

**RENATO DE LIMA VITORASSO**

**AVALIAÇÃO DA MECÂNICA RESPIRATÓRIA DE CAMUNDONGOS  
SUBMETIDOS À METACOLINA POR VIA INTRAVENOSA: BOLUS VS.  
INFUSÃO CONTÍNUA**

São Paulo  
2020

**RENATO DE LIMA VITORASSO**

**AVALIAÇÃO DA MECÂNICA RESPIRATÓRIA DE CAMUNDONGOS  
SUBMETIDOS À METACOLINA POR VIA INTRAVENOSA: BOLUS VS.  
INFUSÃO CONTÍNUA**

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

São Paulo  
2020

**RENATO DE LIMA VITORASSO**

**AVALIAÇÃO DA MECÂNICA RESPIRATÓRIA DE CAMUNDONGOS  
SUBMETIDOS À METACOLINA POR VIA INTRAVENOSA: BOLUS VS.  
INFUSÃO CONTÍNUA**

**Versão Corrigida**

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

Área de concentração:  
Engenharia Biomédica

Orientador:  
Prof. Dr. Henrique Takachi Moriya

São Paulo  
2020

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.

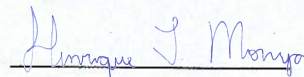
Este exemplar foi revisado e corrigido em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, 20 de julho de 2020

Assinatura do autor:



Assinatura do orientador:



#### Catálogo-na-publicação

Vitorasso, Renato de Lima

AVALIAÇÃO DA MECÂNICA RESPIRATÓRIA DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À METACOLINA POR VIA INTRAVENOSA: BOLUS VS. INFUSÃO CONTÍNUA / R. L. Vitorasso, H. T. Moriya – versão corr. – São Paulo, 2020.

130 p.

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

1.Mecânica Respiratória 2.Modelo de fase constante 3.Impedância respiratória 4.Asma 5.Envelhecimento I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia de Telecomunicações e Controle II.t. III.Moriya, Henrique Takachi

Dedico este trabalho à minha esposa e à minha mãe.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por tudo que ele fez e faz por mim.

À minha amada esposa, por ser mais que eu sempre sonhei em todos os sentidos da frase. Por me amar e me ajudar com tudo que ela tem.

À minha mãe que sempre acreditou em mim, mesmo quando eu sabia não ter condições. Por sempre entregar o melhor dela, mostrando o quão melhor que eu ela é.

Ao meu pai pela vida e pelo zelo.

Ao Professor Dr. Henrique Takachi Moriya por ter me dado a chance de estar aqui. Por tudo que ele me ajudou, mesmo pessoalmente, no mestrado e no término do Doutorado.

A todos os professores que tive oportunidade de ter contado.

A todos do Laboratório de Fisiopatologia da Inflamação Experimental do ICB-USP. Mais uma vez, em especial, agradeço a Maria Aparecida de Oliveira "Cida" por toda a paciência e amizade que apresentou por mim. A carreira de muita gente foi influenciada pela vida dela.

A todos do Laboratório de Engenharia Biomédica da escola Politécnica da USP.

Ao Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima por ceder gentilmente o espaço do laboratório, pelas conversas, pelo livro e por todo o auxílio.

Ao auxílio financeiro da CAPES.

A todos os meus amigos de "longa data" que me ajudaram a construir quem eu sou.

A todos que direta ou indiretamente auxiliaram-me até aqui.

*"Ensina-nos a contar os nossos dias,  
de tal maneira que alcancemos  
corações sábios.*

*Salmos 90:12."*

## RESUMO

As diferenças na administração de broncoconstritor afetam o desenvolvimento subsequente da broncoconstrição, afetando, portanto, a avaliação da mecânica respiratória. A mecânica respiratória é realizada por meio de modelagem matemática e o modelo linear aqui empregado é o Modelo de Fase Constante (MFC). Hipotetizou-se que variações na mecânica respiratória com diferentes protocolos de administração de Metacolina (MCh) poderiam ser observadas em um modelo de envelhecimento normal e em um modelo de inflamação pulmonar por asma (Ovalbumina - OVA). Assim, este trabalho teve como objetivo comparar protocolos de *bolus* e infusão contínua de MCh em dois cenários: 1) processo normal de envelhecimento; 2) camundongos inflamados e não inflamados. Além disso, como o MFC é um modelo linear, este estudo teve como objetivo determinar quantitativamente os efeitos de não linearidade em cada protocolo. Para tal, usou-se um coeficiente de não linearidade ( $k_d$ ). Juntamente com a não linearidade, este estudo teve como objetivo comparar a confiabilidade do modelo em cada protocolo. Foram encontradas diferenças estatísticas entre grupos e doses em ambos os protocolos. As diferenças entre grupos acerca dos parâmetros do MFC foram similares entre os protocolos *bolus* e infusão contínua para a linhagem SAMR1, sendo a elastância o parâmetro mais influenciado pelo processo de envelhecimento. Além disso, houve um incremento nos valores de  $k_d$  nas primeiras mensurações após a injeção de MCh, *i.e.* pico observado, para o protocolo *bolus*, bem como menores valores de ajuste do modelo e uma maior incerteza dos parâmetros do MFC comparado ao protocolo de infusão contínua. Para a linhagem Balb/c, houve diferença entre OVA e controle nas doses de 0,3 e 1 mg/kg para  $R_n$  no protocolo *bolus* ( $p < 0,0001$  e  $p < 0,001$ , respectivamente). Já no protocolo de infusão contínua, houve diferença entre OVA e controle na dose de 192  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  para  $R_n$ ,  $G$  e  $H$  ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ;  $p < 0,001$ , respectivamente). Ademais, assim como observado nos animais SAMR1, houve um incremento nos valores de  $k_d$  nas primeiras mensurações após a injeção de MCh no protocolo *bolus*, bem como menores valores de ajuste do modelo e uma maior incerteza dos parâmetros do MFC. Portanto, com base nos resultados apresentados, o protocolo *bolus* mostrou-se mais não linear e menos confiável nos momentos de maior interesse (pico observado) que o protocolo de infusão contínua em ambas as linhagens. Para os animais SAMR1, as diferenças entre idades e doses encontradas foram semelhantes nos *bolus* e infusão contínua. No entanto, o protocolo em *bolus* foi capaz de melhor diferenciar o valor de resistência das vias aéreas de animais inflamados e não inflamados, *i.e.* Balb/c, e, neste cenário e linhagem, o protocolo de infusão contínua foi mais sensível às variáveis do MFC relacionadas ao parênquima pulmonar. Logo, estes achados devem ser levados em consideração durante o delineamento, análises e discussão nos estudos de mecânica respiratória.

**Palavras-chave:** Avaliação da mecânica respiratória; Asma; Envelhecimento; Modelo de fase constante; Impedância respiratória.



## ABSTRACT

Differences in bronchoconstrictor administration affect the subsequent development of bronchoconstriction, hence affecting the respiratory mechanics assessment. Respiratory mechanics is performed via mathematical modeling and the linear model used herein is the Constant Phase Model (MFC). It was hypothesized that variations in respiratory mechanics with different Methacholine (MCh) administration protocols could be observed in a normal aging model and in a pulmonary inflammation (asthma) model (Ovalbumin - OVA). Thus, this study aimed to compare MCh *bolus* and continuous infusion protocols in two scenarios: 1) normal aging process; 2) inflamed and non-inflamed mice. In addition, as the MFC is a linear model, this study aimed to quantitatively determine the effects of non-linearity in each protocol. For this, a non-linearity coefficient ( $k_d$ ) was used. Additionally to nonlinearity, this study aimed to compare the model's reliability in each protocol. Statistical differences were found between groups and doses in both protocols. The differences among groups regarding the MFC parameters were similar between the *bolus* and continuous infusion protocols for the SAMR1 lineage. The elastance was the parameter most influenced by the aging process. In addition, there was an increase in the  $k_d$  values at the first measurements after the MCh injection, *i.e.* the observed peak, for the *bolus* protocol, as well as lower model adjustment values and a greater uncertainty of the MFC parameters in comparison with the continuous Infusion protocol. For the Balb/c lineage, there was a difference between OVA and control at doses of 0.3 and 1 mg/kg for  $R_n$  in the *bolus* protocol ( $p < 0.0001$  and  $p < 0.001$ , respectively). In the continuous infusion protocol there was a difference between OVA and control at 192  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  dose for  $R_n$ ,  $G$  and  $H$  ( $p < 0.01$ ;  $p < 0.001$ ;  $p < 0.001$ , respectively). Furthermore, as observed in the SAMR1 animals, there was an increase in the  $k_d$  values at the first measurements after the MCh injection in the *bolus* protocol, as well as lower model adjustment values and a greater uncertainty of the MFC parameters in comparison with the continuous Infusion protocol. Therefore, based on the results presented, the *bolus* protocol proved to be more non-linear and less reliable in the moments of greatest interest (observed peak) than the continuous infusion protocol in both strains. For SAMR1 animals, the differences between ages and doses were similar in *bolus* and continuous Infusion protocols. However, the *bolus* protocol was able to better differentiate the airway resistance value of inflamed and non-inflamed animals, *i.e.* Balb/c, and, in this scenario and lineage, the continuous infusion protocol was more sensitive to variables related to the lung parenchyma. Hence, these findings must be considered during the design, analysis and discussion in respiratory mechanics studies.

**Keywords:** Assessment of respiratory mechanics; Asthma; Aging; Constant phase model; Respiratory impedance.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Imagem do modelo do ventilador mecânico utilizado no presente estudo..... 25
- Figura 2 - Imagem do modelo atual do ventilador mecânico e seu aplicativo de controle..... 26
- Figura 3 - Diagrama do ventilador para pequenos animais (*flexiVent*, SCIREQ, Canadá). PEEP é pressão positiva de final de expiração do inglês "Positive End-Expiratory Pressure". A/D é o conversor analógico digital.  $v_{cyl}$  e  $p_{cyl}$  são volume e pressão do cilindro, respectivamente.  $p_{ao}$  é a pressão na saída das vias aéreas.  $v_{tr}$  e  $p_{tr}$  são volume e pressão traqueais, respectivamente..... 26
- Figura 4 - Diagrama representando o sistema respiratório como um sistema com entrada e saída.  $v(t)$  é o volume em função do tempo e  $p(t)$  é a pressão em função do tempo. .... 28
- Figura 5 - Representação do modelo viscoelástico.  $E1$  e  $E2$  são Elastâncias;  $Rt$  Resistência do tecido pulmonar;  $p(t)$  pressão em função do tempo;  $v(t)$  volume em função do tempo e  $R_{aw}$  Resistência de vias aéreas..... 32
- Figura 6 -  $E1$  e  $E2$  (Elastâncias);  $Rt$  Resistência do tecido pulmonar. a) Corpo de Kelvin. b) Corpo de Maxwell ..... 32
- Figura 7 - Adição de corpos de Maxwell suficientes para mimetizar o comportamento do tecido pulmonar.  $E1$  e  $E2$  (Elastâncias);  $Rt$  Resistência do parênquima pulmonar..... 33
- Figura 8 - Parênquima pulmonar modelado com a impedância do tecido é descrito por  $G$  e  $H$ .  $Rn$  é a Resistência Newtoniana ao fluxo e  $I$  é a Inertância..... 36
- Figura 9 - Animal traqueostomizado e com veia jugular dissecada..... 45

Figura 10 - Cânula utilizada na traqueostomia. ....	45
Figura 11 - Diagrama do protocolo <i>bolus</i> . ....	47
Figura 12 - Diagrama do protocolo de infusão contínua.....	48
Figura 13 - Protocolo de asma.OVA: Ovalbumina.....	49
Figura 14 - Parâmetros do MFC durante uma curva de dose-resposta para os animais SAMR1 em todas as idades no protocolo <i>bolus</i> . Média e erro-padrão.....	58
Figura 15 - Parâmetros do MFC para os animais Balb/c controle e OVA no protocolo <i>bolus</i> . Média e erro-padrão. ....	59
Figura 16 - Valores de COD para os animais SAMR1 no protocolo <i>bolus</i> . Foi traçada uma linha no valor de COD igual a 0,9 para pontuar o valor de corte. Média e erro-padrão. ....	60
Figura 17 - Valores de COD no protocolo <i>bolus</i> para os animais Balb/c. Foi traçada uma linha no valor de COD igual a 0,9 para pontuar o valor de corte. Média e erro-padrão. ....	60
Figura 18 - Parâmetros do MFC para os animais SAMR1 em todas as idades no protocolo de infusão contínua. Média e erro-padrão.....	61
Figura 19 - Parâmetros do MFC para os animais Balb/c controle e OVA no protocolo de infusão contínua. Média e erro-padrão. ....	62
Figura 20 - Valores de COD no protocolo de infusão contínua para os animais SAMR1. Foi traçada uma linha no valor de COD igual a 0,9 para pontuar o valor de corte. Média e erro-padrão.....	63
Figura 21 - Valores de COD dos animais Balb/c no protocolo de infusão contínua. Foi traçada uma linha no valor de COD igual a 0,9 para pontuar o valor de corte. Média e erro-padrão.....	63
Figura 22 - Comparações dos valores de pico dos parâmetros $Rn$ , $G$ e $H$ dos animais SAMR1 no protocolo <i>bolus</i> . Os valores de $p$ foram menores que	

