fisiológicas do sistema respiratório são expressas com o uso de equações matemáticas (IRVIN; BATES, 2003).

No final da década de 60, foi observado que a pressão p através do tecido pulmonar em resposta a uma mudança de volume v , na forma de degrau, diminui de forma quase

que perfeitamente linear com o logaritmo do tempo por pelo menos duas décadas de tempo (BACHOFEN, 1968; HILDEBRANDT, 1969a; HILDEBRANDT, 1969b). Consequentemente, o relaxamento da tensão pulmonar pode ser expresso conforme descrito na Equação 2.3:

$$\frac{p}{v} = A - B \cdot \ln(t) \quad (2.3)$$

Onde: t é o tempo, $\ln$ se refere ao logaritmo natural ou neperiano e A e B são constantes (portanto, parâmetros do modelo).

O relaxamento de tensão é uma propriedade exibida por quase todos os materiais e, especialmente, pelos tecidos biológicos menos rígidos. Sua ocorrência no pulmão é conhecida e relatada. Uma vez que o relaxamento da tensão pulmonar é uma manifestação de viscoelasticidade, esta envolve dissipação de energia (HILDEBRANDT, 1969a).

Ao contrário das substâncias puramente elásticas, substâncias viscoelásticas possuem um componente elástico e um componente viscoso. A viscosidade de uma substância viscoelástica confere à substância uma dependência da taxa de deformação com o tempo. Materiais puramente elásticos não dissipam energia quando tensão é aplicada e depois removida. No entanto, uma substância viscoelástica dissipa energia durante a fase de relaxamento da tensão. Assim, a área de histerese da curva $p - v$ também foi mensurada. Os resultados encontrados indicaram que a quantidade de dissipação de energia (histerese) durante as oscilações senoidais eram praticamente independentes da frequência. Hildebrandt também descobriu que, para um balão de borracha, a função de relaxamento da tensão seguia uma lei de potência dependente do tempo de acordo com a Equação 2.4:

$$\frac{p}{v} = a \cdot t^{-k} + b \quad (2.4)$$

Onde: t é o tempo, k constante de proporcionalidade e a e b são constantes (HILDEBRANDT, 1969a).

Experimentos de relaxamento de tensão em pulmões inteiros e isolados, descobriram que a pressão diminui com o logaritmo do tempo após um aumento repentino de volume. Uma lei de potência referente à pressão, descreve a resposta do pulmão a uma mudança gradual de volume (BATES, 2009).

Conforme teoria de sistemas lineares, uma função de potência no tempo caracteriza a resposta de um sistema linear a uma entrada impulsiva. Com isso, a transformada de

Laplace do transiente dado pela Equação 2.4 é conforme Equação (8):

$$\frac{P(s)}{V} = \frac{a \cdot \Gamma(1 - k)}{s^{1-k}} + \frac{b}{s} \quad (2.5)$$

Considerando-se a função de transferência em frequência onde $s = j \cdot \omega$ e $\Gamma(1 - k)$ é a função gama de $(1 - k)$, ao combinar a Equação 2.2 e Equação 2.5, a função de transferência torna-se:

$$Z(j\omega) = a \cdot \Gamma(1 - k)[j \cdot \omega]^k + b \quad (2.6)$$

Onde $Z(j\omega)$ é a impedância e pode ser resolvida em uma parte real resistiva em fase e uma parte imaginária reativa fora de fase, sendo ω a frequência angular.

Trabalhando com ratos, Hantos et al. (1987) ajustou a Equação 2.6 à impedância de entrada de baixa frequência $Z(f)$ do tecido pulmonar, resultando na função descrita pela Equação 2.7:

$$Z(f) = \frac{G}{\omega} - j \cdot \frac{H}{\omega} \quad (2.7)$$

Onde: j é a unidade imaginária, f é a frequência, ω é a frequência angular, G e H são parâmetros do modelo.

Considerando-se a frequência angular definida por $\omega = 2 \cdot \pi \cdot f$, os parâmetros G e H representam a Viscância e a Elastância, respectivamente, do tecido pulmonar para $\omega = 2 \cdot \pi \cdot f = 1$ rad/s (SUKI; BARABASI; LUTCHEN, 2017; BATES, 2009).

Para outros valores de ω , o parâmetro H ainda mantém o significado de Elastância. No entanto, dimensionalmente ele possui unidades de impedância (BATES, 2009).

Este modelo tem sido denominado modelo de “fase constante”, uma vez que a fase de Z , ou seja, $\tan^{-1}(Im\{Z\}/Re\{Z\})$ é independente da frequência. O que implica uma eficiência mecânica independente da frequência. Onde $Re\{Z\}$ e $Im\{Z\}$ denotam as partes reais e imaginárias de Z (SUKI; BARABASI; LUTCHEN, 2017).

A modelagem definida pela Equação 2.7 representa somente o pulmão. Logo, para que tenhamos um modelo para o sistema respiratório como um todo, ou seja, impedância do sistema respiratório, faz-se necessário acrescentarmos os termos referentes às vias aéreas. Conforme Hantos et al. (1992) o acréscimo da Resistência Newtoniana das vias aéreas (R_n) e da Inércia do gás nas vias aéreas (I), define o modelo de fase constante (CPM)

para o sistema respiratório:

$$Z_{sr}(f) = R_n + j \cdot \omega \cdot I + \frac{G - j \cdot H}{\omega^\alpha} \quad (2.8)$$

Onde: R_n é a Resistência Newtoniana das vias aéreas, I é a Inertância dos gases nas vias aéreas, G é a Viscância do tecido pulmonar, H é a elastância do tecido pulmonar, e o parâmetro α caracteriza as propriedades histeréticas dos tecidos respiratórios e é descrito pela Equação 2.9.

$$\alpha = \frac{2}{\pi} \cdot \tan^{-1} \left(\frac{H}{G} \right) \quad (2.9)$$

O CPM não apenas descreve a Z_{sr} com mais precisão do que os modelos anteriores (compartimentais), mas o faz com menos parâmetros (BATES, 2009). Somente quatro parâmetros conforme definido pela Equação 2.8. O CPM permite a partição da Z_{sr} em um compartimento das vias aéreas caracterizado por R_n e I . Assim como um compartimento do tecido pulmonar, descrito por G e H . No entanto, a interpretação fisiológica dos parâmetros do CPM não é simples.

Diferentemente dos parâmetros R_n e I , os parâmetros G e H não possuem um análogo físico direto. Uma vez que o tecido pulmonar é complexo, sendo constituído por um sistema de células, biomoléculas, fibras e fluidos que agem de maneira conjunta para determinar o comportamento mecânico do parênquima pulmonar. No caso específico da modelagem pelo CPM, G pode ser relacionada a dissipação de energia do tecido pulmonar ao passo que H pode ser relacionada ao armazenamento de energia na porção parênquimal.

Assim, no caso de broncoconstrição, podemos esperar um aumento dos valores de R_n e I devido ao estreitamento das vias aéreas (CARVALHO; ZIN, 2011). Por outro lado, um aumento proporcional em G e H pode ocorrer como resultado do fechamento das vias aéreas ou colapso alveolar. No caso de heterogeneidade pulmonar, G tende a aumentar substancialmente em comparação com H .

2.6 Decaimento exponencial

Diz-se que uma quantidade está sujeita a um decaimento exponencial se diminuir a uma taxa proporcional ao seu valor atual. Simbolicamente, este processo pode ser expresso pela seguinte equação diferencial (OTTO; DAY, 2007; CRAUDER; EVANS; NOELL, 2008):

$$\frac{dx}{dt} = \lambda \cdot x \quad (2.10)$$

Onde x é a quantidade e λ é uma taxa negativa chamada constante de decaimento exponencial.

Se a constante de proporcionalidade λ for positiva, então a quantidade aumenta com o tempo e, está sofrendo crescimento exponencial. No caso de um domínio discreto de definição do tempo, com intervalos iguais, também é chamado de crescimento geométrico ou decaimento geométrico, uma vez que os valores da função formam uma progressão geométrica.

A solução para a Equação 2.10 é:

$$x(t) = x_0 \cdot e^{\lambda t} \quad (2.11)$$

Onde $x(t)$ é a quantidade em um dado instante t , x_0 é o valor inicial de x para $t = 0$ ou $x(0)$ e λ é uma taxa negativa ($\lambda < 0$) chamada constante de decaimento exponencial.

O crescimento de uma colônia de bactérias é frequentemente usado para ilustrar o crescimento exponencial. Uma bactéria se divide em 2, cada uma das quais se divide em outras duas resultando em 4, depois 8, 16, 32 e assim por diante. A taxa de crescimento continua aumentando porque é proporcional ao número cada vez maior de bactérias. Um crescimento como esse é observado em outros fenômenos da natureza ou mesmo da vida cotidiana, como a disseminação da infecção por vírus, o crescimento da dívida devido aos juros compostos e a quebra de átomos em uma fissão nuclear (OTTO; DAY, 2007; CRAUDER; EVANS; NOELL, 2008). A Figura 11 traz um comparativo das taxas de crescimento linear, potenciação e exponencial.

Da mesma forma, o decaimento exponencial ocorre em uma ampla variedade de situações, em sua maioria no domínio das ciências naturais. Materiais luminescentes decaem exponencialmente, dependendo do número de mecanismos envolvidos, o decaimento pode ser mono ou multiexponencial. Em radioatividade, dado que o número de átomos seja grande, segue o decaimento exponencial (OTTO; DAY, 2007; CRAUDER; EVANS; NOELL, 2008). Em farmacologia descobriu-se que muitas substâncias administradas são distribuídas e metabolizadas de acordo com padrões de decaimento exponencial (BINDSLEV, 2017; HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 2005). Na transferência de calor, a diferença de temperatura entre o objeto e o meio segue decaimento exponencial. Assim como em alguns protocolos de roteamento de tráfego na internet (TCP-BGP, Border Gateway Pro-

Figura 11 – Exemplo de curvas com crescimento linear, a potenciação e exponencial.

Fonte: Próprio autor.

tocol) possuem algoritmos de descarte de rotas conforme decaimento exponencial (*Route Flap Damping*) .

Em casos reais, o crescimento exponencial inicial muitas vezes não permanece constante indefinidamente, em vez disso, diminui eventualmente devido aos limites superiores causados por fatores externos. Em uma série de três artigos do matemático belga Pierre François Verhulst, entre 1838 e 1847, um modelo de crescimento populacional foi idealizado por meio do ajuste do modelo de crescimento exponencial (Equação 2.12), sob a orientação de Adolphe Quetelet (VERHULST, 1838; VERHULST, 1845; VERHULST, 1847).

$$\frac{dx}{dt} = \lambda \cdot x \cdot \left(1 - \frac{x}{K}\right) \quad (2.12)$$

Onde a constante λ define a taxa de crescimento e K é a capacidade de carga (ou valor máximo).

Na Equação 2.12, o crescimento inicial e desimpedido é modelado pelo primeiro termo $\lambda \cdot x$ (Equação 2.10). O valor da taxa de crescimento λ representa o aumento proporcional

da população x em uma unidade de tempo. Conforme a população cresce, o segundo termo (quadrático), $\lambda \cdot x^2/K$, também cresce e já na mesma grandeza do primeiro termo limita o crescimento da população. Esse efeito antagonista é chamado de gargalo, e é modelado pelo valor do parâmetro K . A taxa combinada de crescimento diminui até que o valor da quantidade x pare de crescer (equilíbrio), Figura 12.

A solução para a Equação 2.12 é conforme Equação 2.13:

$$x(t) = \frac{K \cdot x_0 \cdot e^{\lambda t}}{K + x_0 \cdot (e^{\lambda t} - 1)} \quad (2.13)$$

Onde $x(t)$ é a quantidade em um dado instante t , x_0 é o valor inicial de x para $t = 0$ ou $x(0)$, K é a capacidade de carga e λ é a taxa da constante de crescimento ($\lambda > 0$) ou decaimento ($\lambda < 0$) exponencial.

Em seu artigo, que foi publicado em 1845, denominado *Recherches mathématiques sur la loi d'accroissement de la population* (VERHULST, 1845), Verhulst nomeou a função como *logística* ou crescimento logístico, uma das hipóteses para adoção dessa nomenclatura seria que a aplicação da mesma era no estudo do crescimento populacional. Seus cálculos iniciais incluíram tabelas para países como França, Bélgica, Essex e Rússia ortodoxa.

Verhulst não esclareceu a escolha do termo "logístico" (francês: *logistique*), mas é presumivelmente em contraste com a curva logarítmica, (termo utilizado à época da escrita do artigo para a curva exponencial). Seu modelo de crescimento é precedido por uma discussão de crescimento aritmético e crescimento geométrico, portanto, "crescimento logístico" é provavelmente denominado por analogia com aritmética sendo do grego antigo (romanizado): *logistikós*, uma divisão tradicional da matemática grega. É pouco provável que o termo esteja relacionado com o termo militar e de gestão logística, que por sua vez provem do francês: "*logis*" (alojamentos).

A função ou curva logística generalizada, também conhecida como curva de Richards, originalmente desenvolvida para modelagem de crescimento, é uma extensão das funções logísticas ou sigmóides, permitindo curvas em forma de S mais flexíveis (como por exemplo ponto de inflexão da curva em diferentes pontos da mesma e não só no centro como a logística) e foi proposta por F. J. Richards em 1959 (Equação 2.14) (RICHARDS, 1959).

$$x(t) = A + \frac{K - A}{(C + Q \cdot e^{-B(t-t_0)})^{1/\nu}} \quad (2.14)$$

Onde A é a assíntota inferior, B é a taxa de crescimento ($B > 0$) ou decaimento ($B < 0$),

K é a assíntota superior (capacidade de carga ou suporte), ν é o parâmetro que determina ponto de inflexão da curva, t_0 é o instante no tempo para valor máximo da função, Q está relacionado ao valor $x(0)$.

A Figura 13 traz uma série de gráficos com variações nos valores dos parâmetros da Equação 2.14. Podemos notar o impacto de cada um dos parâmetros isoladamente na curva de Richards, mantendo-se todos os demais parâmetros constantes. Nota-se que tanto o parâmetro A , mas sobretudo o parâmetro B (taxa de crescimento ou decaimento) são capazes de transformar uma curva de comportamento crescente ($B > 0$) em curva decrescente ($B < 0$).

