JEFFERSON LIMA DE SANTANA

Relações entre mecânica respiratória e medidas morfológicas em camundongos BALB/c

São Paulo
2019

JEFFERSON LIMA DE SANTANA

Relações entre mecânica respiratória e medidas morfológicas em camundongos BALB/c

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

São Paulo
2019

JEFFERSON LIMA DE SANTANA

Relações entre mecânica respiratória e medidas morfológicas em camundongos BALB/c

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
2019

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, 15 de outubro de 2019

Assinatura do autor: _____

Assinatura do orientador: _____

Catalogação-na-publicação

Santana, Jefferson Lima de
Relações entre mecânica respiratória e medidas morfológicas em camundongos Balb/c / J. L. Santana – versão corr. – São Paulo, 2019.
82 f.

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

1.Mecânica respiratória 2.Modelo de fase constante 3.Volume de pulmões ex vivo 4.Medidas morfológicas I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia de Telecomunicações e Controle II.t.

Aos meus pais José Everaldo de Santana e Rosana Lima da Silva Santana pelo crucial apoio à minha formação.

AGRADECIMENTOS

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

À minha querida esposa pelo constante apoio, compreensão e sabedoria, que me ajudaram a superar os obstáculos encontrados durante essa trajetória.

Ao Prof. Dr. Henrique Takachi Moriya, pela oportunidade de realizar um trabalho de qualidade sob sua excelente orientação, a qual me proporcionou desenvolvimento pessoal e profissional por meio de enriquecedoras conversas.

Ao Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima, por ceder gentilmente o espaço do Laboratório de Fisiopatologia da Inflamação Experimental do Departamento de Farmacologia do ICB-USP.

À Profa. Dra. Maria Aparecida de Oliveira (*Cida*), por toda a sua paciência, empenho e habilidade, durante as várias horas dedicadas aos nossos experimentos, e as valiosas conversas e análises que tivemos.

Também gostaria de agradecer ao colega Renato de Lima Vitorasso, pelas horas dedicadas me auxiliando/ensinando procedimentos laboratoriais e conceituais sobre diversos temas deste trabalho.

Aos professores da Escola Politécnica que, por meio das aulas ministradas de excelente qualidade, permitiram que eu pudesse agregar conhecimento valioso à minha formação.

A todos os colegas que tive a oportunidade de conhecer na Escola Politécnica e ICB, em especial, ao colega André Schimidt Suaiden, que me apresentou ao Prof. Henrique, participando, assim, do início dessa jornada.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

Por fim, a todos os envolvidos, direta ou indiretamente, que contribuíram para a realização deste trabalho.

"O conhecimento serve para encantar as pessoas, não para humilhá-las."

(Mario Sergio Cortella)

RESUMO

A mecânica respiratória de roedores é amplamente avaliada por intermédio da impedância do sistema respiratório que pode ser obtida por meio da técnica de oscilações forçadas (FOT), utilizando-se um ventilador mecânico para pequenos animais (SAV). Esse método é intrinsecamente dependente de uma característica física do animal, a massa corpórea, que é utilizada pelo SAV para ajustar as amplitudes das perturbações ventilatórias requeridas pela FOT. De modo a entender melhor a relação entre a avaliação da mecânica do sistema respiratório (via FOT) e as características físicas de roedores, este trabalho relacionou as propriedades mecânicas do sistema respiratório, utilizando parâmetros do modelo de fase constante (MFC) (R_n, G e H), com medidas morfológicas de camundongos BALB/c machos com 18 semanas de idade, como a massa corpórea, comprimento naso-anal (CNA), índice de Lee (IL) e volume dos pulmões *ex vivo*. Para estimar o volume total dos pulmões *ex vivo* dos animais, foi desenvolvido um aparato que aplica o princípio de Arquimedes. Este estudo foi desenvolvido com um modelo animal de inflamação pulmonar e seu grupo controle. A mecânica respiratória foi avaliada em condições basais sob duas formas de administração de solução salina tampão fosfato (PBS) via veia jugular direita: bolus (B) e infusão contínua (I). Dessa maneira, quatro grupos foram avaliados: OVA-B (n=6), que representa o modelo animal de inflamação pulmonar com administração de PBS por bolus; Controle-B (n=7), que simboliza o grupo controle do OVA-B; OVA-I (n=8), modelo animal de inflamação pulmonar, mas com administração de PBS por infusão contínua; e, por último, o grupo Controle-I (n=10), que caracteriza o controle do OVA-I. Correlações negativas e significativas foram observadas no grupo Controle-I para os parâmetros G e H com a massa corpórea ($p < 0,001$ e $p = 0,011$, respectivamente) e CNA ($p = 0,001$ e $p = 0,001$, respectivamente). Considera-se que essas associações significativas observadas no grupo Controle-I estejam mais relacionadas ao método aplicado para avaliar a mecânica respiratória desses animais (FOT), onde os de massa corpórea maior recebem amplitudes de perturbações ventilatórias maiores, do que às variações no volume (tamanho) dos pulmões entre esses animais, pois não foi verificada qualquer correlação positiva e significativa do volume dos pulmões estimado *ex vivo* com a massa corpórea ou CNA. Dessa forma, observou-se, também, que os parâmetros do MFC, obtidos via FOT, são mais suscetíveis a variações devido ao volume/fluxo de ar dentro dos pulmões, capaz de alterar as condições funcionais das regiões centrais e periféricas, do que as pequenas variações anatômicas no volume dos pulmões entre camundongos da mesma linhagem.

Palavras-Chave: Camundongos BALB/c. Mecânica respiratória. Modelo de fase constante. Volume dos pulmões *ex vivo*. Medidas morfológicas.

ABSTRACT

The respiratory mechanics of rodents is widely assessed through the impedance of the respiratory system, which might be attained by the forced oscillation technique (FOT), using a mechanical ventilator for small animals (SAV). This method is intrinsically dependent on a physical characteristic of the animal, the body mass, that is used by the SAV to adjust the amplitude of flow perturbations required by the FOT. In order to better understand the relationship between the assessment of the respiratory system mechanics (by FOT) and the physical characteristics of rodents, this work assessed the relationship of the mechanical properties of the respiratory system, using parameters of the constant phase model (MFC) (R_n, G e H), with morphological measurements of male BALB/c mice 18 week-old such as body mass, nose-to-anus length (CNA), Lee index (IL) and *ex vivo* lung volume. To estimate the total *ex vivo* lung volume of the animals, it was developed an apparatus that uses the Archimedes's principle. This study was conducted with an animal model of lung inflammation and a control group. The respiratory mechanics was assessed in the basal condition under two ways of injection of phosphate-buffered saline (PBS) via right jugular vein: bolus (B) and continuous infusion (I). Hence, four groups were assessed: OVA-B (n=6), which represents the animal model of lung inflammation with PBS injection via bolus; Controle-B (n=7), which symbolizes the control group of OVA-B; OVA-I (n=8), the animal model of lung inflammation, but with PBS injection via continuous infusion; and, at last, the Controle-I, which indicates the control group of OVA-I. Significant negative correlations were observed in the group Controle-I for the parameters G and H with the body mass ($p < 0,001$ and $p = 0,011$, respectively) and CNA ($p = 0,001$ and $p = 0,001$, respectively). We posit that these significant associations observed in the group Controle-I are more related to the method used to assess the respiratory mechanics of these animals (FOT), where the ones with higher value of body mass receive higher amplitudes of flow perturbations, than due to the changes in the volume (size) of the lungs among these animals, because it was not observed any positive and significant correlation of the *ex vivo* lung volume estimated with body mass or CNA. Thereby, it was also noted that the parameters of the MFC, attained by FOT, are more susceptible to changes due to the volume/flux of air within the lungs, capable of changing functional conditions in central and periphery regions, than due to small anatomical changes in the volume of the lung among mice of the same strain.

Keywords: BALB/c mice. Respiratory mechanics. Constant phase model. Lung volume *ex vivo*. Morphological measurements.

LISTA DE FIGURAS

1 Diagrama de blocos do funcionamento do SAV (legacy $flexiVent$, SCIREQ Inc., Canadá). Um motor linear desloca o ar do cilindro que é utilizado para ventilar o animal. Duas válvulas de três vias controlam a direção do fluxo de ar durante a respiração: a válvula inspiratória que conecta a saída do cilíndro à traqueia durante a inspiração ou ao meio ambiente durante a fase de expiração; e a válvula expiratória que conecta a traqueia do animal a uma câmara com pressão controlada (PEEP) durante a fase de expiração passiva do roedor. A/D é um conversor analógico-digital, que transmite os sinais medidos, descritos a seguir, para um controlador configurado pelo computador. P_{cil} e V_{cil} representam mensurações da pressão e o volume de ar deslocado no cilindro, respectivamente, e P_{ao} é a mensuração da pressão na entrada das vias aéreas. Com esses valores medidos P_{tr} e V_{tr}, pressão e o volume de ar na traqueia, respectivamente, são estimados. 23

2 Efeito do volume pulmonar sobre os parâmetros R_n, G, e H com o tórax fechado (Z_{sr}) e aberto (Z_p). O volume zero adotado nos gráficos, corresponde ao valor da CRF do animal com o tórax fechado. 28

3 Média ± SD da massa corpórea de 80 camundongos BALB/cJ (40 machos e 40 fêmeas), aferida semanalmente, de 3 a 20 semanas de idade. 30

4 Exemplo de um rato em posição supina para evidenciar a distância medida da extremidade do nariz ao ânus (CNA). 36

5 (a) Sistema utilizado para medir a massa do líquido deslocado, com uma massa inicial M_1 (já considerando o volume adicional da haste imersa). (b) Sistema com o órgão imerso ao líquido, com uma massa M_2 registrada. A diferença entre as massas (M_o) corresponde à massa do líquido deslocado pelo órgão de volume V_o. 39

6 Formação dos grupos OVA e Controle de camundongos BALB/c por meio do protocolo de indução de inflamação pulmonar desenvolvido no Laboratório de Fisiopatologia da Inflamação Experimental do Departamento de Farmacologia do ICB-USP. 42

7 Exemplo de um camundongo BALB/c traqueostomizado e conectado ao ventilador mecânico durante experimento no Laboratório de Fisiopatologia da Inflamação Experimental do Departamento de Farmacologia do ICB-USP. 43

8 Bomba de infusão (11 Plus, Harvard Apparatus, EUA) utilizada para administrar o PBS (5 minutos a uma vazão constante), via jugular direita, nos camundongos BALB/c. Em (a) tem-se uma visão frontal da bomba de infusão durante o experimento. Em (b) tem-se uma visão superior da bomba de infusão, que controla o êmbolo da seringa durante todo o procedimento. 44

9 SAV utilizado na avaliação da mecânica respiratória de roedores, localizado no Laboratório de Fisiopatologia da Inflamação Experimental do Departamento de Farmacologia do ICB-USP. 45

10 Manobra de recrutamento alveolar realizada antes da avaliação mecânica. (a) A pressão foi monitorada pelo SAV na região da traqueia para realizar a manobra (P_{tr}). (b) Volume de ar correspondente entregue aos pulmões (V_{tr}). 45

11 Exemplo de impedância do sistema respiratório (Z_{sr}) de um BALB/c computada nas 13 frequências compostas na perturbação ventilatória. Z_{sr} é representada pela sua parte real (R) por pontos em vermelho, e imaginária (X) por pontos em ciano. As 13 Z_{sr} computadas são, posteriormente, utilizadas para ajustar o MFC (linha vermelha e ciano). 46

12 Oito dos 15 registros a serem computados dos parâmetros R_n, G e H do MFC fornecidos pelo software de aquisição de dados do SAV ($flexiVent$ v5.2, SCIREQ Inc., Canadá) durante experimento em laboratório. Pontos preenchidos em vermelho possuem COD $\geq 0,9$ e os vazados COD $< 0,9$. . 47

13 Mensuração do comprimento naso-anal (CNA) dos camundongos utilizados. 48

14 Diagrama esquemático do aparato de fixação dos pulmões desenvolvido. Um funil de vidro é preenchido com paraformaldeído 4% a uma altura de 25 cm, em relação aos pulmões, com o auxílio de um suporte universal e garras de condensador. Assim, através de um registro e um tubo, o fixador é instilado aos pulmões previamente canulados. 49

15 (a) Aparato montado para realizar a fixação dos pulmões dos animais em laboratório. (b) Pulmões de um camundongo BALB/c completamente insuflados durante o procedimento de fixação. 50

16 (a) Diagrama do aparato desenvolvido para manter os pulmões submersos em solução salina com um suporte universal e haste acoplada (com uma pequena argola na extremidade). (b) Com esse aparato, os pulmões foram imersos em PBS a uma profundidade fixa, ponto onde a mufa dupla giratória atinge a marca de altura de referência em vermelho no suporte universal. 51

17 (a) Processo de tara da balança com apenas a haste imersa na solução salina. (b) Pulmões fixados à haste com a própria linha utilizada para amarrar a traqueia após a instilação traqueal. (c) Valor da massa do líquido deslocado pelos pulmões submersos, ou seja, o volume dos pulmões do camundongo (ml) considerando-se o PBS com densidade de 1 g/ml. 51

18 Volume dos pulmões *ex vivo* para os quatro grupos: Controle-B, OVA-B, Controle-I e OVA-I. Média ± SD. Não houve diferença significativa entre os grupos, segundo a ANOVA. 55

19 Relação do parâmetro R_n com medidas morfométricas dos camundongos BALB/c pertencentes ao grupo Controle-B. 56

20 Relação do parâmetro G com medidas morfométricas dos camundongos BALB/c pertencentes ao grupo Controle-B. 56

21 Relação do parâmetro H com medidas morfométricas dos camundongos BALB/c pertencentes ao grupo Controle-B. 57

22 Relação do parâmetro R_n com medidas morfométricas dos camundongos BALB/c pertencentes ao grupo Controle-I. 57

23 Relação do parâmetro G com medidas morfométricas dos camundongos BALB/c pertencentes ao grupo Controle-I. 58

24 Relação do parâmetro H com medidas morfométricas dos camundongos BALB/c pertencentes ao grupo Controle-I. 58

25 Relação do volume dos pulmões *ex vivo* com medidas morfométricas dos camundongos BALB/c do grupo Controle-B. 59

26 Relação do volume dos pulmões *ex vivo* com medidas morfométricas dos camundongos BALB/c do grupo Controle-I. 60

27 Relação do parâmetro R_n com medidas morfométricas dos camundongos BALB/c pertencentes ao grupo OVA-B. 61

28 Relação do parâmetro G com medidas morfométricas dos camundongos BALB/c pertencentes ao grupo OVA-B. 61

29 Relação do parâmetro H com medidas morfométricas dos camundongos BALB/c pertencentes ao grupo OVA-B. 62

30 Relação do parâmetro R_n com medidas morfométricas dos camundongos BALB/c pertencentes ao grupo OVA-I. 62

31 Relação do parâmetro G com medidas morfométricas dos camundongos BALB/c pertencentes ao grupo OVA-I. 63

32 Relação do parâmetro H com medidas morfométricas dos camundongos BALB/c pertencentes ao grupo OVA-I. 63

33 Relação do volume dos pulmões *ex vivo* com medidas morfométricas dos camundongos BALB/c do grupo OVA-B. 64

34 Relação do volume dos pulmões *ex vivo* com medidas morfométricas dos camundongos BALB/c do grupo OVA-I. 65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAL Lavado Broncoalveolar (do inglês *Bronchoalveolar Lavage*)

CEUA Comissão de Ética no Uso de Animais

CNA Comprimento Naso-Anal

COD Coeficiente de Determinação

CPT Capacidade Pulmonar Total

CRF Capacidade Residual Funcional

DPOC Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

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

$\mathbf{f}_r$ Frequência Respiratória

G Viscância, associada à dissipação de energia

H Elastância, associada ao armazenamento de energia elástica

HRB Hiperresponsividade Brônquica

i.p. Intraperitoneal

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

IL Índice de Lee

IMC Índice de Massa Corpórea

$\mathbf{I_gE}$ Imunoglobulina E

IL-13 Interleucina 13

IL-5 Interleucina 5

IL-4 Interleucina 4

MFC Modelo de Fase Constante

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

PBW Peso Previsto/Ideal (do inglês *Predicted Body Weight*)

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

PPGEE Programa de Pós-Graduação da Engenharia Elétrica

$\mathbf{R}_n$ Resistência Newtoniana

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*)

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

$\mathbf{T}_H\mathbf{1}$ Células T Auxiliares (helper) tipo 1

$\mathbf{T}_H\mathbf{2}$ Células T Auxiliares (helper) tipo 2

USP Universidade de São Paulo

$\mathbf{V}_c$ Volume Corrente

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **15**

1.1 Objetivos 16

1.1.1 Objetivo principal 16

1.1.2 Objetivos secundários 17

1.2 Justificativas 17

2 REVISÃO DE LITERATURA **19**

2.1 Avaliação da mecânica respiratória em roedores 19

2.1.1 Ventilador mecânico para pequenos animais 21

2.1.1.1 Ajuste de volume corrente 23

2.1.2 Modelo de Fase Constante (MFC) 25

2.2 Camundongos BALB/c 29

2.2.1 Asma: modelo de inflamação pulmonar 31

2.3 Dados morfométricos em roedores 34

2.3.1 Índice de Lee 35

2.3.2 Estimativa do volume dos pulmões *ex vivo* 38

3 MATERIAIS E MÉTODOS **41**

3.1 Animais de experimentação e o protocolo de asma 41

3.1.1 Preparação dos animais 42

3.2 Avaliação da mecânica respiratória 44

3.3 Lavado broncoalveolar, comprimento naso-anal e índice de Lee 47

3.3.1 Lavado broncoalveolar 47

3.3.2 Comprimento naso-anal e índice de Lee 48

3.4 Volume dos pulmões *ex vivo* 49

3.5 Análise dos dados 52

4 RESULTADOS **54**

5 DISCUSSÃO **66**

6 CONCLUSÃO **73**

REFERÊNCIAS **74**

APÊNDICE **80**

1 INTRODUÇÃO

Neste manuscrito são apresentados os estudos realizados como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências na área de Engenharia Biomédica do Programa de Pós-Graduação da Engenharia Elétrica (PPGEE) da Universidade de São Paulo (USP). Esta dissertação é fundamentada na avaliação das propriedades mecânicas do sistema respiratório e de medidas morfológicas obtidas em camundongos BALB/c.

A mecânica respiratória foi avaliada por intermédio da impedância de entrada do 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 Inc., Canadá), durante perturbações volumétricas realizadas sob ventilação mecânica. A impedância é uma ferramenta muito útil na avaliação do sistema respiratório, pois é capaz de caracterizar, quantitativamente, o complexo comportamento mecânico desse sistema.

No entanto, a melhor maneira de se compreender, fisiologicamente, como a impedância está associada às propriedades mecânicas dos pulmões e caixa torácica, é por meio da utilização de modelos matemáticos, como o modelo de fase constante (MFC) empregado neste trabalho (BATES, 2009). Esse modelo matemático apresenta quatro parâmetros (R_n, I, G e H) que são amplamente aplicados na caracterização das propriedades mecânicas do sistema respiratório. Três desses parâmetros (R_n, G e H) estão presentes neste estudo para avaliar possíveis correlações com dados morfométricos de camundongos BALB/c como massa corpórea, comprimento naso-anal, índice de Lee e volume dos pulmões *ex vivo*.

Diversas análises correlacionais entre variáveis morfológicas como massa corpórea, medidas de comprimento corporal do animal, ou até mesmo de área superficial, podem ser encontradas na literatura (AGUH et al., 2013; HANSON; HEYS, 1924). Da mesma forma, diversas relações alométricas já foram verificadas para parâmetros funcionais como frequência respiratória (f_r), capacidade pulmonar total (CPT), volume corrente (V_c), complacência pulmonar, etc., para uma grande variedade de mamíferos (BENNETT; TEN-

NEY, 1982; STAHL, 1967).

No entanto, estudos avaliando possíveis correlações dos parâmetros mecânicos do sistema respiratório (R_n, G e H), não só com a massa corpórea do animal, mas também com outros dados morfométricos, como os utilizados neste trabalho, são mais raros. Além disso, o fato dos parâmetros R_n, G e H apresentarem significado fisiológico para a impedância do sistema, obtida com um ventilador mecânico, levanta uma preocupação em relação às proporções alométricas dos animais sob avaliação, pois todas as perturbações ventilatórias impostas ao animal são ajustadas em relação à sua massa corpórea, e não ao tamanho de seus pulmões (GUIVARCH et al., 2018; SCHUESSLER; BATES, 1995).

Desse modo, este trabalho procurou avaliar as relações entre as medidas morfológicas (massa corpórea, comprimento naso-anal, índice de Lee e volume dos pulmões *ex vivo*) e os três principais parâmetros do MFC.

Todos os procedimentos experimentais com animais foram realizados em colaboração com o Laboratório de Fisiopatologia da Inflamação Experimental do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), coordenado pelo Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima.

Portanto, foram criados em biotério dois grupos de camundongos BALB/c machos: um modelo de inflamação pulmonar (induzida por ovalbumina) (OVA) e seu grupo controle (Controle), os quais foram posteriormente subdivididos para análise dos dados, totalizando quatro grupos para investigação.

Tal divisão foi feita de acordo com o tipo de administração de solução salina tampão fosfato (PBS) aplicado durante a avaliação da mecânica respiratória em condições basais: injeção endovenosa (jugular direita) por bolus (OVA-B e Controle-B) ou infusão contínua (OVA-I e Controle-I).

1.1 Objetivos

Nesta seção, são apresentados os objetivos que motivaram a realização deste trabalho.

1.1.1 Objetivo principal

Investigar as relações entre os parâmetros da mecânica respiratória (R_n, G, e H) e mensurações morfológicas para os quatro grupos de camundongos BALB/c estudados: OVA-B, Controle-B, OVA-I e Controle-I.

1.1.2 Objetivos secundários

a) Verificar alguns dados morfométricos, além da massa corpórea, passíveis de medição para relacionar com os parâmetros R_n, G e H;

b) Desenvolver um aparato para obter o volume dos pulmões *ex vivo* em laboratório.

1.2 Justificativas

Atualmente, a avaliação da mecânica respiratória de animais é amplamente realizada por meio da técnica de oscilações forçadas (FOT) com um ventilador mecânico que, além de ventilar o animal, gera as perturbações de volume de ar para estimar a impedância do sistema respiratório (BATES; SUKI, 2008; BATES, 2009; SCHUESSLER; BATES, 1995).

Nesse prisma, a amplitude do V_c e as perturbações de volume de ar geradas pelo ventilador mecânico são ajustadas de acordo com a massa corpórea dos animais (SCHUESSLER; BATES, 1995), assim, a avaliação da mecânica respiratória é também dependente da massa corpórea, em que um animal obeso, por exemplo, é avaliado com perturbações volumétricas de amplitude maior do que um não obeso. Entretanto, não há evidências que provem que somente a massa corpórea influencia no tamanho dos pulmões.

No entanto, com seres humanos essa questão é tratada por meio da adoção do peso ideal/previsto (PBW), o qual considera outros fatores como idade, sexo e altura, além da massa corpórea dos pacientes no cálculo do fluxo de ar a ser gerado pelo ventilador mecânico (LINARES-PERDOMO et al., 2015; TROUTMAN, 2002).

Já para animais, essa ideia de peso ideal/previsto é inexistente e o fato da impedância do sistema respiratório ser obtida com perturbações volumétricas indexadas à massa corpórea, cria-se, naturalmente, a necessidade de se compreender como fatores morfológicos estão associados com a mecânica respiratória.

Estudos que avaliam a associação das propriedades mecânicas e de parâmetros funcionais do sistema respiratório com a massa corpórea tanto de animais (BENNETT; TENNEY, 1982; STAHL, 1967) quanto de humanos (COOK; HELLIESEN; AGATHON, 1958; STAHL, 1967) são encontrados na literatura. Porém, para avaliar as propriedades mecânicas do sistema respiratório de diversas espécies, a maioria dos métodos usados nessas pesquisas, não empregaram a FOT ou um dos modelos matemáticos mais utilizados e recomendados: o MFC (BATES, 2009).

Assim, surgiu o interesse em realizar uma análise correlacional entre parâmetros mor-

fológicos dos animais (comprimento naso-anal, índice de Lee e o volume dos pulmões *ex vivo*), não se limitando à massa corpórea, com os principais parâmetros da mecânica respiratória provenientes do MFC (R_n, G e H).