0,05 para idade e doses em todos os parâmetros, exceto para idade no  $Rn$  ( $p = 0,0597$ ). Média e erro-padrão..... 65

Figura 23 - Comparações dos valores de pico dos parâmetros  $Rn$ ,  $G$  e  $H$  dos animais Balb/c no protocolo *bolus*. No modelo sem medidas repetidas (gráficos abaixo) os valores de  $p$  foram menores que 0,001 para doses, grupos e interação para o  $Rn$ , menores que 0,0001 em doses para  $G$  e não significativo para  $H$ . No modelo de medidas repetidas os valores de  $p$  para doses ( $p < 0,0001$ ), interação ( $p = 0,011$ ) e grupos ( $p = 0,0062$ ) foram estatisticamente significante para o  $Rn$ , foram menores que 0,05 para doses e interação para  $G$ , o valor de  $p$  não foi significativo para grupos, doses e interação para  $H$ . Média e erro-padrão. .... 66

Figura 24 - Comparações dos valores de platô dos parâmetros  $Rn$ ,  $G$  e  $H$  dos animais SAMR1 em todas as idades no protocolo de infusão contínua. Os valores de  $p$  foram menores que 0,05 para idade e doses em todos os parâmetros. Média e erro-padrão. .... 68

Figura 25 - Comparações dos valores de platô dos parâmetros  $Rn$ ,  $G$  e  $H$  dos animais Balb/c no protocolo de infusão contínua. No modelo sem medidas repetidas os valores de  $p$  foram menores que 0,05 para doses, grupos e interação na comparação do último ponto e das médias em todos os parâmetros, exceto o  $Rn$  na comparação utilizando o último ponto de cada dose ( $p = 0,065$ ). No modelo de medidas repetidas os valores de  $p$  para doses e interação e sujeitos foram menores que 0,05 em todos os cenários, entretanto para grupos os valores não foram estatísticos ( $0,086 \pm 0,039$ ). Média e erro-padrão. .... 69

Figura 26 - O incremento de cada parâmetro quando as doses são dobradas para os animais SAMR1 ( $p < 0,03$  para idades em  $Rn$  e  $G$ ;  $p < 0,001$  para protocolos em  $Rn$  e  $H$ ) e quando são quadruplicadas ( $p < 0,05$  para idades em  $G$ ;  $p < 0,0001$  para protocolos em  $Rn$  e  $H$ ). Infusão contínua: 48 a 96 e 48 a 192  $\mu\text{g.kg}^{-1}\text{min}^{-1}$ . *Bolus*: 100 a 200 e 100 a 400  $\mu\text{g/kg}$ . \*\*\* corresponde a  $p < 0,001$ ..... 72

Figura 27 - O incremento de cada parâmetro quando as doses são dobradas para os animais Balb/c ( $p < 0,05$ para protocolos em <i>Rn</i> e <i>G</i> ) e quando são quadruplicadas ( $p = 0,0084$ para protocolos em <i>Rn</i> ; e $p < 0,05$ para controle vs OVA em e <i>H</i> ) infusão contínua: 48 a 96 e 48 a 192 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ . Bolus: 100 a 200 e 100 a 400 $\mu\text{g/kg}$ . Valores não significativos no pós teste.....	73
Figura 28 - Valores do <i>kd</i> dos animais SAMR1 no protocolo <i>bolus</i> . Média e erro-padrão.....	75
Figura 29 - Valores do <i>kd</i> dos animais Balb/c no protocolo <i>bolus</i> . Média e erro-padrão.....	76
Figura 30 - Valores do <i>kd</i> dos animais SAMR1 no protocolo de infusão contínua. Média e erro-padrão.....	76
Figura 31 - Valores do <i>kd</i> dos animais Balb/c no protocolo de infusão contínua. Média e erro-padrão. ....	77
Figura 32 - As curvas gaussianas representam, cada uma, o intervalo de confiança de dois parâmetros do MFC. A conjunção destes intervalos de confiança gera uma elipse tracejada. ....	77
Figura 33 - Valores dos volumes dos elipsoides dos animais SAMR1 em todas as doses do protocolo <i>bolus</i> . Média e erro-padrão.....	78
Figura 34 - Valores dos volumes dos elipsoides dos animais Balb/c em todas as doses do protocolo <i>bolus</i> . Média e erro-padrão.....	79
Figura 35 - Valores dos volumes dos elipsoides dos animais SAMR1 em todas as doses do protocolo de infusão contínua. Média e erro-padrão. ....	80
Figura 36 - Valores dos volumes dos elipsoides dos animais Balb/c em todas as doses do protocolo de infusão contínua. Média e erro-padrão.....	81
Figura 37 - Valores de pressão traqueal de um animal exemplo na última dose e uma interpolação de seus pontos. Protocolo <i>bolus</i> . Em vermelho é apresentado o intervalo de tempo correspondente aos 3 segundos	

necessários para a perturbação utilizada para o MFC. Perturbação aplicada na subida..... 83

Figura 38 - Valores de pressão traqueal de um animal exemplo na última dose e uma interpolação de seus pontos. Protocolo *bolus*. Em vermelho é apresentado o intervalo de tempo correspondente aos 3 segundos necessários para a perturbação utilizada para o MFC. Perturbação aplicada antes do pico..... 83

Figura 39 - Valores de pressão traqueal de um animal exemplo na última dose e uma interpolação de seus pontos. Protocolo *bolus*. Em vermelho é apresentado o intervalo de tempo correspondente aos 3 segundos necessários para a perturbação utilizada para o MFC. Perturbação aplicada na descida. .... 84

Figura 40 - Exemplo de uma possível curva e a perda do pico de resposta. ... 84

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Duração e composição em frequência das perturbações disponíveis no aplicativo do ventilador .....	27
Tabela 2 - Valores de volume e vazões em cada dose para um animal exemplo de 25 g.....	48
Tabela 3 - Massa corpórea e lavado broncoalveolar (Bal) dos animais SAMR1 no protocolo <i>bolus</i> e infusão contínua. Houve significância estatística na análise de variância ( $p < 0,0001$ ) para a comparação do Bal nas idades no protocolo <i>bolus</i> . .....	56
Tabela 4 - Massa corpórea e lavado broncoalveolar (Bal) dos animais Balb/c no protocolo <i>bolus</i> e infusão contínua. O número de células na comparação OVA e Controle foram diferentes nos protocolos <i>bolus</i> ( $p = 0,0170$ ) e infusão contínua ( $p < 0,0001$ ). .....	56
Tabela 5 - Contagem diferencial de células no lavado broncoalveolar dos animais Balb/c. Houve diferença ( $p < 0,05$ ) entre Controle e OVA em ambos os protocolos e todas as células. ....	57
Tabela 6 - Valores de $p$ dos pós-testes das análises via pico (a) e platô (b) dos animais SAMR1. NS - são significantivo.....	70
Tabela 7 - Valores de $p$ dos pós-testes das análises via pico (a) e platô (b) dos animais Balb/c. NS - são significantivo. ....	71
Tabela 8 - Doses necessárias para atingir 150, 200 e 300% da resposta basal do $Rn$ nos protocolos de <i>bolus</i> e infusão contínua dos animais a) SAMR1 e b) Balb/c. Mediana e Intervalo interquartilico (IQ).....	74
Tabela 9 - Animais excluídos no protocolo <i>bolus</i> dentre os SAMR1. ....	81
Tabela 10 - Animais excluídos no protocolo <i>bolus</i> - Balb/c. ....	82
Tabela 11 - Medidas excluídas no protocolo <i>bolus</i> - Balb/c. ....	82

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
ANOVA	Análise de variância
Bal	Lavado Broncoalveolar
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COD	Coeficiente de determinação
ECG	Eletrocardiograma
EEG	Eletroencefalograma
FOT	Técnica de Oscilações Forçadas
i.h.	Inalatória
i.p.	Intraperitonal
i.v.	Intravenoso
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
MCh	Metacolina
MFC	Modelo de fase constante
NS	Não significativo
OVA	Ovalbumina
PBS	Solução tampão, do inglês " <i>Phosphate Buffered Saline</i> "
PEEP	Do inglês " <i>Positive End-Expiratory Pressure</i> " ou pressão positiva ao final da



expiração

SAM	Camundongos com senescência acelerada, do inglês " <i>Accelerated senescence mice</i> "
SAMR1	Camundongos resistentes à senescência acelerada, do inglês " <i>Accelerated senescence-resistant mice</i> "
SPRN	Ruído pseudo-aleatório esparço de banda larga, do inglês " <i>Broadband sparse pseudorandom noise</i> "
SSR	Soma dos resíduos quadrados
VPP	Ventilação por pressão positiva

## LISTA DE SÍMBOLOS

$C_{P(f),\mathfrak{F}[\dot{v}(t)]}$	densidade espectral média da correlação cruzada entre pressão e fluxo
$C_{\mathfrak{F}[\dot{v}(t)],\mathfrak{F}[\dot{v}(t)]}$	densidade espectral média da autocorrelação do fluxo
$cmH_2O$	centímetros de água
$E$	elastância do sistema respiratório
$f$	frequência cíclica
$f_0$	frequência fundamental de entrada
$F$ ou $F_{1-\alpha}$	distribuição F
$\mathfrak{F}[\ ]$	transformada de Fourier
$G$	viscância, associada dissipação de energia
$H$	elastância, associada ao armazenamento de energia pelos tecidos pulmonares
$H_{ij}$	matriz Hessiana
Hz	hertz
$I$	inertância
$Im[\ ]$	parte imaginária de um número
$j$	unidade imaginária
$J_{ij}$	matriz Jacobiana
$k$	constante da exponencial da lei de potência
$k_d$	índice de distorção harmônica

$kg$	quilograma
$L$	número de frequências dentro do intervalo das frequências
$L_i$	tamanho dos eixos do elipsoide
$ln$	logaritmo neperiano
$\mu g$	micrograma
$\mu L$	microlitro
$mg$	miligrama
$mL$	mililitro
$n$	tamanho da amostra de um grupo
$N$	número de frequências de entrada
$NP$	média da potência de saída acima do intervalo das frequências conhecidas
$P(f)$	pressão no domínio da frequência
$\hat{p}$	pressão predita pelo modelo
$\bar{p}$	pressão média do sinal
$p(t)$	pressão no domínio do tempo
$p_0$	pressão inicial. Constante da lei de potência na pressão
$p_a$	pressão alveolar
$p_{ao}$	pressão na abertura das vias aéreas
$p_{cyl}$	pressão do cilindro
$p_i$	pressão mensurada

$P_{NI}$	potência das frequências que diferem das frequências de entrada
$p_{sva}$	pressão da saída das vias aéreas
$p_{tr}$	pressão no domínio do tempo após calibração, pode ser entendida como pressão traqueal
$P_{tot}$	potência total do sinal de saída
$R$	resistência do sistema respiratório
$R^2$	coeficiente de determinação. Notação usual na estatística
$R_{aw}$	resistência das vias aéreas
$Re[ ]$	parte real de um número
$R_n$	resistência newtoniana
$R_t$	resistência dos tecidos
$R_{tubo}$	resistência oferecida pelo tubo frente à passagem do ar
$t$	instante de tempo
$T_0$	tensão inicial. Constante da lei de potência
$Tensão(t)$	tensão em função do tempo
$V(f)$	volume no domínio da frequência
$v(t)$	volume em função do tempo
$\dot{v}(t)$	fluxo em função do tempo
$v_{cyl}$	volume do cilindro
$v_{tr}$	volume corrigido por meio da calibração, pode ser entendido como volume traqueal

$\dot{v}_{tr}$	fluxo corrigido por meio da calibração, pode ser entendido como fluxo traqueal
$W$	matriz de ponderação. Usado no cálculo da matriz Hessiana
$X(f)$	conteúdo espectral de entrada
$Y_{lin}(f)$	subsistema linear
$Z(f)$	impedância
$Z_{app}$	função de transferência aparente. Conseqüentemente, esta variável consiste nos valores de impedância conhecidos em cada frequência de entrada
$Z_{entrada}$	impedância de entrada
$Z_{lin}$	função de transferência de um subsistema linear
$Z_m$	impedância modelada
$Z_{tecidos}$	impedância dos tecidos
$Z_{sr}$	impedância do sistema respiratório
$Z_{vva}$	impedância de vias aéreas
$\alpha$	parâmetro que relaciona $G$ e $H$ no MFC
$\Gamma$	função gama. Interpolação da função fatorial
$\partial\theta_j$	derivada parcial para $\theta_j$ parâmetros do MFC
$\delta\phi$	variância do ruído observado
$\epsilon$	erro na estimação do modelo linear
$\phi$	fase

$\theta$	cada parâmetro do MFC
$\theta^*$	valores ótimos de cada parâmetro do MFC
$\lambda_i$	autovalores da matriz Hessiana
$\pi$	constante $\pi$
$\Phi(f)$	coeficiente de ajuste modelado no domínio da frequência. Análogo ao COD no domínio da frequência
$\omega$	frequência angular. Equivale a $2 \cdot \pi \cdot f$