Outra característica a ser observada nas curvas de Richards apresentadas na Figura 13 são o caráter puramente exponencial no início da curva até atingir seu ponto de inflexão quando o crescimento ou decaimento passa a ser reduzido até o ponto de equilíbrio onde não há mais crescimento ou decaimento.

Figura 12 – Digitalização da imagem original da curva logística em contraste com uma curva logarítmica (exponencial nos termos de hoje) presente no artigo *Recherches mathématiques sur la loi d'accroissement de la population* de 1845 (VERHULST, 1845).

Mémoire sur la population par M. P. Verhulst.

Fonte: (VERHULST, 1845)

Figura 13 – Efeito na curva logística generalizada, também denominada curva de Richards, para cada um dos parâmetros presentes na Equação 2.14.

$B=C=K=Q=v=1$

$A=0, C=K=Q=v=1$

$A=0, B=K=Q=v=1$

$A=0, B=K=Q=v=1$

$A=0, B=C=K=v=1$

$A=0, B=C=K=Q=1$

Fonte: Próprio autor.

3 MATERIAL E MÉTODOS

É apresentada nesse capítulo a metodologia aplicada para a realização dos experimentos com animais. Assim como os procedimentos matemáticos e computacionais adotados para obtenção dos dados experimentais referentes a mecânica respiratória de camundongos e sua posterior análise.

3.1 Procedimento Experimental

Os procedimentos experimentais descritos a seguir foram efetuados no Laboratório de Fisiopatologia da Inflamação Experimental do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB-USP) coordenado pelo Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima.

3.1.1 Animais de experimentação

Todos os camundongos das linhagens *BALB/c* e *C57BL/6* que foram objeto deste estudo são provenientes do Biotério do Departamento de Farmacologia do ICB-USP. Os experimentos com animais realizados foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do ICB-USP com o registro nº 15 à fl. 16 do livro 3, 27 de março de 2014, referente a animais da linhagem *BALB/c* e protocolo nº 48/2016 de 08 de agosto de 2016 para animais da linhagem *C57BL/6*, obedecendo às diretrizes estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). Os procedimentos estão de acordo com a Lei Nacional nº 11794 de 8 de outubro de 2008, que regulamenta todas as atividades de pesquisa envolvendo o uso de animais no país.

Foram utilizados um total de 54 camundongos albinos *BALB/c*. Desses animais, 23 machos com massa corpórea média de $27,8 \pm 2,0$ g (média $\pm$ SD) e 31 fêmeas com massa corpórea média de $22,3 \pm 1,9$ g (média $\pm$ SD).

Um segundo grupo de animais foi considerado neste estudo, constituído por 17 ca-

camundongos da linhagem *C57BL/6*. Todos os 17 são machos com massa corpórea média de $27,3 \pm 2,2$ g (média $\pm$ SD).

Animais pertencentes a cada uma das linhagens foram separados em dois grupos. Assim, alguns camundongos de cada linhagem foram utilizados para compor um grupo de modelo animal de inflamação pulmonar (modelo animal de asma, grupo OVA) e outro para formar um grupo de referência, sem inflamação (grupo Controle). A Tabela 1 detalha a composição de cada grupo mencionado.

Tabela 1 – Composição dos grupos Controle e OVA para linhagens de camundongos *BALB/c* e *C57BL/6*.

	<i>BALB/c</i>		<i>C57BL/6</i>	
	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos
Controle	9	10	0	9
OVA	22	13	0	8

Fonte: Próprio autor.

3.1.2 Indução da inflamação pulmonar crônica com sensibilização por Ovalbumina (OVA)

Para formar o grupo OVA, os camundongos da linhagem *BALB/c* foram previamente induzidos a desenvolver inflamação pulmonar com 9 a 18 semanas de idade por intermédio de um protocolo de sensibilização por Ovalbumina (Grau V, SIGMA, EUA) e hidróxido de alumínio, $Al(OH)_3$, em uma primeira etapa. (CACERES et al., 2009; DAUBEUF; FROSSARD, 2013; WARREN et al., 2019; MENDIOLA et al., 2016; HAHN et al., 2003) Na sequência do protocolo, apenas OVA é utilizada nas etapas de desafio.

No início do protocolo, marco 0 ou dia 0, os camundongos foram sensibilizados por 30 µg de OVA com 1,6 mg de hidróxido de alumínio diluídos em solução salina tampão fosfato (PBS) via intraperitoneal (i.p.). A segunda sensibilização ocorreu sete dias depois, dia 7, também via i.p. com 50 µg de OVA e 1,6 mg de hidróxido de alumínio diluídos em solução salina.

Os camundongos receberam o antígeno (desafio), na semana seguinte ao término das sensibilizações, com aplicações intranasais de OVA nos dias 14 e 21 após o início do protocolo, sendo estes dois desafios iniciais com 10 µg e 20 µg respectivamente. O terceiro desafio foi realizado no dia 22, sendo administrado via intratraqueal com 20 µg de OVA.

Os camundongos do grupo Controle passaram pelo mesmo protocolo de indução de inflamação pulmonar que o grupo OVA. No entanto, receberam PBS ao invés de OVA e hidróxido de alumínio, tanto na fase de sensibilização quanto na de desafios. De forma a estabelecer uma comparação fácil e direta entre ambos os procedimentos para se formar os grupos OVA e Controle, a Figura 14 é apresentada.

O protocolo de inflamação pulmonar para camundongos *BALB/c* foi realizado no Laboratório de Fisiopatologia da Inflamação Experimental do Departamento de Farmacologia do ICB-USP.

Figura 14 – Formação dos grupos OVA (A) e Controle (B) para camundongos *BALB/c* através do protocolo de indução de inflamação pulmonar desenvolvido no Laboratório de Fisiopatologia da Inflamação Experimental do Departamento de Farmacologia do ICB-USP.

Fonte: Próprio autor.

Com relação à formação do grupo OVA para camundongos da linhagem *C57BL/6*, os camundongos ainda neonatos foram inalados com 1,2-naftoquinona (1,2-NQ) na concentração 100 nM/10 mL por três dias alternados, dia 6, dia 8 e dia 10. Quando adultos, são submetidos ao protocolo de sensibilização por OVA (Grau V, SIGMA, EUA) e hidróxido de alumínio, Al(OH)₃. Os camundongos *C57BL/6* foram sensibilizados por 10 µg de OVA com 1,6 mg de hidróxido de alumínio diluídos em solução salina (PBS) via subcutânea (s.c.) nos dias 59 e 66 de vida. Na sequência do protocolo, os camundongos *C57BL/6* são submetidos a desafios com OVA via inalatória, com solução OVA (1%, 10 mL) duas vezes por semana durante quatro semanas.

Como no protocolo de sensibilização descrito para a outra linhagem de camundongos, os camundongos da linhagem *C57BL/6* que constituíram o grupo Controle, também passaram pelo mesmo protocolo de indução de inflamação pulmonar. No entanto, receberam PBS ao invés de OVA e hidróxido de alumínio, tanto na fase de sensibilização quanto na de desafios (Figura 15). O protocolo de asma para camundongos *C57BL/6* também foi realizado no Laboratório de Fisiopatologia da Inflamação Experimental do Departamento de Farmacologia do ICB-USP.

Figura 15 – Formação dos grupos OVA (A) e Controle (B) para camundongos *C57BL/6* através do protocolo de indução de inflamação pulmonar desenvolvido no Laboratório de Fisiopatologia da Inflamação Experimental do Departamento de Farmacologia do ICB-USP.

Fonte: Próprio autor.

3.1.3 Preparação dos animais

No dia do estudo, os animais tiveram inicialmente sua massa corpórea aferida e, na sequência, foram anestesiados com uma solução de cetamina (120 mg/kg) e xilazina (12 mg/kg) via i.p..

Com o animal anestesiado, quando não mais apresentava sensibilidade à dor, foi realizada a traqueostomia e canulação para a inserção na traqueia, de uma cânula metálica 18G (BD Company, Brasil) serrada (3,2 cm de comprimento) e com o bisel suavizado para realizar a conexão com o SAV, e dar início a sua ventilação mecânica.

Após encerrada a traqueostomia, a veia jugular direita de cada animal foi exposta para que uma agulha de diâmetro externo de 0,28 mm, anexada a um tubo flexível de PVC

(PTY, Critchley Electrical Products, Austrália), fosse inserida. Este tubo flexível apresenta diâmetro interno de 0,28 mm, diâmetro externo de 0,61 mm e 10 cm de comprimento (Figura 16).

Figura 16 – Exemplo de um camundongo *BALB/c* traqueostomizado, canulação por meio de cânula metálica 18G (BD Company, Brasil) e jugular direita dissecada e conectada ao tubo flexível de PVC (PTY, Critchley Electrical Products, Austrália).

Fonte: Próprio autor.

3.1.4 Avaliação da mecânica respiratória

Encerrado os procedimentos cirúrgicos necessários à preparação de cada camundongo, foram conectados ao SAV e ventilados em forma de onda quasi-senoidal com volume corrente de 10 mL/kg com frequência respiratória de 150 respirações por minuto e PEEP de 3 cmH₂O (Figura 17).

Na sequência, injetou-se brometo de pancurônio (1 mg/kg i.p.) para realizar a paralisação da musculatura respiratória. Os camundongos foram ventilados por sete minutos para que o paralisante pudesse bloquear completamente a musculatura respiratória. Caso após este período o animal apresentasse algum sinal de respiração espontânea era realizado uma suplementação de 30% de brometo de pancurônio.

A avaliação da mecânica respiratória de cada camundongo tem início com duas ma-

Figura 17 – SAV (*flexiVent* v5.2, SCIREQ, Canadá) utilizado na avaliação da mecânica respiratória de roedores. Em (A) tem-se uma visão geral do SAV. Em (B) tem-se os detalhes das válvulas e sua conexão ao camundongo (*C57BL/6*).

Fonte: Adaptado do manual legacy *flexiVent*, SCIREQ, Canadá.

nobras de recrutamento. Cada manobra de recrutamento alveolar teve duração de 6 segundos e constituiu-se no aumento da pressão traqueal (P_{tr}) em rampa por aproximadamente 3 segundos a partir da PEEP preestabelecida de 3 cmH₂O até a pressão máxima de 30 cmH₂O, a qual foi sustentada por mais 3 segundos, para garantir a completa insuflação e homogeneização dos pulmões.

Após as manobras de recrutamento alveolar, PBS foi injetada em *bolus* na jugular direita com uso de uma seringa ao tubo flexível de PVC. Neste momento a ventilação mecânica é interrompida para que se efetue a mensuração da impedância do sistema respiratório (Z_{sr}) por intermédio de perturbação ventilatória conforme protocolo FOT.

Para cada aplicação da PBS foram realizadas 15 perturbações de aproximadamente 3 segundos cada, em apneia, com intervalo de 5 segundos entre cada avaliação. A perturbação consistiu de um sinal composto por 13 senóides de frequências (Hz): 1, 1,5, 2,5, 3,5, 5,5, 6,5, 8,5, 8,5, 9,5, 11,5, 14,5, 15,5, 18,5 e 20,5 (Figura 18).

Após a perturbação, os animais foram novamente ventilados com forma de onda quasi-senoidal com volume corrente de 10 mL/kg, frequência respiratória de 150 respirações por minuto e PEEP de 3 cmH₂O por dois minutos até a próxima injeção. As mesmas perturbações foram realizadas para todas as doses de MCh adotadas neste estudo: 30, 100, 300 e 1000 µg/kg.

O software de aquisição de dados do SAV (*flexiVent* v5.2, SCIREQ, Canadá) fornece os parâmetros R_n , I , G e H conforme CPM. No entanto, o foco deste estudo está restrito

Figura 18 – Exemplo de impedância do sistema respiratório (Z_{sr}) para camundongo *BALB/c* mensurada a partir do sinal composto por 13 senoides de diferentes frequências presentes na perturbação ventilatória. Z_{sr} é representada pela sua parte real (R), pontos em vermelho, e imaginária (X), pontos em ciano. Os 13 valores de Z_{sr} computados para cada frequência são utilizados para ajustar o CPM (linhas vermelha e ciano).

Fonte: Próprio autor.

aos valores de R_n e G .

Para padronizar o procedimento, rotinas de automação do programa de controle do ventilador foram utilizadas para realizar as perturbações. A Figura 19 apresenta o resumo do procedimento experimental, broncoprovocação (desafio) com MCh e os procedimentos FOT.

Figura 19 – Protocolo Experimental.

Fonte: Próprio autor.

3.1.5 Lavado broncoalveolar (LBA)

Após a conclusão dos experimentos relativos à avaliação da mecânica respiratória, os camundongos foram submetidos a eutanásia e na sequência, à lavagem broncoalveolar (LBA) com o intuito de se caracterizar o modelo de inflamação pulmonar nos animais do grupo OVA (inflamação pulmonar).

Os pulmões dos animais da linhagem *BALB/c*, tanto do grupo OVA, quanto do grupo Controle, foram lavados duas vezes através do tubo traqueal com doses de 0,8 mL de PBS para um volume total de 1,6 mL de PBS.

O fluido LBA foi centrifugado por 15 min a 1500 rpm (Centrifuge 5810, Eppendorf, Alemanha), o sobrenadante removido e o precipitado celular foi ressuspensão com 1,0 mL de PBS. Em amostras de 45 μ L desta solução de lavado broncoalveolar (LBA), 5 μ L de violeta de cristal foram adicionados para formar nova solução.

Na sequência, 10 μ L dessa solução foram colocados na câmara de Neubauer para contagem total de células. Para a quantificação diferencial das células, quando ocorreu, amostras de 200 μ L foram colocadas em citocentrífuga (Citospin, Fanem, Brasil) e centrifugadas a 400 rpm por 5 min. Depois de secas, as preparações citocentrifugadas foram coradas com kit de corantes (Instant Prov, Newprov, Brasil) e a contagem diferencial, com contagem mínima de 400 células por lâmina, foi realizada quando aplicável em microscopia óptica (Eclipse E100, Nikon, Japão).