2 REVISÃO DE LITERATURA

Neste capítulo é apresentada a sustentação teórica para os temas abordados no estudo. Inicialmente, expõem-se os tópicos pertinentes à avaliação da mecânica respiratória em roedores e ao ventilador mecânico para pequenos animais. Na sequência, os camundongos BALB/c e o modelo animal de inflamação pulmonar são introduzidos. Por último, alguns métodos comumente utilizados para obter dados/medidas morfológicas de roedores também são mostrados.

2.1 Avaliação da mecânica respiratória em roedores

O sistema respiratório de roedores, assim como o de humanos, é composto basicamente pelos pulmões e pela caixa torácica, que sofre diversas influências dos músculos respiratórios, controlados em parte pelo sistema nervoso autônomo, de modo a propiciar a respiração necessária e adequada para cada animal/indivíduo (BRAUN et al., 2004; WEST, 2012).

Tal sistema respiratório apresenta uma acentuada natureza mecânica e sua característica estrutural que envolve ossos, músculos, tecidos pulmonares e conjuntivos, contribui para com as propriedades mecânicas resistivas, elásticas e inerciais, comumente observadas no sistema respiratório (BATES, 2009; COTES; CHINN; MILLER, 2006).

Essencialmente, a avaliação da mecânica respiratória é um campo multidisciplinar da ciência, que tem como objetivo principal investigar e estudar as propriedades mecânicas do sistema respiratório do ser humano ou de animais de experimentação, para que uma melhor compreensão no quesito funcional do sistema seja obtida, inclusive em quadros patológicos (BATES, 2009).

Cabe ressaltar que a avaliação da mecânica do sistema respiratório é amplamente realizada por meio de estudos com animais de experimentação (ALVAREZ, 2017), principalmente com pequenos roedores, como por exemplo, ratos e camundongos, que oferecem

boa reprodutibilidade da pesquisa realizada com um custo de criação e/ou manutenção em biotério inferior ao dos mamíferos maiores (GOMES et al., 2000).

Os pequenos roedores possuem ainda outras vantagens: uma mecânica respiratória similar a de vários outros mamíferos, como a do cachorro, do porco e do humano; um sistema imunológico amplamente estudado, que proporciona um conveniente controle sobre os modelos patológicos estudados; e um ciclo reprodutivo curto, possibilitando estudos longitudinais (BATES; IRVIN, 2003; GOMES et al., 2000; GOMES et al., 2001).

No entanto, devido ao pequeno porte desses animais, desafios práticos são comumente encontrados pelo pesquisador para obter dados quantitativos com precisão, além de exigir cuidados durante a interpretação das informações quando se deseja extrapolar a avaliação para o sistema respiratório humano (BATES; IRVIN, 2003; GOMES et al., 2001).

Nesse contexto, de modo a reduzir ao máximo as imprecisões nos dados quantitativos adquiridos, diferentes técnicas foram desenvolvidas para avaliar a função pulmonar e as características mecânicas do sistema respiratório dos roedores, principalmente, por intermédio do processo de miniaturização das técnicas já utilizadas em seres humanos ou mamíferos maiores (BATES; IRVIN, 2003).

Apesar disso, independentemente da técnica utilizada, o custo de uma maior exatidão nas informações obtidas estará diretamente relacionado ao distanciamento do animal de suas condições fisiológicas normais, ou seja, quanto mais precisão for requerida no experimento, mais distante o animal ficará de sua condição fisiológica natural, pois mais invasivo será o método (BATES; IRVIN, 2003).

Sendo assim, um método que pode ser considerado não invasivo na avaliação da função pulmonar de roedores é a pletismografia sem restrição de corpo inteiro, em que o animal não é anestesiado e respira espontaneamente (BATES; IRVIN, 2003). No entanto, os dados obtidos não contam com a precisão e nem acurácia suficiente para expressar quaisquer alterações práticas na mecânica respiratória (BATES et al., 2004; LUNDBLAD et al., 2002; MITZNER; TANKERSLEY, 2003).

Portanto, tal método não é adequado quando se deseja avaliar e quantificar mudanças intrínsecas às propriedades mecânicas do sistema respiratório. Para tal objetivo, um método muito mais invasivo é geralmente empregado, um que se baseia na respiração forçada (ventilação por pressão positiva) do animal, como o utilizado neste trabalho (BATES; IRVIN, 2003; BATES, 2009).

Dessa maneira, esse método de avaliar a mecânica do sistema respiratório é conside-

rado o mais preciso disponível (BATES; IRVIN, 2003), mas sob o custo de ser seriamente invasivo para o animal, pois ele deve estar anestesiado, paralisado e traqueostomizado, ou seja, em condições fisiológicas diferentes do seu estado natural.

O método é amplamente realizado com o auxílio de um ventilador mecânico para pequenos animais, que é responsável por induzir fluxos de ar via traqueia de maneira controlada aos pulmões e, simultaneamente, registrar os valores de pressão nesta região. A partir desses valores medidos, propriedades mecânicas do sistema respiratório podem ser estimadas com exatidão, considerando-se um comportamento linear do sistema (BATES, 2009; MORIYA; MORAES; BATES, 2003).

2.1.1 Ventilador mecânico para pequenos animais

O ventilador mecânico para pequenos animais (SAV) é fruto do processo de miniaturização e adaptação de equipamentos médicos, já utilizados com seres humanos e animais de grande porte, para a crescente área de pesquisa com pequenos roedores (BATES; IRVIN, 2003; GOMES et al., 2000; SCHUESSLER; BATES, 1995).

O SAV utilizado neste estudo (legacy $flexiVent$, SCIREQ Inc., Canadá) foi proposto por Schuessler e Bates (1995) devido à necessidade de se analisar com maior precisão a mecânica respiratória de pequenos animais, pois as avaliações mecânicas realizadas até aquele momento dependiam de informações imprecisas, provenientes de dispositivos inicialmente projetados para seres humanos, como o pneumotacógrafo (SCHUESSLER; BATES, 1995).

Logo, esse modelo de SAV, além de funcionar como um equipamento de suporte respiratório, permite o uso de pertubações ventilatórias que podem ser caracterizadas como um fluxo de ar gerado para mimetizar um sinal banda larga, com amplitude proporcional ao V_c ajustado, composto por diversas senoides de diferentes frequências (SCHUESSLER; BATES, 1995). Com isso, por meio dessas perturbações, o comportamento do sistema respiratório do animal pode ser avaliado por intermédio de técnicas de identificação de sistemas (BATES, 2009).

Assim, o SAV é utilizado para investigar a mecânica respiratória do animal como um identificador de sistemas, ou seja, um sinal de entrada conhecido (fluxo de ar) é aplicado ao sistema, o sinal de saída (pressão de ar na traqueia) é analisado, e então o comportamento mecânico do sistema pode ser completamente avaliado pela sua impedância (Z_{sr}), equação

2.1, desde que o sistema apresente um comportamento linear (BATES, 2009).

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

onde $\mathfrak{F}[p_{tr}(t)]$ representa a transformada de Fourier da pressão na traqueia do animal 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}) na traqueia do roedor.

Por questão de metodologia, os parâmetros pressão, $p_{tr}(t)$, e fluxo, $\dot{v}_{tr}(t)$, serão apresentados como $P_{tr}(t)$ e $\dot{V}_{tr}(t)$, em letras maiúsculas, tanto no domínio do tempo quando no da frequência por $P_{tr}(f)$ e $\dot{V}_{tr}(f)$, embora o termo $\dot{V}$ deste último parâmetro denote a primeira derivada em relação ao tempo e não à frequência. Tais notações simplificadas serão adotadas para seguir a nomenclatura mais utilizada na literatura (BATES, 2009; CARVALHO; ZIN, 2011).

Além disso, a impedância do sistema respiratório pode ser fisiologicamente interpretada como a dificuldade que o fluxo de ar enfrenta durante os movimentos de inspiração e expiração do animal, e que de maneira geral é gerada a partir das forças resistivas, inertivas e elásticas do sistema respiratório (CARVALHO; ZIN, 2011).

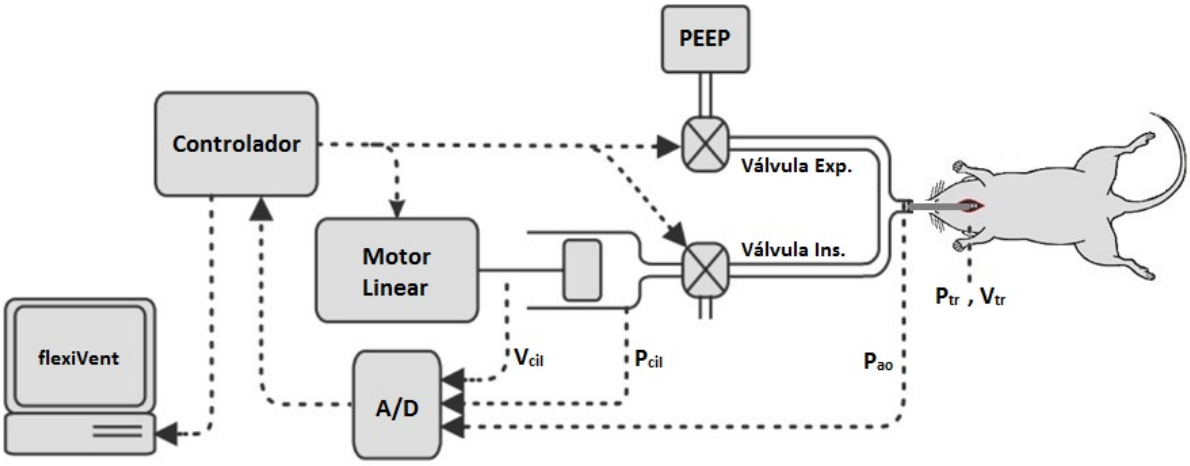
Nesse contexto, o ventilador desenvolvido por Schuessler e Bates (1995) funciona por meio de um motor linear que movimenta um pistão dentro de uma câmara cilíndrica, e esse movimento gera o fluxo de ar necessário para o animal respirar (ventilação por pressão positiva).

Assim, para que o ciclo respiratório ocorra, duas válvulas de três vias são utilizadas para controlar os fluxos inspiratórios (válvula inspiratória) e expiratórios (válvula expiratória). A válvula inspiratória interliga a câmara cilíndrica com o pistão, o meio ambiente e a traqueia do roedor. Já a válvula expiratória conecta apenas a traqueia do animal a uma câmara com selo d'água que estabelece a pressão positiva ao final da expiração (PEEP), a terceira via não é utilizada, é mantida fechada, conforme apresenta a Figura 1.

Consequentemente, para realizar o movimento inspiratório, a válvula expiratória fecha a conexão entre a traqueia e a câmara com a pressão controlada, e a inspiratória fecha a conexão com o meio ambiente e conecta a traqueia com a câmara cilíndrica, para que o pistão desloque o ar diretamente para a traqueia do animal.

Por outro lado, durante a expiração o processo se inverte: a válvula inspiratória fecha o acesso para traqueia do animal e conecta a câmara cilíndrica ao ambiente; enquanto a

Figura 1 – Diagrama de blocos do funcionamento do SAV (legacy $flexiVent$, SCIREQ Inc., Canadá). Um motor linear desloca o ar do cilindro que é utilizado para ventilar o animal. Duas válvulas de três vias controlam a direção do fluxo de ar durante a respiração: a válvula inspiratória que conecta a saída do cilíndro à traqueia durante a inspiração ou ao meio ambiente durante a fase de expiração; e a válvula expiratória que conecta a traqueia do animal a uma câmara com pressão controlada (PEEP) durante a fase de expiração passiva do roedor. A/D é um conversor analógico-digital, que transmite os sinais medidos, descritos a seguir, para um controlador configurado pelo computador. P_{cil} e V_{cil} representam mensurações da pressão e o volume de ar deslocado no cilindro, respectivamente, e P_{ao} é a mensuração da pressão na entrada das vias aéreas. Com esses valores medidos P_{tr} e V_{tr}, pressão e o volume de ar na traqueia, respectivamente, são estimados.



Fonte: Adaptado do manual legacy flexiVent.

válvula expiratória conecta a traqueia à câmara com a PEEP preestabelecida para, assim, realizar a expiração passiva. Concomitantemente à expiração do animal, o pistão recuará para sua posição inicial (obtendo ar do meio ambiente) para, em seguida, realizar um novo movimento inspiratório e reiniciar o ciclo respiratório.

Os fluxos de ar, ou volumes aplicados, são controlados e mantidos em valores desejados preestabelecidos por meio de malhas de realimentação, que transmitem, via transdutores, informações físicas do sistema para o controlador como pressão na entrada das vias aéreas (P_{ao}) e pressão (P_{cil}) e volume de ar deslocado (V_{cil}) no cilindro, para assim, estimar os valores de pressão (P_{tr}) e volume (V_{tr}) na traqueia do animal (Figura 1).

2.1.1.1 Ajuste de volume corrente

A determinação do valor adequado de V_c é um fator crucial para proporcionar uma ventilação mecânica segura aos animais ou seres humanos, pois diversos efeitos danosos podem surgir nos pulmões saudáveis ou agravar quadros de patologias já presentes, caso

o V_c seja sub ou superestimado (PINHEIRO DE OLIVEIRA et al., 2010; WALDER et al., 2005; WARNER; PATEL, 2013).

A estimação do V_c para seres humanos é baseada, na maioria das vezes, no PBW, que é calculado considerando fatores como a altura, idade, e o peso atual do paciente para, assim, estimar o seu volume de ventilação adequado (LINARES-PERDOMO et al., 2015; TROUTMAN, 2002; YNDROME; ETWORK, 2000).

Em geral, é recomendado um V_c entre $6 - 8\,\mathrm{ml/kg}$ (PBW) para pacientes com lesões pulmonares, como em quadros que apresentem síndrome da angústia respiratória aguda (SDRA), ou um V_c mais elevado, entre $10 - 15\,\mathrm{ml/kg}$, para indivíduos sem lesões pulmonares ou sob anestesia (GUIVARCH et al., 2018; YNDROME; ETWORK, 2000).

Nesse prisma, a ideia principal ao se utilizar o PBW é compensar o fato de que uma pessoa obesa ou com grave retenção de líquido, por exemplo, não necessariamente possui pulmões maiores do que uma pessoa em melhor condição física, o que acarretaria uma superestimação do V_c. O caso oposto também é verdadeiro, em que um paciente desnutrido receberia um V_c abaixo do ideal (LINARES-PERDOMO et al., 2015; YNDROME; ETWORK, 2000).

Além disso, recentes estudos demonstram que os efeitos deletérios causados pela ventilação mecânica são agravados quando o peso do paciente é utilizado para estimar o V_c ao invés do PBW (GUIVARCH et al., 2018; O'BRIEN et al., 2016), principalmente quando estão presentes lesões pulmonares.

No entanto, não existe um modelo para se definir o peso ideal para roedores e, dessa forma, estabelecer um valor adequado de V_c para determinado animal (WALDER et al., 2005). Dessa maneira, o V_c proporcionado pelo ventilador mecânico é estimado diretamente a partir de sua massa corporal sem considerar fatores morfológicos, o que pode gerar e/ou agravar lesões pulmonares, principalmente, em animais obesos (GUIVARCH et al., 2018).

Destarte, uma prática comum encontrada em pesquisas com roedores é utilizar como referência para o V_c um valor geralmente encontrado na respiração espontânea dos animais, independentemente da sua condição física ou patológica, o qual para ratos é em média de $8 - 10\,\mathrm{ml/kg}$ e para camundongos ao redor de $6 - 10\,\mathrm{ml/kg}$ (GOMES et al., 2000; GOMES et al., 2001; GUIVARCH et al., 2018; MORIYA; MORAES; BATES, 2003; WALDER et al., 2005).

2.1.2 Modelo de Fase Constante (MFC)

Por meio da FOT, usando um ventilador mecânico como o SAV, é possível induzir diferentes perturbações ventilatórias (frequências e amplitudes) no sistema respiratório de um animal, como abordado na seção anterior, e assim, obter a impedância do sistema para cada uma dessas perturbações (Equação 2.1) (BATES, 2009).

Embora a Z_{sr} caracterize muito bem o sistema respiratório, considerando-o com comportamento linear, extrair informações de cunho fisiológico da Z_{sr} não é simples, pois ela comprime diferentes informações provenientes de um sistema complexo que reúne ossos, músculos, tecidos pulmonares e conjuntivos (BATES, 2009; COTES; CHINN; MILLER, 2006).

As tentativas de obter significados fisiológicos de Z_{sr} vieram por intermédio de diversos modelos matemáticos (BATES; SUKI, 2008) que atribuem diferentes parâmetros no domínio do tempo ou da frequência para explicar as propriedades mecânicas e fisiológicas do sistema respiratório como resistência e elastância (BATES, 2009).

Um modelo amplamente empregado para descrever Z_{sr}, ou apenas a impedância dos pulmões (Z_p) para estudos com o tórax aberto, é conhecido como MFC, o qual representa o modelo mais parcimonioso proposto atualmente (BATES, 2009; CARVALHO; ZIN, 2011) e é representado pela equação 2.2:

$$Z(f) = R_n + j2\pi f I + \frac{G - jH}{(2\pi f)^{\alpha}} \tag{2.2}$$

onde R_n representa a resistência Newtoniana e I a inertância do gás no sistema, fatores que contribuem para a impedância das vias aéreas do sistema respiratório. G simboliza a viscância do sistema associada à perda de energia por dissipação tecidual e H a elastância do sistema, que expressa a energia elástica armazenada nos tecidos, ambos constituem a impedância tecidual do sistema respiratório. O termo f indica as frequências em hertz da perturbação imposta ao sistema e j a unidade imaginária.

O expoente α presente na equação 2.2 é definido pela equação 2.3, que justifica o nome do modelo em questão, onde a fase da impedância tecidual é explicitada por uma relação entre suas componentes dissipativas e elásticas, que vem a ser independente da frequência (BATES, 2009; HANTOS et al., 1987).

$$\alpha = \frac{2}{\pi} \arctan \frac{H}{G} \tag{2.3}$$

Com esse modelo, é possível avaliar, de maneira muito satisfatória, a mecânica respiratória tanto de humanos quanto de animais até frequências ao redor de 20 Hz (BATES, 2009), em que observações e análises podem ser realizadas acerca das vias aéreas (R_n e I) e/ou do tecido pulmonar (G e H) (BATES; SUKI, 2008).

De modo a proporcionar uma acurácia maior na avaliação da mecânica do sistema respiratório, vale reiterar a necessidade da suspensão da respiração espontânea do animal durante o procedimento de identificação do seu sistema, a modelagem inversa, ou seja, enquanto o estímulo ventilatório é aplicado, para assim garantir uma descrição fiel do sistema respiratório analisado (BATES, 2009). Tal invasividade é o custo para se obter uma avaliação mecânica adequada com apenas os parâmetros R_n, I, G e H do modelo (BATES; IRVIN, 2003).

Uma avaliação quantitativa do quão bem o modelo se ajusta aos dados experimentais medidos é comumente expressa pelo coeficiente de determinação (COD) (Equação 2.4) (BATES, 2009), que fornece um valor entre 0 e 1, onde 1 denota um ajuste perfeito e 0 indica que o modelo não representa os valores medidos:

$$COD = 1 - \frac{\text{SSR}}{\sum_{i=1}^{N}(P_i - \bar{P})^2} \tag{2.4}$$

onde P_i é a pressão medida, $\bar{P}$ é a pressão média do sinal medido e o termo SSR é a soma dos resíduos quadrados (Equação 2.5).

$$\text{SSR} = \sum_{i=1}^{N}(P_i - \hat{P})^2 \tag{2.5}$$

na qual $\hat{P}$ representa a pressão predita pelo modelo.

Por conseguinte, diversos estudos já foram feitos utilizando o MFC de modo a se analisar os impactos da f_r sobre a mecânica do sistema respiratório (GOMES et al., 2000; HANTOS et al., 1987; MORIYA; MORAES; BATES, 2003). No entanto, pouco se conhece a respeito dos possíveis efeitos do volume pulmonar sobre o sistema respiratório (HIRAI et al., 1999).

Uma maneira de examinar o efeito do volume pulmonar na mecânica do sistema respiratório foi proposta por Hirai et al. (1999), que investigou o sistema respiratório de ratos, por meio do MFC, para diferentes volumes pulmonares por meio do aumento gradual da PEEP de 0 a 9 cmH_2O (incrementos na capacidade residual funcional (CRF))

em duas situações: com a caixa torácica do animal fechada (intacta) ou aberta. Assim, a análise da impedância do sistema com o tórax fechado representa a avaliação da mecânica do sistema respiratório do animal na totalidade (Z_{sr}), enquanto para o tórax aberto, a avaliação se restringe, apenas, às características dos pulmões do animal (Z_p).

Com esse estudo, Hirai et al. (1999) puderam, também, obter a impedância da caixa torácica (Z_{ct}) por intermédio da diferença entre Z_{sr} e Z_P, o que possibilitou avaliar a influência da caixa torácica, para diferentes valores de CRF, no sistema respiratório dos ratos.

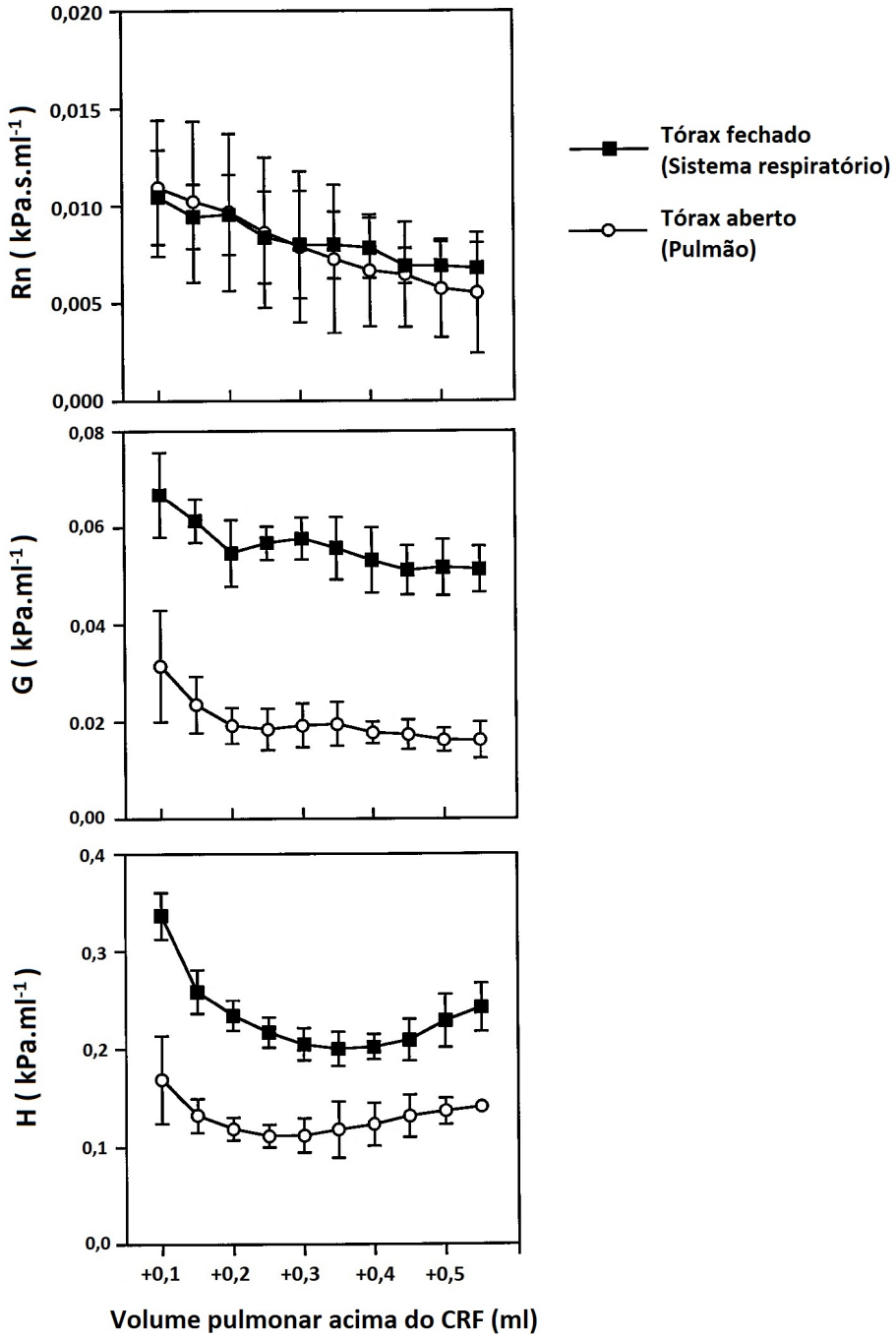
Em geral, todos os parâmetros do MFC demonstraram ser afetados pelo volume pulmonar ao qual a avaliação mecânica foi realizada, conforme podemos verificar na Figura 2, com exceção do parâmetro I do modelo que foi negligenciado, sem perda de acuracidade significativa, devido a sua baixa influência no estudo (HIRAI et al., 1999). Isso se deve ao fato de que a inertância é um fator diretamente relacionado à aceleração do fluido nas vias aéreas, ou seja, para estímulos com baixa frequência (acelerações) impostos ao sistema respiratório em ventilações convencionais, a inertância apresentará valores muito baixos e costuma ser omitida (BATES, 2009; CARVALHO; ZIN, 2011).