## Sumário

1	Introdução .....	23
1.1	Objetivos .....	24
1.1.1	Objetivo geral .....	24
1.1.2	Objetivos específicos .....	24
2	Revisão de literatura .....	25
2.1	Ventilação mecânica em camundongos.....	25
2.2	Modelagem do sistema respiratório .....	28
2.3	Modelo de fase constante.....	31
2.3.1	Ajuste do modelo .....	37
2.4	Índice de distorção harmônica ( <i>kd</i> ).....	38
2.5	Região de confiança dos parâmetros do modelo e sensibilidade.....	38
2.6	Metacolina.....	41
2.7	<i>Bolus</i> .....	41
2.8	Infusão contínua.....	42
2.9	Comparação <i>bolus</i> e infusão contínua .....	43
3	Métodos .....	44
3.1	Preparação dos animais .....	44
3.2	Protocolo <i>bolus</i> .....	45
3.3	Protocolo de infusão contínua .....	46
3.4	Modelo .....	48
3.5	Protocolo de asma.....	49
3.6	Lavagem Broncoalveolar .....	50
3.7	Correções e estimativas do <i>kd</i> .....	51
3.8	Volume do elipsoide da região de confiança dos parâmetros.....	53
3.9	Análise estatística .....	54
3.9.1	Análise do incremento da resposta.....	54

4	Resultados .....	56
4.1	Massa corpórea e lavado bronco-alveolar .....	56
4.2	Curva dose-resposta.....	57
4.2.1	Curva dose-resposta - <i>bolus</i> .....	57
4.2.2	Curva dose-resposta - infusão contínua.....	60
4.3	Pico e platô .....	64
4.3.1	Pico - <i>bolus</i> .....	64
4.3.2	Platô - infusão contínua .....	67
4.4	Análise estatística - pico vs platô .....	67
4.5	Comparação das curvas - <i>bolus</i> vs infusão contínua.....	71
4.6	Índice de distorção harmônica ( <i>kd</i> ).....	75
4.6.1	<i>kd</i> - <i>bolus</i> .....	75
4.6.2	<i>kd</i> - infusão contínua .....	75
4.7	Volume do elipsoide.....	77
4.7.1	Volume do elipsoide – <i>bolus</i> .....	78
4.7.2	Volume do elipsoide - infusão contínua.....	80
4.8	Exclusão dos animais - COD.....	81
4.9	Amostragem e valor de pico .....	82
5	Discussão .....	85
5.1	Conclusões.....	92
	Referências .....	94



## 1 Introdução

Na literatura corrente, há um grande número de artigos que realizam a avaliação da mecânica respiratória em pequenos animais ventilados mecanicamente (BURBURAN et al., 2014; HANIFI et al., 2012; MORIYA; MORAES; BATES, 2003; SCHWARTZ et al., 2011; WALKER; KRAFT; FISHER, 2012), assim como na presente tese, e isto ocorre devido à necessidade de fomentar áreas relacionadas à fisiologia respiratória.

O modelo utilizado neste estudo para a avaliação da mecânica respiratória é o modelo de fase constante (HANTOS; SUKI; DARÓCZY, 1987), um modelo amplamente difundido e aplicado.

Modelos matemáticos representam simplificada e um sistema e no caso da avaliação da mecânica respiratória, o sistema respiratório é modelado por meio de valores de pressão, fluxo e volume. A avaliação da mecânica respiratória tem apresentado uma inexorável associação com a modelagem deste sistema (BATES, 2017).

A relevância prima da modelagem respiratória é a interpretação fisiológica do fenômeno observado e/ou instaurado. Com a utilização das equações preditivas e das variáveis de entrada e saída é possível, por exemplo, modelar parâmetros como a elastância do parênquima e a resistência de vias aéreas (BATES, 2009; HANTOS; SUKI; DARÓCZY, 1987; VITORASSO, 2016), mesmo no modelo menos complexo.

Entretanto, estes parâmetros obtidos por meio da modelagem matemática variam de acordo com diversos fatores. Ressalta-se dentre os fatores: a escolha da linhagem animal; o modelo patofisiológico; ou mesmo a concentração da droga utilizada no estudo.

Todavia, além da concentração da droga, um dos fatores que influenciam nos parâmetros obtidos é a maneira na qual o broncoconstritor (a Metacolina (MCh), no caso do presente trabalho) é administrado (JONASSON et al., 2009; PETÁK et al., 1997; SALERNO; LUDWIG, 1996). No entanto, esta influência que a administração do broncoconstritor tem nos parâmetros obtidos pode não ser similar em linhagens saudáveis e, e.g., na inflamação pulmonar.

Uma vez que a forma de administração da MCh pode influenciar na aplicação e resposta da mecânica respiratória, este trabalho tem por objetivo estudar as diferenças e similaridades de dois protocolos de injeção de MCh (*bolus* e infusão contínua) em uma linhagem hígida e um modelo de inflamação pulmonar. Para tal, foram estudados camundongos SAMR1 em 3 diferentes idades (3, 6 e 10 meses) e animais Balb/c em um modelo de asma eosinofílica.

## **1.1 Objetivos**

Nesta seção são apresentados os objetivos gerais e específicos do presente estudo.

### **1.1.1 Objetivo geral**

Comparar dois protocolos de injeção de Metacolina (*bolus* e infusão contínua), por meio do Modelo de Fase Constante (MFC), em duas linhagens de camundongos: 1) SAMR1 em 3 diferentes idades e 2) camundongos Balb/c controle e em modelo de inflamação pulmonar.

### **1.1.2 Objetivos específicos**

- Avaliar as respostas dos parâmetros do Modelo de Fase Constante em cada protocolo nas duas linhagens.
- Comparar as curvas e o padrão de resposta de cada protocolo, bem como avaliar se há uma equivalência de doses entre protocolos.
- Avaliar a influência dos protocolos no MFC, como em exclusão de medidas ou valores de pico.
- Avaliar não linearidade e critérios de aceitação do MFC em ambas as linhagens e protocolos.
- Discutir as repercussões que cada protocolo de injeção de um broncoconstritor tem na avaliação de mecânica respiratória.

## 2 Revisão de literatura

Nesta revisão de literatura são apresentados os tópicos relacionados à ventilação mecânica, à modelagem do sistema respiratório, à metacolina, e aos protocolos de *bolus* e infusão contínua.

### 2.1 Ventilação mecânica em camundongos

A Ventilação por Pressão Positiva (VPP) em pesquisa animal é amplamente utilizada para se avaliar mecânica respiratória (BATES, 2017). Entretanto, há um paradoxo descrito na literatura que declara que métodos menos invasivos e menos precisos (e.g. pletismografia sem restrição) e métodos mais precisos e mais invasivos (e.g. VPP com anestesia e bloqueio neuromuscular) não podem ser otimizados simultaneamente (BATES; IRVIN, 2003). Isto é, com a escolha de uma maior precisão na avaliação, perder-se-á em liberdade ao animal e o animal estará mais distante de sua ventilação espontânea.

Neste trabalho apresentou-se um método mais preciso e, conseqüentemente, mais invasivo. Foi utilizado um ventilador mecânico para pequenos animais (*flexiVent*, SCIREQ, Canadá) e este ventilador é apresentado na figura 1 e sua versão mais recente é apresentada na figura 2.

Figura 1 - Imagem do modelo do ventilador mecânico utilizado no presente estudo.



Fonte: Imagem adquirida no Laboratório de Inflamação Pulmonar. Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da USP

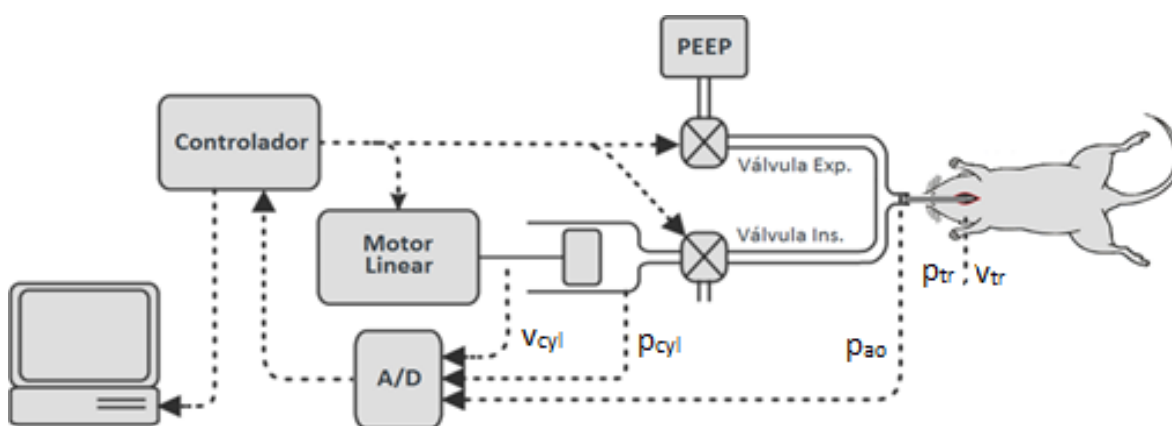
Figura 2 - Imagem do modelo atual do ventilador mecânico e seu aplicativo de controle.



Fonte: Imagem acessada no website da Scireq (SCIREQ, 2015), modelo flexiVentFX.

Porém, desde a versão mais antiga até a versão mais recente, o funcionamento e os parâmetros referentes à avaliação da mecânica respiratória exportados são similares (ROBICHAUD et al., 2015). Na figura 3 é apresentado um diagrama funcional deste ventilador (VITORASSO, 2016).

Figura 3 - Diagrama do ventilador para pequenos animais (*flexiVent*, SCIREQ, Canadá). PEEP é pressão positiva de final de expiração do inglês "Positive End-Expiratory Pressure". A/D é o conversor analógico digital.  $v_{cyl}$  e  $p_{cyl}$  são volume e pressão do cilindro, respectivamente.  $p_{ao}$  é a pressão na saída das vias aéreas.  $v_{tr}$  e  $p_{tr}$  são volume e pressão traqueais, respectivamente.



Fonte: Modificado do manual *flexiVent*.

O software do ventilador apresenta em tempo real os sinais de pressão e volume adquiridos junto ao animal. Porém, os parâmetros referentes à mecânica respiratória são obtidos por meio de modelagem matemática. Torna-se então necessário utilizar perturbações específicas de volume para a aplicação dos modelos matemáticos. Durante essas perturbações, o ventilador armazena os dados de pressão e volume com uma frequência de amostragem de 256 Hz.

As perturbações em volume ocorrem com a válvula expiratória fechada para o animal e consistem em um somatório de sinais senoidais com frequências e fases pré-estabelecidas. A duração de uma perturbação pode variar de 1,5 segundos para uma única senoide ou de 3 a 16 segundos para uma composição de senoides dependendo da perturbação (tabela 1). Há também uma perturbação de 2 segundos, bem como há a possibilidade de se compor perturbações mais curtas, entretanto estas são menos frequentes na literatura.

Tabela 1 - Duração e composição em frequência das perturbações disponíveis no aplicativo do ventilador

Denominação	Duração		Frequências (Hz)									
	1,5 s	2,5										
Snapshot	1,5 s	2,5										
Quick Prime	3 s	1	1,5	2,5	3,5	5,5	6,5	8,5	9,5	11,5	14,5	
		15,5	18,5	20,5								
Prime 8	8 s	0,5	0,75	1,25	1,75	2,75	3,25	4,25	4,75	5,75	7,25	
		9,25	10,25	11,75	14,75	16,75	18,25	19,75				
Prime 16	16 s	0,25	0,625	1,375	2,125	2,875	3,875	5,125	5,875	7,375	8,375	
		9,125	10,375	12,125	12,875	13,625	15,875	17,125	18,625	19,625		

Fonte: Tabela realizada pelo próprio autor

Vale destacar que, quando o pistão do ventilador move-se para realizar a insuflação pulmonar, uma parte do volume de ar é comprimida. Como o volume é calculado por meio da posição do pistão, o volume entregue ao animal não é igual ao volume calculado pelo movimento do pistão. Para estimar o volume e pressão traqueais é necessário realizar uma série de calibrações antes de cada experimento (AOKI, 2013; BATES et al., 1997; VITORASSO,

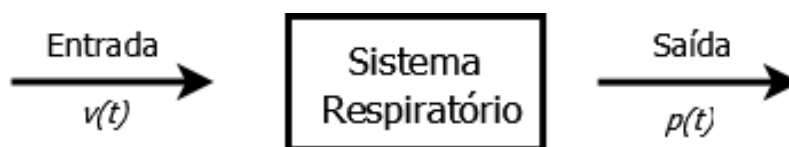
2016). Destaca-se que estas calibrações pressupõem um comportamento linear do sistema.

## 2.2 Modelagem do sistema respiratório

Modelos matemáticos representam um sistema utilizando hipóteses simplificadoras. No caso da avaliação da mecânica respiratória, as variáveis utilizadas para o estudo do sistema respiratório são: pressão, fluxo e volume. Concomitantemente, sabe-se que as tentativas de se avaliar a mecânica respiratória é indissociada da modelagem matemática (BATES, 2017).