3.2 Coeficiente de Determinação (COD)

Neste estudo, os valores da impedância do sistema respiratório (Z_{sr}) para camundongos foram obtidos de acordo com o CPM, proposto pela primeira vez em 1987 (HANTOS et al., 1987).

O CPM é ajustado à impedância do sistema respiratório por meio da Equação 2.8 e regressão linear múltipla de acordo com a literatura (BATES, 2009; MORIYA; MORAES; BATES, 2003).

Para avaliar a qualidade do ajuste realizado no modelo, o Coeficiente de Determinação (COD) é utilizado, uma vez que o mesmo reflete o ajuste do modelo matemático aos dados experimentais. Valores baixos indicam um ajuste ruim, desta forma esses dados são descartados. Para serem considerados valores válidos, o COD deve estar acima de um valor definido arbitrariamente. Neste estudo, o valor 0,85 foi definido como valor

limite, sendo o intervalo entre 0 e 1 o intervalo de valores existentes. Onde 1 indica que as previsões de regressão se ajustam perfeitamente aos dados, e o valor 0 que o modelo não acompanha os dados experimentais. COD é definido pela Equação 3.1 (BATES, 2009; THAMRIN et al., 2004):

$$COD = 1 - \frac{SSR}{SST} \quad (3.1)$$

Onde SSR é a soma dos resíduos quadrados, medida da discrepância entre os dados experimentais e a estimativa do modelo (Equação 3.2). O termo SST é a soma total dos quadrados, proporcional à variância dos dados (Equação 3.3).

$$SSR = \sum_{i=1}^N [Z(f_i) - \hat{Z}(f_i)]^2 \quad (3.2)$$

Onde $Z(f_i)$ é a impedância mensurada na i -ésima frequência, e a $\hat{Z}(f_i)$ representa a impedância estimada pelo modelo na i -ésima frequência.

$$SST = \sum_{i=1}^N [Z(f_i) - \bar{Z}]^2 \quad (3.3)$$

na qual $Z(f_i)$ é a impedância mensurada na i -ésima frequência, e a $\bar{Z}$ é a impedância média dos valores obtidos experimentalmente.

3.3 Regressão não linear

Os valores de pico, ou máximos da resposta de R_n e G , em diferentes doses de MCh foram identificados e modelos de regressão não linear foram ajustados aos valores experimentais tanto de R_n quanto de G conforme comportamento de decaimento exponencial a partir deste valor de máximo (R_n e G) para cada dose de MCh. Duas funções foram empregadas neste estudo, função exponencial simples da forma descrita pela Equação 3.4 e função logística generalizada, também conhecida como curva de Richards e descrita pela Equação 3.5.

A Equação 2.11 pode ser escrita na forma:

$$\left. \begin{aligned} R_n &\sim a \cdot e^{-b(t-t_m)} + c \\ G &\sim a \cdot e^{-b(t-t_m)} + c \end{aligned} \right\} \quad (3.4)$$

Onde R_n é a Resistência Newtoniana das vias aéreas, G é a Viscância do tecido pulmonar, t_m o instante no tempo onde valor máximo é observado, a constante que define valor de máximo, b taxa de decaimento exponencial e c constante que define o valor mínimo ou basal do parâmetro CPM.

Um caso particular para a função logística generalizada ou curva de Richards descrita pela Equação 2.14 ocorre quando: $C = Q = \nu = 1$, neste caso temos então a curva de crescimento (ou decaimento) logístico (Equação 3.5):

$$\left. \begin{aligned} R_n &\sim \frac{a - c}{(1 + e^{-b(t-t_m)})} + c \\ G &\sim \frac{a - c}{(1 + e^{-b(t-t_m)})} + c \end{aligned} \right\} \quad (3.5)$$

A função exponencial simples e curva de Richards de melhor ajuste, foram obtidas por método iterativo de mínimos quadrados. Para tal, um modelo de regressão não linear implementado no “R” (R Core Team 2015) via pacote *minpack.lm: R Interface to the Levenberg-Marquardt Nonlinear Least-Squares Algorithm Found in MINPACK, Plus Support for Bounds* (ELZHOV et al., 2016) foi utilizado. O pacote *minpack.lm* fornece uma interface “R” para resolver problemas de mínimos quadrados não lineares por uma modificação do algoritmo de Levenberg-Marquardt, com suporte para limites de parâmetro inferior e superior.

O processo de ajustar a função exponencial simples e curva de Richards aos valores decrescentes de R_n e G foi repetido uma segunda vez. Nesta segunda vez, excluindo-se o valor de pico identificado de R_n e G . O objetivo deste procedimento é emular a exclusão de valores de pico rejeitados por valores não validos de COD , ou seja, na ocorrência de $COD < 0,85$ (neste estudo) ou outro valor especificado num possível estudo com COD limite igual a 0,90 ou mesmo 0,95, por exemplo (Figura 20).

Durante as regressões não lineares são considerados dados válidos de R_n e G somente valores positivos do mesmo, assim como medições para as quais os valores de pico ou máximo de R_n e G apresentam valores de $COD \geq 0,85$.

Outro critério de exclusão adotado foi a localização do ponto de máximo para o parâmetro R_n e G . Dados experimentais que apresentavam o ponto de máximo localizado na segunda metade da curva de decaimento tanto para R_n quanto para G foram descartados. Neste caso, os dados descartados são referentes somente a dose do agonista, MCh na qual ocorreu a não conformidade.

Figura 20 – Fluxograma simplificado da regressão não linear para parâmetro R_n . Mesmo procedimento foi utilizado para o parâmetro G . O procedimento apresentado foi empregado igualmente para as duas linhagens de camundongos, *BALB/c* e *C57BL/6*.

Fonte: Próprio autor.

Como resultado do procedimento descrito de forma sucinta na Figura 20, temos quatro modelos ajustados aos dados experimentais obtidos via CPM para o parâmetro R_n , sendo

dois deles com o emprego de função exponencial simples e dois deles com o uso da curva de Richards:

- a) R_{n_mExp0} : Modelo exponencial ajustado aos dados experimentais do parâmetro R_n a partir do seu valor máximo sem exclusão de nenhum ponto durante a fase de decaimento dos valores de R_n ;
- b) R_{n_mExp1} : Modelo exponencial ajustado aos dados experimentais do parâmetro R_n excluindo-se o valor máximo e iniciando-se o ajuste com os pontos a partir do valor subsequente ao valor de pico;
- c) R_{n_mSig0} : Modelo da curva de Richards, curva em formato de Sigmoide, ajustado aos dados experimentais do parâmetro R_n a partir do seu valor máximo sem exclusão de nenhum ponto durante a fase de decaimento dos valores de R_n ;
- d) R_{n_mSig1} : Modelo da curva de Richards ajustado aos dados experimentais do parâmetro R_n excluindo-se o valor máximo e iniciando-se o ajuste com os pontos a partir do valor subsequente ao valor de pico.

O mesmo procedimento foi adotado para o parâmetro G . Neste caso, os modelos ajustados aos dados experimentais obtidos via CPM para o parâmetro G são:

- a) G_{mExp0} : Modelo exponencial ajustado aos dados experimentais do parâmetro G a partir do seu valor máximo sem exclusão de nenhum ponto durante a fase de decaimento dos valores de G ;
- b) G_{mExp1} : Modelo exponencial ajustado aos dados experimentais do parâmetro G excluindo-se o valor máximo e iniciando-se o ajuste com os pontos a partir do valor subsequente ao valor de pico;
- c) G_{mSig0} : Modelo da curva de Richards, curva em formato de Sigmoide, ajustado aos dados experimentais do parâmetro G a partir do seu valor máximo sem exclusão de nenhum ponto durante a fase de decaimento dos valores de G ;
- d) G_{mSig1} : Modelo da curva de Richards ajustado aos dados experimentais do parâmetro G excluindo-se o valor máximo e iniciando-se o ajuste com os pontos a partir do valor subsequente ao valor de pico.

3.4 Análise dos dados

Foram analisados os parâmetros R_n , G e COD provenientes do CPM, assim como calculado a área sob a curva (AUC) dos modelos de regressão não linear ajustados aos dados experimentais.

Os resultados são apresentados como a média $\pm$ Erro Padrão da Média (SEM). A significância estatística foi avaliada por métodos não paramétricos usando o teste de Scheirer-Ray-Hare, uma extensão do teste de Kruskal-Wallis para emprego com dois fatores. Quando não foi requerido teste estatístico com dois fatores, foi empregado o teste de Kruskal-Wallis. Pois, apesar de ser um teste unilateral, o mesmo pode ser empregado para testes multi grupos, ou seja, dois ou mais grupos. Na comparação múltipla de pares entre as médias dos grupos, foi empregado o teste de Wilcoxon Pareado. Os resultados foram considerados significativos para $p \leq 0,05$ ou 5%.

Dados experimentais assim como valores estimados ou calculados foram objeto da análise de *outliers*. Análises estatísticas foram precedidas por testes de normalidade. Sendo empregadas técnicas de visualização, como função de densidade de probabilidade (PDF) e diagramas quantil-quantil (diagramas Q-Q). Seguidos do teste de Shapiro-Wilk, uma vez que este método é mais apropriado para tamanhos de amostra pequenos como o caso deste estudo (<50 amostras).

Os gráficos foram elaborados no “R” (R Core Team 2015) com o pacote *ggplot2: Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics* (WICKHAM, 2016).

3.4.1 Área Sob a Curva (AUC)

A área sob a curva (AUC) foi calculada por meio de análise numérica usando o interpolador cúbico de Hermite, isto é, polinômio de terceiro grau especificado na forma de Hermite, também conhecido como *spline* de Hermite. Neste estudo, o pacote *DescTools: Tools for Descriptive Statistics* (SIGNORELL et al., 2020) forneceu a interface “R” (R Core Team 2015) apropriada para a estimativa de AUC.

A estimativa de AUC foi realizada considerando-se os valores de máximo dos parâmetros R_n e G dos conjuntos de dados experimentais obtidos via CPM. Assim como os valores máximos calculados através das regressões não lineares da função exponencial simples e curva de Richards. No caso das regressões não lineares, foram considerados os quatro modelos obtidos para cada parâmetro objeto deste estudo, R_n (R_{n_mExp0} , R_{n_mExp1} , G_{mSig0} e G_{mSig1}) e G (G_{mExp0} , G_{mExp1} , G_{mSig0} e G_{mSig1}), conforme descrito na seção anterior

(3.3).

3.4.2 Análise de *outliers*

Em estatísticas, *outliers* são valores, ou pontos no caso de gráficos, de um conjunto de dados que diferem significativamente dos demais valores ou pontos do conjunto das amostras.

A presença de valores ou pontos anômalos em um conjunto de dados tende a distorcer os resultados em função de anormalidades experimentais ou erros nas medições realizadas. Podendo conduzir a conclusões errôneas, dado a introdução de um viés no conjunto de dados. Logo, é importante realizar uma análise exploratória dos dados, para se identificar e excluir eventuais valores ou pontos de *outliers*, se certificando de que o conjunto de dados a ser analisado não se encontra contaminado com esse tipo de problema.

A análise para identificação de *outliers* se inicia com o cálculo da mediana, definida pelo 50º percentil, seguido da determinação do primeiro quartil (Q1), definido pelo 25º percentil e o terceiro quartil (Q3), como sendo o 75º percentil.

A partir do Q1 e Q3 é possível se determinar o intervalo interquartil (IQR) conforme Equação 3.6.

$$IQR = Q3 - Q1 \quad (3.6)$$

A grande maioria das análises de *outliers* emprega como critério de exclusão, os limites inferior e superior dados por:

$$Limite Inferior = Q1 - 1,5 \times IQR \quad (3.7)$$

$$Limite Superior = Q3 + 1,5 \times IQR \quad (3.8)$$

A razão do emprego deste critério é que para dados amostrais que seguem a distribuição normal ou quase normal, o valor $1,5 \times IQR$ equivale a aproximadamente 3σ , ou desvio padrão (SD), mais precisamente $2,698\sigma$. Com isso, espera-se que 99,3% das amostras existentes se encontrem dentro deste intervalo, conforme ilustrado na Figura 21.

Como o número de amostras deste estudo não é grande, e existe o descarte de dados experimentais por *COD* não válidos, ou seja, com valores inferiores a 0,85, adotou-se por

Figura 21 – Comparação de um *boxplot* para uma distribuição quase normal e uma função de densidade de probabilidade (PDF) para uma distribuição normal. Para distribuição normal, ou quase, os *outliers* correspondem a 0,7% dos dados amostrais.

Fonte: Próprio autor.

excluir somente os *outliers* extremos, definidos por:

$$\text{Limite Inferior Extremo} = Q1 - 3,0 \times IQR \quad (3.9)$$

$$\text{Limite Superior Extremo} = Q3 + 3,0 \times IQR \quad (3.10)$$

A Figura 22 apresenta um *boxplot* que permite se visualizar os cálculos requeridos para se identificar *outliers* nesse estudo.

Figura 22 – Utilização de um *boxplot* para demonstrar os cálculos dos limites que permitem identificar os dados que se apresentam como *outliers*.

Fonte: Próprio autor.

4 RESULTADOS

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos a partir da metodologia apresentada no capítulo anterior, MATERIAL E MÉTODOS.

4.1 Caracterização dos grupos de camundongos

Para caracterizarmos os grupos de camundongos estudados foram estimadas as massas corpóreas de cada grupo, a Tabela 2 detalha os valores encontrados para cada grupo.

Tabela 2 – Massa corpórea em grama (g), formato (média $\pm$ SD) dos grupos Controle e OVA para linhagens de camundongos *BALB/c* e *C57BL/6*.

	BALB/c		C57BL/6	
	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos
Controle	23,1 $\pm$ 1,3	27,1 $\pm$ 2,3		27,1 $\pm$ 2,6
OVA	21,9 $\pm$ 2,0	28,3 $\pm$ 1,5		27,5 $\pm$ 1,8

Fonte: Próprio autor.