Desse modo, Hirai et al. (1999) avaliaram apenas os parâmetros R_n, G, e H através dos diferentes volumes pulmonares e, com isso, demostraram que o R_n decresce conforme a CRF dos pulmões aumenta (Figura 2), tanto para o tórax fechado quanto aberto, sem diferenças significativas entre ambas as circunstâncias estudadas. O fato de não existir diferenças significativas entre ambas as condições é justificado pela quase nula influência da caixa torácica sobre o valor de R_n no sistema respiratório dos ratos (tórax fechado), sendo majoritariamente controlado pelas características dos pulmões apenas (HIRAI et al., 1999).

Quando a viscância do sistema respiratório foi avaliada por Hirai et al. (1999), ou seja, G, notou-se que esse parâmetro não sofre influência significativa do volume pulmonar quando apenas a impedância imposta pela caixa torácica é avaliada. No entanto, embora seja essencialmente independente do volume, o valor de G para a caixa torácica é significativamente maior do que apenas para os pulmões, o que apresenta um decréscimo com o aumento do volume pulmonar, elevando a viscância do sistema respiratório na totalidade, que se encontra ilustrado na Figura 2.

Em relação ao parâmetro H do MFC, uma influência marcante é observada tanto para os pulmões quanto para a caixa torácica isolada do sistema. Em ambas as situações, tórax fechado ou aberto, a elastância tende a diminuir com o aumento do volume pulmonar

Figura 2 – Efeito do volume pulmonar sobre os parâmetros R_n, G, e H com o tórax fechado (Z_{sr}) e aberto (Z_p). O volume zero adotado nos gráficos, corresponde ao valor da CRF do animal com o tórax fechado.



Fonte: Adaptado de Hirai et al. (1999).

(Figura 2), evidenciando uma maior facilidade na sua expansão (complacência maior), devido ao seu estado já parcialmente expandido, requerendo assim menos energia (HIRAI et al., 1999). Essa queda na elastância relatada por Hirai et al. (1999), tende a um valor limite mínimo, o qual é determinado pelas características dos pulmões, caixa torácica e de

todos os músculos e tecidos envolvidos no sistema respiratório. Após tal valor, a elastância dos pulmões, caixa torácica e do sistema respiratório na totalidade, começam a aumentar conforme se incrementa o volume pulmonar como evidenciado na Figura 2.

Esse aumento no valor de H, após um valor mínimo observado no trabalho de Hirai et al. (1999), é devido às propriedades elásticas dos diferentes elementos que formam o sistema respiratório (ossos, músculos, pulmões, tecidos conectivos, etc.) que estão hiperestendidos, o que faz com que apresentem uma maior resistência à extensão (BATES, 2009; COTES; CHINN; MILLER, 2006).

Trabalhos semelhantes ao de Hirai et al. (1999) foram feitos também com camundongos para avaliar a influência do volume pulmonar na mecânica respiratória, por meio de incrementos na PEEP, e comportamentos similares foram registrados para os principais parâmetros do MFC (R_n, G e H) (CANNIZZARO et al., 2009; GOMES et al., 2000).

Assim, observa-se que as características mecânicas do sistema respiratório, que podem ser muito bem avaliadas através do MFC, são marcadamente influenciadas pelo volume pulmonar ao qual o sistema é avaliado. No entanto, tal avaliação mecânica é amplamente realizada com a FOT, que aplica perturbações ventilatórias dependentes da massa corpórea dos animais (Seção 2.1.1), e não do tamanho/volume de seus pulmões (GUIVARCH et al., 2018).

Com isso, o entendimento sobre as características mecânicas do sistema respiratório do animal pode ser comprometido, principalmente nos casos em que este está fora da faixa de peso para sua linhagem, como por exemplo, um animal magro pode possuir uma perturbação ventilatória de amplitude menor do que para um animal obeso, apenas por ele possuir uma massa corpórea menor, mesmo que ambos possuam o mesmo tamanho/volume de pulmões.

2.2 Camundongos BALB/c

Um grande número de linhagens de camundongos, muito utilizadas atualmente em pesquisas biomédicas, foram desenvolvidas e introduzidas em pesquisas biológicas a partir do início do século XX, por meio de diversos cruzamentos entre irmãos, ou genitores e prole (*inbred strains*) para se estabelecer homogeneidade genética das linhagens (LINDER; DAVISSON, 2004).

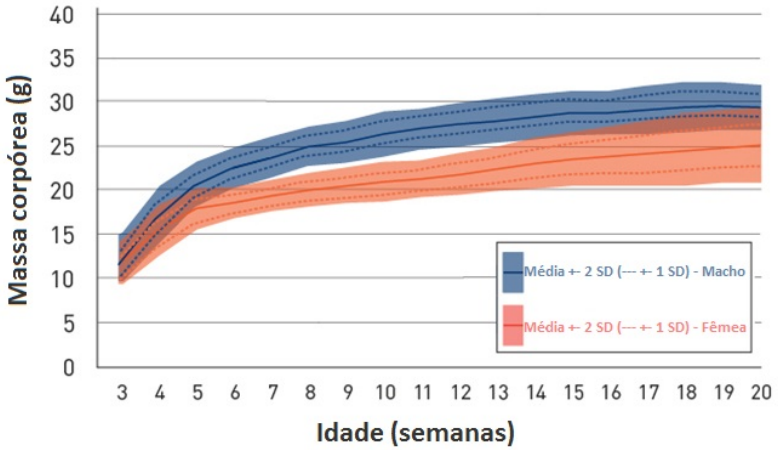
Dentre as linhagens de camundongos mais utilizadas está a BALB/c, que conta com diversas sublinhagens com características genéticas distintas, desenvolvidas ao longo de

um século, como o BALB/cJ, BALB/cByJ e o BALB/cGn, produzidos e distribuídos por diferentes laboratórios (POTTER, 1985).

Esses camundongos possuem uma estimativa de vida que varia entre 29 e 30 meses, período também observado em outras linhagens muito utilizadas, como a C57BL/6 e a Swiss-Webster (PINKERTON et al., 2014; JOHNSON, 2019).

Um exemplo do aumento da massa corpórea dos camundongos BALB/c com o envelhecimento (3 a 20 semanas) é apresentado na Figura 3 por meio da média ± desvio padrão (SD) de 40 camundongos de cada sexo (THE JACKSON LABORATORY, 2007).

Figura 3 – Média ± SD da massa corpórea de 80 camundongos BALB/cJ (40 machos e 40 fêmeas), aferida semanalmente, de 3 a 20 semanas de idade.



Fonte: Adaptado de The Jackson Laboratory (2007).

Conforme apresentado por Kawakami, Paul e Thurlbeck (1984), o volume dos pulmões dos camundongos BALB/c também continua aumentando com a idade (Tabela 1), diferentemente, por exemplo, do observado nos camundongos C57BL/6J fêmeas, que começa a diminuir a partir dos 6 aos 24 meses (PINKERTON et al., 2014).

Inicialmente, os camundongos BALB/c foram utilizados no estudo do câncer relacionado ao vírus da leucemia murina (POTTER, 1985), mas ao longo das décadas eles se tornaram um modelo animal de propósito geral e muito usado em diversas áreas da pesquisa de base como a genética, a cardiovascular, a respiratória e a imunológica (JOHNSON, 2019; LINDER; DAVISSON, 2004).

Atualmente, devido ao amplo conhecimento obtido sobre o seu sistema imunológico e a característica e intensidade de resposta à presença de antígenos, o BALB/c se tornou o camundongo mais utilizado nas pesquisas sobre a inflamação pulmonar, o que o torna

Tabela 1 – Registro do aumento no volume dos pulmões *ex vivo* dos camundongos BALB/cNNia (n=6) com o envelhecimento e a respectiva massa corpórea do grupo (média ± erro padrão da média (SEM)). Os volumes foram estimados por meio do método de deslocamento de líquido (SCHERLE, 1970).

Idade	2 meses	9 meses	19 meses	28 meses
Massa corpórea (g)	23,98 ± 0,77	28,46 ± 0,83	31,27 ± 0,46	28,42 ± 0,65
Volume dos pulmões (ml)	1,14 ± 0,03	1,47 ± 0,07	1,68 ± 0,03	1,87 ± 0,10

Fonte: Adaptado de Kawakami, Paul e Thurlbeck (1984).

o principal modelo animal empregado no estudo da asma humana (AUN et al., 2017; KUMAR; HERBERT; FOSTER, 2008).

2.2.1 Asma: modelo de inflamação pulmonar

A asma pode ser definida como uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, altamente complexa, heterogênea e essencialmente observada em seres humanos (AUN et al., 2017; MARQUÉS-GARCÍA; MARCOS-VADILLO, 2016). Mais de 300 milhões de indivíduos sofrem com essa patologia que é caracterizada por apresentar hiperresponsividade brônquica (HRB), superprodução de muco, estreitamento do lúmen e remodelamento da parede das vias aéreas (AUN et al., 2017). Esta doença, embora complexa e heterogênea, é geralmente classificada em duas categorias: alérgica (atópica) que se desenvolve ainda quando criança e persiste na vida adulta; e não alérgica (intrínseca) que se desenvolve mais tardiamente (LAMBRECHT; HAMMAD, 2015).

Diversos endotipos de asma estão, continuamente, sendo revelados nas últimas décadas como suscetibilidade genética, fatores ambientais, idade e respostas a terapias, fazendo com que surjam divergências entre especialistas sobre a enfermidade ser avaliada como uma única doença ou uma síndrome (LAMBRECHT; HAMMAD, 2015; ZOSKY; SLY, 2007). Além disso, existem casos associados à doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), o que aumenta a complexidade do diagnóstico e dos tratamentos (GODBOUT; MACDONALD; GIBSON, 2018).

Logo, isso torna a classificação da asma em alérgica e não alérgica um pouco simplista diante da complexidade envolvida nessa doença. No entanto, para se estudar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento e progressão da asma, essa divisão se torna muita adequada e amplamente aplicada em pesquisas científicas (MARQUÉS-GARCÍA; MARCOS-VADILLO, 2016; ZOSKY; SLY, 2007).

Com o propósito de se compreender melhor a fisiopatologia da asma e os mecanismos imunológicos envolvidos, é comum usar modelos animais (ZOSKY; SLY, 2007). No entanto, eles não desenvolvem asma naturalmente e, portanto, precisam ser induzidos a desenvolver a patologia, experimentalmente, por intermédio de diferentes alérgenos e, assim, estudar alguma característica específica da asma no animal, pois esse modelo não consegue reproduzir todas as características envolvidas na asma humana (AUN et al., 2017; MARQUÉS-GARCÍA; MARCOS-VADILLO, 2016).

As características da asma humana mais estudadas por modelos animais são a inflamação das vias aéreas e a HRB provocadas por reações alérgicas que são induzidas por alérgenos como o ácaro, o pólen e a ovalbumina, sendo esta última o alérgeno mais comum (MARQUÉS-GARCÍA; MARCOS-VADILLO, 2016).

Os protocolos aplicados nesses estudos são, normalmente, compostos por duas fases: sensibilização e desafio, as quais são necessárias para simular no animal o processo inflamatório observado na asma humana (AUN et al., 2017; ZOSKY; SLY, 2007). Na sensibilização, o antígeno é apresentado ao sistema imunológico, geralmente via intraperitoneal (i.p.), para dar-se início a síntese de anticorpos específicos para este antígeno (imunoglobulina E (I_gE)). Já no desafio, o alérgeno é exposto novamente ao animal, via ar, instilação intranasal ou intratraqueal, desencadeando uma reação alérgica e inflamatória (AUN et al., 2017; LAMBRECHT; HAMMAD, 2015).

De acordo com a duração da fase dos desafios, dois principais tipos de modelo animal podem ser formados para se estudar a asma: o modelo agudo (curto prazo) e o crônico (longo prazo) (KUMAR; HERBERT; FOSTER, 2008; ZOSKY; SLY, 2007). No modelo agudo, a exposição do alérgeno ao animal geralmente é realizada em um curto intervalo de tempo (dias ou semanas) (MARQUÉS-GARCÍA; MARCOS-VADILLO, 2016), enquanto no crônico o antígeno é apresentado ao animal em doses menores do que no agudo, mas por um intervalo maior (meses), como relatado na literatura por meio de protocolos com dois ou mesmo 12 meses de duração (KUMAR; HERBERT; FOSTER, 2008).

Em pesquisas mais atuais, o modelo mais utilizado é o agudo, pois é bem conveniente devido ao seu curto prazo de implementação e por possibilitar o estudo dos mecanismos envolvidos na inflamação das vias aéreas e a HRB (NIALS; UDDIN, 2008), embora não apresente algumas características observadas na asma humana, como o remodelamento das vias aéreas, processo mais explorado por meio do modelo crônico (AUN et al., 2017; MARQUÉS-GARCÍA; MARCOS-VADILLO, 2016; KUMAR; HERBERT; FOSTER, 2008).

Com relação às espécies, diversos modelos de animais são empregados para estudar a fisiopatologia da asma como ratos, cachorros, cavalos e outros, em que cada espécie possui vantagens e desvantagens frente à asma humana, como por exemplo, custo de manutenção da linhagem, semelhança anatômica em relação ao ser humano ou o nível de conhecimento do seu sistema imunológico (AUN et al., 2017; MARQUÉS-GARCÍA; MARCOS-VADILLO, 2016; ZOSKY; SLY, 2007).

Entretanto, hoje, usam-se mais os camundongos na pesquisa sobre a asma (AUN et al., 2017) e as razões são variadas: sistema imunológico vastamente estudado, diferentes linhagens conhecidas e diversos animais geneticamente modificados disponíveis. Além de numerosos fatores econômicos, como o baixo custo de manutenção em biotérios, grande disponibilidade no mercado e ciclo de vida curto, o que facilita a realização de estudos longitudinais (AUN et al., 2017; MARQUÉS-GARCÍA; MARCOS-VADILLO, 2016).

Dentre os camundongos, a linhagem BALB/c é a mais amplamente utilizada, porque além de possuir as vantagens citadas, esses animais são muito úteis para se investigar a asma humana mais comum, a alérgica (DEBEUF et al., 2016). Nesse tipo de asma, o processo inflamatório das vias aéreas é marcadamente regulado por células T auxiliares (helper) tipo 2 (T_H2) do sistema imunológico (AUN et al., 2017; LAMBRECHT; HAMMAD, 2015). Inúmeros relatos da literatura mostram que essas células são ativadas de acordo com o tipo de alérgeno e podem produzir diferentes interleucinas (como IL-4, IL-5 e IL-13) que serão responsáveis pela síntese de I_gE e o recrutamento de eosinófilos, caracterizando, assim, o processo inflamatório das vias aéreas (LAMBRECHT; HAMMAD, 2015; YANG et al., 2008; ZOSKY; SLY, 2007).

Tal característica faz com que os camundongos BALB/c sejam adequados, pois além deles poderem ser facilmente sensibilizados e sofrerem os desafios com o alérgeno ovalbumina, que é de baixo custo e alta disponibilidade (MARQUÉS-GARCÍA; MARCOS-VADILLO, 2016), o seu sistema imunológico possui uma acentuada resposta alérgica e inflamatória via T_H2 a esse alérgeno (AUN et al., 2017; KUMAR; HERBERT; FOSTER, 2008), quando comparados, por exemplo, com os camundongos C57BL/6, que apresentam uma resposta alérgica predominantemente regulada por células T auxiliares (helper) tipo 1 (T_H1), ou ainda com os roedores C3H/HeJ e DBA/2, que apresentam baixa resposta alérgica e inflamatória induzida por alérgenos (MARQUÉS-GARCÍA; MARCOS-VADILLO, 2016).

Mediante um modelo animal de inflamação pulmonar, é possível avaliar a reação alérgica induzida de diferentes maneiras, pois ocorrem alterações significativas no âmbito

imunológico, funcional e estrutural do seu sistema respiratório (AUN et al., 2017).

Logo, é comum avaliar a resposta inflamatória provocada por meio da contagem total e diferencial de leucócitos em uma amostra de lavado broncoalveolar (BAL) dos animais, que apresentam um elevado aumento no número de eosinófilos, nos modelos agudos e crônicos de inflamação pulmonar (AUN et al., 2017; YANG et al., 2008).

Vale ressaltar que, embora essa prática seja tradicional para caracterizar a inflamação do modelo, em humanos asmáticos o aumento de eosinófilos conta com uma estimativa de apenas 1 a 3% dos leucócitos do BAL, enquanto que nos modelos de curto prazo desafiados com ovalbumina, esse número é cerca de 40 a 80% (KUMAR; HERBERT; FOSTER, 2008). Outros parâmetros imunológicos que podem ser avaliados e quantificados são a presença das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 encontrados no BAL e o nível de I_gE no plasma sanguíneo (AUN et al., 2017).

Alterações estruturais podem ser histologicamente observadas nos modelos animais por meio do espessamento do músculo liso, presença de células inflamatórias ao redor dos brônquios, acúmulo de fibras de colágeno e elastina nas vias aéreas e o estreitamento do lúmen (GUEDERS et al., 2009; SHINAGAWA; KOJIMA, 2003).

Essas mudanças estruturais contribuem para as alterações funcionais observadas no sistema respiratório de humanos asmáticos e de animais induzidos à asma, como o aumento da resistência das vias aéreas, elastância e hiperresponsividade (BATES; SUKI, 2008; PRIDE; MACKLEM, 2011; SHINAGAWA; KOJIMA, 2003). Porém, o remodelamento das vias aéreas, bastante evidenciado em humanos, é percebido apenas quando se utilizam modelos animais crônicos (MARQUÉS-GARCÍA; MARCOS-VADILLO, 2016; KUMAR; HERBERT; FOSTER, 2008).

2.3 Dados morfométricos em roedores

As medidas morfológicas são informações importantes e utilizadas por décadas para caracterizar o estado ou um grupo de roedores (AGUH et al., 2013; BOHOUSSOU et al., 2014), seja por simples aferição de sua massa corpórea, ou por meio da mensuração de comprimentos, ou áreas superficiais no corpo do animal (FALEH; ANNABI; SAID, 2012; KONOPELNIUK et al., 2018).

Ademais, quando dados morfológicos e estruturais são utilizados com informações fisiológicas ou funcionais, seja do animal ou de um órgão específico, pode ser obtido um entendimento mais detalhado e acurado sobre um fenômeno biológico sob avaliação

(WEIBEL, 2017).

No que tange ao sistema respiratório, diversos estudos realizados durante décadas, notaram que variáveis respiratórias como a resistência, a complacência, o volume e a massa pulmonar de mamíferos de diferentes dimensões seguem leis alométricas (CASHA et al., 2017; GOMES et al., 2000; STAHL, 1967), como a apresentada pela equação 2.6:

$$X = a \times M^b \tag{2.6}$$

onde X representa a variável estudada, M a massa corpórea do animal (ou do órgão) e a e b são parâmetros determinados por regressão linear.

No trabalho de Gomes et al. (2000), por exemplo, é constatada uma acentuada relação alométrica (Equação 2.6) entre os parâmetros do MFC (R_n, G e H), quando são avaliados quatro mamíferos de tamanhos distintos.

Nesse contexto, uma medida morfológica simples e comumente realizada há anos em roedores é o comprimento naso-anal (CNA): que mede a distância da extremidade do nariz até o ânus do animal e proporciona uma informação quantitativa sobre a morfologia da linhagem em estudo (LANG et al., 2004; LEE, 1929).

Também são reconhecidas na literatura, as relações alométricas significativas de diversas medidas lineares dos roedores, como o CNA, comprimento da cauda e a circunferência do crânio, com sua massa corporal (AGUH et al., 2013; HANSON; HEYS, 1924; LANG et al., 2004).

No entanto, cabe mencionar que medidas lineares como essas, envolvendo parâmetros da mecânica respiratória, são raras em pesquisas atuais (BENNETT; TENNEY, 1982; COOK; HELLIESEN; AGATHON, 1958), principalmente, quando se trata de modelos animais avaliados por meio do MFC.

Além disso, por intermédio dessas medidas básicas de comprimento, outros parâmetros mais elaborados podem ser deduzidos, como o índice de massa corpórea (IMC), aplicado para analisar se um indivíduo está na faixa de peso ideal, e o índice de Lee que é semelhante ao IMC, mas utilizado com animais.

2.3.1 Índice de Lee

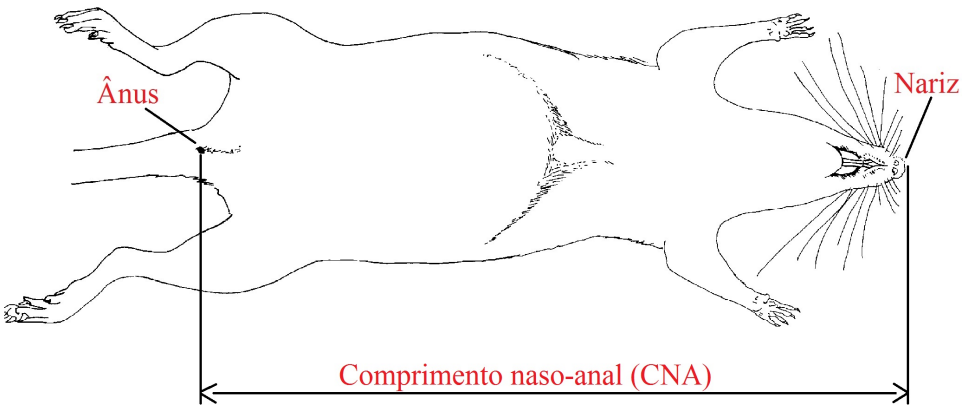
O índice de nutrição, ou índice de Lee (IL) como é popularmente conhecido, é utilizado há vários anos para avaliar o nível de obesidade em roedores e outros animais (HETHE-

RINGTON, 1943; HIGA et al., 2014; LEE, 1929). Matematicamente, ele é descrito como a razão entre a raiz cúbica da massa do animal, pelo seu CNA (Figura 4), como mostrado na equação 2.7:

$$IL = \frac{\sqrt[3]{M}}{CNA} \tag{2.7}$$

onde M representa a massa do animal em gramas e CNA o seu comprimento naso-anal em centímetros.

Figura 4 – Exemplo de um rato em posição supina para evidenciar a distância medida da extremidade do nariz ao ânus (CNA).



Fonte: Adaptado de Yang et al. (2002).

Esse índice procura apresentar, de maneira quantitativa, os diferentes estados nutritivos do corpo de um animal (ex.: saudável ($IL = 0,3$), gordo ($IL > 0,3$), ou magro ($IL < 0,3$), considerando-se o fato de que qualquer incremento no comprimento de um corpo (linear) acarretará também em um aumento tridimensional (volume) sobre ele (COWGILL; DRABKIN, 1927).

Com isso, se a gravidade específica do corpo for considerada constante, a própria massa do animal pode ser utilizada como unidade tridimensional dessa correlação, e o CNA o seu fator linear (COWGILL; DRABKIN, 1927), como apresentado na equação 2.7.

Portanto, por ser considerado um índice adequado para avaliar a condição nutritiva dos corpos, ele é muito utilizado como um fator de correção para o cálculo de área superficial de diversos animais, que é comumente aplicado em trabalhos sobre o consumo energético do corpo e sua respectiva taxa metabólica (COWGILL; DRABKIN, 1927; LEE, 1929).

Ademais, devido a sua praticidade, o IL é amplamente empregado na avaliação quantitativa de quadros de obesidades em roedores, pois há estudos que demonstraram uma acentuada correlação entre o IL e a porcentagem de gordura encontrada na carcaça dos animais (BERNARDIS; PATTERSON, 1968; HETHERINGTON, 1943; SIMSON; GOLD, 1982).