Um sistema é capaz de receber um sinal de entrada e prover um sinal de saída. No caso do sistema respiratório, em geral, é utilizado o volume ou fluxo como entrada e a pressão como saída (BATES, 2009) (figura 4).

Figura 4 - Diagrama representando o sistema respiratório como um sistema com entrada e saída.  $v(t)$  é o volume em função do tempo e  $p(t)$  é a pressão em função do tempo.



Fonte: Diagrama realizado pelo próprio autor.

A maneira mais simples de se modelar o sistema respiratório é dada pela equação 1. Este modelo também utiliza uma entrada (volume,  $v(t)$  ou fluxo,  $\dot{v}(t)$ ) e uma saída (pressão,  $p(t)$ ) para representar o sistema respiratório.

$$p(t) = E \cdot v(t) + R \cdot \dot{v}(t) \quad (1)$$

onde  $E$  é a elastância do sistema respiratório e  $R$  é a resistência do sistema respiratório.

Em geral, são utilizados modelos lineares para representar o sistema respiratório. Para que um sistema seja considerado linear, ele deve obedecer ao princípio da superposição.

Este princípio, já aplicado ao sistema respiratório, denota que para um fluxo ( $\dot{v}(t)$ ) constituído, por exemplo, por dois sinais senoidais com frequências  $f_1$  e  $f_2$ , dadas em Hz, aplicadas simultaneamente, produzem na pressão ( $p(t)$ ) as mesmas frequências com variação de amplitude e fase (BATES, 2009). Isto é, se a onda pressórica resultante da primeira frequência  $f_1$  for (equação 2):

$$p_1(t) = A_1 \text{sen}(2\pi f_1 t + \phi_1) \quad (2)$$

onde  $A$  é a amplitude,  $t$  é o tempo e  $\phi$  é a fase e, por sua vez, se a onda pressórica resultante da segunda frequência  $f_2$  for (equação 3):

$$p_2(t) = A_2 \text{sen}(2\pi f_2 t + \phi_2) \quad (3)$$

a saída na pressão, quando as duas ondas de fluxo são aplicadas na entrada do sistema será (equação 4):

$$p(t) = A_1 \text{sen}(2\pi f_1 t + \phi_1) + A_2 \text{sen}(2\pi f_2 t + \phi_2) \quad (4)$$

Há modelos em que a análise é realizada no domínio da frequência, uma vez que para se obter a resposta frente a diversas frequências é utilizada uma onda composta por um somatório de senoides com frequências conhecidas.

Logo, é possível utilizar a transformada de Fourier, seja para utilização direta ou em qualquer um dos métodos utilizados para a obtenção do espectro de potência (BATES, 2009; OPPENHEIM; SCHAFER; BUCK, 1998). Um exemplo bastante utilizado na área de saúde é o método de Welch, principalmente em áreas relacionadas ao estudo de Eletroencefalograma (EEG) e Eletrocardiograma (ECG) (RATTI et al., 2017; SOSNOWSKI; CZYZ; TENDERA, 2002).

O conteúdo espectral é importante para a determinação da impedância respiratória. A impedância em qualquer sistema é uma função que relaciona saídas (respostas às excitações) e entradas (excitações ao sistema) de um

sistema e no sistema respiratório não é diferente (HANTOS et al., 1992). No entanto, a impedância é obtida partindo do pressuposto que o sistema se comporta de maneira linear. Para tal, alguns pré-requisitos devem ser satisfeitos, a exemplo de perturbação de baixa amplitude (KACZKA; DELLACÁ, 2011; MORIYA; MORAES; BATES, 2003).

Portanto, a impedância respiratória é calculada após o uso de Técnica de Oscilações Forçadas (FOT). Esta técnica utiliza variações de pressão ou fluxo a frequências determinadas aplicadas ao sistema respiratório e posterior investigação do conteúdo espectral do fluxo ou pressão resultantes (PESLIN, 1999).

A impedância respiratória (eq. 5), comumente, relaciona pressão e fluxo a frequências conhecidas (BATES, 2009). A equação 5 é uma equação geral:

$$Z(f) = \frac{\mathfrak{F}[p(t)]}{\mathfrak{F}[\dot{v}(t)]} \quad (5)$$

onde  $Z(f)$  denota a impedância respiratória no domínio da frequência,  $\mathfrak{F}[p(t)]$  ou  $P(f)$ , como é mais comumente utilizado, denota a transformada em frequência da pressão e  $\mathfrak{F}[\dot{v}(t)]$  é a transformada em frequência do sinal de fluxo excitatório.

Variações do local onde o sinal de pressão é mensurado podem gerar interpretações distintas na impedância. Hantos e colaboradores mediram o sinal de pressão na saída das vias aéreas ( $p_{sva}$ ) e o sinal da pressão alveolar ( $p_a$ ) utilizando um cateter aderido à pleura visceral. A fim de calcular a impedância de entrada ( $Z_{entrada}$ ) (equação 6), toma-se como saída a  $P_{sva}(f)$ , isto é já no domínio da frequência (HANTOS et al., 1992):

$$Z_{entrada}(f) = \frac{P_{sva}(f)}{\mathfrak{F}[\dot{v}(t)]} \quad (6)$$

Conseqüentemente, a impedância dos tecidos ( $Z_{tecidos}$ ) (equação 7) toma como saída a pressão alveolar medida por meio de uma cápsula alveolar (TOMIOKA; BATES; IRVIN, 2002):



$$Z_{tecidos}(f) = \frac{P_a(f)}{\Im[\dot{v}(t)]} \quad (7)$$

Ademais, é possível obter a impedância de vias aéreas ( $Z_{vva}$ ) por meio da equação 8:

$$Z_{vva}(f) = Z_{entrada}(f) - Z_{tecidos}(f) \quad (8)$$

A impedância de entrada será obtida no momento em que o fluxo de ar for aplicado na abertura das vias aéreas e a pressão resultante for medida (MORIYA; MORAES; BATES, 2003). Por sua vez, a impedância das vias aéreas (eq. 9) pode ser calculada da seguinte maneira (BATES, 2009; HANTOS et al., 1992; MORIYA; MORAES; BATES, 2003):

$$Z_{vva}(f) = R_n + j \cdot 2 \cdot \pi \cdot f \cdot I \quad (9)$$

onde  $R_n$  é a Resistência Newtoniana, o  $I$  é a Inertância,  $j$  é a unidade imaginária e  $f$  são as frequências das ondas que compõem o sinal. A Inertância é o análogo à Indutância no modelo Elétrico (ALCIATORE; HISTAND, 2014).

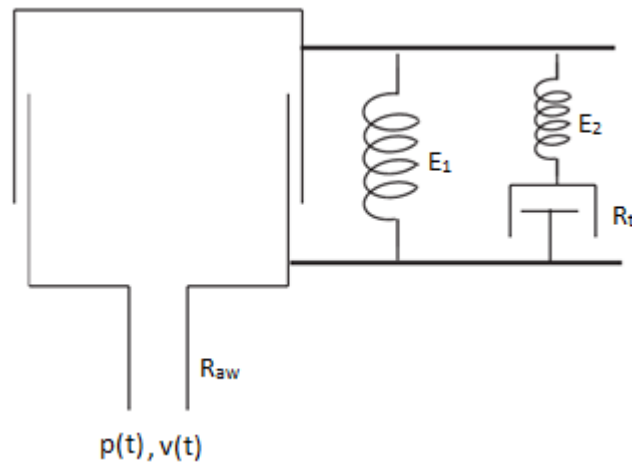
### 2.3 Modelo de fase constante

O sistema respiratório apresenta características viscoelásticas (BATES et al., 1994). Com isto, por meio do modelo viscoelástico (figura 5), o tecido pulmonar pode ser representado como um corpo de Kelvin, consistido de  $E_1$  e  $E_2$  (Elastâncias) e  $R_i$  (Resistência), como apresentado na figura 6 (BATES, 2009).

A representação do parênquima pulmonar por meio de corpos de Maxwell ( $E$  e  $R$  em série) mostra-se satisfatória e pode ser estendida

adicionando um número incontável destes corpos, assim como exibido na figura 7.

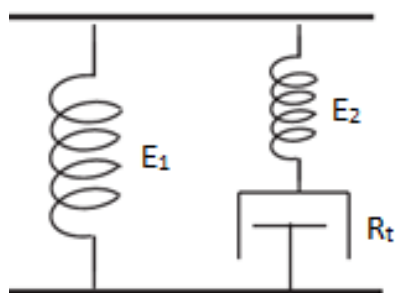
Figura 5 - Representação do modelo viscoelástico.  $E_1$  e  $E_2$  são Elastâncias;  $R_t$  Resistência do tecido pulmonar;  $p(t)$  pressão em função do tempo;  $v(t)$  volume em função do tempo e  $R_{aw}$  Resistência de vias aéreas.



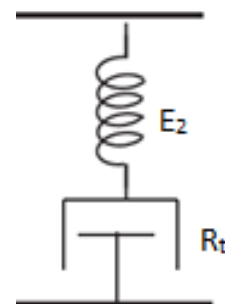
Fonte: Bates, 2009.

Figura 6 -  $E_1$  e  $E_2$  (Elastâncias);  $R_t$  Resistência do tecido pulmonar. a) Corpo de Kelvin. b) Corpo de Maxwell

a)

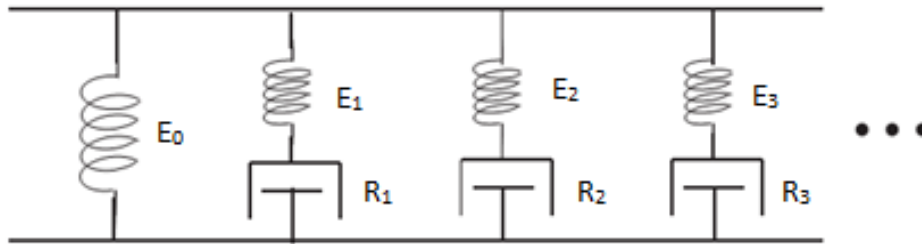


b)



Fonte: Modificado de Bates, 2009.

Figura 7 - Adição de corpos de Maxwell suficientes para mimetizar o comportamento do tecido pulmonar.  $E_1$  e  $E_2$  (Elastâncias);  $R_t$  Resistência do parênquima pulmonar.



Fonte: Bates, 2009.

O tecido pulmonar desinflado, quando devidamente preparado, ao ser tracionado obedece à lei de potência (equação 10) (BATES et al., 1994; BATES, 2009):

$$\text{Tensão}(t) = T_0 t^{-k} \quad (10)$$

onde  $T_0$  e  $k$  são constantes e  $t$  é o instante de tempo. Logo, a tensão realizada sobre o tecido apresenta um decaimento exponencial. Esta lei poderia ser aplicada a todos os corpos de Maxwell considerando uma constante de tempo ( $R/E$ ) para cada corpo. Porém, para tal, seriam necessários infinitos corpos para modelar o estresse e relaxamento de todo o parênquima (BATES, 2009).

Foi encontrada, na década de 1960 em um estudo de estresse e relaxamento, uma queda logarítmica na pressão e com isso obteve-se uma aproximação da lei de potência para a pressão ( $p(t)$ ) (HILDEBRANDT, 1969) (equação 11):

$$p(t) = p_0 t^{-k} \quad (11)$$

Além disso, utilizando-se do subterfúgio abaixo (equação 12):

$$t = e^{\ln(t)} \Rightarrow p(t) = p_0 (e^{\ln(t)})^{-k} \quad (12)$$

é possível expandir a equação 11 em série de Taylor (equação 13):

$$p(t) = p_0 \left[ 1 - k \ln(t) + \frac{(k \ln(t))^2}{2!} - \frac{(k \ln(t))^3}{3!} + \frac{(k \ln(t))^4}{4!} - \dots \right] \quad (13)$$

Como o  $k$  é muito menor que 1 a pressão se comporta de maneira praticamente linear com o  $\ln(t)$  (BATES et al., 1994).

A lei de potência na pressão descreve a resposta pulmonar a um aumento ou diminuição de volume (BATES, 2009). Logo, a lei de potência, quando substituída a tensão por pressão, pode ser tomada como saída do sistema respiratório e a variação do volume no tempo (fluxo) como entrada. Utilizando a transformada de Fourier ( $\mathfrak{F}$ ) (OPPENHEIM; SCHAFER; BUCK, 1998) na lei de potência (BATES, 2009) obtém-se a impedância (equação 14):

$$\begin{aligned} Z(\omega) &= \mathfrak{F}\{p_0 t^{-k}\} \\ &= \left( p_0 \sqrt{\frac{2}{\pi}} \right) \Gamma(1 - k) \left\{ \frac{\cos\left[(1-k)\frac{\pi}{2}\right] - i \operatorname{sen}\left[(1-k)\frac{\pi}{2}\right]}{\omega^{1-k}} \right\} \\ &= \frac{G - jH}{\omega^\alpha} \end{aligned} \quad (14)$$

onde  $\Gamma$  é a função gama (equação 15), uma integral que interpola a função fatorial de números inteiros, com isto, é possível obter valores fatoriais de números reais ou mesmo complexos.

$$\Gamma(t) = \int_0^\infty x^{t-1} e^{-x} dx \quad (15)$$

Por fim,  $G$  e  $H$  são (equações 16 e 17):

$$G = \left( p_0 \sqrt{\frac{2}{\pi}} \right) \Gamma(1 - k) \cos\left[(1 - k)\frac{\pi}{2}\right] \quad (16)$$

$$H = \left( p_0 \sqrt{\frac{2}{\pi}} \right) \Gamma(1 - k) \operatorname{sen} \left[ (1 - k) \frac{\pi}{2} \right] \quad (17)$$

e  $\alpha$  é (equação 18):

$$\alpha = 1 - k \quad (18)$$

Com as equações 16 e 17 (BATES, 2009):

$$\alpha = \frac{2}{\pi} \tan^{-1} \frac{H}{G} \quad (19)$$

Como o  $k$  é muito pequeno, o  $\alpha$  tende a ser 1.