O gráfico de barras da Figura 23 apresenta a contagem total de células do lavado broncoalveolar (LBA) para a linhagem de camundongo *BALB/c*. Não foram apresentados os valores da contagem diferencial, pois esta não se encontra disponível para todos os animais presentes neste estudo, que se caracteriza por analisar dados existentes de uma ampla gama de experimentos realizados no Laboratório de Fisiopatologia da Inflamação Experimental do Departamento de Farmacologia do ICB-USP. Experimentos estes efetuados sob os protocolos de sensibilização por OVA conforme descrito na Seção 3.1. Para camundongos da linhagem *C57BL/6* não há resultados da LBA disponíveis.

Figura 23 – Contagem total de células do lavado broncoalveolar (LBA) para animais submetidos ao protocolo de sensibilização por Ovalbumina (OVA) e solução salina, PBS (Controle) referente a linhagem de camundongos, *BALB/c*. Valores apresentados conforme formato média $\pm$ SEM.

Fonte: Próprio autor.

4.2 Dinâmica da mecânica respiratória

Os parâmetros: R_n , G e H , obtidos experimentalmente a partir do CPM, são apresentados conforme formato média $\pm$ SEM para camundongos *BALB/c* (Figura 24) e *C57BL/6* (Figura 25) para seus respectivos grupos Controle e OVA.

Figura 24 – Valores dos parâmetros CPM: R_n , G e H obtidos durante avaliação da mecânica respiratório via teste de broncoprovocação em camundongos da linhagem *BALB/c*. Notar que para cada valor da dose do agonista (MCh), temos 15 pontos na curva correspondente. São as 15 perturbações efetuadas durante procedimento de FOT. Valores apresentados conforme formato média $\pm$ SEM.

Figura 25 – Valores dos parâmetros CPM: R_n , G e H obtidos durante avaliação da mecânica respiratório via teste de broncoprovocação em camundongos da linhagem *C57BL/6*. Notar que para cada valor da dose do agonista (MCh), temos 15 pontos na curva correspondente. São as 15 perturbações efetuadas durante procedimento de FOT. Valores apresentados conforme formato média $\pm$ SEM.

4.3 Regressões não lineares

Para o parâmetro R_n , temos a Figura 26, onde os pontos representam os valores mensurados experimentalmente através do modelo CPM ($R_{n.mens}$) e as curvas representam os modelos ajustados aos dados experimentais conforme regressões não lineares.

- a) $R_{n.mExp0}$: Modelo exponencial simples sem exclusão de pontos (exclusão = 0);
- b) $R_{n.mExp1}$: Modelo exponencial simples ajustado aos dados experimentais excluindo-se o valor máximo (exclusão = 1);
- c) $R_{n.mSig0}$: Modelo da curva de Richards, curva em formato de Sigmoides, sem exclusão de pontos (exclusão = 0);
- d) $R_{n.mSig1}$: Modelo da curva de Richards, curva em formato de Sigmoides, ajustada aos dados experimentais excluindo-se o valor máximo (exclusão = 1).

Da mesma forma, a Figura 27 ilustra o procedimento adotado conforme item 3.3 para o parâmetro G . Onde os pontos representam os valores mensurados experimentalmente através do modelo CPM (G_{mens}) e as curvas representam os modelos ajustados aos dados experimentais conforme regressões não lineares.

- a) G_{mExp0} : Modelo exponencial simples sem exclusão de pontos (exclusão = 0);
- b) G_{mExp1} : Modelo exponencial simples ajustado aos dados experimentais excluindo-se o valor máximo (exclusão = 1);
- c) G_{mSig0} : Modelo da curva de Richards, curva em formato de Sigmoides sem exclusão de pontos (exclusão = 0);
- d) G_{mSig1} : Modelo da curva de Richards, curva em formato de Sigmoides ajustada aos dados experimentais excluindo-se o valor máximo (exclusão = 1).

Figura 26 – Curvas ajustadas através de regressões não lineares aos valores do parâmetro R_n , em um comportamento de decaimento para cada dose do agonista MCh durante um desafio brônquico realizado em camundongo da linhagem *BALB/c* e pertencente ao grupo Controle. Os pontos referem-se aos valores mensurados através do CPM (R_{n_mens}) e as linhas sólidas são valores conforme modelos ajustados. (a) R_{n_mExp0} : modelo Exponencial sem exclusão do ponto de máximo. (b) R_{n_mExp1} : modelo Exponencial com exclusão do ponto de máximo. (c) R_{n_mSig0} : modelo da curva de Richards (curva Sigmoidal) sem exclusão do ponto de máximo. (d) R_{n_mSig1} : modelo da curva de Richards (curva Sigmoidal) com exclusão do ponto de máximo.

Fonte: Próprio autor.

Figura 27 – Curvas ajustadas através de regressões não lineares aos valores do parâmetro G , em um comportamento de decaimento para cada dose do agonista MCh durante um desafio brônquico realizado em camundongo da linhagem *BALB/c* e pertencente ao grupo OVA. Os pontos referem-se aos valores mensurados através do CPM (G) e as linhas sólidas são valores conforme modelos ajustados. (a) G_{mExp0} : modelo Exponencial sem exclusão do ponto de máximo. (b) G_{mExp1} : modelo Exponencial com exclusão do ponto de máximo. (c) G_{mSig0} : modelo da curva de Richards (curva Sigmoidal) sem exclusão do ponto de máximo. (d) G_{mSig1} : modelo da curva de Richards (curva Sigmoidal) com exclusão do ponto de máximo.

Fonte: Próprio autor.

4.3.1 Valores máximos dos parâmetros R_n e G

A Figura 28 apresenta os valores máximos de R_n obtidos experimentalmente através do CPM (R_{n_mens}) e conforme predição dos modelos ajustados com uso de regressão não lineares. Da mesma forma, a Figura 29 apresenta os valores máximos para o parâmetro G obtidos experimentalmente através do CPM (G_{mens}) e conforme predição dos modelos ajustados com uso de regressão não lineares.

4.3.2 Área Sob a Curva (AUC) dos parâmetros R_n e G

Efetuuou-se uma comparação entre os valores previstos para AUC via modelos de regressões não lineares e a AUC dos valores mensurados experimentalmente via CPM. A Figura 30 mostra os valores de AUC calculados para todos os modelos ajustados e os valores provenientes dos dados experimentais para R_n . Assim como, a Figura 31 apresenta as mesmas informações para o parâmetro G .

Figura 28 – Valores máximos do parâmetro R_n por dose do agonista MCh, para valores mensurados experimentalmente via CPM (R_{n_mens}) e predito com o uso das regressões não lineares obtidas. R_{n_mExp0} : modelo Exponencial sem exclusão do ponto de máximo. R_{n_mExp1} : modelo Exponencial com exclusão do ponto de máximo. R_{n_mSig0} : modelo da curva de Richards sem exclusão do ponto de máximo. R_{n_mSig1} : modelo da curva de Richards com exclusão do ponto de máximo. Valores apresentados conforme formato média $\pm$ SEM. Para cada grupo, dose de MCh e modelo ajustado, é apresentado o número de pontos válidos considerado durante o cálculo da média. (a) camundongos da linhagem *BALB/c*. (b) camundongos da linhagem *C57BL/6*.

Figura 29 – Valores máximos do parâmetro G por dose do agonista MCh, para os valores mensurados experimentalmente via CPM (G_{mens}) e predito com o uso das regressões não lineares obtidas. G_{mExp0} : modelo Exponencial sem exclusão do ponto de máximo. G_{mExp1} : modelo Exponencial com exclusão do ponto de máximo. G_{mSig0} : modelo da curva de Richards sem exclusão do ponto de máximo. G_{mSig1} : modelo da curva de Richards com exclusão do ponto de máximo. Valores apresentados conforme formato média $\pm$ SEM. Para cada grupo, dose de MCh e modelo ajustado, é apresentado o número de pontos válidos considerado durante o cálculo da média. (a) camundongos da linhagem *BALB/c*. (b) camundongos da linhagem *C57BL/6*.

Figura 30 – Valores de AUC por dose do agonista MCh tanto para os valores mensurados experimentalmente via CPM (R_{n_mens}), quanto predito com o uso das regressões não lineares obtidas. R_{n_mExp0} : modelo Exponencial sem exclusão do ponto de máximo. R_{n_mExp1} : modelo Exponencial com exclusão do ponto de máximo. R_{n_mSig0} : modelo da curva de Richards sem exclusão do ponto de máximo. R_{n_mSig1} : modelo da curva de Richards com exclusão do ponto de máximo. Valores apresentados conforme formato média $\pm$ SEM. Para cada grupo, dose de MCh e modelo ajustado, é apresentado o número de pontos válidos considerado durante o cálculo da média. (a) camundongos da linhagem *BALB/c*. (b) camundongos da linhagem *C57BL/6*.

Figura 31 – Valores de AUC por dose do agonista MCh tanto para os valores mensurados experimentalmente via CPM (G_{mens}), quanto predito com o uso das regressões não lineares obtidas. G_{mExp0} : modelo Exponencial sem exclusão do ponto de máximo. G_{mExp1} : modelo Exponencial com exclusão do ponto de máximo. G_{mSig0} : modelo da curva de Richards sem exclusão do ponto de máximo. G_{mSig1} : modelo da curva de Richards com exclusão do ponto de máximo. Valores apresentados conforme formato média $\pm$ SEM. Para cada grupo, dose de MCh e modelo ajustado, é apresentado o número de pontos válidos considerado durante o cálculo da média. (a) camundongos da linhagem *BALB/c*. (b) camundongos da linhagem *C57BL/6*.

4.4 Estudo de normalidade dos valores experimentais

Os gráficos a seguir apresentam os testes de normalidade mais utilizados na verificação da distribuição de probabilidade associada a um conjunto de dados e sua aproximação à distribuição normal. Dentre as principais técnicas utilizadas, temos neste estudo a visualização da PDF e os diagramas Q-Q. Assim como o teste de Shapiro-Wilk.

4.4.1 Resistência Newtoniana (R_n)

A visualização da PDF para o parâmetro R_n é apresentado na Figura 32 e Figura 33, referentes as linhagens de camundongos *BALB/c* e *C57BL/6* respectivamente. Assim como, a Figura 34 e Figura 35 apresentam os diagramas Q-Q e os testes de Shapiro-Wilk para camundongos da linhagens *BALB/c* e *C57BL/6* respectivamente.

4.4.2 Viscância (G)

Da mesma forma que na seção anterior, a Figura 36 apresenta visualização da PDF referente ao parâmetro G para camundongos da linhagem *BALB/c* e Figura 37 para camundongos da linhagem *C57BL/6*. Ainda referente ao parâmetro G , a Figura 38 apresenta os diagramas Q-Q e os testes de Shapiro-Wilk para camundongos *BALB/c* e a Figura 39 apresenta as mesmas informações para camundongos da linhagem *C57BL/6*.

Figura 32 – Visualização da PDF, representada pela área da curva, e respectiva média (linha tracejada), permitem verificar se os conjuntos de dados experimentais do parâmetro R_n seguem a distribuição normal. Camundongos da linhagem *BALB/c*.

Fonte: Próprio autor.

Figura 33 – Visualização da PDF, representada pela área da curva, e respectiva média (linha tracejada), permitem verificar se os conjuntos de dados experimentais do parâmetro R_n seguem a distribuição normal. Camundongos da linhagem *C57BL/6*.

Fonte: Próprio autor.

Figura 34 – Diagrama Q-Q para teste de normalidade (média=0 e SD=1) para parâmetro R_n e referente a camundongos da linhagem *BALB/c*. Juntamente com resultado do teste de normalidade Shapiro-Wilk, onde valor- $p > 0,05$ para conjunto de dados conforme distribuição normal.

Fonte: Próprio autor.

Figura 35 – Diagrama Q-Q para teste de normalidade (média=0 e SD=1) para parâmetro R_n e referente a camundongos da linhagem *C57BL/6*. Juntamente com resultado do teste de normalidade Shapiro-Wilk, onde valor- $p > 0,05$ para conjunto de dados conforme distribuição normal.

Fonte: Próprio autor.

Figura 36 – Visualização da PDF, representada pela área da curva, e respectiva média (linha tracejada), permitem verificar se os conjuntos de dados experimentais do parâmetro G seguem a distribuição normal. Camundongos da linhagem *BALB/c*.

Fonte: Próprio autor.

Figura 37 – Visualização da PDF, representada pela área da curva, e respectiva média (linha tracejada), permitem verificar se os conjuntos de dados experimentais do parâmetro G seguem a distribuição normal. Camundongos da linhagem $C57BL/6$.

Fonte: Próprio autor.

Figura 38 – Diagrama Q-Q para teste de normalidade (média=0 e SD=1) para parâmetro G e referente a camundongos da linhagem *BALB/c*. Juntamente com resultado do teste de normalidade Shapiro-Wilk, onde valor- $p > 0,05$ para conjunto de dados conforme distribuição normal.

Fonte: Próprio autor.

Figura 39 – Diagrama Q-Q para teste de normalidade (média=0 e SD=1) para parâmetro G e referente a camundongos da linhagem *C57BL/6*. Juntamente com resultado do teste de normalidade Shapiro-Wilk, onde valor- $p > 0,05$ para conjunto de dados conforme distribuição normal.

Fonte: Próprio autor.

4.5 Testes estatísticos não paramétricos

Em função dos resultados da seção anterior (4.4), testes estatísticos não paramétricos foram realizados nos conjuntos de dados dos parâmetros R_n e G . Assim como para a AUC calculada para ambos os parâmetros. Foi realizado o teste de Scheirer-Ray-Hare, uma extensão do teste de Kruskal-Wallis para emprego com dois fatores. Foram considerados fatores da análise, o grupo ao qual o animal pertence em relação à inflamação pulmonar (Controle e OVA) e o valor da dose do agonista MCh aplicada em *bolus*.

4.5.1 Teste não paramétrico para valores máximos dos parâmetros R_n e G

Os resultados dos testes de Scheirer-Ray-Hare para os parâmetros R_n e G são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Resultados dos testes Scheirer-Ray-Hare para parâmetros R_n e G , considerando os fatores: grupos relativos à inflamação pulmonar (Controle e OVA) e dose do agonista MCh para as linhagens de camundongos *BALB/c* e *C57BL/6*. Onde, nível de significância $\alpha = 0,05$. (*ns*) não significativo; (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; (****) $p < 0,0001$.