Entretanto, a sensibilidade desse parâmetro para determinar casos de obesidade é questionada há algum tempo, pois inúmeros estudos reportam aumento significativo na gordura visceral, gonadal e retroperitoneal de animais sob dietas hipercalóricas em relação a um grupo controle, no entanto, não é observada diferença significativa no IL entre os grupos (BRESSAN et al., 2013; HIGA et al., 2014; STEPHENS, 1980).

Essa inconsistência pode ocorrer devido ao fato de que o IL leva em consideração dois termos distintos por meio da variável M da equação 2.7: massa gorda (gordura) e a massa magra (líquido e massa corporal sem gordura), que pode ser reescrita como na equação 2.8 abaixo.

$$IL = \sqrt[3]{\frac{Massa\ gorda}{CNA^3} + \frac{Massa\ magra}{CNA^3}} \tag{2.8}$$

Dessa forma, é evidente que o IL, para obter uma exatidão maior na mensuração da gordura corporal de um animal, o termo envolvendo a massa magra deve-se manter relativamente invariável quando comparado ao termo da massa gorda sob avaliação.

No entanto, o termo $\frac{Massa\ magra}{CNA^3}$, presente na equação 2.8, demonstra ser bem variável entre animais de mesmo CNA, ou seja, o CNA não é um determinante de massa magra conveniente (STEPHENS, 1980). Por conseguinte, certa variabilidade e inacurácia podem estar presentes nos resultados obtidos com o IL, o que limita o seu uso.

Por outro lado, nos casos em que a gordura corporal do animal é alta, é observada que a influência da variabilidade do termo envolvendo a massa magra sobre o IL tem menos importância, e com isso, o quadro de obesidade pode ser bem caracterizado (BERNARDIS; PATTERSON, 1968; STEPHENS, 1980). Ademais, se o cerne do trabalho for sobre obesidade, é recomendado que se utilize outros marcadores de obesidade, como a mensuração de gorduras e colesteróis além do IL, para se obter uma caracterização mais fidedigna da patologia.

2.3.2 Estimativa do volume dos pulmões *ex vivo*

Outros dados morfológicos utilizados na avaliação da mecânica respiratória são aqueles provenientes dos pulmões e da caixa torácica, os quais contêm os principais fatores que influenciam no funcionamento do sistema respiratório (BATES, 2009; HIRAI et al., 1999). À vista disso, uma maneira de obter o volume dos pulmões de roedores, por exemplo, é por meio de sua fixação, que garantirá que o órgão esteja completamente insuflado, e subsequente imersão em um líquido. Desse modo, mediante do princípio de Arquimedes, que afirma que a força de empuxo gerada sobre um corpo submerso é quantitativamente igual ao peso do líquido deslocado pelo próprio corpo, ou seja,

$$\vec{E} = M_o \times \vec{g} \tag{2.9}$$

onde $\vec{E}$ simboliza o empuxo sobre o corpo, M_o a massa do líquido deslocado por ele e $\vec{g}$ a aceleração da gravidade. E, considerando ainda que, $M_o = d_l \times V_o$, onde d_l é a densidade do líquido e V_o o volume do líquido deslocado pelo corpo imerso (ou do próprio corpo submerso), o empuxo que age sobre ele também pode ser representado como na equação 2.10 abaixo.

$$\vec{E} = d_l \times V_o \times \vec{g} \tag{2.10}$$

É possível deduzir o volume do corpo submerso, em função de M_o e d_l, igualando-se as equações 2.9 e 2.10, e resolvendo a igualdade para V_o, como é mostrado na equação 2.11 abaixo:

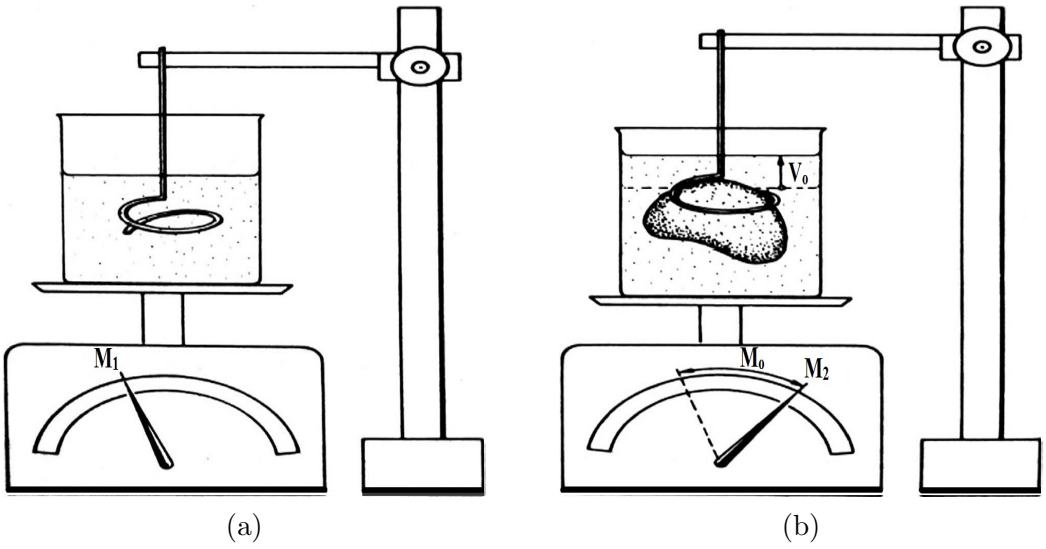
$$V_o = \frac{M_o}{d_l} \tag{2.11}$$

Para se obter M_o de maneira simples e prática, pode-se usar uma balança de precisão em conjunto com uma haste presa a um suporte (Figure 5), para exercer uma força externa sobre o órgão e, desse modo, garantir a sua completa imersão no líquido (SCHERLE, 1970).

Com efeito, contanto que o órgão não encoste no fundo ou nas laterais do recipiente e que o volume da parte da haste mergulhada no líquido seja descontado, M_o poderá ser obtida por meio da diferença de duas medidas realizadas com a balança: M_1 e M_2, onde a primeira se refere a massa inicial do sistema utilizado sem o órgão estar submerso no

líquido (Figura 5a) e a segunda quando o órgão está completamente submerso (Figura 5b). Vale ressaltar que a profundidade alcançada pela haste imersa na obtenção de M_2 deve ser exatamente a mesma na obtenção de M_1, para evitar o acréscimo ou decréscimo de massa em M_o.

Figura 5 – (a) Sistema utilizado para medir a massa do líquido deslocado, com uma massa inicial M_1 (já considerando o volume adicional da haste imersa). (b) Sistema com o órgão imerso ao líquido, com uma massa M_2 registrada. A diferença entre as massas (M_o) corresponde à massa do líquido deslocado pelo órgão de volume V_o.



Fonte: Adaptado de Weibel (1979).

Geralmente, em pesquisas biológicas, para evitar a degradação do tecido por osmose, o líquido utilizado para submersão do órgão é uma solução salina com aproximadamente 300mOsm, que possui densidade que difere em apenas 2 a 3% de 1 g/ml, sendo assim, uma precisão aceitável na estimação do volume pode ser alcançada mesmo assumindo-se $d_l = 1\,\mathrm{g/ml}$ (SCHERLE, 1970).

Consequentemente, a diferença entre a massa final do sistema com o órgão submerso (M_2) e a massa inicial sem o órgão submerso (M_1) pode ser numericamente aproximada ao volume do próprio órgão, ou seja, $V_o \approx M_0 = M_2 - M_1$, quando $d_l = 1\,\mathrm{g/ml}$ (Equação 2.11).

Isso torna o método rápido e prático de ser executado em basicamente qualquer laboratório, além disso, proporciona maior precisão do que os métodos que se baseiam no deslocamento ou extravasamento do líquido para medir volumes, os quais têm a exatidão reduzida, principalmente, para órgãos pequenos como pulmões de camundongos, em que a tensão superficial do líquido pode causar imprecisões significativas nas medidas

(SCHERLE, 1970; WEIBEL, 1979).

Em suma, foi por meio dessa técnica proposta por Scherle (1970) que Kawakami, Paul e Thurlbeck (1984) estimaram o volume dos pulmões *ex vivo* de camundongos BALB/c de diferentes idades e constataram uma elevada correlação positiva com a idade dos animais.

Esse método também é bastante utilizado na estereologia pulmonar (ELLIOTT et al., 2016; FEHRENBACH; OCHS, 1998; KNUDSEN et al., 2010), em que a obtenção do volume total do órgão sob estudo é um referencial crucial para todos os outros parâmetros que serão avaliados (OCHS, 2006; OCHS; MUHLFELD, 2013).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir são apresentados os animais de experimentação utilizados neste trabalho, assim como os procedimentos experimentais realizados para obter os dados morfológicos e fisiológicos abordados no estudo.

3.1 Animais de experimentação e o protocolo de asma

Os experimentos realizados com animais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), do ICB-USP, sob o registro nº 9782280518, obedecendo às diretrizes estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

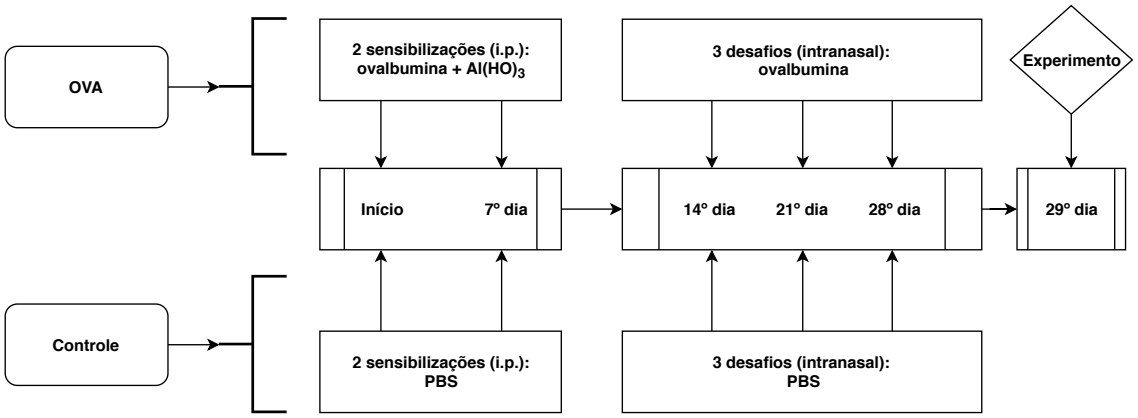
Para o desenvolvimento da pesquisa, foram utilizados um total de 57 camundongos albinos BALB/c machos, com massa corpórea média de $28{,}1 \pm 2{,}0\,\mathrm{g}$ (média ± SD) e 18 semanas de idade. Desses animais, 32 foram direcionados para compor um grupo de modelo animal de inflamação pulmonar (modelo animal de asma, grupo OVA) e 25 para formar um grupo de referência, sem inflamação (grupo Controle).

Para integrar o grupo OVA, os animais foram previamente induzidos a desenvolver inflamação pulmonar com 14 semanas de idade por intermédio de um protocolo com duração de 29 dias, que é utilizado no Laboratório de Fisiopatologia da Inflamação Experimental do Departamento de Farmacologia do ICB-USP.

Esse protocolo utilizou ovalbumina (Grau V, SIGMA, EUA) e hidróxido de alumínio ($Al(OH)_3$) para realizar a etapa de sensibilização dos animais e, na sequência, apenas ovalbumina na etapa de desafio (Figura 6). Como os animais iniciaram o protocolo (1º dia) com 14 semanas de idade, todos concluíram-no com 18 semanas, para dar-se início aos experimentos.

No início do protocolo, a primeira sensibilização é executada com 30 µg de ovalbumina e 2,87 mg de $Al(OH)_3$ diluídos em 0,2 ml de PBS (via i.p.), enquanto na segunda, sete

Figura 6 – Formação dos grupos OVA e Controle de camundongos BALB/c por meio 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.

dias após, 50 µg de ovalbumina foram aplicados.

Os desafios iniciaram-se na semana seguinte, ao término das sensibilizações, com aplicações intranasais a cada 7 dias de 10 µg de ovalbumina para o primeiro desafio e de 20 µg para o segundo e terceiro, todos diluídos em 30 µl de PBS. Os animais do grupo Controle passaram pelo mesmo protocolo de indução de inflamação pulmonar que o grupo OVA, no entanto, receberam PBS ao invés de ovalbumina e/ou hidróxido de alumínio, tanto na fase de sensibilização quanto na de desafios (Figura 6).

Ambos os grupos receberam água e comida à vontade durante a estadia no biotério até a data final do protocolo de indução de inflamação (dia do experimento). Assim, dois grupos de camundongos foram formados para esse trabalho: o grupo OVA com 32 animais e massa corpórea média de $28{,}4 \pm 1{,}6$ g e o Controle com 25 animais e massa corpórea média de $27{,}6 \pm 2{,}4$ g.

3.1.1 Preparação dos animais

Inicialmente, os roedores tiveram sua massa corpórea aferida e, então, foram anestesiados com uma solução de cetamina (120 mg/kg) e xilazina (12 mg/kg) via i.p.. Com o animal completamente anestesiado, uma traqueostomia foi realizada para a inserção na traqueia, por 9 mm, de uma cânula metálica 18G (BD Company, Brasil) serrada (3,2 cm de comprimento e com o bisel suavizado) e realizar a conexão com o SAV para dar início à sua ventilação mecânica, conforme mostra a Figura 7.

Figura 7 – Exemplo de um camundongo BALB/c traqueostomizado e conectado ao ventilador mecânico durante experimento no Laboratório de Fisiopatologia da Inflamação Experimental do Departamento de Farmacologia do ICB-USP.

Fonte: Próprio autor.

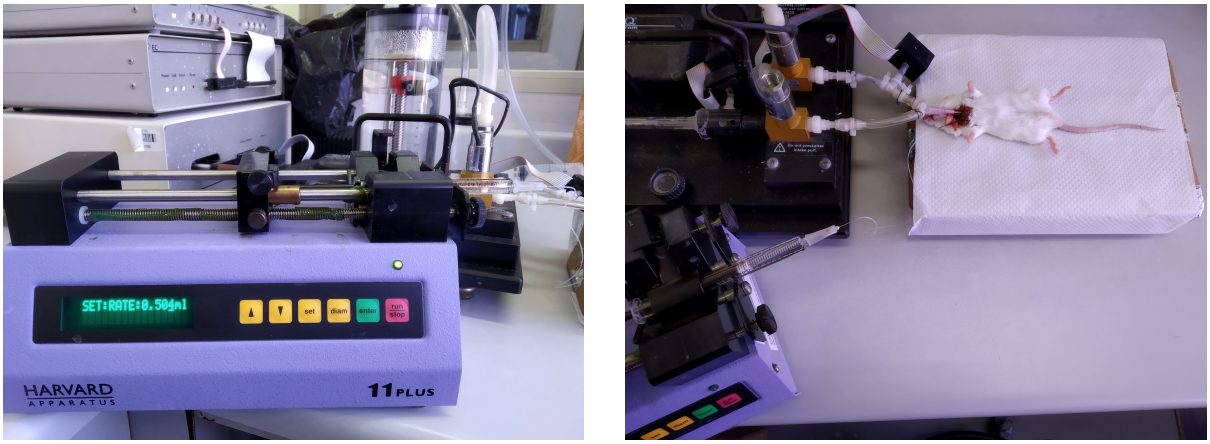
Após a traqueostomia, a veia jugular direita de cada animal foi exposta para que fosse inserida uma agulha, anexada a um tubo flexível de PVC (PTY, Critchley Electrical Products, Austrália).

Através desse tubo, o PBS pode ser administrado via injeção por bolus, com o uso de uma seringa de 1 ml (Figura 7), ou por infusão contínua com o auxílio de uma bomba de infusão (11 Plus, Harvard Apparatus, EUA), que é capaz de injetar o PBS a uma vazão constante (Figura 8), durante a avaliação da mecânica respiratória em condições basais.

Após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram conectados ao ventilador mecânico com uma ventilação quasi-senoidal ($V_c = 10\,\mathrm{ml/kg}$ e $f_r = 150\,\mathrm{respirações/\,min}$). Em seguida, injetou-se brometo de pancurônio (1 mg/kg i.p.) para realizar a paralisação da musculatura respiratória.

Porém, se no decorrer de sete minutos, após a injeção do paralisante, o animal não apresentasse respiração espontânea, ele era considerado apto a ter sua mecânica respiratória avaliada. Caso o camundongo ainda apresentasse respiração espontânea (em raras situações), um reforço de 50% da dose inicial do paralisante era realizado e mais sete mi-

Figura 8 – Bomba de infusão (11 Plus, Harvard Apparatus, EUA) utilizada para administrar o PBS (5 minutos a uma vazão constante), via jugular direita, nos camundongos BALB/c. Em (a) tem-se uma visão frontal da bomba de infusão durante o experimento. Em (b) tem-se uma visão superior da bomba de infusão, que controla o êmbolo da seringa durante todo o procedimento.



(a) (b)

Fonte: Próprio autor.

nutos eram aguardados novamente para dar-se início a avaliação da mecânica respiratória.

3.2 Avaliação da mecânica respiratória

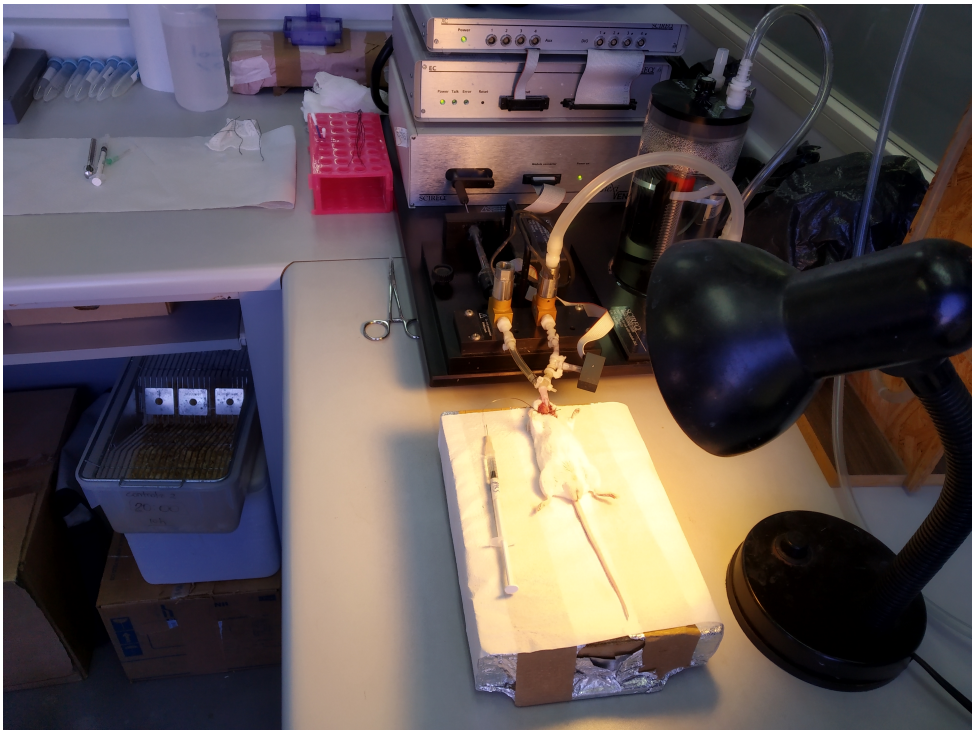
O sistema respiratório dos animais foi avaliado com o uso de um SAV (legacy $flexiVent$, SCIREQ Inc., Canadá), localizado no Laboratório de Fisiopatologia da Inflamação Experimental do Departamento de Farmacologia do ICB-USP (Figura 9).

Duas manobras de recrutamento alveolar foram realizadas com duração total de seis segundos cada (Figura 10), para garantir a completa insuflação e homogeneização dos pulmões (recrutamento).

Cada manobra consistiu de um aumento pressórico, pressão traqueal (P_{tr}), em rampa por aproximadamente três segundos a partir da PEEP preestabelecida de 3 cmH_2O até a pressão máxima de 30 cmH_2O, que foi sustentada por mais três segundos (Figura 10a). Na Figura 10b é apresentada a curva do volume de ar entregue aos pulmões durante a manobra.

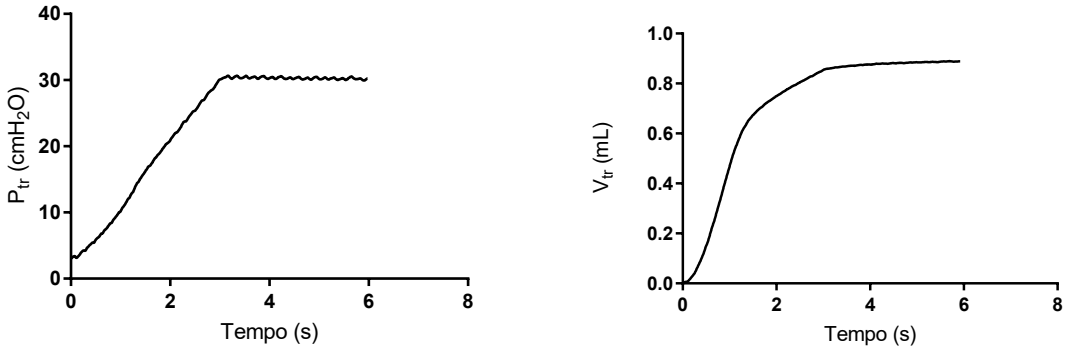
Após as manobras de recrutamento, 2 ml/kg de PBS foram administrados aos animais nos casos de injeção por bolus e um volume médio de 0,02 ml nos casos de infusão contínua (duração de cinco minutos). O volume administrado por infusão contínua também foi

Figura 9 – SAV utilizado na avaliação da mecânica respiratória de roedores, localizado no Laboratório de Fisiopatologia da Inflamação Experimental do Departamento de Farmacologia do ICB-USP.



Fonte: Próprio autor.

Figura 10 – Manobra de recrutamento alveolar realizada antes da avaliação mecânica. (a) A pressão foi monitorada pelo SAV na região da traqueia para realizar a manobra (P_{tr}). (b) Volume de ar correspondente entregue aos pulmões (V_{tr}).



(a) (b)

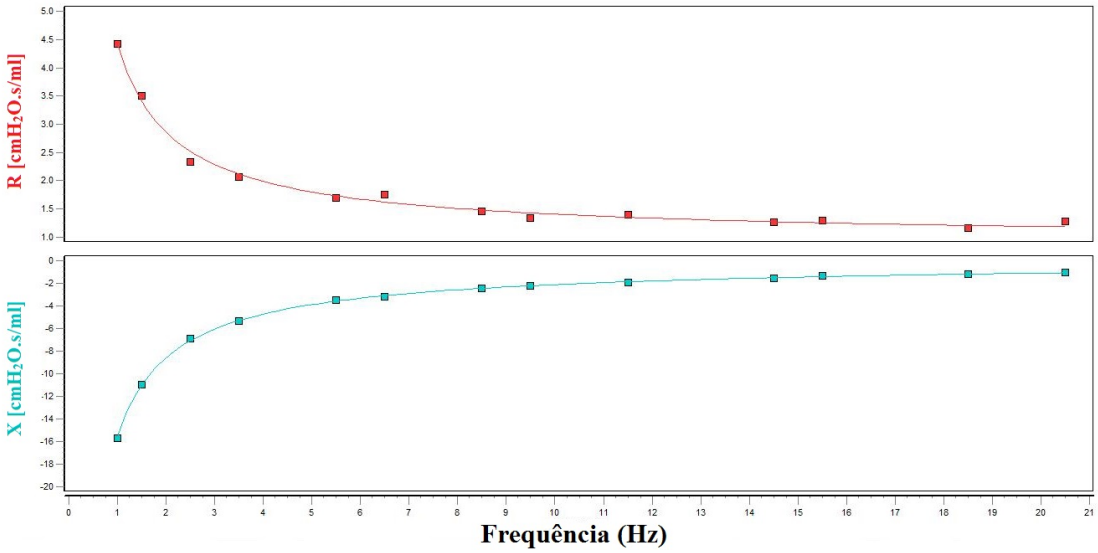
Fonte: Próprio autor.

associado à massa corpórea dos roedores, mas foi tido como referência o volume utilizado para proporcionar uma dose de 48 µg/kg × min de metacolina a partir de uma solução mãe de 320 µg/ml (estudo sobre broncoconstrição realizado à parte pelo grupo). Ambas

as aplicações foram via jugular direita do animal e caracterizaram o início da avaliação da mecânica respiratória em regime basal.