O termo fase constante advém do fato de a razão entre parte imaginária e a parte real da impedância ser tangente à fase da mesma (equação 20). Com isso, independe da frequência (BATES, 2009).

$$\phi = \tan^{-1} \frac{H}{G} = (1 - k) \frac{\pi}{2} \quad (20)$$

Diferentemente do proposto na figura 7 em que o comportamento do parênquima é modelado por infinitos corpos de Maxwell, o modelo de fase constante modela o tecido pulmonar com apenas os parâmetros  $G$  e  $H$  (BATES, 2009) (figura 8). Mesmo que o termo fase constante esteja relacionado ao parênquima, o modelo apresentado na figura 8 como um todo é conhecido como modelo de fase constante (BATES, 2009; MORIYA; MORAES; BATES, 2003). Isto é, inclui a modelagem das vias aéreas.

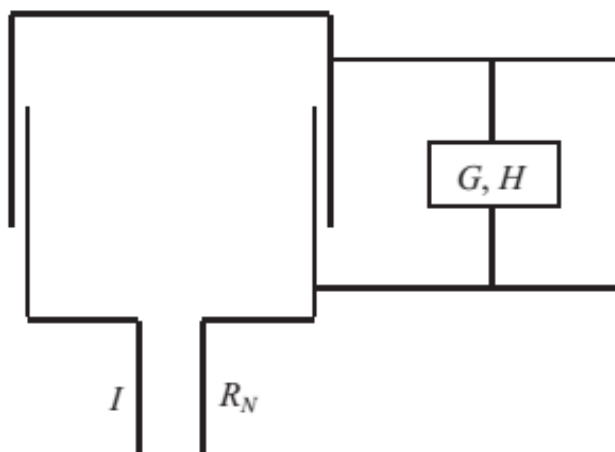
Sendo assim, os parâmetros relacionados ao parênquima não são os únicos a serem modelados por meio dos valores da impedância. O modelo de fase constante é descrito como (Equação 21):

$$Z_{sr}(f) = R_n + j \cdot 2 \cdot \pi \cdot f \cdot I + \frac{G - j \cdot H}{(2 \cdot \pi \cdot f)^\alpha} \quad (21)$$

onde  $R_n$  é a Resistência Newtoniana, o  $I$  é a Inertância e  $j$  é a unidade imaginária.  $G$  denota a característica de Viscância, associada à dissipação de

energia.  $H$  caracteriza o armazenamento de energia potencial elástica nos tecido pulmonares (MORIYA; MORAES; BATES, 2003).

Figura 8 - Parênquima pulmonar modelado com a impedância do tecido é descrito por  $G$  e  $H$ .  $R_n$  é a Resistência Newtoniana ao fluxo e  $I$  é a Inertância.



Fonte: Bates, 2009.

A equação 21 descreve o modelo como um todo e como ele é aplicado atualmente. Este foi primeiramente proposto em 1987 (HANTOS; SUKI; DARÓCZY, 1987).

Matematicamente, a importância da impedância torna-se mais evidente neste momento, uma vez que o sistema respiratório é modelado com base na impedância respiratória ( $Z_{sr}$ ) medida a cada frequência ( $f$ ) de onda conhecida da perturbação aplicada ao sistema, por isso a relevância do estudo do conteúdo espectral das perturbações.

Adicionalmente, como interpretação clínica, a impedância respiratória pode ser compreendida facilmente como uma dificuldade à passagem do ar (CARVALHO; TOUFEN JUNIOR; FRANCA, 2007). Entretanto, o motivo cerne de seu cálculo é a obtenção dos coeficientes ( $R_n$ ,  $I$ ,  $G$  e  $H$ ) da equação preditiva (equação 21) que são os parâmetros com significado fisiológico de interesse.

### 2.3.1 Ajuste do modelo

Da mesma maneira que há critérios de ajuste em uma análise de regressão (PEREIRA, 2010), como o Coeficiente de Determinação ( $R^2$ ) de uma regressão em estatística, há critérios de aceitação para os valores de modelagem.

O ajuste do modelo, ainda no domínio do tempo, pode ser medido por meio do Coeficiente de Determinação (COD) (equação 22) (BATES, 2009). O COD pode variar de 0 a 1, na qual, 1 é o ajuste perfeito e 0 denota que o modelo não possui relação com os valores (BATES, 2009; VITORASSO, 2016).

$$COD = 1 - \frac{SSR}{\sum_{i=1}^N (p_i - \bar{p})^2} \quad (22)$$

onde  $p_i$  é a pressão mensurada,  $\bar{p}$  é a pressão média do sinal e  $SSR$  é a Soma dos Resíduos Quadrados (equação 23):

$$SSR = \sum_{i=1}^N [p_i - \hat{p}_i]^2 \quad (23)$$

onde  $\hat{p}_i$  é a pressão predita pelo modelo. Como critério de aceitabilidade foi utilizado um valor de corte de 0,9 do COD (ROBICHAUD; FERREYDOONZAD; SCHUESSLER, 2015). Além de um critério de ajuste no domínio do tempo, há um coeficiente de ajuste modelado no domínio da frequência (BATES, 2009) (equação 24):

$$\Phi(f) = \frac{C_{P(f),\mathfrak{S}[\dot{v}(t)]}^2}{C_{P,P}(f)C_{\mathfrak{S}[\dot{v}(t)],\mathfrak{S}[\dot{v}(t)]}} \quad (24)$$

onde  $C_{P,P}(f)$  é a densidade espectral de potência de  $p(t)$ ;  $C_{P(f),\mathfrak{S}[\dot{v}(t)]}$  e  $C_{\mathfrak{S}[\dot{v}(t)],\mathfrak{S}[\dot{v}(t)]}$  são, respectivamente, a densidade espectral média da correlação cruzada (pressão e fluxo) e da autocorrelação (fluxo). Por fim, o  $\Phi(f)$  é o análogo no domínio da frequência do COD.

## 2.4 Índice de distorção harmônica ( $k_d$ )

O Índice de distorção harmônica ( $k_d$ ) (ZHANG; SUKI; LUTCHEN, 1995) quantifica o quão não-linear está o sistema perturbado por um ruído pseudo-aleatório esparso de banda larga (broadband sparse pseudorandom noise - SPRN). Portanto, este índice é utilizado nos sinais provenientes de oscilações forçadas.

Ele mostra, em porcentagem, quão não linear um sistema está em um dado momento, comparando a potência total do sinal de saída com a potência das frequências que diferem das de entrada, quando um sinal de banda larga é aplicado ao sistema respiratório (equação 25).

$$k_d = \sqrt{\frac{P_{NI}}{P_{tot}}} \times 100\% \quad (25)$$

onde  $P_{tot}$  é a potência total do sinal de saída e  $P_{NI}$  é a potência das frequências que diferem das frequências de entrada. Para estimar o  $P_{NI}$  relativo apenas a não linearidades uma série de correções são feitas e estas são descritas nos métodos da presente tese.

## 2.5 Região de confiança dos parâmetros do modelo e sensibilidade

Nesta subseção são apresentados os cálculos relacionados aos 95% de confiança das conjunções dos parâmetros do MFC. Estes cálculos são baseados nos estudos de Thamrin e colaboradores (THAMRIN et al., 2004) e Lutchen e Jackson (LUTCHEN; JACKSON, 1987). Primeiramente, tem-se o cálculo da matriz Jacobiana (equação 26):

$$J_{ij} = \frac{\partial Z_{sr}(f_i)}{\partial \theta_j} \quad (26)$$



onde o  $i$  é o índice das frequências e o  $j$  indexa os parâmetros do modelo. Como é uma matriz Jacobiana o  $\partial$  representa a derivada parcial, portanto esta matriz é composta pelas derivadas parciais da impedância do sistema respiratório ( $Z_{sr}$ ) com respeito a cada parâmetro do modelo de fase constante ( $\theta$ ). Esta matriz é relevante uma vez que a sensibilidade do modelo a cada parâmetro ( $R_n$ ,  $G$  e  $H$ ) é dada pela variação esperada do modelo a cerca de cada parâmetro que o compõe.

Subsequentemente, esta matriz pode ser utilizada para o cálculo da matriz Hessiana  $H$ , que por sua vez é uma matriz de derivadas parciais de segunda ordem. Esta pode ser aproximada por:

$$H \approx 2 \cdot J^T \cdot W \cdot J \quad (27)$$

sendo  $W$  uma matriz de ponderação onde os elementos de sua diagonais foram definidos de tal modo que cada elemento de  $H$  seja ponderado pelo recíproco do quadrado de  $|Z_{sr}|$  em cada ponto de frequência correspondente. Assim, obtém-se que:

$$H_{ij} = \sum_{k=1}^n \frac{1}{|Z_{sr}(f_k)|^2} \left[ \frac{\partial \text{Re}[Z_{sr}(f_k)]}{\partial \theta_i} \cdot \frac{\partial \text{Re}[Z_{sr}(f_k)]}{\partial \theta_j} + \frac{\partial \text{Im}[Z_{sr}(f_k)]}{\partial \theta_i} \cdot \frac{\partial \text{Im}[Z_{sr}(f_k)]}{\partial \theta_j} \right] \quad (28)$$

Para critérios absolutos a diagonal de  $W$  é ajustada como 1. A matriz Hessiana é utilizada na resolução da equação referente a um elipsoide p-dimensional (equação 29), na qual a p-dimensionalidade está atrelada ao número de parâmetros do modelo. Este elipsoide, basicamente, é uma representação da conjunção dos intervalos de confiança dos parâmetros estudados.

$$\delta \theta^T H \delta \theta = \delta \phi \quad (29)$$

Sendo  $\theta$  o vetor com os parâmetros do modelo e o  $\delta \theta$  um vetor (equação 30) que representa o desvio dos reais parâmetros do modelo e seus valores ótimos ( $\theta^*$ ) que minimizam o erro quadrático. Este vetor relaciona-se

com a variância do ruído observado  $\delta\phi$  (a variância do ruído observado - equação 31).

$$\delta\theta = \theta - \theta^* \quad (30)$$

$$\delta\phi = 2 \cdot p \cdot s^2 \cdot F_{1-\alpha}(p, 2 \cdot n - p) \quad (31)$$

onde  $\theta^*$  refere-se ao conjunto ideal de parâmetros assumidos para dar o melhor ajuste de modelo;  $p$  é o número de parâmetros;  $n$  o número de frequências;  $F$  refere-se à distribuição F (PEREIRA, 2010). O valor  $s^2$  é estimado por meio da equação 32.

$$s^2 = \frac{n \cdot \phi \cdot (\theta^*)^2}{2 \cdot n - p} \quad (32)$$

O  $\phi$  é o erro, podendo ser um erro absoluto ou relativo, no qual é possível tomar o módulo da impedância como realizado no artigo de Thamrin e colaboradores (THAMRIN et al., 2004).

Para o cálculo do tamanho dos eixos do elipsoide ( $L_i$ ) calculam-se os  $p$  autovalores ( $\lambda_i$ ) da matriz Hessiana (equação 33).

$$L_i = \sqrt{\frac{\delta\phi}{\lambda_i}} \quad (33)$$

A contribuição máxima de cada parâmetro ao longo de qualquer eixo é considerada a incerteza máxima do determinado parâmetro. Esta é a máxima variação permitida no parâmetro sob a qual ainda as mudanças correspondentes na impedância podem ser atribuídas a ruído.

Ademais, como o elipsoide é uma representação da conjunção dos intervalos de confiança dos parâmetros modelados por meio do MFC, o volume deste elipsoide refere-se ao tamanho da incerteza dos parâmetros modelados.

## 2.6 Metacolina

Uma das maneiras de se desafiar o sistema respiratório é por meio da administração de MCh. Ela mimetiza a ação da Acetilcolina (ACh) causando broncoconstrição, que por sua vez é um estreitamento brônquico que pode ser causado farmacologicamente (KATZUNG, 2012). A ACh é um neurotransmissor que age em receptores nicotínicos e muscarínicos (HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 2000). Isto é, neurônios pós-ganglionares do sistema parassimpático.

Portanto, a MCh é uma droga parassimpatomimética de ação direta, sendo assim, age diretamente nos receptores de ACh, em especial os receptores muscarínicos. Logo, tanto a ACh quanto a MCh sinalizam a musculatura lisa de brônquios para causar a broncoconstrição.