	BALB/c		C57BL/6	
	R_n	G	R_n	G
Grupos relativos à inflamação pulmonar (Controle e OVA)	***	****	ns	ns
Dose do agonista MCh	****	****	****	****
Interação entre os fatores	**	ns	ns	ns

Fonte: Próprio autor.

O pós teste (comparações múltiplas) foi realizado com valores máximos dos parâmetros R_n e G para cada valor da dose do agonista MCh aplicada em *bolus* durante teste de broncoprovocação. Desta forma, buscou-se avaliar a diferença significativa observada nos fatores referentes ao grupo do qual o animal pertence em relação à inflamação pulmonar (Controle e OVA) e ao modelo da regressão não linear adotada. Gráficos na Figura 40 e Figura 41 apresentam os resultados do pós teste para o parâmetro R_n , linhagens de camundongos *BALB/c* e *C57BL/6* respectivamente. Da mesma forma, os resultados para o parâmetro G são apresentados na Figura 42 e Figura 43, para camundongos das linhagens *BALB/c* e *C57BL/6* respectivamente.

4.5.2 Teste não paramétrico para AUC dos parâmetros R_n e G

Os resultados dos testes de Scheirer-Ray-Hare para AUC calculadas referentes aos parâmetros R_n e G são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Resultados dos testes Scheirer-Ray-Hare para AUC dos parâmetros R_n e G , considerando os fatores: grupos relativos à inflamação pulmonar (Controle e OVA) e dose do agonista MCh para as linhagens de camundongos *BALB/c* e *C57BL/6*. Onde, nível de significância $\alpha = 0,05$. (*ns*) não significativo; (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; (****) $p < 0,0001$.

	BALB/c		C57BL/6	
	AUC- R_n	AUC- G	AUC- R_n	AUC- G
Grupos relativos à inflamação pulmonar (Controle e OVA)	ns	***	ns	ns
Dose do agonista MCh	****	****	****	****
Interação entre os fatores	**	ns	ns	ns

Fonte: Próprio autor.

O pós teste (comparações múltiplas) foi realizado para os valores encontrados da AUC dos parâmetros, R_n e G , em cada valor da dose do agonista MCh aplicada em *bolus* durante teste de broncoprovocação. Desta forma, buscou-se avaliar a diferença significativa observada nos fatores referentes ao grupo do qual o animal pertence em relação à inflamação pulmonar (Controle e OVA) e ao modelo da regressão não linear adotado. Gráficos na Figura 44 e Figura 45 apresentam os resultados do pós teste para a AUC do parâmetro R_n , linhagens de camundongos *BALB/c* e *C57BL/6* respectivamente. Da mesma forma, os resultados para a AUC do parâmetro G são apresentados na Figura 46 e Figura 47, para camundongos das linhagens *BALB/c* e *C57BL/6* respectivamente.

Figura 40 – Valores máximos do parâmetro R_n para camundongos da linhagem *BALB/c* por dose do agonista MCh, tanto para os valores mensurados experimentalmente via CPM (R_{n_mens}), quanto para valores preditos com o uso das regressões exponenciais (R_{n_mExp0} e R_{n_mExp1}) e regressões com curva de Richards (R_{n_mSig0} e R_{n_mSig1}). Valores apresentados conforme formato média $\pm$ SEM. Para cada grupo, dose de MCh e modelo ajustado, é apresentado o resultado das comparações múltiplas da significância estatística e pós teste de significância dos pares, com referência ao valor de R_n mensurado experimentalmente (R_{n_mens}). (*ns*) não significativo; (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

Fonte: Próprio autor.

Figura 41 – Valores máximos do parâmetro R_n para camundongos da linhagem $C57BL/6$ por dose do agonista MCh, tanto para os valores mensurados experimentalmente via CPM (R_{n_mens}), quanto valores preditos com o uso das regressões exponenciais (R_{n_mExp0} e R_{n_mExp1}) e regressões para curva de Richards (R_{n_mSig0} e R_{n_mSig1}). Valores apresentados conforme formato média $\pm$ SEM. Para cada grupo, dose de MCh e modelo ajustado, é apresentado o resultado das comparações múltiplas da significância estatística e pós teste de significância dos pares, com referência ao valor de R_n mensurado experimentalmente (R_{n_mens}). (*ns*) não significativo; (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

Fonte: Próprio autor.

Figura 42 – Valores máximos do parâmetro G para camundongos da linhagem *BALB/c* por dose do agonista MCh. tanto para os valores mensurados experimentalmente via CPM (G_{mens}), quanto valores preditos com o uso das regressões exponenciais (G_{mExp0} e G_{mExp1}), e regressões para curva de Richards (G_{mSig0} e G_{mSig1}). Valores apresentados conforme formato média $\pm$ SEM. Para cada grupo, dose de MCh e modelo ajustado, é apresentado o resultado das comparações múltiplas da significância estatística e pós teste de significância dos pares, com referência ao valor de G mensurado experimentalmente (G_{mens}). (*ns*) não significativo; (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

Fonte: Próprio autor.

Figura 43 – Valores máximos do parâmetro G para camundongos da linhagem $C57BL/6$ por dose do agonista MCh, tanto para os valores mensurados experimentalmente via CPM (G_{mens}), quanto valores preditos com o uso das regressões exponenciais (G_{mExp0} e G_{mExp1}) e regressões para curva de Richards, G_{mSig0} e G_{mSig1} . Valores apresentados conforme formato média $\pm$ SEM. Para cada grupo, dose de MCh e modelo ajustado, é apresentado o resultado das comparações múltiplas da significância estatística e pós teste de significância dos pares, com referência ao valor de G mensurado experimentalmente (G_{mens}). (ns) não significativo; (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

Fonte: Próprio autor.

Figura 44 – Valores da AUC para camundongos da linhagem *BALB/c* por dose do agonista MCh, tanto para os valores mensurados experimentalmente via CPM (R_{n_mens}), quanto valores preditos com o uso das regressões exponenciais (R_{n_mExp0} e R_{n_mExp1}), e regressões para curva de Richards (R_{n_mSig0} e R_{n_mSig1}). Valores apresentados conforme formato média $\pm$ SEM. Para cada grupo, dose de MCh e modelo ajustado, é apresentado o resultado das comparações múltiplas da significância estatística e pós teste de significância dos pares, com referência ao valor de AUC a partir dos dados mensurados experimentalmente (R_{n_mens}). (ns) não significativo; (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

Fonte: Próprio autor.

Figura 45 – Valores da AUC para camundongos da linhagem *C57BL/6* por dose do agonista MCh, tanto para os valores mensurados experimentalmente via CPM (R_{n_mens}), quanto valores preditos com o uso das regressões exponenciais (R_{n_mExp0} e R_{n_mExp1}) e regressões para curva de Richards (R_{n_mSig0} e R_{n_mSig1}). Valores apresentados conforme formato média $\pm$ SEM. Para cada grupo, dose de MCh e modelo ajustado, é apresentado o resultado das comparações múltiplas da significância estatística e pós teste de significância dos pares, com referência ao valor de AUC a partir dos dados mensurados experimentalmente (R_{n_mens}). (*ns*) não significativo; (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

Fonte: Próprio autor.

Figura 46 – Valores da AUC para camundongos da linhagem *BALB/c* por dose do agonista MCh, tanto para os valores mensurados experimentalmente via CPM (G_{mens}), quanto valores preditos com o uso das regressões exponenciais (G_{mExp0} e G_{mExp1}) e regressões para curva de Richards, (G_{mSig0} e G_{mSig1}). Valores apresentados conforme formato média $\pm$ SEM. Para cada grupo, dose de MCh e modelo ajustado, é apresentado o resultado das comparações múltiplas da significância estatística e pós teste de significância dos pares, com referência ao valor de AUC a partir dos dados mensurados experimentalmente (G_{mens}). (*ns*) não significativo; (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

Fonte: Próprio autor.

Figura 47 – Valores da AUC para camundongos da linhagem *C57BL/6* por dose do agonista MCh, tanto para os valores mensurados experimentalmente via CPM (G_{mens}), quanto valores preditos com o uso das regressões exponenciais (G_{mExp0} e G_{mExp1}) e regressões para curva de Richards (G_{mSig0} e G_{mSig1}). Valores apresentados conforme formato média $\pm$ SEM. Para cada grupo, dose de MCh e modelo ajustado, é apresentado o resultado das comparações múltiplas da significância estatística e pós teste de significância dos pares, com referência ao valor de AUC a partir dos dados mensurados experimentalmente (G_{mens}). (*ns*) não significativo; (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

Fonte: Próprio autor.

5 DISCUSSÃO

A partir da proposta de análise da mecânica respiratória através do comportamento dinâmico de dois parâmetros CPM, associados à perda de energia no sistema respiratório, R_n e G , demonstrou-se que regressões não lineares são capazes de descrever o comportamento em decaimento exponencial desses parâmetros. Dado que ambos os parâmetros apresentam picos iniciais que refletem a contração do músculo liso das vias aéreas induzida pelo agonista MCh, seguido de uma fase em decaimento devido ao relaxamento do músculo liso das vias aéreas. (BATES, 2009; GUYTON; HALL, 2011)

Os resultados obtidos experimentalmente através do modelo CPM e apresentados na seção 4.2, demonstram que valores máximos ou de pico estimados a partir das regressões não lineares empregadas neste estudo foram capazes de reproduzir os valores encontrados experimentalmente, que por sua vez estão em concordância com fontes da literatura (BATES, 2009; JONASSON et al., 2009; PETÁK et al., 1997).

Outro aspecto pouco explorado na literatura associada, que no entanto faz parte do escopo deste trabalho, é a utilização do COD como figura de mérito para o ajuste efetuado do modelo linear, CPM, aos dados experimentais. Dentre a literatura associada ao tema, destaca-se (ROBICHAUD; FERREYDOONZAD; SCHUESSLER, 2015) que faz referência explícita ao uso do COD como fator de exclusão de dados experimentais, e apresenta o limiar de exclusão para $COD < 0,90$. No presente estudo, foi adotado o valor $COD < 0,85$, como limiar de exclusão. O intuito ao se adotar este valor, foi o de incluir o maior número possível de amostras, sem no entanto comprometer a qualidade do ajuste do modelo.

Os resultados apresentados na Figura 24 e Figura 25, apresentam os valores dos principais parâmetros CPM obtidos para cada uma das linhagens de camundongos, *BALB/c* e *C57BL/6* respectivamente. Assim como os grupos estudados, Controle ou OVA.

É possível observar nos gráficos (Figura 24 e Figura 25), as reações dos principais parâmetros do CPM (R_n , G e H), que caracterizam as propriedades mecânicas do sistema

respiratório, ao incremento das taxas de infusão do agonista MCh, até o valor máximo de 1000 $\mu\text{g/kg}$. Uma vez que a ação do agonista MCh leva à contração muscular (musculatura lisa) ao estimular os receptores colinérgicos muscarínicos que podem ser encontrados nas vias aéreas e no parênquima pulmonar, em um curto intervalo de tempo, não mais que 20 a 30 segundos para a grande maioria dos casos, nota-se que os parâmetros R_n e G atingem seus valores máximos ou de pico, ao passo que o parâmetro H atinge seu platô, seguido por valores decrescentes. Assim, as Figuras 24 e 25 permitem verificar o comportamento típico da mecânica respiratória quando os camundongos são submetidos ao desafio brônquico, empregando como agonista a MCh.

Nota-se no conjunto de dados apresentado na Figura 24 para camundongos *BALB/c*, que conforme a dose do agonista MCh aumenta, a broncoconstrição também aumenta, resultando em valores mais elevados dos parâmetros R_n , G e H . Verifica-se no grupo de camundongos inflamados (OVA) valores ainda mais elevados dos parâmetros R_n , G e H quando comparados aos camundongos do grupo Controle. Caracteriza-se desta forma a broncoconstrição mais aguda no grupo de camundongos *BALB/c* inflamados (OVA).

Para os camundongos da linhagem *BALB/c*, a avaliação da mecânica respiratória mostrou um aumento da resistência das vias aéreas centrais (R_n) e amortecimento do tecido (G) para animais do grupo OVA, caracterizando-se portanto, um aumento na hiperresponsividade das vias aéreas dos animais do grupo OVA. Da mesma forma, a resposta pela contagem de células através da análise LBA, indica um aumento da ordem de seis vezes o número de células do grupo OVA comparado ao grupo Controle (Figura 23).

Referente a linhagem de camundongos *C57BL/6*, Figura 25, temos resposta similar ao desafio brônquico da linhagem *BALB/c* (Figura 24). Ou seja, conforme a dose do agonista MCh aumenta, a broncoconstrição também aumenta, resultando em resposta da avaliação da mecânica respiratória mais acentuada para as doses mais elevadas de MCh, isso se traduz em valores dos parâmetros R_n , G e H mais elevados. No entanto, diferentemente dos camundongos da linhagem *BALB/c*, temos para os camundongos da linhagem *C57BL/6*, valores dos parâmetros R_n e G próximos entre os grupos OVA e Controle. Logo, somente para o parâmetro H é que se verifica no grupo de camundongos OVA, valores mais elevados quando comparados ao grupo Controle.

Embora a resposta ao agonista MCh observada nas vias aéreas para os parâmetros R_n e G na linhagem de camundongos *C57BL/6* seja semelhantes entre grupos OVA e Controle, é possível distinguir um aumento da rigidez intrínseca do tecido, parâmetro H , para grupo OVA que pode resultar da distorção do parênquima à medida que as vias

aéreas se estreitam devido a ação do agonista MCh. Indicativo de que o tecido pulmonar apresente um epitélio fisicamente espessado e mais carregado de muco (BATES, 2009; JONASSON et al., 2009).