Na sequência, a ventilação mecânica quasi-senoidal foi interrompida para mensurar a impedância do sistema respiratório (Z_{sr}) por intermédio de uma perturbação ventilatória, que consiste em um sinal banda larga, de amplitude proporcional ao peso do camundongo avaliado (3 ml/kg), composto por 13 senóides com frequências de 1, 1,5, 2,5, 3,5, 5,5 6,5, 8,5, 9,5, 11,5 14,5, 15,5, 18,5, e 20,5 hertz, nas quais Z_{sr} foi computada (Figura 11).

Figura 11 – Exemplo de impedância do sistema respiratório (Z_{sr}) de um BALB/c computada nas 13 frequências compostas na perturbação ventilatória. Z_{sr} é representada pela sua parte real (R) por pontos em vermelho, e imaginária (X) por pontos em ciano. As 13 Z_{sr} computadas são, posteriormente, utilizadas para ajustar o MFC (linha vermelha e ciano).



Fonte: Imagem capturada durante experimento em laboratório pelo próprio autor.

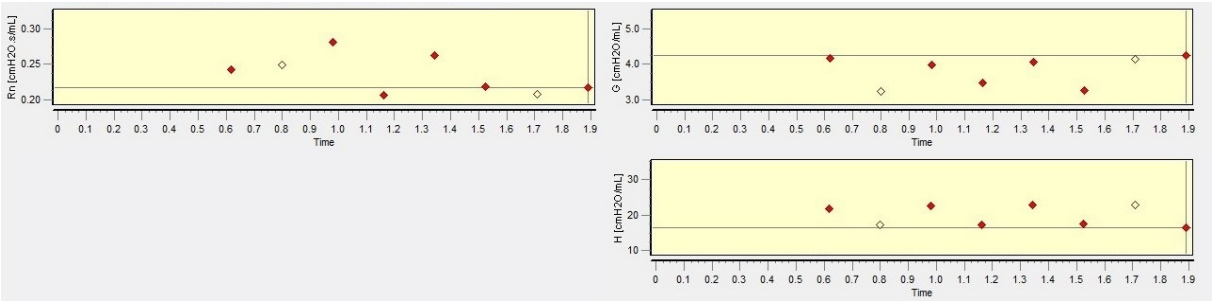
Cada perturbação ventilatória possui duração aproximada de três segundos, período no qual os dados de pressão e volume/fluxo são obtidos pelo SAV e as impedâncias do sistema respiratório nas 13 frequências computadas, para que o MFC seja ajustado pelo próprio software de aquisição de dados ($flexiVent$ v5.2, SCIREQ Inc., Canadá) (Figura 11).

Para avaliar a qualidade do ajuste do modelo às impedâncias, foi aplicado o COD que varia de 0 a 1, onde o valor 0 representa que o modelo não possui relação com os dados (Z_{sr}) utilizados na regressão e o valor 1 indica um ajuste perfeito.

Foram executadas 15 perturbações ventilatórias para a avaliação da mecânica respiratória, assim, os parâmetros avaliados do MFC (R_n, G, e H) foram computados 15 vezes

para cada animal. Na Figura 12 são apresentados oito registros desses parâmetros dos 15 a serem computados.

Figura 12 – Oito dos 15 registros a serem computados dos parâmetros R_n, G e H do MFC fornecidos pelo software de aquisição de dados do SAV ($flexiVent$ v5.2, SCIREQ Inc., Canadá) durante experimento em laboratório. Pontos preenchidos em vermelho possuem COD $\geq 0,9$ e os vazados COD $< 0,9$.



Fonte: Imagem capturada durante experimento em laboratório e editada pelo autor.

Os pontos preenchidos em vermelho na Figura 12 indicam um COD $\geq 0,9$, enquanto os pontos vazados representam COD $< 0,9$. Para este trabalho, utilizou-se como parâmetros R_n, G e H para as análises a média aritmética dos valores obtidos pelo SAV com COD $\geq 0,9$ apenas.

3.3 Lavado broncoalveolar, comprimento naso-anal e índice de Lee

Ao término da avaliação da mecânica respiratória, os animais foram eutanasiados com uma overdose de anestesia (3× a dose inicial) e, em seguida, um procedimento de BAL foi realizado para caracterizar o modelo de inflamação pulmonar utilizado, ou seja, o grupo OVA e o grupo Controle. Após a coleta do BAL, foi feita a mensuração do CNA dos animais e calculado o IL.

3.3.1 Lavado broncoalveolar

Para realizar o BAL, 0,8 ml de PBS foram injetados nos pulmões dos animais com uma seringa, através da cânula já utilizada na traqueostomia, recolhidos e armazenados em um tubo tipo Falcon. Esse procedimento foi realizado novamente e, então, todo o líquido coletado ($\approx$ 1,5 ml) foi centrifugado por 15 min a 1500 rpm (Centrifuge 5810, Eppendorf, Alemanha).

Desprezado o sobrenadante, o precipitado foi ressuspenso em 1 ml de PBS. Em seguida, 45 µl dessa solução foram acrescidos a 5 µl de cristal violeta para formar uma nova solução, da qual 10 µl foram utilizados para realizar a contagem total do número de células em uma câmara de Neubaeur com lamínula, contando-se os 4 quadrantes.

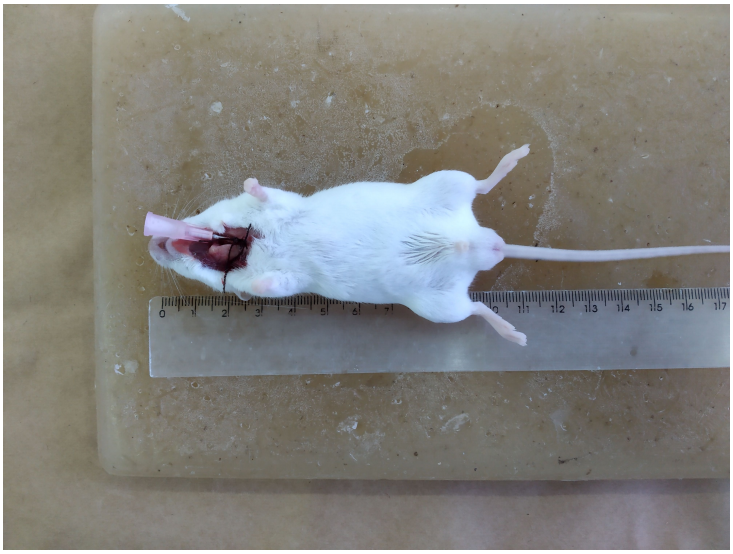
Para a contagem diferencial das células, 200 µl da amostra com o precipitado ressuspenso foram colocados em uma citocentrífuga (Centrifuge 2400, Fanem, Brasil) a 400 rpm por 5 min. Depois de secas (24 horas), as lâminas obtidas foram coradas utilizando-se um kit com corantes para coloração diferencial em hematologia (Instant Prov, Newprov, Brasil).

A contagem diferencial foi feita com um microscópio ótico (Eclipse E100, Nikon, Japão) com a contagem mínima de 400 células, diferenciando-as segundo o tipo celular: mononucleares, neutrófilos e eosinófilos.

3.3.2 Comprimento naso-anal e índice de Lee

Após o procedimento do BAL, o camundongo era colocado em uma placa retangular de parafina para ter seu CNA mensurado com o auxílio de uma régua simples de poliestireno (30 cm), como ilustrado na Figura 13.

Figura 13 – Mensuração do comprimento naso-anal (CNA) dos camundongos utilizados.



Fonte: Próprio autor.

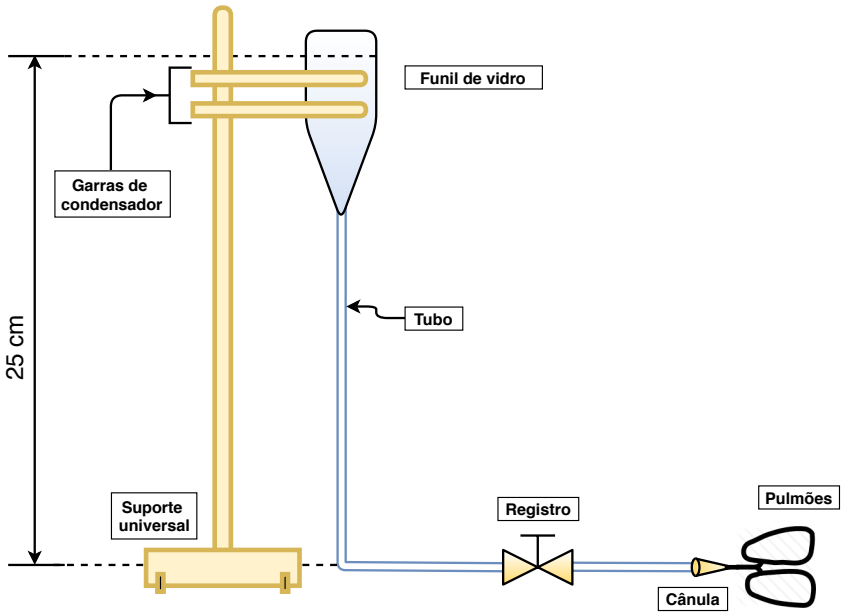
Com o CNA e a massa corpórea do animal, previamente obtida, o IL pode então ser calculado seguindo a equação 2.7.

3.4 Volume dos pulmões *ex vivo*

Seguindo com o procedimento, os pulmões do camundongo foram excisados (removendo-se também o coração, o esôfago e tecidos conjuntivos da região do mediastino) e iniciou-se o processo de fixação dos pulmões de modo a mantê-los completamente insuflados, para realizar a estimativa volumétrica *in totum*.

O processo de fixação foi realizado mediante instilação traqueal de paraformaldeído 4% a 25 cmH_2O de pressão por 15 minutos, com o auxílio de um aparato desenvolvido para manter o líquido fixador na altura de 25 cm acima dos pulmões (Figura 14).

Figura 14 – Diagrama esquemático do aparato de fixação dos pulmões desenvolvido. Um funil de vidro é preenchido com paraformaldeído 4% a uma altura de 25 cm, em relação aos pulmões, com o auxílio de um suporte universal e garras de condensador. Assim, através de um registro e um tubo, o fixador é instilado aos pulmões previamente canulados.



Fonte: Próprio autor.

Na Figura 15 são apresentadas as imagens registradas desse procedimento durante o experimento em laboratório. Após os 15 minutos de instilação traqueal, a traqueia do animal foi amarrada com uma linha de algodão e, então, o volume dos pulmões completamente insuflados pode ser medido.

A estimação do volume dos pulmões *ex vivo* dos camundongos ocorreu com o auxílio de uma técnica fundamentada no princípio de Arquimedes (SCHERLE, 1970), que realiza a imersão completa dos pulmões excisados e fixados em um líquido com densidade conhecida

Figura 15 – (a) Aparato montado para realizar a fixação dos pulmões dos animais em laboratório. (b) Pulmões de um camundongo BALB/c completamente insuflados durante o procedimento de fixação.

(a) (b)

Fonte: Próprio autor.

para estimar o seu volume, como abordado na seção 2.3.2.

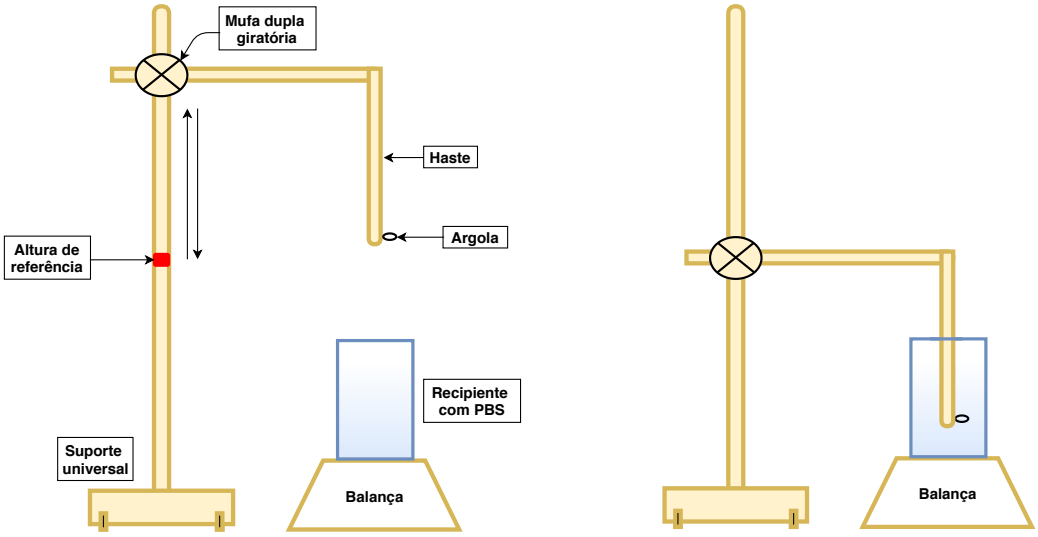
Neste estudo, o líquido que serviu para a imersão dos pulmões foi a solução PBS 1X com pH $= 7,4$ e densidade cerca de 1 g/ml. Para manter o órgão submerso na solução, outro sistema com um suporte universal e uma haste foi desenvolvido (Figura 16), e para medir a massa do líquido deslocado por eles, necessária para estimar o volume, foi usada uma balança semianalítica (Micronal B400, EUA).

Com esse sistema, ocorreram três procedimentos para estimar o volume dos pulmões. Primeiramente, apenas a haste foi mergulhada na solução PBS abaixando-se a mufa giratória até a altura de referência indicada no suporte universal e, então, a balança foi zerada (Figura 17a).

Em seguida, a haste foi retirada da solução, e os pulmões foram anexados à argola em sua extremidade (Figura 17b) e imersos novamente na solução, até a mesma profundidade atingida anteriormente (altura de referência), com isso, uma nova medida foi obtida (Figura 17c).

Como foi considerada uma densidade de 1 g/ml para o PBS, o último valor registrado pela balança em gramas (Figura 17c), foi, numericamente, igual ao volume dos pulmões do camundongo em mililitros (Equação 2.11).

Figura 16 – (a) Diagrama do aparato desenvolvido para manter os pulmões submersos em solução salina com um suporte universal e haste acoplada (com uma pequena argola na extremidade). (b) Com esse aparato, os pulmões foram imersos em PBS a uma profundidade fixa, ponto onde a mufa dupla giratória atinge a marca de altura de referência em vermelho no suporte universal.



(a) (b)

Fonte: Próprio autor.

Figura 17 – (a) Processo de tara da balança com apenas a haste imersa na solução salina. (b) Pulmões fixados à haste com a própria linha utilizada para amarrar a traqueia após a instilação traqueal. (c) Valor da massa do líquido deslocado pelos pulmões submersos, ou seja, o volume dos pulmões do camundongo (ml) considerando-se o PBS com densidade de 1 g/ml.

(a) (b) (c)

Fonte: Próprio autor.

3.5 Análise dos dados

Conforme informado anteriormente, para desenvolver a pesquisa, foram utilizados 25 animais do grupo Controle e 32 do grupo OVA, os quais serviriam para coletar dados da mecânica respiratória (R_n, G e H) e morfológicos (massa corpórea, volume dos pulmões *ex vivo*, comprimento naso-anal e índice de Lee).

No entanto, devido às perdas durante os procedimentos experimentais realizados, como na estimativa do volume dos pulmões (perfuração do órgão durante procedimento cirúrgico) e/ou na avaliação da mecânica respiratória (falecimento do animal durante o procedimento), o número de animais utilizados para avaliar as relações entre os parâmetros mecânicos e morfológicos ficou comprometido.

Dessa forma, decidiu-se que os animais com algum comprometimento nos dados coletados, durante qualquer procedimento experimental, fossem retirados da análise estatística e somente apresentados e comentados no APÊNDICE desta dissertação.

No total, oito animais pertencentes ao grupo Controle e 18 ao grupo OVA foram removidos da análise principal do trabalho. Assim, toda a análise de dados (estatística) foi realizada com 17 animais do grupo Controle (27,3 ± 2,4 g) (média ± SD) e 14 do grupo OVA (27,7 ± 1,4 g).

Na Tabela 2, os grupos que foram avaliados são detalhados considerando-se também o tipo de administração de PBS utilizado na avaliação da mecânica respiratória, ou seja, os grupos Controle com injeção de PBS por bolus e infusão contínua (Controle-B e Controle-I, respectivamente) e os grupos OVA com injeção de PBS por bolus e infusão contínua (OVA-B e OVA-I, respectivamente).

Tabela 2 – Número de animais utilizados na análise estatística com média ± SD da massa corpórea para os quatro grupos: Controle com administração de PBS via bolus (Controle-B) e infusão contínua (Controle-I); e OVA com administração de PBS via bolus (OVA-B) e infusão contínua (OVA-I).

	Grupos			
	Controle-B	Controle-I	OVA-B	OVA-I
n	7	10	6	8
Massa corpórea (g) (média ± SD)	$26,4 \pm 2,5$	$28,0 \pm 2,3$	$27,3 \pm 1,4$	$28,0 \pm 1,4$

Fonte: Próprio autor.

A análise estatística, assim como os gráficos realizados, foi efetuada com o auxílio de um software dedicado à análise de dados (GraphPad Prism 7.00, GraphPad Software, EUA), no qual uma avaliação inicial, para os quatro grupos, foi feita de modo a excluir possíveis *outliers* dos dados obtidos por meio do método ROUT (MOTULSKY; BROWN, 2006) com uma taxa de falso positivo máxima (Q) de 5%.

Na sequência, uma análise de variância (ANOVA two-way) foi feita, seguida por um teste de comparações múltiplas (Tukey-Kramer) (apenas para os resultados significativos da ANOVA), para avaliar os parâmetros da mecânica respiratória em relação aos grupos. Também foi realizada uma ANOVA one-way para verificar a variabilidade do volume dos pulmões *ex vivo* medido entre os quatro grupos de animais pesquisados.

Nesse contexto, as relações entre as variáveis da mecânica respiratória e as medidas morfológicas obtidas foram avaliadas por meio de gráficos de dispersão e análise do grau de correlação linear por intermédio do coeficiente de Pearson (r). Todas as análises realizadas utilizaram como nível de significância $\alpha = 0{,}05$.

4 RESULTADOS

De modo a caracterizar os grupos estudados, foram elaboradas análises de celularidade do BAL dos roedores, e a Tabela 3 detalha os valores encontrados para cada grupo.

Tabela 3 – Análise de celularidade do BAL dos grupos Controle-B, OVA-B, Controle-I e OVA-I com contagem total (células $\times$ 10^5/ml) e diferencial (em % do total das células). Os valores são apresentados na forma média $\pm$ SD dos grupos analisados.

	Total	Diferencial		
	células $\times$ 10^5/ml	Mononuclear (%)	Neutrófilo (%)	Eosinófilo (%)
Controle-B	$1,8 \pm 1,0$	$97,9 \pm 3,1$	$0,5 \pm 1,1$	$1,6 \pm 2,4$
OVA-B	$4,6 \pm 2,3$	$65,6 \pm 14,8$	$3,0 \pm 5,7$	$31,4 \pm 16,9$
Controle-I	$0,8 \pm 0,5$	$98,2 \pm 1,7$	$0,6 \pm 1,0$	$1,2 \pm 1,4$
OVA-I	$2,5 \pm 0,6$	$50,5 \pm 17,7$	$4,3 \pm 4,4$	$45,2 \pm 19,8$

Fonte: Próprio autor.

Não foram observados *outliers* entre os dados, portanto, o número de variáveis avaliado permaneceu o mesmo para todos os camundongos pesquisados.

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos com a análise de variância (ANOVA two-way) executada com os parâmetros R_n, G e H, considerando como fatores da análise o grupo que o animal pertence em relação à inflamação pulmonar (Controle e OVA) e o tipo de aplicação de PBS utilizada (bolus e infusão contínua). Nenhuma interação entre os fatores foi percebida e os três parâmetros não apresentaram diferença significativa em relação à inflamação pulmonar (Controle e OVA).

No tocante ao tipo de administração de PBS, apenas com o parâmetro R_n verificou-se uma diferença significativa e, com isso, foi realizado o teste Tukey-Kramer (comparações múltiplas) com esse parâmetro, após a ANOVA, de modo a investigar a localização dessa diferença significativa entre os quatro grupos analisados, que resultou em nenhuma variação significativa dentre as comparações feitas.

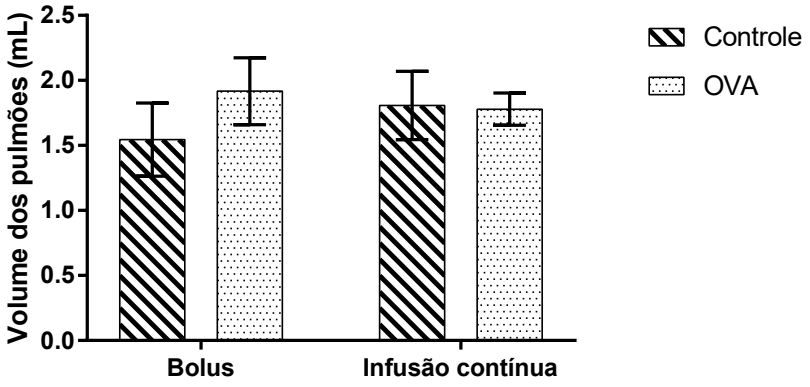
Tabela 4 – Análise de variância (ANOVA two-way) dos parâmetros R_n, G e H com os fatores: tipo de administração de PBS (bolus e infusão contínua) e grupos relativos à inflamação pulmonar (Controle e OVA). Onde, ns e * representam: não significativo e significativo ($p = 0,019$), respectivamente.

	R_n	G	H
Tipo de administração de PBS (bolus e infusão contínua)	*	ns	ns
Grupos relativos à inflamação pulmonar (Controle e OVA)	ns	ns	ns
Interação entre os fatores	ns	ns	ns

Fonte: Próprio autor.

O gráfico de barras da Figura 18 exibe a média ± SD dos volumes dos pulmões *ex vivo* estimados para os quatro grupos. A ANOVA one-way, efetuada para esses grupos, não mostrou resultados significativos.

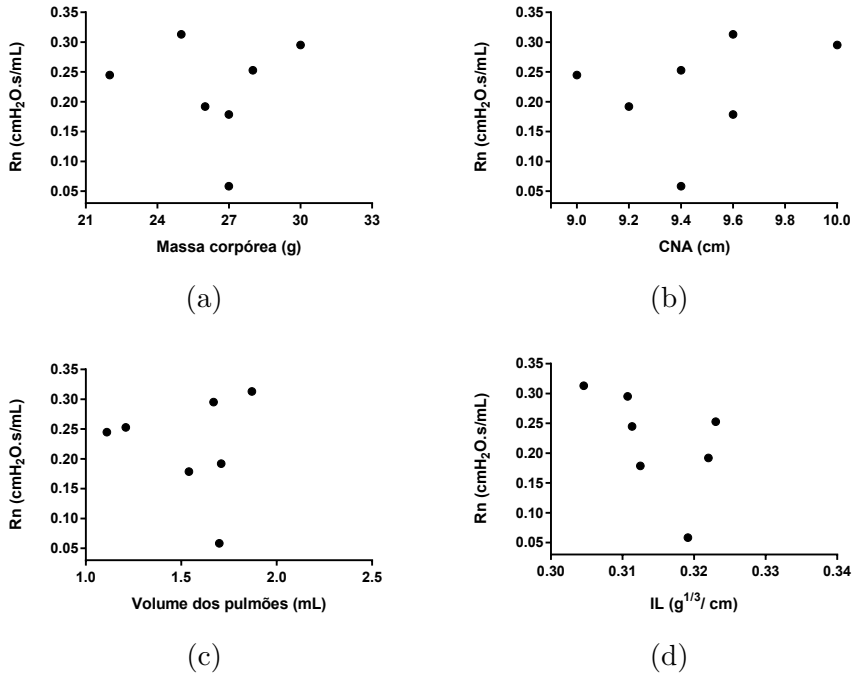
Figura 18 – Volume dos pulmões *ex vivo* para os quatro grupos: Controle-B, OVA-B, Controle-I e OVA-I. Média ± SD. Não houve diferença significativa entre os grupos, segundo a ANOVA.



Fonte: Próprio autor.