A MCh difere da ACh em termos de duração e seletividade. A MCh possui uma duração maior devido a degradação mais lenta pela Acetilcolinesterase e possui uma maior seletividade a receptores muscarínicos (HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 2000)

## 2.7 Bolus

A grande parte dos estudos de mecânica respiratória, quando não é utilizada via inalatória ou em comparações destas (JONASSON et al., 2009; PETÁK et al., 1997), utiliza-se de uma injeção do tipo *bolus*, isto é, uma injeção não sustentada da MCh (BATES et al., 1997, 2012; BATES; LAUZON, 2007; DAVEY; BATES, 1993; WALKER; KRAFT; FISHER, 2012).

A MCh apresenta sua máxima ação broncoconstritora em questão de segundos. Isto foi descrito tanto na administração por via inalatória (BATES et al., 2012) quanto por intravenosa (*i.v.*) (COJOCARU et al., 2008). Ainda que a ação da MCh *i.v.* não seja totalmente homogênea (BATES; LAUZON, 2007)

Visto que a ação da MCh é rápida, a curva característica de broncoconstrição possui uma subida rápida, um valor de “pico” de broncoconstrição entre 15 e 30 segundos (BATES et al., 1997, 2012) e uma queda acentuada após o pico.

Todavia, como a avaliação da mecânica respiratória exige um intervalo de tempo não desprezível entre e durante as perturbações, é possível e provável que o valor de pico real não corresponda ao valor efetivamente mensurado na avaliação da mecânica respiratória em uma curva dose-resposta.

## 2.8 Infusão contínua

A infusão contínua tem como semelhança ao protocolo *bolus* a via de acesso. Em ambos os casos a droga, no caso a MCh, é injetada de maneira *i.v.* e, quase que impreterivelmente, é injetada via jugular. Entretanto, a diferença reside na manutenção da injeção de MCh na infusão contínua. Sendo assim, faz-se necessária a utilização de uma bomba de infusão contínua.

Com isto, a curva de dose-resposta na infusão contínua obtida apresenta um platô após 5 minutos (BOZANICH et al., 2007) e não um pico com queda acentuada, como ocorre em um protocolo *bolus*. Esta maneira de se injetar a MCh é menos utilizada que a injeção por *bolus* (BOZANICH et al., 2007; COLLINS et al., 2007; LARCOMBE et al., 2008; SUKI et al., 1997).

Bozanich e colaboradores compararam a mecânica respiratória de camundongos Balb/c de 2 a 8 semanas de vida e não encontraram diferenças relevantes. Para tal, utilizaram infusão contínua de MCh com doses variando de 4 a 48  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ , dobrando a dose a cada estágio. Neste estudo foi citado que a MCh atinge o platô em 5 minutos (BOZANICH et al., 2007).

Neste último estudo a última dose utilizada pelo grupo correspondeu a menor dose utilizada no presente trabalho. Entretanto, a dose de 48  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  não é a maior utilizada na literatura. No estudo de Collins e col. foram estudados camundongos Balb/c e foi utilizada uma dose máxima de 96  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  (COLLINS et al., 2007).

No trabalho de Collins e col. e no estudo de Larcombe e col. foi utilizado Sulfato de Atropina para a abolição da resposta colinérgica (LARCOMBE et al., 2008), já o presente estudo não fez uso deste fármaco, uma vez que utiliza uma curva com efeito cumulativo.

Todos os artigos citados nesta subseção (infusão contínua) fazem parte ou tem colaboração com um mesmo grupo húngaro e a principal motivação para o uso da infusão contínua é duração temporal da perturbação. O método de avaliação da mecânica respiratória (wavetube) utilizado por este grupo húngaro aplica uma perturbação de 16 segundos, sendo assim, uma curva dose-resposta de MCh injetada como *bolus* não pode ser realizada, devido a sua rápida resposta.

## 2.9 Comparação *bolus* e infusão contínua

Como citado, existem dois estudos que comparam *i.h.* e *i.v.* MCh (JONASSON et al., 2009; PETÁK et al., 1997). Essencialmente, em camundongos (JONASSON et al., 2009) a administração intravenosa de MCh leva a uma broncoconstrição mais homogênea e, em ratos (PETÁK et al., 1997), a MCh *i.v.* está associada a uma predominância da contração das vias aéreas em relação ao parênquima pulmonar.

Há um estudo anterior aos trabalhos de Peták et. al. e Jonasson et. al. que compara a administração de MCh (inalada; *i.v.* - *bolus* e *i.v.* - infusão contínua) em ratos (SALERNO; LUDWIG, 1996). Neste estudo, Salerno e Ludwig modelaram a resistência e elastância com o modelo unicompartmental e sem um ventilador comercial.

Eles descobriram uma maior incidência de vias aéreas altamente contraídas no grupo aerossol em comparação com o grupo de infusão contínua. Além disso, a incidência de hiperinflação dinâmica local foi mais alta nos grupos *i.v.* em relação ao grupo aerossol.

Finalmente, em um estudo de protocolo de imagem (THOMAS et al., 2009), verificou-se que o grau de broncoconstrição e o número de defeitos de ventilação eram consistentemente menores na administração de MCh por infusão contínua do que em doses semelhantes entregues via protocolo *bolus*. Além disso, os defeitos de ventilação se recuperaram mais rapidamente após a infusão contínua do que após a injeção em *bolus*. Os “defeitos de ventilação” foram as regiões em que a ventilação é prejudicada ou inexistente (ALTES et al., 2001; THOMAS et al., 2009).

### 3 Métodos

Neste capítulo são apresentados os métodos empregados nesta tese de doutorado.

#### 3.1 Preparação dos animais

O protocolo deste estudo está em conformidade com as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP) (nº 15 nas fls. 16 do livro 3, 27/03 de 2014 para os animais SAMR1 e protocolo 9782280518 para os Balb/c).

Foram estudadas duas linhagens de camundongos: 1) SAMR1 machos de 3, 6 e 10 meses de idade; 2) Balb/c machos com 18 semanas de vida (no dia do experimento) em um modelo de inflamação por Ovalbumina (OVA) e um grupo controle. Ambas as linhagens foram submetidas aos dois protocolos de administração de um broncoconstritor, MCh: protocolo *bolus* e de infusão contínua.

Os animais foram anestesiados com Cetamina (120 mg/kg) e Xilazina (12 mg/kg) via intraperitoneal (*i.p.*). Quando o animal (figura 9) não mais apresentava sensibilidade à dor, foi realizada a traqueostomia e canulação da traqueia com uma cânula metálica 18 G (BD Company, Brasil), serrada totalizando 3,2 cm de comprimento e com o bisel suavizado ( figura 10).

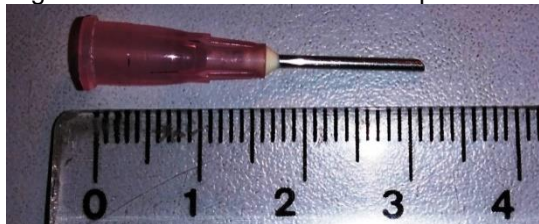
Encerrada a traqueostomia, o animal foi conectado ao ventilador mecânico para pequenos animais (*flexiVent*, SCIREQ, Canadá). Em seguida, a veia jugular direita foi dissecada para inserção de uma agulha com diâmetro externo de 0,28 mm, inserida a um tubo flexível de PVC (*PTY, Critchley Electrical Products, Austrália*) com diâmetro externo de 0,61 mm, diâmetro interno de 0,28 mm e comprimento de 10 cm.

Figura 9 - Animal traqueostomizado e com veia jugular dissecada.



Fonte: Imagem adquirida durante experimento realizado no Laboratório de Fisiopatologia da Inflamação do Departamento de Farmacologia do ICB-USP.

Figura 10 - Cânula utilizada na traqueostomia.



Fonte: Próprio autor

Para o bloqueio da musculatura respiratória, injetou-se brometo de pancurônio (1 mg/kg *i.p.*). Após a injeção do pancurônio, aguardou-se 7 minutos para a ação do fármaco e então foi dado o início da avaliação. Caso o animal apresentasse sinais de respiração espontânea, era realizada uma suplementação de 30% da dose de pancurônio.

### 3.2 Protocolo *bolus*

Antes do início da injeção do PBS (uma solução tampão, do inglês "*Phosphate Buffered Saline*"), foram realizadas duas manobras de recrutamento. Cada manobra de recrutamento alveolar apresentou duração de 6 segundos e consistia em um aumento pressórico em rampa, partindo do valor da Pressão ao final da expiração (*Positive End-Expiratory Pressure* - PEEP) até

atingir o valor de 30 cmH<sub>2</sub>O, sendo sustentado até o final da manobra. Em seguida o PBS foi injetado pela jugular com um volume (2 µL/g do animal) correspondente a de cada dose de MCh.

Durante o PBS foram realizadas 15 perturbações, portanto o modelo de fase constante foi aplicado 15 vezes com intervalo de 5 segundos entre cada perturbação. Após o término da bateria de mensurações, o animal é ventilado em uma ventilação quasi-senoidal por dois minutos com PEEP de 3 cmH<sub>2</sub>O e frequência respiratória de 150 respirações por minuto.

Cada perturbação foi composta por um somatório de 13 senoides. O intervalo de tempo de uma perturbação é igual a 2,991 segundos. A impedância do sistema respiratório e o subsequente ajuste do modelo de fase constante foram calculados por meio do aplicativo de controle do ventilador para pequenos animais.

As mesmas 15 perturbações realizadas no PBS foram realizadas em todas as doses de MCh: 0,03, 0,1, 0,3 e 1 mg/kg. Ao final das 15 perturbações de uma dose, assim como no PBS, o animal era ventilado por 2 minutos em uma ventilação quasi-senoidal até a injeção da dose subsequente. Antes da última dose o animal era suplementado com 30 % da dose de anestesia. Entre cada injeção de MCh, a via de acesso a jugular foi clampeada a fim de evitar a entrada de doses prévias. A via era aberta somente no momento da injeção das doses, isto é, imediatamente antes de realizar as mensurações. A figura 11 apresenta um diagrama esquemático de todo o experimento.

Para a padronização das avaliações, foram utilizadas rotinas de automatização próprias no programa de controle do ventilador.

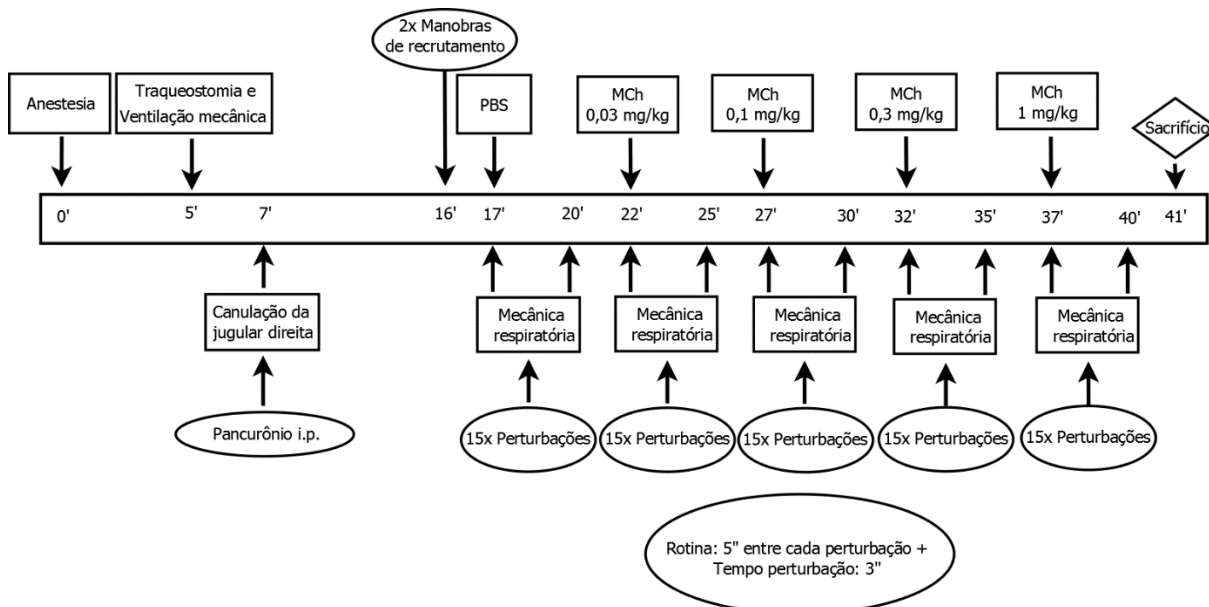
### **3.3 Protocolo de infusão contínua**

Assim como protocolo *bolus*, antes do início da injeção do PBS, foram realizadas duas manobras de recrutamento. As manobras de recrutamento foram as mesmas do protocolo descrito acima, isto é, duração de 6 segundos e pressão de recrutamento de 30 cmH<sub>2</sub>O.



Em seguida, o PBS era injetado, também pela jugular, durante 5 minutos por meio de uma bomba de infusão contínua (11 Plus, Harvard Apparatus, EUA) e novamente 15 perturbações foram aplicadas.

Figura 11 - Diagrama do protocolo *bolus*.



Fonte: Diagrama realizado pelo próprio autor.