Para camundongos da linhagem *C57BL/6* não dispomos dos resultados da LBA para avaliar o aumento da hiperresponsividade das vias aéreas dos animais do grupo OVA após protocolo de sensibilização por Ovalbumina. Portanto, podemos apenas especular quais as razões pelas quais a resposta inflamatória nos camundongos da linhagem *C57BL/6* não produziu avaliação da mecânica respiratória semelhante a responsividade obtida para linhagem *BALB/c*. Entre as diferenças existentes, além da linhagem propriamente dita, temos as diferentes condições de criação e manejo desses animais no Biotério do Departamento de Farmacologia do ICB-USP, protocolo de sensibilização por OVA ligeiramente diferente, e somente a presença de camundongos machos, sendo que para camundongos da linhagem *BALB/c* havia a presença de animais machos e fêmeas. Dado o maior tamanho dos animais machos, é plausível a existência de vias aéreas de maior calibre, o que poderia resultar em uma menor obstrução das vias aéreas ao estímulo da MCh, e portanto impacto nos parâmetros R_n e G .

Em camundongos da linhagem *BALB/c*, a avaliação da mecânica respiratória demonstrou um aumento na hiperresponsividade das vias aéreas dos animais do grupo OVA com um claro reflexo na resistência das vias aéreas centrais (R_n) e amortecimento do tecido (G). Estas alterações não foram observadas em camundongos da linhagem *C57BL/6*.

Assim, este estudo confirma as dificuldades que camundongos da linhagem *C57BL/6* possuem em desenvolver hiperresponsividade das vias aéreas após protocolo de sensibilização por OVA (SWEDIN et al., 2010; GUEDERS et al., 2009; WHITEHEAD et al., 2003; TAKEDA et al., 2001; CAREY et al., 2007; DUGUET et al., 2000), e que essa linhagem de camundongos é hiporresponsiva a MCh em comparação com outras linhagens. No entanto, há estudos em que aumentos na dissipação ou viscosidade (G) e elastância (H) do tecido foram observados em camundongos *C57BL/6* (JONASSON et al., 2009; TOMIOKA; BATES; IRVIN, 2002).

Curvas dose-resposta podem ser entendidas como um gráfico coordenado que relaciona a magnitude de um estímulo à resposta do receptor. A relação dose-resposta modelada por funções matemáticas (curva dose-resposta) caracterizam a relação e permitem sua análise. Assim, funções não lineares na forma de exponenciais foram ajustadas aos valores dos parâmetros R_n e G durante a fase de decaimento, uma vez que ambos os parâmetros estão associados ao mesmo fenômeno físico, a dissipação de energia nas vias aéreas (R_n)

e tecido pulmonar (G), e representam a parte real da impedância Z no CPM.

O comportamento em decaimento dos valores dos parâmetros R_n e G , que se segue ao pico ou valor máximo, foi modelado conforme duas funções não lineares. Função de decaimento exponencial simples, dada pela Equação 3.4 e curva de Richards inversa dada pela Equação 3.5. Ambas as funções descrevem o decaimento dos parâmetros R_n e G em forma exponencial. No entanto, diferentemente da função exponencial simples, a curva de Richards inversa considera que a taxa de crescimento ou decaimento, não será constante, mas sofrerá redução conforme limitações do sistema respiratório.

A Figura 26 (R_n) e a Figura 27 (G) fornecem exemplos do ajuste das curvas exponenciais aos valores obtidos experimentalmente para os parâmetros R_n e G durante a fase de decaimento a partir do seu ponto de máximo para cada dose do agonista MCh. Os resultados destes ajustes podem ser observados na Figura 28 (R_n) e Figura 29 (G) são apresentados tanto para os dados mensurados experimentalmente via CPM quanto predito pelos modelos exponenciais ajustados aos dados experimentais conforme descrito na seção 3.3.

Com relação ao parâmetro R_n podemos notar na Figura 28 que para animais inflamados (OVA) o número de amostras válidas disponíveis após verificação de critérios de validação descritos na seção 3.3 é menor que seu correspondente do grupo Controle, que pese a maior presença de animais inflamados (OVA) 35 no total para 19 do grupo Controle. Isso se deve sobretudo a presença de amostras com seu máximo comprometido pelo critério de $COD < 0,85$. Fato particularmente relevante para doses mais elevadas do agonista MCh, 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para camundongos pertencentes a linhagem *BALB/c* e 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para camundongos pertencentes a linhagem *C57BL/6*. Esse comportamento é de certa forma esperado, uma vez que o ajuste do CPM pressupõe ajuste linear à impedância respiratória. No entanto, uma das razões para valores de COD abaixo do aceitável é a presença de não linearidades em decorrência da broncoconstrição induzida farmacologicamente pelo agonista MCh administrado em *bolus*.

As principais vias aéreas têm receptores de ACh que respondem ao agonista MCh. Assim, a broncoconstrição de grandes vias aéreas pode ser alcançada em ambos os grupos Controle e OVA. No entanto, as vias aéreas menores não contêm músculo liso e, portanto, não há receptores de ACh. Nessas vias aéreas, significativa hiperresponsividade foi observada em animais inflamados (OVA). Muito em função de não linearidades em decorrência das distorções associadas a alterações das vias aéreas e parênquima pulmonar que em geral conduzem a distorções heterogêneas (WAGERS et al., 2002; THAMRIN et al., 2004;

VITORASSO, 2016). Essas distorções são particularmente presentes nas altas doses do agonista (MCh) e animais que apresentam espessamento e resposta parenquimatosa mais pronunciada, além de outros efeitos da inflamação alérgica aguda (grupo OVA).

Referente ao parâmetro G (Figura 29), podemos notar que o comportamento diante da não linearidade nas doses mais elevadas do agonista MCh para animais inflamados (OVA), conduz à mesma perda de amostras de valores máximos devido ao critério estabelecido para $COD < 0,85$. A exceção é a dose do agonista MCh de $30 \mu\text{g/kg}$ para camundongos pertencentes a linhagem *BALB/c*, onde os outros critérios de exclusão são responsáveis pela desclassificação das amostras, sobretudo a ocorrência do ponto de máximo na segunda metade da curva de decaimento.

No presente trabalho, foi efetuada comparação entre os valores calculados de AUC para os dois modelos não lineares ajustados, assim como suas respectivas variantes, e a AUC calculada conforme valores mensurados experimentalmente.

A Figura 30 apresenta os valores de AUC calculados para o parâmetro R_n . De forma geral, os valores de AUC calculados conforme valores preditos pelas funções ajustadas pelos modelos apresentam concordância com o valor de AUC calculado para os valores mensurados experimentalmente. Exceção ao modelo $R_{n.mExp1}$, que apresenta valores mais elevados nas duas doses mais altas do agonista MCh, $300 \mu\text{g/kg}$ e $1000 \mu\text{g/kg}$. Fato este presente para ambas as linhagens de camundongos, *BALB/c* e *C57BL/6* e que demonstra que o modelo exponencial simples, $R_{n.mExp1}$, na ausência do ponto de máximo e com taxa de decaimento constante, apresenta uma tendência por superestimar o valor máximo.

Com referência à AUC calculada para parâmetro G , podemos notar na Figura 31 que existe concordância entre os valores obtidos a partir dos modelos ajustados (G_{mExp0} , G_{mExp1} , G_{mSig0} e G_{mSig1}) e os obtidos através dos valores experimentais, G_{mens} .

Testes estatísticos foram empregados para a análise do desempenho dos dois modelos selecionados para regressão não linear, exponencial simples e curva de Richards inversa. Bem como, seus respectivos modelos ajustados com a inclusão do ponto de máximo e na ausência do ponto de máximo. A seleção do teste estatístico a ser empregado foi baseada na distribuição dos dados (normal ou não). Logo, estudos de normalidade foram executados para valores de máximo dos parâmetros R_n e G observados experimentalmente.

No estudo de normalidade, a análise visual da PDF é muito empregada para se inspecionar a distribuição dos dados, se estão de acordo com o esperado, neste caso a distribuição normal (SOKAL; ROHLF, 1995). Outra forma visual de se inspecionar o conjunto de dados experimentais é com o auxílio dos diagramas Q-Q. Assim para R_n temos a Figura 32 e

Figura 33 que apresentam a PDF para as linhagens de camundongos *BALB/c* e *C57BL/6* respectivamente. Da mesma forma temos a Figura 34 e Figura 35 com os diagramas Q-Q e resultados dos testes de Shapiro-Wilk para R_n , *BALB/c* e *C57BL/6* respectivamente. Da observação das figuras retromencionadas podemos verificar que para a linhagem de camundongos *BALB/c*, duas doses do agonista MCh, 100 µg/kg e 300 µg/kg, resultaram em um conjunto de dados com distribuição não normal para animais do grupo OVA. E para a linhagem de camundongos *C57BL/6* apenas uma dose do agonista MCh, 30 µg/kg, resultou em um conjunto de dados com distribuição não normal também para animais do grupo OVA.

Para G , temos que duas doses no grupo de animais inflamados (OVA), MCh 100 µg/kg e MCh 300 µg/kg, apresentaram conjunto de dados experimentais não normais para camundongos da linhagem *BALB/c* (Figura 36 e Figura 38). Para camundongos da linhagem *C57BL/6* apenas um conjunto de dados experimentais resultou em não normal, foi no grupo Controle quando da aplicação de MCh a 300 µg/kg (Figura 37 e Figura 39).

Dado que nem todos os conjuntos de dados experimentais resultaram em distribuições normais ou quase-normais, testes não paramétricos foram empregados. A preferência por testes não paramétricos sobre a transformada dos dados experimentais em conjuntos normais (ou quase-normais) deveu-se pela facilidade de cálculo e pelo fato de que testes de análise da variância não paramétricos são mais robustos estatisticamente para detectar divergências da hipótese nula, além de serem capazes de operar uma grande variedade de distribuições (SOKAL; ROHLF, 1995). Assim, o teste de Kruskal-Wallis foi empregado como teste estatístico neste trabalho. Quando foi necessário empregar teste de variância para dois fatores, o teste de Scheirer-Ray-Hare (extensão do teste de Kruskal-Wallis) foi utilizado.

A Tabela 3 apresenta os resultados dos testes de Scheirer-Ray-Hare aplicados aos valores máximos dos parâmetros R_n e G . Podemos concluir que para a linhagem de camundongos *BALB/c* existem diferenças significativas referente aos grupos de inflamação pulmonar (Controle e OVA), $p < 0,001$. Assim, como referente a dose aplicada do agonista MCh, $p < 0,0001$. Conclusões e valores válidos tanto para o parâmetro R_n quanto para o parâmetro G .

Quando se trata da linhagem de camundongos *C57BL/6* podemos apenas afirmar que existe diferença significativa referente a dose do agonista MCh empregada, $p < 0,0001$. Para a hipótese de diferenças significativas referente a grupos Controle e OVA, o teste de Scheirer-Ray-Hare não resultou em diferença significativa, $p \geq 0,05$ (*ns*). Este resultado

confirma o que pode ser visualmente percebido com a inspeção da Figura 25, tanto para o parâmetro R_n quanto para o parâmetro G .

Comparações múltiplas da significância estatística foram efetuadas para valores máximos do parâmetro R_n . O teste empregado foi o de Kruskal-Wallis e pós teste de de Wilcoxon Pareado com referência ao valor de R_n mensurado experimentalmente ($R_{n.mens}$). Evidencia-se na linhagem de camundongos *BALB/c* (Figura 40) que na dose mais elevada do agonista MCh, 1000 µg/kg, o modelo $R_{n.mExp1}$ apresenta diferença significativa referente aos dados mensurados experimentalmente ($R_{n.mens}$) tanto para animais do grupo Controle ($p < 0,001$) quanto para animais do grupo OVA ($p < 0,01$). Confirmando desta forma a tendência por superestimar valores máximos de R_n do modelo $R_{n.mExp1}$. Apesar de ser possível a observação visual da tendência do modelo $R_{n.mExp1}$ por superestimar valores máximos de R_n para outras doses do agonista MCh, sobretudo para grupo com inflamação pulmonar (OVA). Nenhum outro modelo apresentou diferença estatística significativa em relação a referência $R_{n.mens}$.

A Figura 41 apresenta os resultados para o teste de Kruskal-Wallis e pós teste de Wilcoxon Pareado com referência ao valor de $R_{n.mens}$ para a linhagem de camundongos *C57BL/6*. Tal qual os resultados para a linhagem *BALB/c*, animais *C57BL/6* apresentaram diferença significativa para valores conforme modelo $R_{n.mExp1}$ e referência $R_{n.mens}$ no conjunto de dados experimentais para a mais alta dose do agonista MCh, 1000 µg/kg, tanto para o grupo Controle ($p < 0,05$) quanto para o grupo OVA ($p < 0,05$). Além desta diferença, outra diferença significativa foi constatada, para a dose MCh 30 µg/kg, a menor dose de agonista utilizada neste estudo. Podemos notar na Figura 41 (a), diferenças significativas para com a referência $R_{n.mens}$ nos grupos-modelos: Controle- $R_{n.mExp1}$ ($p < 0,05$), Controle- $R_{n.mSig1}$ ($p < 0,05$), OVA- $R_{n.mExp1}$ ($p < 0,05$) e OVA- $R_{n.mSig1}$ ($p < 0,05$). Além das diferenças significativas observadas, temos para a dose MCh 30 µg/kg uma grande dispersão dos dados experimentais para $R_{n.mens}$ do grupo OVA. As razões para este resultado não são claros. Uma possível explicação são as poucas amostras para esta dose de MCh (30 µg/kg), $n=4$ para cada grupo (Controle e OVA), menos da metade do total existente ($n=9$). Para a menor dose do agonista, MCh = 30 µg/kg a curva dose-resposta não apresenta um pico expressivo e um decaimento exponencial bem caracterizado de forma a permitir um bom ajuste do modelo exponencial sem o valor de máximo, seja ele uma exponencial simples ou curva de Richards inversa.

Comparações múltipla da significância estatística foram efetuadas também para valores máximos do parâmetro G . Na Figura 42 encontra-se os resultados do teste de Kruskal-Wallis e pós teste de de Wilcoxon Pareado com referência ao valor de G_{mens}

para a linhagem de camundongos *BALB/c*. Os resultados indicam que na dose MCh 1000 µg/kg, para grupo Controle, o modelo G_{mExp1} apresenta diferenças significativas referentes aos dados mensurados experimentalmente (G_{mens}) tanto para modelo ajustado G_{mExp1} ($p < 0,01$) quanto o modelo G_{mSig1} ($p < 0,05$). Nenhuma outra diferença significativa foi indicada pelos testes estatísticos para a linhagem de camundongos *BALB/c*, resultando em testes sem diferença significativa (ns).