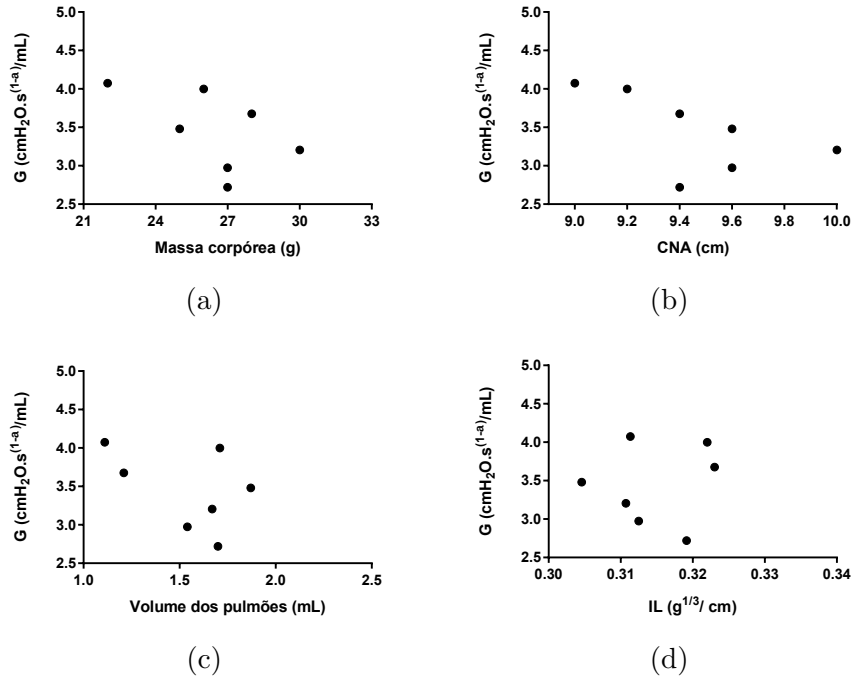
As relações dos parâmetros da mecânica respiratória (R_n, G, e H) com as medidas morfométricas dos camundongos pertencentes ao grupo Controle-B são evidenciadas pelos gráficos das Figuras 19 a 21. Na sequência, as relações para o grupo Controle-I são apresentadas (Figuras 22 a 24).

Figura 19 – Relação do parâmetro R_n com medidas morfométricas dos camundongos BALB/c pertencentes ao grupo Controle-B.



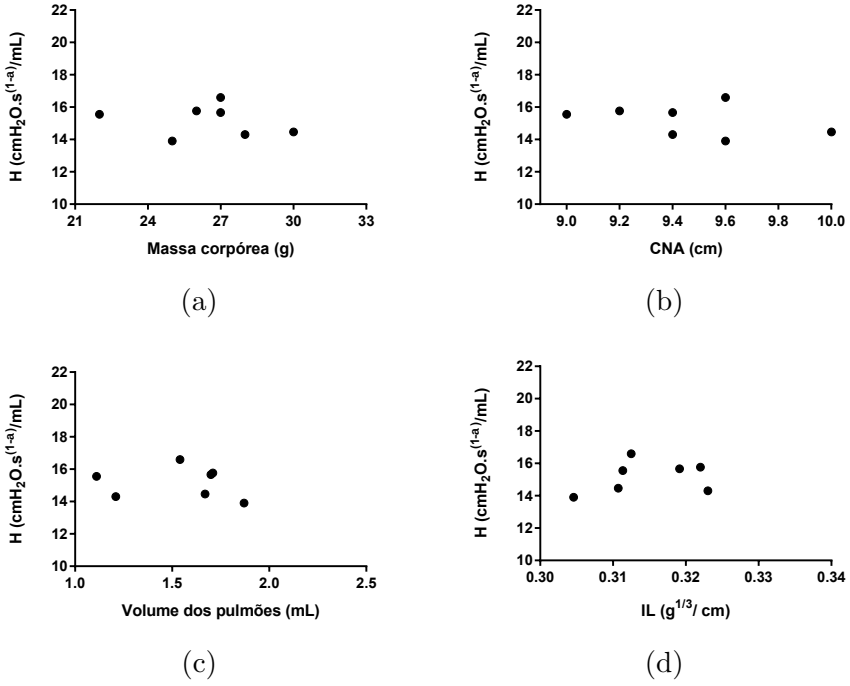
Fonte: Próprio autor.

Figura 20 – Relação do parâmetro G com medidas morfométricas dos camundongos BALB/c pertencentes ao grupo Controle-B.



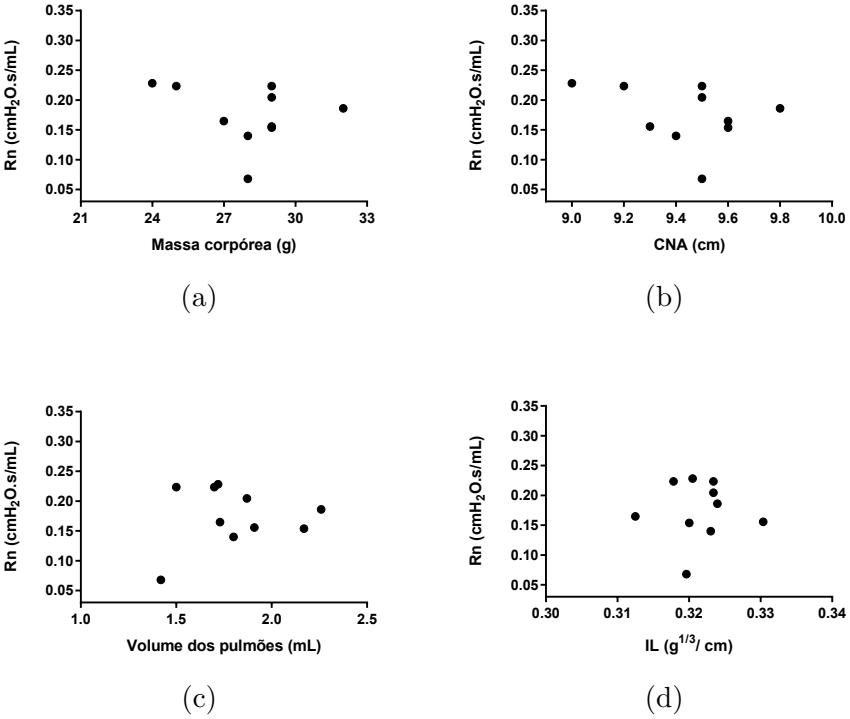
Fonte: Próprio autor.

Figura 21 – Relação do parâmetro H com medidas morfométricas dos camundongos BALB/c pertencentes ao grupo Controle-B.



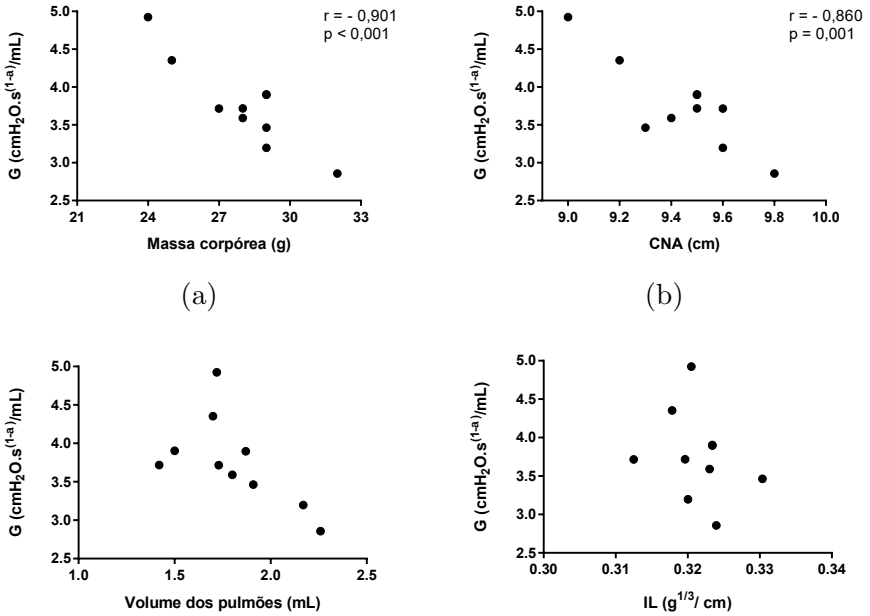
Fonte: Próprio autor.

Figura 22 – Relação do parâmetro R_n com medidas morfométricas dos camundongos BALB/c pertencentes ao grupo Controle-I.



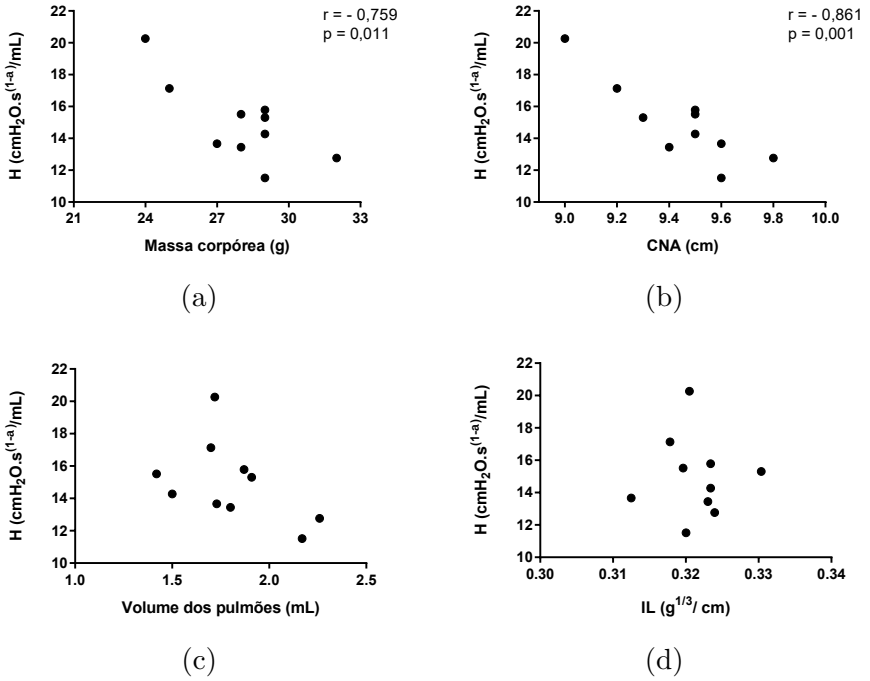
Fonte: Próprio autor.

Figura 23 – Relação do parâmetro G com medidas morfométricas dos camundongos BALB/c pertencentes ao grupo Controle-I.



Fonte: Próprio autor.

Figura 24 – Relação do parâmetro H com medidas morfométricas dos camundongos BALB/c pertencentes ao grupo Controle-I.

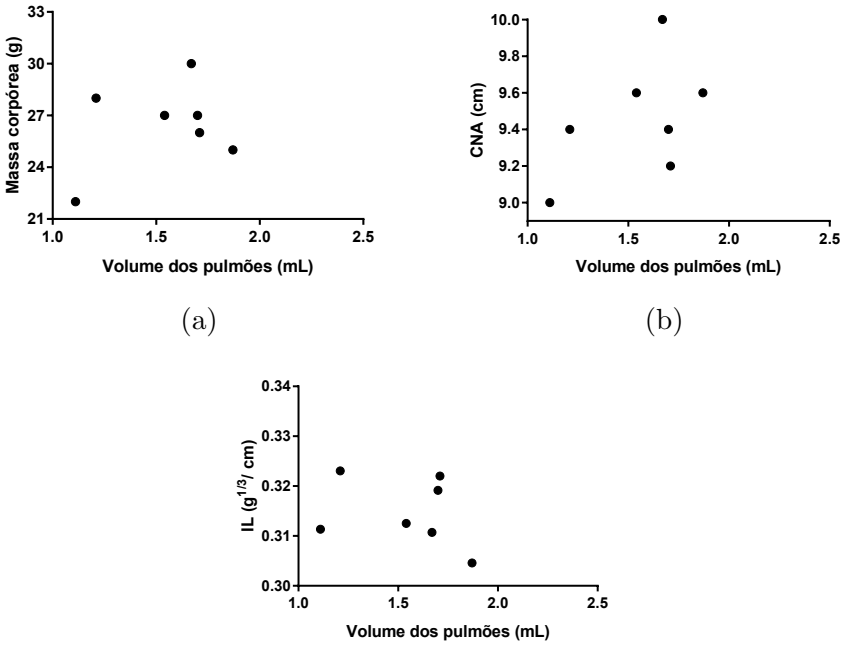


Fonte: Próprio autor.

Os valores de r e p (bicaudal) das análises correlacionais, entre as variáveis da mecânica respiratória e medidas morfométricas, são explicitados nas figuras para conhecimento, apenas para os gráficos que apresentaram correlação significativa entre as variáveis.

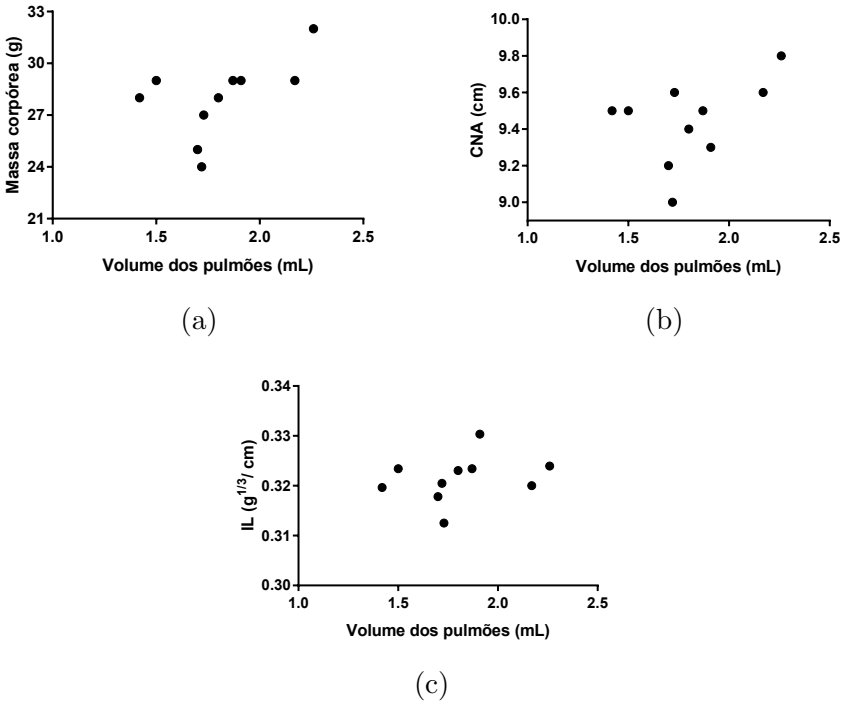
Análises de correlação entre o volume dos pulmões *ex vivo* dos animais com suas respectivas medidas morfométricas também foram feitas para o grupo Controle-B e Controle-I, Figuras 25 e 26, respectivamente.

Figura 25 – Relação do volume dos pulmões *ex vivo* com medidas morfométricas dos camundongos BALB/c do grupo Controle-B.



Fonte: Próprio autor.

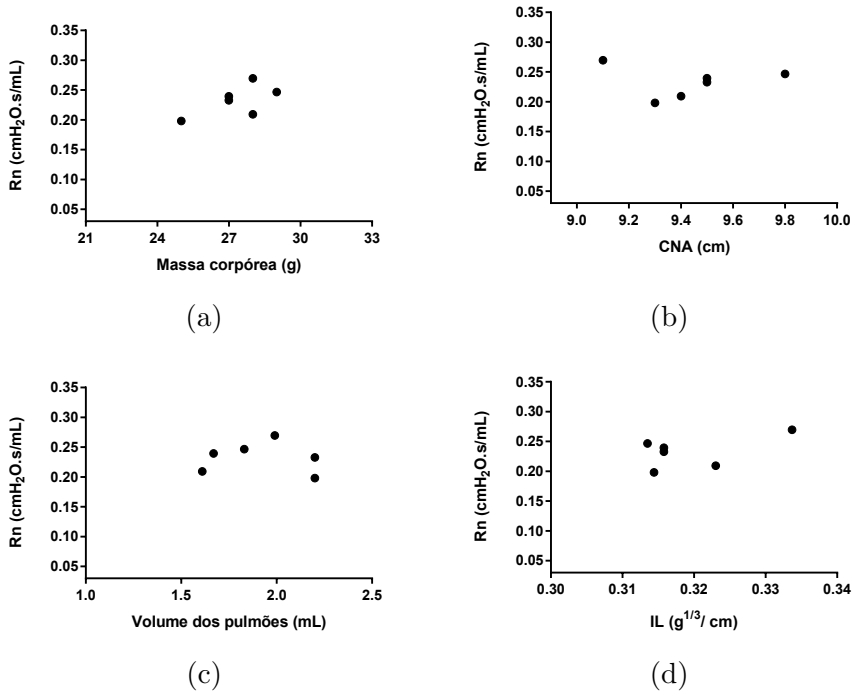
Figura 26 – Relação do volume dos pulmões *ex vivo* com medidas morfométricas dos camundongos BALB/c do grupo Controle-I.



Fonte: Próprio autor.

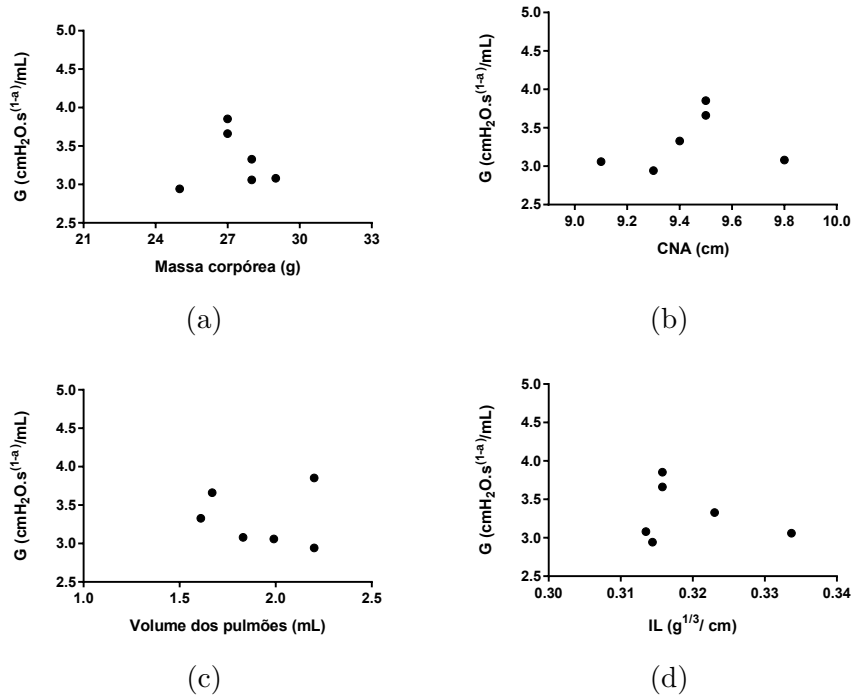
As mesmas análises entre os parâmetros mecânicos R_n, G e H com as medidas morfológicas dos camundongos foram feitas para o grupo OVA-B e são mostradas pelos gráficos das Figuras 27, 28 e 29. Em seguida, as análises obtidas com o grupo OVA-I também são apresentadas (Figuras 30, 31 e 32).

Figura 27 – Relação do parâmetro R_n com medidas morfométricas dos camundongos BALB/c pertencentes ao grupo OVA-B.



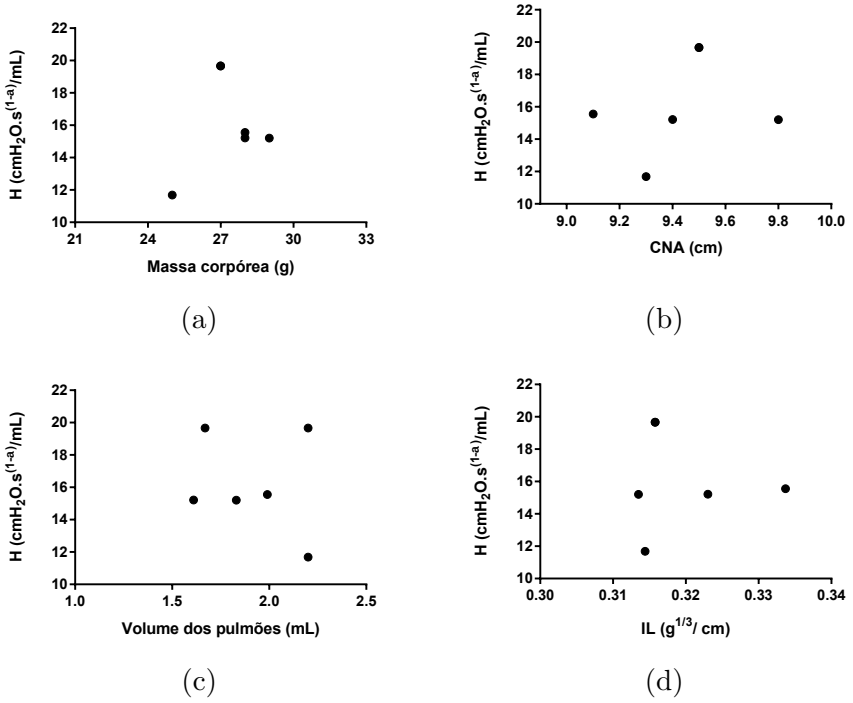
Fonte: Próprio autor.

Figura 28 – Relação do parâmetro G com medidas morfométricas dos camundongos BALB/c pertencentes ao grupo OVA-B.



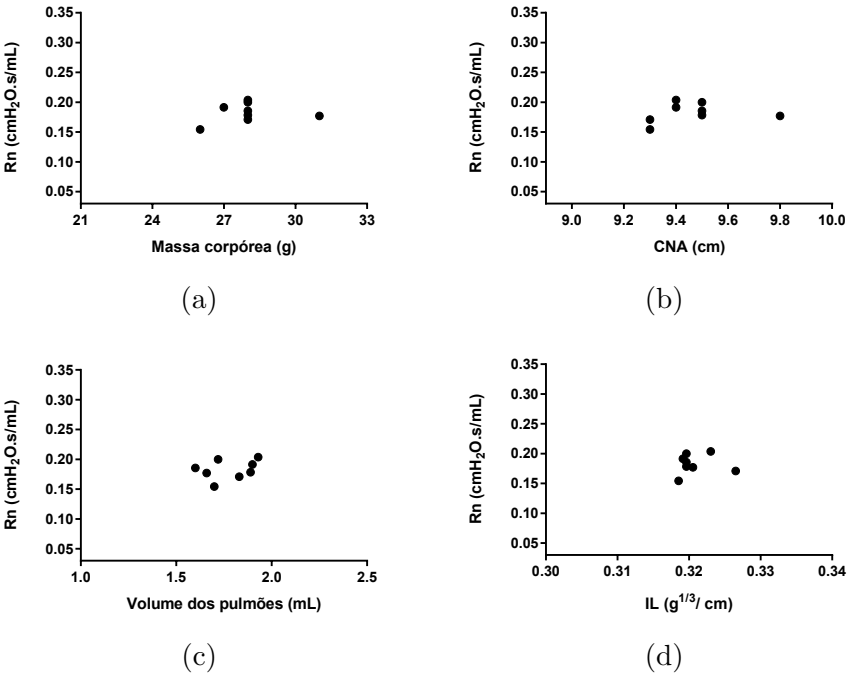
Fonte: Próprio autor.

Figura 29 – Relação do parâmetro H com medidas morfométricas dos camundongos BALB/c pertencentes ao grupo OVA-B.



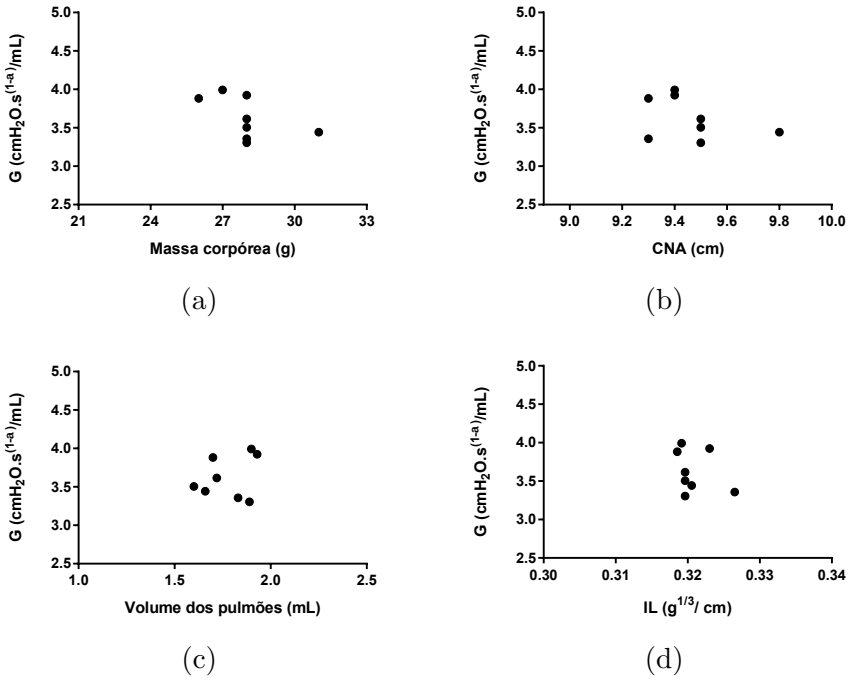
Fonte: Próprio autor.