Logo após a administração do PBS, a solução de MCh foi infundida por 2 minutos (“wash out”) antes do início das mensurações da primeira dose de MCh. No protocolo de infusão contínua, a dose foi incrementada com o aumento da vazão e não da concentração da solução (BOZANICH et al., 2007; LARCOMBE et al., 2008).

A concentração da solução de MCh era de 320  $\mu\text{g/mL}$  e as doses de MCh injetadas foram: 48, 96 e 192  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ . Com isto, a cada incremento da dose, a vazão era dobrada e o cálculo da vazão foi realizado com base na massa de cada animal. Na tabela 2 são apresentados os valores de volume e vazão para um animal de 25 g.

No protocolo de infusão contínua não houve o intervalo de 2 minutos entre o final das mensurações de uma dose e o início da dose subsequente, logo, para manter do tempo de 5 minutos por dose (BOZANICH et al., 2007) com 15 perturbações o tempo inter perturbação foi de 17 segundos.

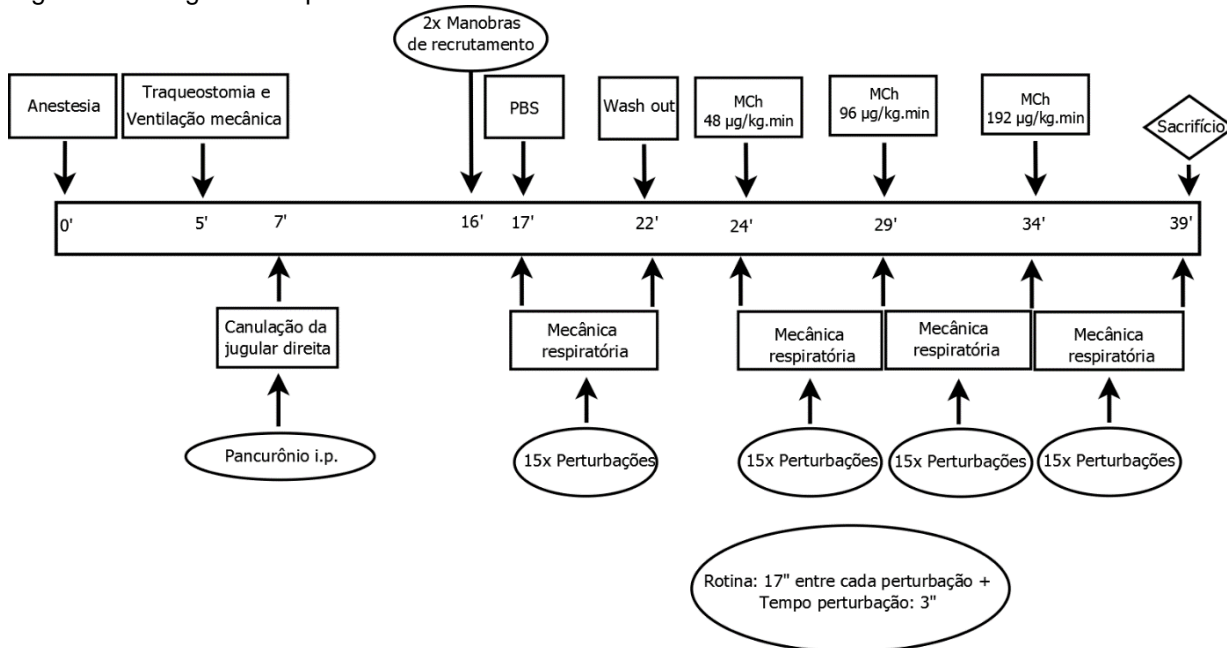
Tabela 2 - Valores de volume e vazões em cada dose para um animal exemplo de 25 g.

<b>Animal modelo de 25 g</b>		
<b>Dose (<math>\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}</math>)</b>	<b>Volume a cada min (mL)</b>	<b>Vazão (mL/h)</b>
PBS	0,00375	0,225
48	0,00375	0,225
96	0,00750	0,450
192	0,01500	0,900

Fonte: Tabela realizada pelo próprio autor.

Assim como no protocolo *bolus*, foram utilizadas rotinas de automatização próprias no programa de controle do ventilador. A figura 12 abaixo mostra um diagrama esquemático do protocolo de infusão contínua.

Figura 12 - Diagrama do protocolo de infusão contínua.



Fonte: Diagrama realizado pelo próprio autor.

### 3.4 Modelo

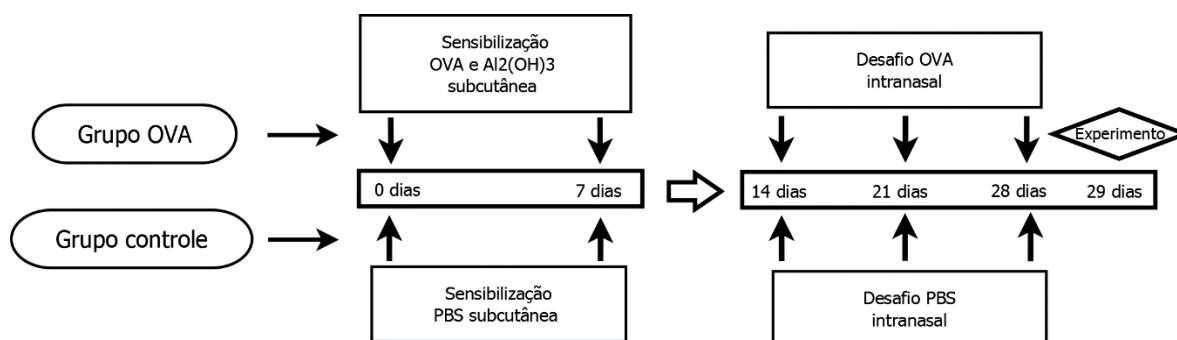
Conforme apresentado no capítulo de revisão, as variáveis do modelo de fase constante e variáveis de interesse deste estudo são: Resistência Newtoniana ( $R_n$ ), a Viscância ( $G$ ), Elastância ( $H$ ) e Coeficiente de

Determinação (*COD*). Todos estes parâmetros podem ser calculador por meio dos dados brutos ou exportados diretamente pelo aplicativo do ventilador. Foram utilizados os valores exportados diretamente pelo software de controle do ventilador mecânico.

### 3.5 Protocolo de asma

Os camundongos Balb/c foram separados em grupo controle e OVA. Foi utilizado um protocolo de inflamação pulmonar que visa mimetizar a asma eosinofílica (UMAÑA; TAVARES-DE-LIMA, 2019). Na figura 13 é apresentado um diagrama referente ao protocolo de inflamação pulmonar.

Figura 13 - Protocolo de asma.OVA: Ovalbumina.



Fonte: Diagrama realizado pelo próprio autor.

Os animais deste protocolo foram recebidos com 7 semanas de vida e mantidos no biotério por mais 7 semanas, com isto o início do protocolo (marco 0) dá-se no 14<sup>o</sup> semana de vida. O grupo OVA foi sensibilizado com uma injeção subcutânea de 0,2 mL de uma solução de ovalbumina (OVA) (Grau V, SIGMA, EUA) e  $Al_2(OH)_3$  6%.

Foram duas sensibilizações subcutâneas sendo a solução da primeira composta por: 450  $\mu$ L de uma solução mãe (0,001 g de OVA + 1 mL de PBS), 1850  $\mu$ L de PBS e 700  $\mu$ L do hidróxido de alumínio. A solução da segunda sensibilização foi: 750  $\mu$ L de uma solução mãe (0,001g de OVA + 1mL de PBS), 1550  $\mu$ L de PBS e 700  $\mu$ L do hidróxido de alumínio. Com isto e com base no volume de 0,2 mL distribuído, os animais receberam 30  $\mu$ g de OVA na

primeira e 50  $\mu\text{g}$  na segunda. Nas duas sensibilizações os animais receberam 2,8  $\mu\text{g}$  de  $\text{Al}_2(\text{OH})_3$ .

Os animais receberam o antígeno (desafio) por três vezes (14, 21 e 28 dias após o início do protocolo). Os desafios foram administrados via intranasal e o volume administrado foi de 30 $\mu\text{L}$ . A solução do primeiro desafio foi: 150 $\mu\text{L}$  da solução mãe (a mesma composição da solução mãe da sensibilização) e 300 $\mu\text{L}$  de PBS. No segundo e terceiro desafios: 300 $\mu\text{L}$  da solução mãe (a mesma composição da solução mãe da sensibilização) e 150 $\mu\text{L}$  de PBS. Sendo assim, cada animal recebeu 10 $\mu\text{g}$  de OVA no primeiro desafio e 20 $\mu\text{g}$  no segundo e terceiro desafios.

Os animais do grupo controle foram imunizados e desafiados conforme descrito, porém sendo utilizado PBS.

### **3.6 Lavagem Broncoalveolar**

Após a finalização da avaliação de mecânica respiratória e eutanásia, os camundongos foram submetidos a Lavagem Broncoalveolar (Bal). Os pulmões foram lavados duas vezes por meio da cânula de traqueostomia com lavagens de 0,8 mL de PBS. O volume total era o obtido nas duas lavagens. O fluido do lavado foi então imediatamente centrifugado (15 min, 1500 rpm). Após remoção do sobrenadante, o sedimento celular foi ressuspenso com 1,0 mL de PBS. Nas amostras de 45  $\mu\text{L}$  desta solução de Bal, foram adicionados 5  $\mu\text{L}$  de cristal violeta (0,2% de violeta de cristal em 30 % de ácido acético). Na sequência, 10  $\mu\text{L}$  dessa solução foram colocados na câmara de Neubauer para a contagem total de células. Para a quantificação diferencial de células, amostras de 200  $\mu\text{L}$  foram colocadas em uma citocentrífuga (Citospin, Fanem) e centrifugadas a 1.000 rpm por 5 min. As preparações citocentrífugas foram coradas com um reagente (solução de ciclohexatrieno a 0,1%, solução azobenzenossulfônica a 0,1% e solução de fenotiazina a 0,1%) e a contagem diferencial foi realizada por microscopia óptica.

### 3.7 Correções e estimativas do $k_d$

Os cálculos descritos nesta seção foram guiados pelo trabalho de Zhang e colaboradores (ZHANG; SUKI; LUTCHEN, 1995). O  $Z_{lin}$  é a função de transferência de um subsistema linear. Caso o conteúdo espectral de entrada ( $X(f)$ ) contiver energia nas frequências diferentes das de entrada, é possível prever a contribuição do subsistema linear,  $Y_{lin}(f)$ , para a saída das mesmas frequências (equação 34):

$$Y_{lin}(f) = Z_{lin}(f) \cdot X(f), \quad (f \neq f_N), \quad (34)$$

onde  $f$  é um inteiro múltiplo de  $f_0$ , a frequência fundamental de entrada, entretanto  $f$  é diferente de qualquer uma das frequências de entrada ( $f_N$ ). Salientando que, no caso do presente estudo, as frequências de entrada da perturbação são (Hz): 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.

Uma vez que a impedância respiratória calculada para o modelo de fase constante é  $P(f)/\mathfrak{F}[\dot{v}(t)]$ , o  $Y_{lin}(f)$  seria a Pressão no domínio da frequência e  $X(f)$  o fluxo:

$$X(f) = V(f) \cdot \omega \cdot j \quad (35)$$

onde  $\omega$  é a frequência angular e o  $j$  é a unidade imaginária. O  $\omega j$  surge devido à transformada de Fourier de uma derivada. Como o fluxo é a primeira derivada no tempo do volume, a transformada de Fourier do fluxo pode ser obtida diretamente do volume na frequência.

Em seguida, admite-se o que o erro no ajuste do modelo linear irá produzir uma incerteza em  $Y_{lin}(f)$ , portanto assume-se o erro ( $\epsilon$ ) na estimação do modelo linear como (Equação 36):

$$\epsilon = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{f=f_N} (\{Re[Z_{app}] - Re[Z_m]\}^2 + \{Im[Z_{app}] - Im[Z_m]\}^2)}, \quad (36)$$

onde  $N$  é o número de frequências de entrada, neste trabalho são 13, o  $Re$  e  $Im$  correspondem à parte real e imaginária do  $Z_{app}$  e  $Z_m$ . O  $Z_{app}$  é a função de transferência aparente. Conseqüentemente, esta variável consiste nos valores de impedância conhecidos em cada frequência de entrada. O  $Z_m$  torna-se a impedância modelada, isto é os dados de impedância calculados por meio dos parâmetros obtidos pelo modelo de fase constante,  $R_n$ ,  $G$  e  $H$  (a inércia foi desprezada).