Camundongos da linhagem *C57BL/6* apresentaram diferença significativa somente no pós teste de Wilcoxon Pareado para um modelo ajustado, G_{mSig1} ($p < 0,05$) grupo OVA e dose MCh 30 µg/kg. Demonstrando grande concordância entre os modelos ajustados e valores experimentais utilizados como referência.

Os resultados dos testes de Scheirer-Ray-Hare aplicados aos valores calculados para a AUC dos valores máximos dos parâmetros R_n e G são apresentados na Tabela 4. Conclui-se que independentemente da linhagem de camundongos ou mesmo do parâmetro R_n ou G , existe diferença significativa, $p < 0,0001$, com referência a dose do agonista MCh aplicada. Porém o mesmo não se observa para o outro critério, ou seja, grupos Controle ou OVA. O teste a indicar diferença significativa com referência aos grupos de inflamação pulmonar é AUC calculada para valores máximos do parâmetro G e linhagem de camundongos *BALB/c*. Todos os demais testes para AUC resultaram em diferença não significativa. O que indica que o cálculo da AUC não é um bom descritor entre grupos de inflamação pulmonar. Assim, a distinção dos grupos Controle e OVA, pode ficar comprometida quando empregado o cálculo de AUC.

De fato, os gráficos presentes na Figura 45 e Figura 47 indicam que não há diferença significativa para camundongos da linhagem *C57BL/6* tanto para o parâmetro R_n quanto para parâmetro G . De certa forma, este resultado já era esperado, pois a inspeção visual da Figura 25, Figura 30 e Figura 31 já demonstravam que não haveria diferença significativa referente aos grupos Controle e OVA para camundongos *C57BL/6*.

Mesmo para camundongos da linhagem *BALB/c*, não há diferença significativa consistente entre os grupos de inflamação pulmonar quando o critério empregado é a AUC. A diferença é significativa somente para as doses mais elevadas do agonista MCh, 300 µg/kg e 1000 µg/kg, tanto para o parâmetro R_n (Figura 44) quanto para parâmetro G (Figura 46).

Do exposto acima, temos como melhor critério para distinguirmos grupos Controle e OVA os valores máximos dos parâmetros R_n e G conforme valores mensurados experimentalmente ou através dos valores máximos preditos pelos modelos ajustados. Este critério, se mostrou superior ao cálculo da AUC dos parâmetros R_n e G . Porém, um

outro aspecto possui relevância nesta análise. É sabido que há certa imprecisão na determinação dos valores máximos ou de pico dos parâmetros R_n e G . Devemos ter ciência de que o valor máximo experimental ou de pico dos parâmetros R_n e G observados pode não ser particularmente preciso ou com acurácia. Visto que a taxa de amostragem do experimento não permite uma identificação de pico confiável. A própria duração das perturbações necessárias para que o CPM seja ajustado via procedimento experimental de FOT é de quase três segundos. Portanto, o valor de pico medido pode ter sido identificado precocemente (região ascendente da curva dose-resposta) ou mesmo tardiamente (na região decrescente da curva dose-resposta). Logo, o uso do valor de máximo ou pico de qualquer um dos parâmetros (R_n e G), observados experimentalmente, apresenta certa imprecisão. Por outro lado, os valores determinados a partir do modelo ajustado em decaimento exponencial, seja por uma curva exponencial simples ou curva de Richards inversa, permite que o conjunto de todos os dados observados experimentalmente sejam empregados na determinação do valor máximo, conferindo confiabilidade e robustez ao processo. Permitindo até mesmo que o descarte do ponto de máximo possa ocorrer em caso de *COD* insuficiente diante dos critérios adotados.

6 CONCLUSÃO

Esta dissertação de mestrado foi desenvolvida com o objetivo de contribuir com processos que visam expandir a avaliação da mecânica respiratória em camundongos dada a importância que o modelo animal de asma possui na literatura existente sobre o tema (WALKER; KRAFT; FISHER, 2013).

A revisão de literatura, encontrada no capítulo 2 pretende apresentar os principais tópicos da literatura que são relevantes ao entendimento do assunto tratado neste trabalho. Assim, variados tópicos que vão desde a mecânica respiratória até modelagem matemática são apresentados.

O capítulo 3 possui a intenção de apresentar de forma clara porem, resumida os procedimentos experimentais empregados durante os estudos realizados. Nos capítulos 4 e 5 são apresentados e discutidos os resultados encontrados de forma a cumprir com os objetivos declarados para esta monografia no capítulo 1.

Apesar de algumas limitações existentes, como dados incompletos referentes ao procedimento de LBA, sobretudo para animais *C57BL/6*, os estudos referentes a mecânica respiratória em camundongos foi efetuado sem nenhum prejuízo. As regressões não lineares empregadas neste trabalho foram capazes de reproduzir os valores e o comportamento em decaimento exponencial dos dados experimentais coletados para os parâmetros selecionados, R_n e G , para ambas as linhagens de camundongos, *BALB/c* e *C57BL/6*. O emprego da estimativa do valor de máximo ou pico dos parâmetros, R_n e G , com emprego das regressões não lineares se mostrou superior a utilização do calculo da área sob a curva (AUC). Esta última foi incapaz de distinguir de forma clara os grupos Controle e OVA em algumas situações conforme discutido no capítulo anterior (5).

Em virtude do modelo exponencial simples ($R_{n.mExp1}$ e G_{mExp1}) apresentar a tendência de superestimar os valores máximos dos parâmetros, R_n e G na dose experimental máxima do agonista MCh (1000 µg/kg), o modelo empregando a curva de Richards inversa se apresenta como o modelo de melhor acurácia dentre os dois modelos de regressão não linear

avaliados neste estudo. Uma vez que este último apresentou resultados confiáveis para ambas as linhagens de camundongos, e todas as doses do agonista MCh empregadas. Sendo capaz de fornecer valores máximos de modo a distinguir os grupos Controle e OVA mesmo diante do descarte do valor máximo mensurado experimentalmente quando do ajuste do modelo (na ocorrência eventual de *COD* insuficiente). Constituindo-se desta forma em um método robusto e confiável. Evitando-se assim, o descarte do conjunto de dados a partir de procedimentos experimentais com camundongos, mitigando o desperdício de animais e outros recursos de acordo com os princípios dos 3Rs (Refinamento, Redução e Substituição) (GUHAD, 2005; HOVELL, 2013). Logo, conclui-se que os objetivos elencados nos itens 1.1.1 e 1.1.2 foram alcançados.

REFERÊNCIAS¹

AMERICAN THORACIC SOCIETY. American Thoracic Society Guidelines for Methacholine and Exercise Challenge Testing — 1999. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 161, n. 10, p. 309–329, 1999. ISSN 1073-449X.

BACHOFEN, H. Lung tissue resistance and pulmonary hysteresis. **Journal of Applied Physiology**, v. 24, n. 3, 1968.

BAILEY, T. C.; MARUSCAK, A. A.; MARTIN, E. L.; FORBES, A. R.; PETERSEN, A.; MCCAIG, L. A.; YAO, L. J.; LEWIS, J. F.; VELDHUIZEN, R. A. The effects of long-term conventional mechanical ventilation on the lungs of adult rats. **Critical Care Medicine**, v. 36, n. 8, p. 2381–2387, 2008. ISSN 15300293.

BATES, J. H. T. **Lung Mechanics, An Inverse Modeling Approach**. 1st. ed. [S.l.]: Cambridge University Press, 2009. ISBN 9780521509602.

BINDSLEV, N. **Drug–Acceptor Interactions– Modeling theoretical tools to test and evaluate experimental equilibrium effects**. [S.l.]: Routledge, 2017. v. 20. 213–213 p. ISBN 789197707107.

BORGES, M. D. C.; FERRAZ, E.; VIANNA, E. O. Bronchial provocation tests in clinical practice Teste de broncoprovocação na prática clínica. **Sao Paulo Med J**, v. 129, n. 4, p. 243, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/spmj/v129n4/08.pdf>.

BROOKS, S. M.; BERNSTEIN, I. L.; RAGHUPRASAD, P. K.; MACCIA, C. A.; MICEZKOWSKI, L. Assessment of airway hyperresponsiveness in chronic stable asthma. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 85, n. 1 PART 1, p. 17–26, 1990. ISSN 00916749.

CACERES, A. I.; BRACKMANN, M.; ELIA, M. D.; BESSAC, B. F.; Del Camino, D.; D'AMOURS, M.; WITEK, J. A. S.; FANGER, C. M.; CHONG, J. A.; HAYWARD, N. J.; HOMER, R. J.; COHN, L.; HUANG, X.; MORAN, M. M.; JORDT, S. E. A sensory neuronal ion channel essential for airway inflammation and hyperreactivity in asthma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 22, p. 9099–9104, 2009. ISSN 00278424.

CAREY, M. A.; CARD, J. W.; BRADBURY, J. A.; MOORMAN, M. P.; HAYKAL-COATES, N.; GAVETT, S. H.; GRAVES, J. P.; WALKER, V. R.; FLAKE, G. P.; VOLTZ, J. W.; ZHU, D.; JACOBS, E. R.; DAKHAMA, A.; LARSEN, G. L.; LOADER, J. E.; GELFAND, E. W.; GERMOLEC, D. R.; KORACH, K. S.; ZELDIN, D. C. Spontaneous airway hyperresponsiveness in estrogen receptor- α - deficient mice. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 175, n. 2, p. 126–135, 2007. ISSN 1073449X.

CARVALHO, A. R.; ZIN, W. A. Respiratory system dynamical mechanical properties: Modeling in time and frequency domain. **Biophysical Reviews**, v. 3, n. 2, p. 71–84, 2011. ISSN 18672450.

CRAUDER, B.; EVANS, B.; NOELL, A. **Functions and Change: A Modeling Approach to College Algebra and Trigonometry**. 1st. ed. Boston, MA: Richard Stratton, 2008. 737 p. ISBN 978-0-618-85804-0.

DAUBEUF, F.; FROSSARD, N. Acute Asthma Models to Ovalbumin in the Mouse. **Current Protocols in Mouse Biology**, v. 3, n. 1, p. 31–37, 2013. ISSN 2161-2617.

DAVIS, B. E.; BLAIS, C. M.; COCKCROFT, D. W. Methacholine challenge testing: comparative pharmacology. **Journal of Asthma and Allergy**, Volume 11, p. 89–99, 2018.

DREYFUSS, D.; SAUMON, G. Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies (State of the Art). **Am J Respir Crit Care Med**, v. 157, p. 1–30, 1998.

DUGUET, A.; BIYAH, K.; MINSHALL, E.; GOMES, R.; WANG, C. G.; TAOUDI-BENCHEKROUN, M.; BATES, J. H.; EIDELMAN, D. H. Bronchial responsiveness among inbred mouse strains: Role of airway smooth-muscle shortening velocity. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 161, n. 3 I, p. 839–848, 2000. ISSN 1073449X.

ELZHOV, T.; MULLEN, K.; SPIESS, A.; BOLKER, B. **minpack.lm: Interface to the Levenberg-Marquardt Nonlinear Least-Squares Algorithm Found in MINPACK, Plus Support for Bounds**. 2016. Disponível em: [⟨https://cran.r-project.org/web/packages/minpack.lm/minpack.lm.pdf⟩](https://cran.r-project.org/web/packages/minpack.lm/minpack.lm.pdf).

FRYER, A. D.; CHRISTOPOULOS, A.; NATHANSON, N. M. **Muscarinic Receptors**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012. v. 208. 1–499 p. (Handbook of Experimental Pharmacology, v. 208). ISSN 0002-9629. ISBN 978-3-642-23273-2. Disponível em: [⟨http://doi.contentdirections.com/mr/mgh.jsp?doi=10.1036/0071422803http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-23274-9⟩](http://doi.contentdirections.com/mr/mgh.jsp?doi=10.1036/0071422803http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-23274-9).

GANDY, W.; GRAYSON, S.; KODAT, J. IN A PROLONGED ASTHMA ATTACK, START AT THE END. When bronchodilators aren't working, your patient is in jeopardy. **EMS World**, v. 46, n. 06, p. 29–34, 2017. Disponível em: [⟨https://www.emsworld.com/article/12339676/in-a-prolonged-asthma-attack-start-at-the-end⟩](https://www.emsworld.com/article/12339676/in-a-prolonged-asthma-attack-start-at-the-end).

GUEDERS, M. M.; PAULISSEN, G.; CRAHAY, C.; QUESADA-CALVO, F.; HACHA, J.; Van Hove, C.; TOURNOY, K.; LOUIS, R.; FOIDART, J. M.; NOËL, A.; CATALDO, D. D. Mouse models of asthma: A comparison between C57BL/6 and BALB/c strains regarding bronchial responsiveness, inflammation, and cytokine production. **Inflammation Research**, v. 58, n. 12, p. 845–854, 2009. ISSN 10233830.

GUHAD, F. Introduction to the 3Rs (refinement, reduction and replacement). **Contemporary topics in laboratory animal science**, v. 44, n. 2, p. 58–9, 2005. ISSN 1060-0558. Disponível em: [⟨http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15812977⟩](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15812977).

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Medica**. 12. ed. [S.l.]: Elsevier Editora Ltda, 2011. ISBN 9788535249804.

HAHN, Y.-S.; TAUBE, C.; JIN, N.; TAKEDA, K.; PARK, J.-W.; WANDS, J. M.; AY-DINTUG, M. K.; ROARK, C. L.; LAHN, M.; O'BRIEN, R. L.; GELFAND, E. W.; BORN, W. K. $V\gamma 4 + \gamma\delta$ T Cells Regulate Airway Hyperreactivity to Methacholine in Ovalbumin-Sensitized and Challenged Mice. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 6, p. 3170–3178, 2003. ISSN 0022-1767.