Figura 30 – Relação do parâmetro R_n com medidas morfométricas dos camundongos BALB/c pertencentes ao grupo OVA-I.



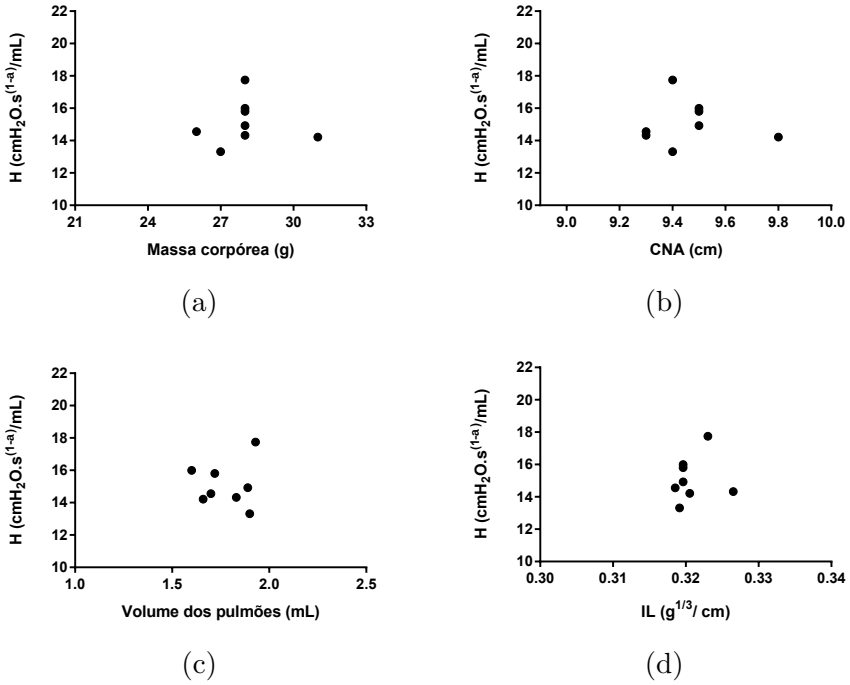
Fonte: Próprio autor.

Figura 31 – Relação do parâmetro G com medidas morfométricas dos camundongos BALB/c pertencentes ao grupo OVA-I.



Fonte: Próprio autor.

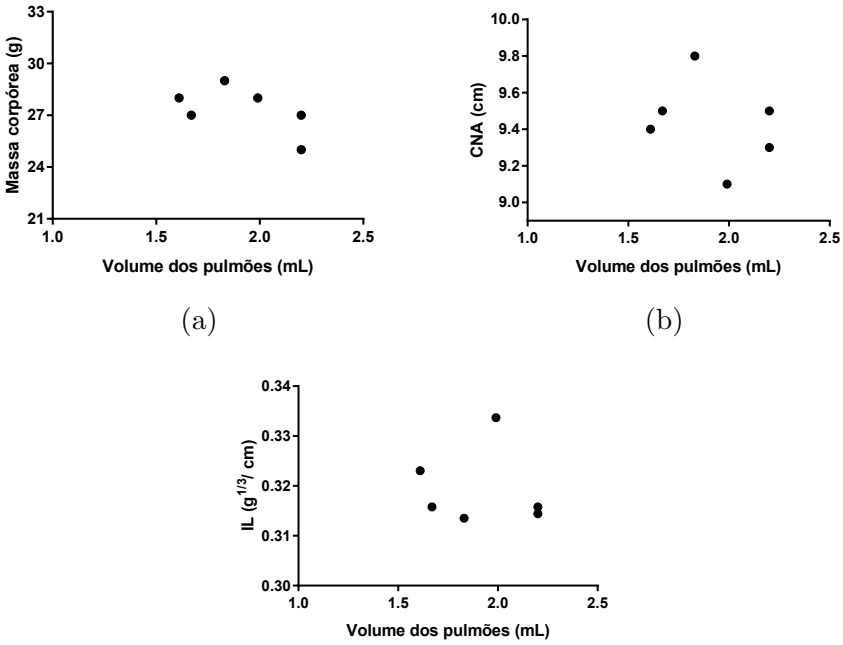
Figura 32 – Relação do parâmetro H com medidas morfométricas dos camundongos BALB/c pertencentes ao grupo OVA-I.



Fonte: Próprio autor.

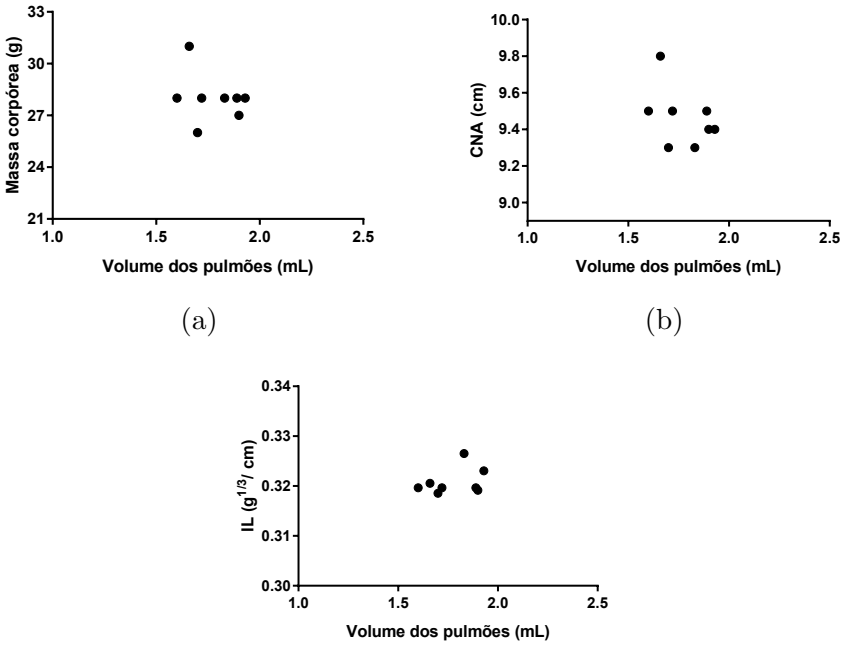
As relações do volume dos pulmões *ex vivo* dos roedores com sua respectiva massa corpórea, CNA e IL, para os grupos OVA-B e OVA-I, são evidenciados nas Figuras 33 e 34.

Figura 33 – Relação do volume dos pulmões *ex vivo* com medidas morfométricas dos camundongos BALB/c do grupo OVA-B.



Fonte: Próprio autor.

Figura 34 – Relação do volume dos pulmões *ex vivo* com medidas morfométricas dos camundongos BALB/c do grupo OVA-I.



Fonte: Próprio autor.

5 DISCUSSÃO

Este trabalho investigou a relação entre medidas morfológicas provenientes de camundongos BALB/c com parâmetros amplamente empregados na avaliação da mecânica respiratória. Por meio da alometria, verificou-se que existem relações entre as diversas variáveis estruturais e funcionais dos mamíferos como volume sanguíneo, ossos, massa dos pulmões, f_r, V_c, etc, com sua massa corpórea (GOMES et al., 2000; LINDSTEDT, 1987; STAHL, 1967).

Desse modo, este manuscrito teve como objetivo avaliar a relação entre diferentes medidas morfológicas de camundongos BALB/c como CNA, volume dos pulmões *ex vivo*, IL e massa corpórea com os principais parâmetros do MFC (R_n, G e H), que caracterizam as propriedades mecânicas do sistema respiratório.

Para conduzir este estudo, inicialmente, desenvolveram-se dois grupos de animais: um grupo modelo animal de inflamação pulmonar (OVA) e um grupo controle (Controle). Em seguida, devido ao tipo de procedimento realizado para administrar o PBS aos roedores (bolus (B) ou infusão contínua (I)) durante a avaliação da mecânica respiratória, esses dois grupos iniciais foram novamente separados em dois, formando-se, então, quatro grupos: OVA-B, OVA-I, Controle-B e Controle-I.

Os animais receberam PBS porque se trata da primeira etapa de uma avaliação do tipo concentração-resposta à metacolina e, normalmente, é considerada a situação basal. Esse tipo de avaliação é amplamente empregada em estudos de modelo animal de inflamação pulmonar.

O grau de inflamação pulmonar foi avaliado por meio da análise do BAL para esses quatro grupos, conforme apresentado na Tabela 3, em que é possível observar que a implementação do modelo eosinofílico de inflamação pulmonar foi bem sucedida, ou seja, aumento no número de eosinófilos em relação ao grupo controle, para ambos os tipos de administração de PBS (bolus e infusão contínua).

Tal separação dos grupos OVA e Controle entre os tipos de administração de PBS

foi resultado da análise de variância efetuada com esses fatores (ANOVA two-way), em que foi observada uma diferença significativa (R_n, $p = 0,019$) em relação ao tipo de administração de PBS implementado na avaliação da mecânica respiratória (Tabela 4).

Uma possível explicação para essa diferença percebida nesse parâmetro pode vir da constatação de que o grupo OVA-I apresentou uma inflamação pulmonar mais intensa ($45,2 \pm 19,8$ % eosinófilos) (média ± SD), em comparação ao grupo OVA-B ($31,4 \pm 16,9$ % eosinófilos). Dessa forma, as vias aéreas mais inflamadas seriam representadas por um R_n mais elevado, mesmo quando avaliadas em condições basais.

A razão pela qual os animais do grupo OVA-I responderam mais ao protocolo de inflamação utilizado não é clara, no entanto, uma possível causa está no fato de que os camundongos que formavam os grupos Controle-I e OVA-I vieram de um lote de animais distinto dos roedores dos grupos Controle-B e OVA-B. Isso pode ter introduzido no estudo um fator distinto e inerente de responsividade inflamatória (ao protocolo de asma implementado) aos animais dos grupos bolus e infusão contínua, tornando os animais do grupo OVA-I mais responsivos à indução da inflamação pulmonar quando comparado aos camundongos do grupo OVA-B.

Entretanto, nenhuma diferença significativa foi observada por meio do pós-teste realizado (Tukey-Kramer) para o parâmetro R_n entre os quatro grupos pesquisados (Controle-B, OVA-B, Controle-I e OVA-I), de modo a determinar a possível localização dessa disparidade constatada pela ANOVA. Contudo, mantiveram-se os grupos separados devido o entendimento de que esse resultado é proveniente do caráter mais conservador do teste de comparação aplicado, que controla o nível de significância global α entre as comparações par a par desempenhadas e a diminuição do poder estatístico devido à redução do número de amostra dos grupos.

Durante a avaliação dos volumes dos pulmões *ex vivo*, foi observado que não existe distinção significativa entre os grupos pesquisados (Figura 18), ou seja, o volume do órgão não aparenta sofrer alterações em relação à inflamação pulmonar a qual foi induzido ou à administração de PBS utilizada durante a avaliação da mecânica respiratória.

As médias dos volumes dos pulmões estimados nos quatro grupos são maiores que o observado por Kawakami, Paul e Thurlbeck (1984), que utilizaram um procedimento experimental semelhante ao empregado neste trabalho para camundongos BALB/c de mesma faixa etária (Tabela 1). A média da massa corpórea dos roedores do estudo de 1984 está abaixo dos valores encontrados para as linhagens de camundongos BALB/c que são comercializadas atualmente (Figura 3). Por exemplo, a média da massa corpórea dos

animais de nove meses encontrada na pesquisa de Kawakami, Paul e Thurlbeck (1984), hoje, é semelhante à dos animais com somente 18 semanas (4,5 meses) (Tabela 2).

Considera-se que as diferentes condições de criação e manejo desses animais em locais distintos (Charles River Laboratories, EUA; Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brasil) e possíveis alterações genéticas após quase quatro décadas, podem estar associadas ao desenvolvimento mais acelerado desses camundongos utilizados atualmente, em comparação aos anos de 1980, e como o volume dos pulmões está associado ao crescimento e envelhecimento do animal (KAWAKAMI; PAUL; THURLBECK, 1984), é provável que esse órgão também se desenvolva mais rapidamente.

Com uma análise individual dos quatro grupos, diferentes correlações dos parâmetros da mecânica respiratória com as medidas morfológicas foram observadas envolvendo tanto a condição inflamatória dos animais quanto o método de aplicação de PBS empregado.

Dentre esses quatro grupos, apenas o Controle-I apresentou correlações significativas entre os parâmetros do MFC (G e H) e as medidas morfológicas obtidas dos camundongos (massa corpórea e CNA) (Figuras 23 e 24). Os grupos com inflamação pulmonar (OVA-B e OVA-I) não apresentaram correlações significativas e se distinguem muito bem dos grupos controles (Controle-B e Controle-I) em questão de variabilidade dos dados.

Os pontos mais agrupados, observados nos grupos de inflamação pulmonar nos gráficos de dispersão das Figuras 27 a 32, refletem a intensa caracterização do modelo de asma induzido, que fez com que as respostas obtidas durante a avaliação da mecânica respiratória fossem bem homogêneas. Como nos grupos controles não houve homogeneização de resposta, uma maior variabilidade dos parâmetros (inerente aos animais) foi notada (Figuras 19 a 24).

Além disso, foi observado que esse agrupamento é mais intenso no grupo OVA-I do que no OVA-B, o que representa o fato de que os animais desse primeiro grupo estavam mais inflamados do que o outro (Tabela 3) e podem ter produzido uma resposta mais intensa na avaliação da mecânica respiratória.

Os gráficos de dispersão dos grupos Controle-B e Controle-I tiveram um comportamento correlacional semelhante entre as variáveis analisadas, embora somente no Controle-I foram observadas correlações negativas significativas. A exceção, no entanto, é o parâmetro H do grupo Controle-B que se comportou, praticamente, de forma independente das medidas morfológicas realizadas (Figura 21).

A razão pela qual o grupo Controle-B não apresentou qualquer correlação significa-

tiva, além do fato das correlações serem menos intensas comparadas ao grupo Controle-I, não está muito clara, pois não foram observadas diferenças significativas entre esses dois grupos em relação ao volume dos pulmões (Figura 18) e ao tipo de administração de PBS. Entretanto, nota-se um número de amostras menor para o grupo Controle-B (n=7), em relação ao Controle-I (n=10), o que poderia justificar uma leve queda do poder estatístico. No entanto, é provável que essa diferença de três camundongos não justifique, por exemplo, as baixas correlações percebidas com o parâmetro H. Assim, acredita-se que um novo estudo, com o objetivo de compreender melhor o impacto desses dois tipos de aplicação de PBS (bolus e infusão contínua) seria o mais adequado para tentar elucidar essa questão.

Assim sendo, em relação aos grupos OVA-B e OVA-I, a inflamação imposta aos pulmões limitou a capacidade de encontrar alguma associação entre as variáveis mecânicas com as morfométricas, pois estabeleceu uma resposta à avaliação da mecânica respiratória padronizada entre os animais, impossibilitando a observação de alguma variação tendenciosa.

Cabe ressaltar que nas Figuras 23 e 24, relativas ao grupo Controle-I, nota-se que os parâmetros G e H estão marcadamente associados à massa corpórea ($r = -0,901$ e $p < 0,001$, $r = -0,759$ e $p = 0,011$, respectivamente) e ao CNA ($r = -0,860$ e $p = 0,001$, $r = -0,861$ e $p = 0,001$, respectivamente) dos animais, o que evidencia a relação desses parâmetros com o tamanho do animal sob avaliação.

Nesse âmbito, correlações negativas envolvendo os parâmetros do MFC com o tamanho dos animais (massa corpórea) já foram observadas quando são avaliados mamíferos de diferentes espécies como camundongos, ratos, coelhos e cachorros (BATES et al., 2011; GOMES et al., 2000). Isso pode estar relacionado ao fato de que, em geral, mamíferos maiores (entre espécies) possuem pulmões, caixa torácica e complacência pulmonar maiores (WEST, 2012), o que resulta em valores de resistência e elastância pulmonar menores, assim como a magnitude dos parâmetros do MFC associados à Z_{sr} (R_n, G e H) (BATES, 2009; BATES, 2015; SÜDY et al., 2019).

No entanto, as correlações observadas dos parâmetros G e H com o volume dos pulmões *ex vivo* no grupo Controle-I não foram consideradas significativas, embora seja possível perceber uma tendência correlacional negativa entre essas variáveis (Figura 23c e 24c), principalmente para o parâmetro G ($r = -0,605$ e $p = 0,065$).

Além disso, para os camundongos avaliados desse grupo (Controle-I), apenas correlações (não significativas) moderadas/fracas foram observadas entre o volume dos pulmões *ex vivo* e a massa corpórea ($r = 0,502$ e $p = 0,123$) ou CNA ($r = 0,411$ e $p = 0,237$)

(Figuras 26a e 26b). Assim, sugere-se que devido a esses animais serem da mesma linhagem e não possuírem uma variação significativa de massa corpórea (SD = ± 2,2 g), o volume de seus pulmões estimados *ex vivo* não variam o suficiente (SD = ± 0,2 ml) para obter a acentuada correlação presente entre mamíferos de diferentes espécies (BENNETT; TENNEY, 1982; GOMES et al., 2000; LEITH, 1983).

Desse modo, as marcantes correlações negativas dos parâmetros G e H com a massa corpórea e o CNA, verificadas neste trabalho, devem estar sob a influência de outro fator, além do tamanho dos pulmões dos animais, provavelmente, introduzido pelo método aplicado para obter esses parâmetros (FOT).

A hipótese levantada é que, como o volume dos pulmões não possui uma associação significativa com a massa corpórea dos animais, podem existir situações em que um aumento de massa corpórea não seja acompanhado de um acréscimo no volume dos pulmões do animal de mesma proporção. Caso isso ocorra, o V_c e as perturbações ventilatórias utilizadas nos roedores de maior massa corpórea serão maiores durante a avaliação da mecânica respiratória, o que pode causar um recrutamento maior de unidades alveolares ou até mesmo hiperdistensão de tecidos pulmonares, quando comparado aos camundongos com o mesmo volume pulmonar (ou de variação não relevante), mas com massa corpórea menor ($V_c = 10\,\mathrm{ml/kg}$).

Esse recrutamento maior de distintas unidades alveolares nos pulmões pode diminuir o valor de G e H, pois mais regiões do parênquima estarão disponíveis para receber as perturbações ventilatórias impostas pelo SAV (BATES, 2009; HIRAI et al., 1999). Portanto, entende-se que esse recrutamento maior, constatado nos animais maiores, com a pequena variação no tamanho de seus pulmões devem justificar a considerável correlação negativa encontrada nos parâmetros G e H com a massa corpórea e o CNA.

Quando é avaliada a relação do parâmetro R_n do MFC com as medidas morfológicas realizadas para os quatro grupos (Figuras 19, 22, 27 e 30), nenhuma correlação significativa é verificada, provavelmente devido à sua principal associação à resistência das vias aéreas centrais dos pulmões de camundongos (BATES, 2009). Acreditamos que, como os animais são da mesma linhagem, é improvável que se encontrem diferenças anatômicas significativas, como o calibre das vias aéreas, com pequenas variações no tamanho do roedor e volume dos pulmões para, assim, observar alguma tendência do R_n com o tamanho do animal, como é reportado em estudos entre mamíferos de diferentes espécies (BATES; IRVIN, 2003; GOMES; BATES, 2002).

Dessa forma, os pontos mais dispersos e sem tendência correlacional, registrados em

todos os gráficos que relacionam R_n com as medidas morfológicas, simbolizam apenas uma variabilidade inerente dos animais (e aleatória) em relação ao R_n. Essa variabilidade é reduzida nos grupos OVA-B e OVA-I devido à inflamação pulmonar induzida, como comentado anteriormente.

Uma observação interessante é que nenhum parâmetro do MFC apresentou correlação significativa com o volume dos pulmões *ex vivo* estimado, o que contrasta com trabalhos que avaliaram o comportamento desses mesmos parâmetros durante a variação do volume pulmonar por incrementos no valor da PEEP (GOMES et al., 2000; HIRAI et al., 1999).

Isso evidencia a maior relevância que o volume de ar dentro dos pulmões tem na avaliação da mecânica respiratória, quando se compara com o volume do órgão na totalidade. Ou seja, o V_c utilizado pelo SAV e, consequentemente, a perturbação ventilatória aparentam possuir uma relação mais sensível com os parâmetros do MFC, por meio da capacidade de alterar as condições funcionais das regiões centrais e periféricas dos pulmões, do que pequenas variações anatômicas entre camundongos de mesma linhagem.

Logo, essa observação realça ainda mais a necessidade de se ajustar corretamente o V_c para os camundongos, quando ventilados por algum ventilador mecânico, quando o intuito for de se avaliar a mecânica respiratória, principalmente, nos casos em que a variação de massa corpórea é relevante entre os animais (GUIVARCH et al., 2018).

Foi por intermédio do IL, índice simples e de fácil obtenção em laboratório, que procurou-se avaliar a relação do estado físico dos animais (obeso/magro) com a mecânica respiratória (Figuras 19 a 24; Figuras 27 a 32) e o volume de seus pulmões (Figuras 25 e 26; Figuras 33 e 34).

Entretanto, nenhuma correlação significativa ou mesmo alguma tendência correlacional pode ser apontada nos quatro grupos avaliados, embora existam estudos que reportam a influência da obesidade nas propriedades mecânicas dos pulmões e caixa torácica, tanto em humanos quanto em animais, inclusive atuando como um agravante em patologias como a asma (PETERS et al., 2018; SHORE, 2007).

Contudo, deve-se considerar que o cerne deste trabalho não foi avaliar a relação da mecânica respiratória com medidas morfológicas de animais obesos ou subnutridos, ou seja, nenhum modelo animal utilizado foi desenvolvido para estudar essas condições. Assim, não é possível extrair informações acuradas dos resultados obtidos envolvendo o IL.

Como pode ser observado, todos os animais utilizados se situam, praticamente, no mesmo nível de obesidade, de acordo com esse índice (IL $\approx$ 0,31 – 0,33 $g^{1/3}$/cm), o que

revela a impossibilidade de se analisar as possíveis correlações entre camundongos obesos e magros, por exemplo, com os parâmetros do MFC ou volume dos pulmões. Portanto, uma pesquisa à parte poderia ser desenvolvida para que se avalie em outros aspectos as possíveis implicações do estado físico do animal sobre a mecânica do sistema respiratório.

Outra limitação está no que tange a acurácia do valor medido do volume dos pulmões *ex vivo*, pois a densidade do PBS foi considerada como 1 g/ml, mas é sabido que esse valor varia entre 1,02 – 1,03 g/ml, o que pode subestimar o volume estimado em até 3%. Essa variação não teve muito impacto nas análises feitas no trabalho (sempre o mesmo PBS utilizado), mas caso seja necessário o valor exato (real) do volume do órgão essa aproximação pode ser indesejada.

Entretanto, apesar das limitações encontradas para o desenvolvimento da pesquisa, com os importantes resultados obtidos foi possível avaliar/estudar como algumas medidas morfológicas de camundongos BALB/c, amplamente utilizadas em estudos com roedores, se correlacionam (ou não) com fatores funcionais da mecânica respiratória por meio de parâmetros do MFC, correlações essas que são pouco exploradas na literatura.

Com isso, foi observado que não há uma associação direta significativa da massa corpórea dos animais com o volume de seus pulmões estimado *ex vivo* e que, por outro lado, percebeu-se uma acentuada correlação negativa dos parâmetros G e H do MFC com o tamanho do animal (massa corpórea e CNA), que provavelmente está associada ao método utilizado para avaliar a mecânica respiratória (FOT).

6 CONCLUSÃO

Esta dissertação de mestrado foi desenvolvida com o objetivo de avaliar as relações entre os parâmetros do MFC, que caracterizam as propriedades mecânicas do sistema respiratório, e mensurações morfológicas de quatro grupos de camundongos BALB/c: OVA-B, Controle-B, OVA-I e Controle-I. De modo a relacionar o volume dos pulmões dos animais com a mecânica respiratória, como propósito secundário foi apresentada uma técnica para estimar o volume dos pulmões *ex vivo* por meio do princípio de Arquimedes.