HANTOS, Z.; SUKI, B.; CSENDES, T.; DAROCZY, B. Constant-phase modelling of pulmonary tissue impedance. **Bull. Eur. Physiopathol. Respir.**, v. 23, n. Suppl. 12, p. 326, 1987.

HARDMAN, J.; LIMBIRD, L.; GILMAN, A. **Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics**. 11. ed. New York: McGraw-Hill, 2005. 1984 p. ISBN 0071608915, 9780071608916.

HARKEMA, J. R.; NIKULA, K. J.; HASCHEK, W. M. **Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology (Third Edition) - The respiratory system**. [S.l.: s.n.], 2015. 55–112 p. ISBN 9783642012198.

HILDEBRANDT, J. COMPARISON OF MATHEMATICAL MODELS FOR CAT LUNG AND VISCOELASTIC BALLOON DERIVED BY LAPLACE TRANSFORM METHODS FROM PRESSURE-VOLUME DATA. **Bulletin of Mathematical Biophysics**, p. 651–667, 1969.

HILDEBRANDT, J. Dynamic properties of air-filled excised cat lung determined by liquid plethysmograph. **Journal of Applied Physiology**, v. 27, n. 2, p. 246–250, 1969. ISSN 8750-7587.

HOPP, R. J.; WEISS, S. J.; NAIR, N. M.; BEWTRA, A. K.; TOWNLEY, R. G. Interpretation of the results of methacholine inhalation challenge tests. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 80, n. 6, p. 821–830, 1987. ISSN 00916749.

HOVELL, R. Reduction, refinement and replacement. **Veterinary Record**, v. 172, n. 26, p. 691.1–691, 2013. ISSN 0042-4900.

IRVIN, C. G.; BATES, J. H. Measuring the lung function in the mouse: The challenge of size. **Respiratory Research**, v. 4, p. 1–9, 2003. ISSN 1465993X.

JOHNSON, M. Laboratory Mice and Rats. **Materials and Methods**, Princeton, New Jersey, United States, ISSN : 232, 2012. Disponível em: (<https://www.labome.com/method/Laboratory-Mice-and-Rats.html>).

JONASSON, S.; HEDENSTIERNA, G.; HEDENSTRÖM, H.; HJOBERG, J. Comparisons of effects of intravenous and inhaled methacholine on airway physiology in a murine asthma model. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 165, n. 2-3, p. 229–236, 2009. ISSN 15699048.

KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. **Basic and Clinical Pharmacology**. 12th. ed. [S.l.]: Hill, Mac Graw, 2012. 816–817 p. ISSN 08912033. ISBN 978-0-07-176401-8.

LATHI, B. P.; GREEN, R. A. **Linear Systems and Signals**. 2nd. ed. New York: Oxford University Press, Inc., 2005. 410–484 p. ISBN 0195158334.

LEIGH, R.; ELLIS, R.; WATTIE, J.; SOUTHAM, D. S.; De Hoogh, M.; GAULDIE, J.; O'BYRNE, P. M.; INMAN, M. D. Dysfunction and remodeling of the mouse airway persist after resolution of acute allergen-induced airway inflammation. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 27, n. 5, p. 526–535, 2002. ISSN 10441549.

LEVICK, R. J. **An Introduction to Cardiovascular Physiology**. [S.l.: s.n.], 1991. 279 p. ISSN 0007-0912. ISBN 0340942045.

LÖTVALL, J.; INMAN, M.; O'BYRNE, P. Measurement of airway hyperresponsiveness: new considerations. **Thorax**, v. 53, p. 419–424, 1998. ISSN 00471852.

MACKENZIE, I. (Ed.). **Core Topics in Mechanical Ventilation**. Cambridge: Cambridge University Press, 2008. ISBN 9780511544606. Disponível em: <http://ebooks.cambridge.org/ref/id/CBO9780511544606>.

MARQUÉS-GARCÍA, F.; MARCOS-VADILLO, E. Review of mouse models applied to the study of asthma. **Methods in Molecular Biology**, v. 1434, p. 213–222, 2016. ISSN 10643745.

MCGOVERN, T. K.; ROBICHAUD, A.; FERREYDOONZAD, L.; SCHUESSLER, T. F.; MARTIN, J. G. Evaluation of Respiratory System Mechanics in Mice using the Forced Oscillation Technique. **Journal of Visualized Experiments**, n. 75, may 2013. ISSN 1940-087X. Disponível em: <http://www.jove.com/video/50172/evaluation-respiratory-system-mechanics-mice-using-forced-oscillation>.

MENDIOLA, M.; THARAKAN, A.; CHEN, M.; ASEMPA, T.; LANE, A. P.; RAMANATHAN, M. Characterization of a novel high-dose ovalbumin-induced murine model of allergic sinonasal inflammation. **International Forum of Allergy and Rhinology**, v. 6, n. 9, p. 964–972, 2016. ISSN 20426984.

MORIYA, H. T.; MORAES, C. T.; BATES, J. H. Nonlinear and frequency-dependent mechanical behavior of the mouse respiratory system. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 31, n. 3, p. 318–326, 2003. ISSN 00906964.

NAVAJAS, D.; FARRE, R.; ROTGER, M. **Pulmonary Function in Mechanically Ventilated Patients**. 13. ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1991. v. 13. 1689–1699 p. (Update in Intensive Care and Emergency Medicine, 9). ISSN 1098-6596. ISBN 978-3-540-52650-6. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-84209-2>.

NIALS, A. T.; UDDIN, S. Mouse models of allergic asthma: Acute and chronic allergen challenge. **DMM Disease Models and Mechanisms**, v. 1, n. 4-5, p. 213–220, 2008. ISSN 17548403.

OOSTVEEN, E.; MACLEOD, D.; LORINO, H.; FARRÉ, R.; HANTOS, Z.; DESAGER, K.; MARCHAL, F. The forced oscillation technique in clinical practice: Methodology, recommendations and future developments. **European Respiratory Journal**, v. 22, n. 6, p. 1026–1041, 2003. ISSN 09031936.

OTTO, S. P.; DAY, T. **A biologist's guide to mathematical modeling in ecology and evolution**. 1st. ed. Princeton, New Jersey: Princeton University Press, 2007. 1423 p. ISBN 978-0-691-12344-8.

PELEG, M. Mathematical interpretation of dose-response curves. **Bulletin of Mathematical Biology**, v. 59, n. 4, p. 747–761, jul 1997. ISSN 00928240. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0092-8240\(97\)00032-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8240(97)00032-3)[http://www.springerlink.com/index/10.1016/S0092-8240\(97\)00032-3](http://www.springerlink.com/index/10.1016/S0092-8240(97)00032-3).

PETÁK, F.; HANTOS, Z.; ADAMICZA, A.; ASZTALOS, T.; SLY, P. D. Methacholine-induced bronchoconstriction in rats: effects of intravenous vs. aerosol delivery. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 82, n. 5, p. 1479–87, 1997. ISSN 8750-7587. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9134896>.

POTTER, M. **The BALB/c Mouse - Genetics and Immunology**. [S.l.]: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1985. v. 6. 253 p. ISSN 00900877. ISBN 9783642707421.

RICHARDS, F. J. A flexible growth function for empirical use. **Journal of Experimental Botany**, v. 10, n. 2, p. 290–301, 1959. ISSN 00220957.

ROBICHAUD, A.; FERREYDOONZAD, L.; SCHUESSLER, T. F. Delivered dose estimate to standardize airway hyperresponsiveness assessment in mice. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 308, n. 8, p. L837–L846, 2015. ISSN 15221504.

RUBIN, A. S.; PEREIRA, C. A. d. C.; NEDER, J. A.; FITERMAN, J.; PIZZICHINI, M. M. M. Hiperresponsividade brônquica. **J Pneumol**, v. 28, n. 3, p. 101–121, 2002.

SALAZAR, J. H.; KNOWLES, E. An analysis of pressure-volume characteristics of the lungs. **Journal of Applied Physiology**, v. 19, n. 1, p. 97–104, 1964. Disponível em: <http://jap.physiology.org/content/19/1/97>.

SANTANA, J. L. de. **Relações entre mecânica respiratória e medidas morfológicas em camundongos BALB/c**. 82 p. Tese (Doutorado) — Escola Potitécnica da USP, 2019.

SCHWARTE, L. A.; ZUURBIER, C. J.; INCE, C. Mechanical ventilation of mice. **Basic Research in Cardiology**, v. 95, n. 6, p. 510–520, 2000. ISSN 03008428.

SHERWOOD, L. **Human Physiology : From Cells to Systems**. [S.l.: s.n.], 2013. ISBN 978-1-111-57743-8.

SIGNORELL, A.; AHO, K.; ALFONS, A.; ANDEREGG, N.; ARAGON, T.; ARPPE, A.; BADDELEY, A.; BARTON, K.; BOLKER, B.; W. Borchers, H.; CAEIRO, F.; CHAMPELY, S.; CHESSEL, D.; CHHAY, L.; CUMMINS, C. **DescTools: Tools for Descriptive Statistics**. 2020. Disponível em: <https://cran.r-project.org/package=DescTools>.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Biometry the principles and practice of statistics in biological research**. 3rd. ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1995. 899 p. ISBN 13:978-0-7167-2411-7.

SUKI, B.; BARABASI, A. L.; LUTCHEN, K. R. Lung tissue viscoelasticity: a mathematical framework and its molecular basis. **Journal of Applied Physiology**, v. 76, n. 6, p. 2749–2759, 2017. ISSN 8750-7587.

SWEDIN, L.; ELLIS, R.; KEMI, C.; RYRFELDT, K.; INMAN, M.; DAHLÉN, S. E.; ADNER, M. Comparison of aerosol and intranasal challenge in a mouse model of allergic airway inflammation and hyperresponsiveness. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 153, n. 3, p. 249–258, 2010. ISSN 10182438.

TAKEDA, K.; HACZKU, A.; LEE, J. J.; IRVIN, C. G.; GELFAND, E. W. Strain dependence of airway hyperresponsiveness reflects differences in eosinophil localization in the lung. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 281, n. 2 25-2, p. 394–402, 2001. ISSN 10400605.

THAMRIN, C.; JÁNOSI, T. Z.; COLLINS, R. A.; SLY, P. D.; HANTOS, Z. Sensitivity analysis of respiratory parameter estimates in the constant-phase model. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 32, n. 6, p. 815–822, 2004. ISSN 00906964.

The Jackson Laboratory. **Body Weight Information - Mice Strain C57BL/6J (000664)**. 2021. Disponível em: <https://www.jax.org/strain/000664>.

The Jackson Laboratory. **BODY WEIGHT INFORMATION FOR BALB/CJ (000651)**. 2021. Disponível em: <https://www.jax.org/jax-mice-and-services/strain-data-sheet-pages/body-weight-chart-000651>.

TOMIOKA, S.; BATES, J. H.; IRVIN, C. G. Airway and tissue mechanics in a murine model of asthma: Alveolar capsule vs. forced oscillations. **Journal of Applied Physiology**, v. 93, n. 1, p. 263–270, 2002. ISSN 87507587.

TREUTING, P. M.; DINTZIS, S. M.; MONTINE, K. S. **Comparative Anatomy and Histology: A Mouse, Rat, and Human Atlas**. 2nd. ed. Mica Haley, 2018. ISBN 978-0-12-802900-8. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300985818795862>.

VERHULST, P. F. Notice sur la loi que la population poursuit dans son accroissement. **Correspondance Mathématique et Physique**, X, p. 113–121, 1838.

VERHULST, P. F. Recherches mathématiques sur la loi d'accroissement de la population. **Nouveaux mémoires de l'Académie Royale des Sciences et Belles Lettres de Bruxelles**, XVIII, p. 1–45, 1845.

VERHULST, P. F. Deuxième mémoire sur la loi d'accroissement de la population. **Mémoires de l'Académie Royale des Sciences, des Lettres et des Beaux Arts de Belgique**, XX, p. 1–32, 1847.

VITORASSO, R. d. L. **Análise da aplicação do modelo de fase constante na avaliação da mecânica respiratória em animais durante broncoconstrição**. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2016.

WAGERS, S.; LUNDBLAD, L.; MORIYA, H. T.; BATES, J. H.; IRVIN, C. G. Nonlinearity of respiratory mechanics during bronchoconstriction in mice with airway inflammation. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, n. 5, p. 1802–1807, may 2002. ISSN 87507587. Disponível em: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/japplphysiol.00883.2001>.

WAITE, L.; FINE, J. **Applied BioFluid Mechanics**. [S.l.: s.n.], 2007. ISBN 9780071472173.

WALKER, J. K.; KRAFT, M.; FISHER, J. T. Assessment of murine lung mechanics outcome measures: Alignment with those made in asthmatics. **Frontiers in Physiology**, v. 4 FEB, n. February, p. 1–14, 2013. ISSN 1664042X.

WARREN, K. J.; DICKINSON, J. D.; NELSON, A. J.; WYATT, T. A.; ROMBERGER, D. J.; POOLE, J. A. Ovalbumin-sensitized mice have altered airway inflammation to agriculture organic dust. **Respiratory Research**, Respiratory Research, v. 20, n. 1, p. 1–10, 2019. ISSN 1465993X.

WEST, J. B. **Respiratory physiology: The essentials**. 12. ed. [S.l.: s.n.], 2012. ISSN 00070971. ISBN 978-1-60913-640-6.

WHITEHEAD, G. S.; WALKER, J. K.; BERMAN, K. G.; FOSTER, W. M.; SCHWARTZ, D. A. Allergen-induced airway disease is mouse strain dependent. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 285, n. 1 29-1, p. 32–42, 2003. ISSN 10400605.

WICKHAM, H. **ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis**. Springer-Verlag New York, 2016. ISBN 978-3-319-24277-4. Disponível em: <<https://ggplot2.tidyverse.org>>.

WYLIE, J. L.; HOUSE, A.; MAUSER, P. J.; SELLERS, S.; TEREKETSKI, J.; WANG, Z.; EHRICK, J. D. Inhaled formulation and device selection: Bridging the gap between preclinical species and first-in-human studies. **Therapeutic Delivery**, v. 9, n. 5, p. 387–404, 2018. ISSN 20416008.

¹De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).