Foram observadas correlações negativas significativas dos parâmetros G e H do MFC com a massa corpórea e CNA dos camundongos BALB/c do grupo Controle-I. De acordo com os resultados obtidos, sugere-se que o método utilizado para avaliar a mecânica respiratória (FOT) tenha influenciado nas correlações significativas verficadas.

Para pesquisas futuras, recomenda-se avaliar essas mesmas relações estudadas, mas em um modelo animal de obesidade (e seu grupo controle) para que o IL possa oferecer uma maior acurácia em seus resultados e, também, compreender melhor o impacto da FOT na avaliação da mecânica respiratória de animais obesos e não obesos.

REFERÊNCIAS[1]

AGUH, B. I.; YAHAYA, A.; SAIDU, I. A.; AYEKU, P.; AGBA, A. A. Correlation of body weight and other morphometric measurements in Albino rats (Rattus Norvegicus). **Scientific Journal of Biological Sciences**, v. 2, n. 3, p. 1–6, 2013.

ALVAREZ, F. J. Transparency in Journals on Animal Models of Lung Disease. **Journal of Pulmonology and Respiratory Diseases**, v. 1, n. 1, 2017.

AUN, M.; BONAMICHI-SANTOS, R.; ARANTES-COSTA, F. M.; KALIL, J.; GIAVINA-BIANCHI, P. Animal models of asthma: utility and limitations. **Journal of Asthma and Allergy**, v. 10, p. 293–301, nov 2017.

BATES, J.; IRVIN, C.; BRUSASCO, V.; DRAZEN, J.; FREDBERG, J.; LORING, S.; EIDELMAN, D.; LUDWIG, M.; MACKLEM, P.; MARTIN, J.; MILIC-EMILI, J.; HANTOS, Z.; HYATT, R.; LAI-FOOK, S.; LEFF, A.; SOLWAY, J.; LUTCHEN, K.; SUKI, B.; MITZNER, W.; PARÉ, P.; PRIDE, N.; SLY, P. The use and misuse of penh in animal models of lung disease. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 31, n. 3, p. 373–374, sep 2004.

BATES, J. H. Mechanical Properties of the Lung. In: PARENT, R. A. (Ed.). **Comparative Biology of the Normal Lung**. 2. ed. [S.l.]: Elsevier, 2015. cap. 16, p. 289–304.

BATES, J. H.; IRVIN, C. G.; FARRÉ, R.; HANTOS, Z. Oscillation Mechanics of the Respiratory System. In: **Comprehensive Physiology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley and Sons, Inc., 2011. v. 1, n. 3, p. 1233–1272.

BATES, J. H.; SUKI, B. Assessment of peripheral lung mechanics. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 163, n. 1-3, p. 54–63, nov 2008.

BATES, J. H. T. **Lung mechanics: an inverse modeling approach**. New York: Cambridge University Press, 2009.

BATES, J. H. T.; IRVIN, C. G. Measuring lung function in mice: the phenotyping uncertainty principle. **Journal of Applied Physiology**, v. 94, n. 4, p. 1297–1306, apr 2003.

BENNETT, F.; TENNEY, S. Comparative mechanics of mammalian respiratory system. **Respiration Physiology**, v. 49, n. 2, p. 131–140, aug 1982.

BERNARDIS, L. L.; PATTERSON, B. D. Correlation between 'lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **Journal of Endocrinology**, v. 40, n. 4, p. 527–528, apr 1968.

BOHOUSSOU, H.; AKPATOU, B.; KADJO, B.; SOULEMANE, O.; N'GORAN, E.; NICOLAS, V. Morphometric variation in the forest rodent Malacomys edwardsi (Rodentia: Muridae) in Côte d'Ivoire. **Journal of Applied Biosciences**, v. 80, n. 1, p. 7014–7023, sep 2014.

BRAUN, A.; ERNST, H.; HOYMANN, H. G.; RITTINGHAUSEN, S. Respiratory Tract. In: HEDRICH, H. J.; BULLOCK, G. (Ed.). **The Laboratory Mouse**. [S.l.]: Elsevier, 2004. cap. 14, p. 225–243.

BRESSAN, A.; AFONSO, P.; NASSIF, N.; PAREDES, C. A.; RIBAS, M.; ARIEDE, B. L.; SUE, K. N.; CRUZ, M. A. **OBESITY INDUCTION WITH HIGH FAT SUCROSE IN RATS**. [S.l.], 2013. v. 26, n. 1, 17–21 p.

CANNIZZARO, V.; BERRY, L. J.; NICHOLLS, P. K.; ZOSKY, G. R.; TURNER, D. J.; HANTOS, Z.; SLY, P. D. Lung volume recruitment maneuvers and respiratory system mechanics in mechanically ventilated mice. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 169, n. 3, p. 243–251, 2009.

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, jun 2011.

CASHA, A. R.; CAMILLERI, L.; MANCHÉ, A.; GATT, R.; GAUCI, M.; CAMILLERI-PODESTA, M.-T.; GRIMA, J. N.; SCARCI, M.; CHETCUTI, S. Physiological rules for the heart, lungs and other pressure-based organs. **Journal of Thoracic Disease**, AME Publishing Company, v. 9, n. 10, p. 3793–3801, oct 2017.

COOK, C. D.; HELLIESEN, P. J.; AGATHON, S. Relation Between Mechanics of Respiration, Lung Size and Body Size From Birth to Young Adulthood. **Journal of Applied Physiology**, v. 13, n. 3, p. 349–352, nov 1958.

COTES, J. E.; CHINN, D. J.; MILLER, M. R. **Lung function: physiology, measurement and application in medicine**. 6. ed. Birmingham: Wiley-Blackwell, 2006. 648 p.

COWGILL, G. R.; DRABKIN, D. L. Determination of a formula for the surface area of the dog together with a consideration of formulae available for other species. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 81, n. 1, p. 36–61, jun 1927.

DEBEUF, N.; HASPESLAGH, E.; HELDEN, M. van; HAMMAD, H.; LAMBRECHT, B. N. Mouse Models of Asthma. **Current Protocols in Mouse Biology**, John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, v. 6, n. 2, p. 169–184, jun 2016.

ELLIOTT, J. E.; MANTILLA, C. B.; PABELICK, C. M.; RODEN, A. C.; SIECK, G. C. Aging-related changes in respiratory system mechanics and morphometry in mice. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 311, n. 1, p. L167–L176, 2016.

FALEH, A. B.; ANNABI, A.; SAID, K. Morphometric variation in black rat rattus rattus (Rodentia: Muridae) from Tunisia. **Acta Zoologica Bulgarica**, v. 64, n. 4, p. 381–387, 2012.

FEHRENBACH, H.; OCHS, M. Studying lung ultrastructure. In: **Methods in Pulmonary Research**. Basel: Birkhäuser Basel, 1998. p. 429–454.

GODBOUT, K.; MACDONALD, V. M.; GIBSON, P. G. Definitions of asthma and COPD and overlap. In: BERNSTEIN, J. A.; BOULET, L.-P.; WECHSLER, M. E. (Ed.). **Asthma, COPD, and Overlap**. [S.l.]: CRC Press, 2018. cap. 1, p. 1–11.

GOMES, R. F.; BATES, J. H. Geometric determinants of airway resistance in two isomorphic rodent species. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 130, n. 3, p. 317–325, jun 2002.

GOMES, R. F. M.; SHARDONOFSKY, F.; EIDELMAN, D. H.; BATES, J. H. T. Respiratory mechanics and lung development in the rat from early age to adulthood. **Journal of Applied Physiology**, v. 90, n. 5, p. 1631–1638, may 2001.

GOMES, R. F. M.; SHEN, X.; RAMCHANDANI, R.; TEPPER, R. S.; BATES, J. H. T. Comparative respiratory system mechanics in rodents. **Journal of Applied Physiology**, v. 89, n. 3, p. 908–916, sep 2000.

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, dec 2009.

GUIVARCH, E.; VOIRIOT, G.; ROUZÉ, A.; KERBRAT, S.; Tran Van Nhieu, J.; MONTRAVERS, P.; MAITRE, B.; Mekontso Dessap, A.; DESMARD, M.; BOCZKOWSKI, J. Pulmonary effects of adjusting tidal volume to actual or ideal body weight in ventilated obese mice. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 6439, apr 2018.

HANSON, F. B.; HEYS, F. Correlations of Body Weight, Body Length, and Tail Length in Normal and Alcoholic Albino Rats. **Genetics**, v. 9, n. 4, p. 368–371, 1924.

HANTOS, Z.; DAROCZY, B.; SUKI, B.; NAGY, S. Low-frequency respiratory mechanical impedance in the rat. **Journal of Applied Physiology**, v. 63, n. 1, p. 36–43, jul 1987.

HETHERINGTON, A. W. The production of hypothalamic obesity in rats already displaying chronic hypopituitarism. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 140, n. 1, p. 89–92, oct 1943.

HIGA, T. S.; SPINOLA, A. V.; FONSECA-ALANIZ, M. H.; EVANGELISTA, F. S. Comparison between cafeteria and high-fat diets in the induction of metabolic dysfunction in mice. **Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol**, v. 6, n. 1, p. 47–54, 2014.

HIRAI, T.; MCKEOWN, K. A.; GOMES, R. F. M.; BATES, J. H. T. Effects of lung volume on lung and chest wall mechanics in rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 86, n. 1, p. 16–21, jan 1999.

JOHNSON, M. **Laboratory Mice and Rats**. 2019. 1–18 p. Disponível em: ⟨http://www.labome.com/method/Laboratory-Mice-and-Rats.html⟩.

KAWAKAMI, M.; PAUL, J. L.; THURLBECK, W. M. The effect of age on lung structure in male BALB/cNNia inbred mice. **American Journal of Anatomy**, v. 170, n. 1, p. 1–21, may 1984.

KNUDSEN, L.; WEIBEL, E. R.; GUNDERSEN, H. J. G.; WEINSTEIN, F. V.; OCHS, M. Assessment of air space size characteristics by intercept (chord) measurement: an accurate and efficient stereological approach. **Journal of Applied Physiology**, v. 108, n. 2, p. 412–421, 2010.

KONOPELNIUK, V.; FALALYEYEVA, T.; TSYRYUK, O.; SAVCHENKO, Y.; PRYBYTKO, I.; KOBYLIAK, N.; KOVALCHUK, O.; BOYKO, A.; ARKHIPOV, V. V.; MOROZ, Y.; OSTAPCHENKO, L. The correction of the metabolic parameters of msg-induced obesity in rats by 2-[4-(benzyloxy) phenoxy] acetic acid. **Journal of Nutrition and Intermediary Metabolism**, v. 13, p. 1–9, sep 2018.

KUMAR, R.; HERBERT, C.; FOSTER, P. The "Classical"Ovalbumin Challenge Model of Asthma in Mice. **Current Drug Targets**, v. 9, n. 6, p. 485–494, jun 2008.

LAMBRECHT, B. N.; HAMMAD, H. The immunology of asthma. **Nature Immunology**, v. 16, n. 1, p. 45–56, jan 2015.

LANG, D. H.; SHARKEY, N. A.; LIONIKAS, A.; MACK, H. A.; LARSSON, L.; VOGLER, G. P.; VANDENBERGH, D. J.; BLIZARD, D. A.; STOUT, J. T.; STITT, J. P.; MCCLEARN, G. E. Adjusting Data to Body Size: A Comparison of Methods as Applied to Quantitative Trait Loci Analysis of Musculoskeletal Phenotypes. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 20, n. 5, p. 748–757, dec 2004.

LEE, M. O. Determination of the surface area of the white rat with its application to the expression of metabolic results. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 89, n. 1, p. 24–33, jun 1929.

LEITH, D. E. **Comparative mammalian respiratory mechanics**. 1983. S77–82 p.

LINARES-PERDOMO, O.; EAST, T. D.; BROWER, R.; MORRIS, A. H. Standardizing predicted body weight equations for mechanical ventilation tidal volume settings. **Chest**, v. 148, n. 1, p. 73–78, jul 2015.

LINDER, C. C.; DAVISSON, M. T. Strains, Stocks, and Mutant Mice. In: HEDRICH, H. J.; BULLOCK, G. (Ed.). **The Laboratory Mouse**. [S.l.]: Elsevier, 2004. cap. 3, p. 25–46.

LINDSTEDT, S. L. Allometry: body size constraints in animal design. In: **Pharmacokinetics in Risk Assessment: Drinking Water and Health**. 8. ed. Washington, D.C.: National Academies Press, 1987.

LUNDBLAD, L. K. A.; IRVIN, C. G.; ADLER, A.; BATES, J. H. T. A reevaluation of the validity of unrestrained plethysmography in mice. **Journal of Applied Physiology**, v. 93, n. 4, p. 1198–1207, oct 2002.

MARQUÉS-GARCÍA, F.; MARCOS-VADILLO, E. Review of Mouse Models Applied to the Study of Asthma. In: Isidoro García, M. (Ed.). **Molecular Genetics of Asthma**. New York, NY: Humana Press, 2016. p. 213–222.

MITZNER, W.; TANKERSLEY, C. Interpreting Penh in mice. **Journal of Applied Physiology**, v. 94, n. 2, p. 828–832, feb 2003.

MORIYA, H. T.; MORAES, J. C. T. B.; BATES, J. H. T. Nonlinear and Frequency-Dependent Mechanical Behavior of the Mouse Respiratory System. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 31, n. 3, p. 318–326, mar 2003.

MOTULSKY, H. J.; BROWN, R. E. Detecting outliers when fitting data with nonlinear regression - A new method based on robust nonlinear regression and the false discovery rate. **BMC Bioinformatics**, v. 7, n. 123, mar 2006.

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

O'BRIEN, I. D.; SHACKLOCK, E.; MIDDLEDITCH, A.; BIGHAM, C. Inaccuracies in calculating predicted body weight and its impact on safe ventilator settings. **Journal of the Intensive Care Society**, v. 17, n. 3, p. 191–195, aug 2016.

OCHS, M. A brief update on lung stereology. **Journal of Microscopy**, v. 222, n. 3, p. 188–200, 2006.

OCHS, M.; MUHLFELD, C. Quantitative microscopy of the lung: a problem-based approach. Part 1: basic principles of lung stereology. **AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 305, n. 1, p. L15–L22, 2013.

PETERS, U.; SURATT, B. T.; BATES, J. H.; DIXON, A. E. Beyond BMI. **Chest**, v. 153, n. 3, p. 702–709, mar 2018.

PINHEIRO DE OLIVEIRA, R.; HETZEL, M.; dos Anjos Silva, M.; DALLEGRAVE, D.; FRIEDMAN, G. Mechanical ventilation with high tidal volume induces inflammation in patients without lung disease. **Critical Care**, v. 14, n. 2, p. R39, 2010.

PINKERTON, K. E.; HERRING, M. J.; HYDE, D. M.; GREEN, F. H. Normal Aging of the Lung. In: HARDING, R.; PINKERTON, K. E. (Ed.). **The Lung**. 2. ed. [S.l.]: Elsevier, 2014. cap. 14, p. 265–285.

POTTER, M. History of the BALB/c Family. In: POTTER, M. (Ed.). **The BALB/c Mice: Genetics and Imunology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1985, (Current Topics in Microbiology and Immunology, v. 122). p. 1–5.

PRIDE, N. B.; MACKLEM, P. T. Lung Mechanics in Disease. In: TERJUNG, R. (Ed.). **Comprehensive Physiology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley and Sons, Inc., 2011. cap. 37, p. 659–692.

SCHERLE, W. A Simple Method for Volumetry of Organs in Quantitative Stereology. **Mikroskopie**, v. 26, p. 57–60, 1970.

SCHUESSLER, T. F.; BATES, J. H. T. A computer-controlled research ventilator for small animals: Design and evaluation. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 42, n. 9, p. 860–866, 1995.

SHINAGAWA, K.; KOJIMA, M. Mouse Model of Airway Remodeling. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 168, n. 8, p. 959–967, oct 2003.

SHORE, S. A. Obesity and asthma: lessons from animal models. **Journal of Applied Physiology**, v. 102, n. 2, p. 516–528, feb 2007.

SIMSON, E.; GOLD, R. The lee obesity index vindicated? **Physiology and Behavior**, Pergamon Press, v. 29, n. 2, p. 371–376, aug 1982.

STAHL, W. R. Scaling of respiratory variables in mammals. **Journal of Applied Physiology**, v. 22, n. 3, p. 453–460, mar 1967.

STEPHENS, D. Does the Lee obesity index measure general obesity? **Physiology and Behavior**, v. 25, n. 2, p. 313–315, aug 1980.

SÜDY, R.; FODOR, G. H.; Dos Santos Rocha, A.; SCHRANC, Á.; TOLNAI, J.; HABRE, W.; PETÁK, F. Different contributions from lungs and chest wall to respiratory mechanics in mice, rats, and rabbits. **Journal of Applied Physiology**, v. 127, n. 1, p. 198–204, jul 2019.

THE JACKSON LABORATORY. **Physiological Data Summary - BALB/cJ (000651)**. 2007. Disponível em: ⟨http://jackson.jax.org/rs/444-BUH-304/images/physiological_data_000651.pdf⟩.

TROUTMAN, W. G. Anthropometrics. In: ANDERSON, P. O.; KNOBEN, J. E.; TROUTMAN, W. G. (Ed.). **Handbook of Clinical Drug Data**. 10. ed. New York: McGraw-Hill Medical Publishing Division, 2002. cap. Appendices, p. 1057–1060.

WALDER, B.; FONTAO, F.; TÖTSCH, M.; MOREL, D. R. Time and tidal volume-dependent ventilator-induced lung injury in healthy rats. **European Journal of Anaesthesiology**, v. 22, n. 10, p. 786–794, oct 2005.

WARNER, M. A.; PATEL, B. Mechanical Ventilation. In: HAGBERG, C. A. (Ed.). **Benumof and Hagberg's Airway Management**. 3rd. ed. [S.l.]: W.B. Saunders, 2013. cap. 48, p. 981–997.e3.

WEIBEL, E. R. **Stereological methods: Practical methods for biological morphometry**. London: Academic Press Inc., 1979. v. 1.

WEIBEL, E. R. Lung morphometry: the link between structure and function. **Cell and Tissue Research**, Cell and Tissue Research, v. 367, n. 3, p. 413–426, 2017.

WEST, J. B. **Respiratory Physiology: The Essentials**. 9. ed. California: Lippincott Williams and Wilkins, 2012.

YANG, C. H.; LEE, B.; JUNG, H.; SHIM, I.; ROH, P.; GOLDEN, G. T. Effect of electroacupuncture on response to immobilization stress. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 72, n. 4, p. 847–855, jul 2002.

YANG, Y.-S.; YANG, M.-J.; CHO, K.-H.; LEE, K.; KIM, Y.-B.; KIM, J.-S.; KANG, M.-G.; SONG, C.-W. Study of a BALB/c Mouse Model for Allergic Asthma. **Toxicological Research**, v. 24, n. 4, p. 253–261, dec 2008.

YNDROME, S.; ETWORK, N. Ventilation with Lower Tidal Volumes as Compared with Traditional Tidal Volumes for Acute Lung Injury and the Acute Respiratory Distress Syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 18, p. 1301–1308, may 2000.

ZOSKY, G. R.; SLY, P. D. Animal models of asthma. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 37, n. 7, p. 973–988, jul 2007.

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

APÊNDICE

Animais removidos da análise estatística

Um total de 26 animais (R1 a R26) foram removidos da análise estatística deste trabalho devido às complicações nos procedimentos cirúrgicos de remoção dos pulmões e preparação para a avaliação da mecânica respiratória.

Ademais, o grupo do laboratório, seguindo recomendações da CEUA, ponderou a possibilidade de acrescentar um pré-anestésico (Acepromazina) ao protocolo de avaliação da mecânica respiratória já em uso. No entanto, verificou-se que a droga interferia na resposta da mecânica respiratória sob investigação. Com isso, a Acepromazina foi suspensa do protocolo (após acordo com a CEUA) para não prejudicar o trabalho em andamento, pois uma grande parte dos animais foi avaliada sem pré-anestésico, e os animais que foram avaliados sob o efeito do pré-anestésico foram removidos das análises.

A Tabela 5 revela os animais retirados da análise estatística e a razão de tal remoção, seja por perfuração nos pulmões ou traqueia, óbito durante a avaliação da mecânica respiratória ou terem recebido Acepromazina como pré-anestésico. Nas Tabelas 6 e 7, os valores obtidos para os parâmetros do MFC e medidas morfológicas com esses camundongos, quando puderam ser aferidos, são apresentados para consulta.

Tabela 5 – Animais removidos da análise estatística (R1 a R26) de acordo com as complicações encontradas nos experimentos.

Razão da remoção da análise estatística	Animais
a) Perfuração nos pulmões ou traqueia:	R1, R2, R5, R6, R9 a R12, R14, R15 , R17 e R19 a R26.
b) Óbito durante avaliação da mecânica respiratória:	R4, R7, R16, R17 e R18.
c) Administração de Acepromazina:	R3, R8, R13, R14 e R19.

Fonte: Próprio autor.

Tabela 6 – Valores obtidos para os parâmetros do MFC R_n, G e H com os animais que foram removidos da análise estatística.

Animal	Grupo	Parâmetros do MFC		
		R_n ($cmH_2O \cdot s/ml$)	G ($cmH_2O \cdot s^{(1-\alpha)}/ml$)	H ($cmH_2O \cdot s^{(1-\alpha)}/ml$)
R1	Controle-B	0,23	2,86	15,34
R2	Controle-B	0,20	3,35	15,71
R3	Controle-B	–	–	–
R4	Controle-B	–	–	–
R5	Controle-I	0,12	4,26	15,80
R6	Controle-I	0,17	3,00	12,70
R7	Controle-I	–	–	–
R8	Controle-I	–	–	–
R9	OVA-B	0,24	3,65	22,19
R10	OVA-B	0,23	2,86	14,88
R11	OVA-B	0,29	3,43	14,88
R12	OVA-B	0,22	2,99	14,89
R13	OVA-B	–	–	–
R14	OVA-B	–	–	–
R15	OVA-B	0,26	3,77	22,14
R16	OVA-I	–	–	–
R17	OVA-I	0,19	4,69	19,37
R18	OVA-I	–	–	–
R19	OVA-I	–	–	–
R20	OVA-I	0,16	3,93	15,79
R21	OVA-I	0,16	3,96	16,52
R22	OVA-I	0,16	2,89	13,94
R23	OVA-I	0,20	4,54	13,76
R24	OVA-I	0,18	3,63	15,02
R25	OVA-I	0,17	3,67	16,54
R26	OVA-I	0,21	3,33	13,15

Fonte: Próprio autor.

Tabela 7 – Valores obtidos para as medidas morfológicas realizadas com os animais que foram removidos da análise estatística.

Animal	Grupo	Medidas morfológicas			
		Massa corpórea (g)	Volume dos pulmões *ex vivo* (ml)	CNA (cm)	IL ($g^{1/3}$/cm)
R1	Controle-B	28,0	–	10,0	0,30
R2	Controle-B	29,0	–	9,9	0,31
R3	Controle-B	29,0	1,45	9,6	0,32
R4	Controle-B	22,0	1,80	9,3	0,30
R5	Controle-I	29,0	–	9,8	0,31
R6	Controle-I	30,0	–	9,8	0,32
R7	Controle-I	30,0	1,81	9,7	0,32
R8	Controle-I	28,0	1,76	9,4	0,32
R9	OVA-B	30,0	–	9,8	0,32
R10	OVA-B	28,0	–	9,7	0,31
R11	OVA-B	28,0	–	9,7	0,31
R12	OVA-B	31,0	–	9,8	0,32
R13	OVA-B	29,0	1,85	9,5	0,32
R14	OVA-B	30,0	–	10,0	0,31
R15	OVA-B	28,0	–	9,5	0,32
R16	OVA-I	31,0	1,86	9,7	0,32
R17	OVA-I	29,0	–	9,7	0,32
R18	OVA-I	28,0	1,59	9,2	0,33
R19	OVA-I	26,0	–	9,4	0,32
R20	OVA-I	26,0	–	9,3	0,32
R21	OVA-I	28,0	–	9,4	0,32
R22	OVA-I	32,0	–	9,6	0,33
R23	OVA-I	29,0	–	9,4	0,33
R24	OVA-I	29,0	–	9,4	0,33
R25	OVA-I	30,0	–	9,5	0,33
R26	OVA-I	30,0	–	9,6	0,32

Fonte: Próprio autor.