O erro máximo de pressão por frequência até a frequência de entrada máxima (20,5 Hz) que difere das frequências de entrada é (equação 37):

$$\delta Y_{lin}(f) = \frac{\epsilon}{\sqrt{2}} (|Re[X(f)]| + |Im[X(f)]|) \quad (37)$$

A potência do sinal de saída nas frequências espúrias (não de entrada) ( $P_{NI}$ ) foi estimada por meio da equação 38:

$$P_{NI} = \sum_{f \neq f_N} (\{Re[Y(f)] - Re[Y_{lin}(f)]\}^2 g_{Re}(f) + \{Im[Y(f)] - Im[Y_{lin}(f)]\}^2 g_{Im}(f)) \quad (38)$$

onde:

$$g_{Re}(f) = 1, \text{ se } |Re[Y(f)] - Re[Y_{lin}(f)]| > |Re[\delta Y_{lin}(f)]|$$

$$g_{Re}(f) = 0, \text{ se } |Re[Y(f)] - Re[Y_{lin}(f)]| \leq |Re[\delta Y_{lin}(f)]| \quad (39)$$

O fator  $g_{Im}(f)$  apresenta a mesma expressão, entretanto aparece o  $Im$  no lugar de  $Re$ . O  $P_{NI}$  é corrigido ( $P'_{NI}$ ) retirando-se o ruído:

$$P'_{NI} = (P_{NI} - NP \cdot L) \cdot u(P_{NI} - NP \cdot L) \quad (40)$$

onde  $L$  é o número de frequências dentro do intervalo das frequências com modelo de fase constante, porém que diferem das 13 conhecidas ( $N$ ). A função

degrau unitário  $u(\cdot)$  garante frequências não negativas.  $NP$  é a média da potência de saída acima do intervalo das frequências conhecidas e estima o ruído médio por frequência sobreposta ao sinal verdadeiro. O intervalo de frequências foi escolhido arbitrariamente entre 50 e 100 Hz, mas outros intervalos apresentaram resultados similares.

Finalmente, a potência total de saída ( $P_{tot}$ ) no intervalo de frequências de entrada é estimado como (equação 41):

$$P_{tot} = \sum_f |Y(f)|^2 - NP \cdot (L + N) \quad (41)$$

Por meio do  $P_{tot}$  e  $P'_{NI}$  é possível avaliar o  $k_d$  (equação 25). Foram realizadas rotinas de automação para o cálculo do índice de distorção harmônica (Matlab, The MathWorks, EUA).

### 3.8 Volume do elipsoide da região de confiança dos parâmetros

Para o cálculo do volume do elipsoide da região de confiança dos parâmetros do modelo de fase constante, utilizou-se a equação do volume de um elipsoide e o tamanho dos eixos foram os descritos por meio dos eixos do elipsoide ( $L_i$ ) apresentados na equação 33. Assim, obtém-se (equação 42):

$$Volume\ do\ elipsoide = \frac{4\pi \cdot \sqrt{\delta\phi^3}}{3 \cdot \sqrt{\det H}} \quad (42)$$

onde o  $\det H$  é o produto dos autovalores ( $\lambda$ ) e o  $\delta\phi$  (variância do ruído observado) pode ser obtido por meio da equação 31. O cálculo tanto da região de confiança quanto do volume foram feitos em um ambiente de programação (Matlab, The MathWorks, EUA).

### 3.9 Análise estatística

As principais variáveis deste estudo foram os parâmetros do MFC. Os valores de pico e platô foram selecionados a partir dos protocolos de *bolus* e infusão contínua, respectivamente. As comparações de pico vs platô foram realizadas nas duas linhagens estudadas.

Para avaliar a capacidade de discriminar doses de MCh e as diferentes idades (SAMR1) e grupos inflamado e não inflamado (Balb/c) em ambos os protocolos (*bolus* e infusão contínua), foi utilizada a análise de variância bidirecional (*two-way* ANOVA) como teste estatístico e a análise foi realizada em um pacote estatístico (Prism 6, GraphPad Software, EUA). Além disso, o Bonferroni foi selecionado como pós-teste.

#### 3.9.1 Análise do incremento da resposta

A fim de se comparar em uma mesma análise o protocolo infusão contínua e *bolus* foi analisada a resposta dos parâmetros do modelo de fase constante frente a um determinado incremento na dose. Foi analisada a variação na resposta dos parâmetros quando a dose de MCh era duplicada ou quadruplicada. Como as doses no o protocolo de infusão contínua estavam em potência de 2, foram utilizadas as doses de 48 a 96 e 48 a 192  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  para verificar, respectivamente, a resposta frente ao dobro e quádruplo da dose. Para o protocolo *bolus*, foi realizada uma interpolação dos valores de pico de resposta para obter valores de resposta correspondentes a doses de 100, 200 e 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Utilizou-se uma interpolação cúbica por partes (Piecewise Cubic Hermite), portanto não linear, e esta interpolação também foi realizada em um ambiente de programação (Matlab, The MathWorks, EUA). A mesma interpolação foi aplicada para encontrar as doses necessárias para atingir 150, 200 e 300% da resposta basal do  $R_n$  nos protocolos de *bolus* e infusão contínua.

Logo, as variáveis a serem comparadas e utilizadas no modelo estatístico foram as respostas frente às variações nas doses, por exemplo, a resistência



na dose 2 dividida pela resistência na dose 1 e as doses necessárias para os incrementos de 150, 200 e 300%. Para a comparação destas respostas de um dos parâmetros do modelo de fase constante, utilizou-se uma análise de variância bidirecional (*two-way ANOVA*) e como pós teste o método de Sidak (recomendado para esta análise pelo aplicativo do pacote estatístico). Novamente, a significância estatística adotada foi de  $p < 0,05$ .

## 4 Resultados

Nesta seção são apresentados os resultados referentes aos animais SAMR1 nas 3 idades (3, 6 e 10 meses) e referentes aos animais Balb/c nos grupos controle e OVA.

### 4.1 Massa corpórea e lavado bronco-alveolar

Na tabela 3 são apresentados os dados de massa corpórea e contagem total do lavado broncoalveolar (Bal) dos camundongos da linhagem SAMR1 em ambos os protocolos (*bolus* e infusão contínua).

Tabela 3 - Massa corpórea e lavado broncoalveolar (Bal) dos animais SAMR1 no protocolo *bolus* e infusão contínua. Houve significância estatística na análise de variância ( $p < 0,0001$ ) para a comparação do Bal nas idades no protocolo *bolus*.

Idade	infusão contínua			<i>bolus</i>		
	n	Massa corpórea (g)	Bal ( $\times 10^5$ cel/cm <sup>3</sup> )	n	Massa corpórea (g)	Bal ( $\times 10^5$ cel/cm <sup>3</sup> )
<b>3 meses</b>	10	38,6 $\pm$ 4,0	1,1 $\pm$ 0,7	15	44,1 $\pm$ 3,6	2,3 $\pm$ 0,6
<b>6 meses</b>	13	40,5 $\pm$ 2,8	1,0 $\pm$ 0,7	13	44,8 $\pm$ 5,0	2,8 $\pm$ 1,1
<b>10 meses</b>	7	43,1 $\pm$ 4,6	0,9 $\pm$ 0,6	11	45,7 $\pm$ 4,7	1,2 $\pm$ 0,6

Fonte: Próprio autor

Subsequentemente, os mesmos dados (massa corpórea e Bal) são apresentados para os Balb/c (tabela 4).

Tabela 4 - Massa corpórea e lavado broncoalveolar (Bal) dos animais Balb/c no protocolo *bolus* e infusão contínua. O número de células na comparação OVA e Controle foram diferentes nos protocolos *bolus* ( $p = 0,0170$ ) e infusão contínua ( $p < 0,0001$ ).

	Infusão contínua			<i>bolus</i>		
	n	Massa corpórea (g)	Bal ( $\times 10^5$ cel/cm <sup>3</sup> )	n	Massa corpórea (g)	Bal ( $\times 10^5$ cel/cm <sup>3</sup> )
<b>OVA</b>	15	28,5 $\pm$ 1,7	2,5 $\pm$ 0,9	11	28,1 $\pm$ 1,6	4,0 $\pm$ 2,0
<b>Controle</b>	11	28,3 $\pm$ 2,2	0,8 $\pm$ 0,5	9	26,9 $\pm$ 2,4	2,0 $\pm$ 1,2

Fonte: Próprio autor

Além disso, como a linhagem Balb/c fez parte de um protocolo de inflamação por Ovalbumina visando à instauração de uma inflamação semelhante à asma eosinofílica, na tabela 5 é apresentada a contagem diferencial de células no lavado broncoalveolar.

Tabela 5 - Contagem diferencial de células no lavado broncoalveolar dos animais Balb/c. Houve diferença ( $p < 0,05$ ) entre Controle e OVA em ambos os protocolos e todas as células.

	<b>infusão contínua</b>			<b><i>bolus</i></b>		
	<b>Monócito (%)</b>	<b>Neutrófilo (%)</b>	<b>Eosinófilo (%)</b>	<b>Monócito (%)</b>	<b>Neutrófilo (%)</b>	<b>Eosinófilo (%)</b>
<b>OVA</b>	64,79	4,63	30,58	54,30	5,40	40,30
<b>Controle</b>	98,40	0,39	1,21	97,80	0,70	1,50

Fonte: Próprio autor

## 4.2 Curva dose-resposta

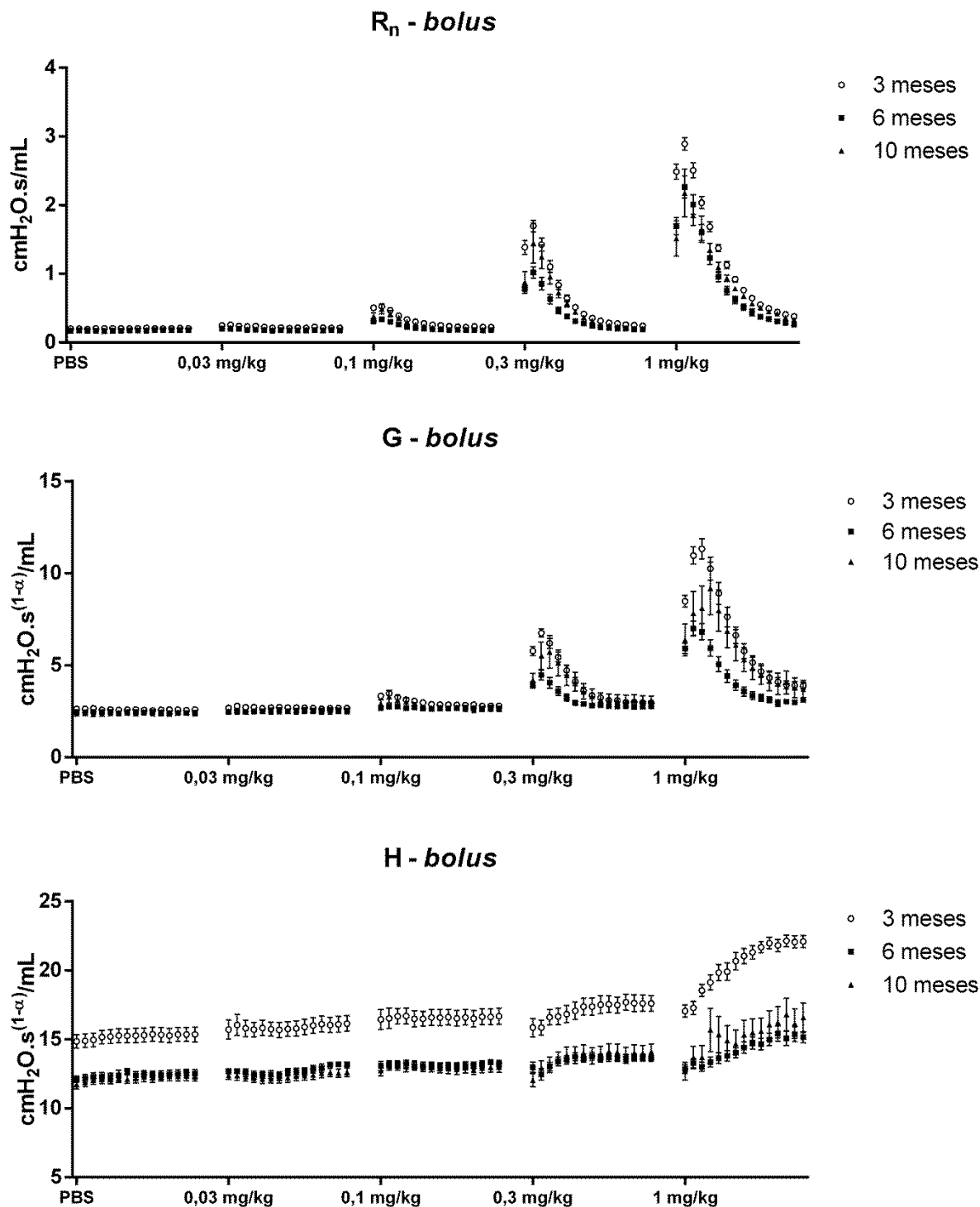
Nesta subseção são apresentadas as curvas de dose-resposta das duas linhagens em ambos os protocolos. As variáveis utilizadas como resposta para as curvas dose-resposta são os parâmetros obtidos por meio do MFC.

### 4.2.1 Curva dose-resposta - *bolus*

Inicialmente, são apresentados os gráficos relativos ao protocolo *bolus*. Na figura 14 são apresentados os parâmetros do MFC para os animais SAMR. Subsequentemente, na figura 15 são apresentados os parâmetros do modelo de fase constante para os animais Balb/c controle e OVA. Como os dados são apresentados como média e erro padrão, a exclusão de valores da curva dose-resposta pode gerar um aumento no erro como observado. Os animais e valores excluídos serão reportados ainda nos resultados.

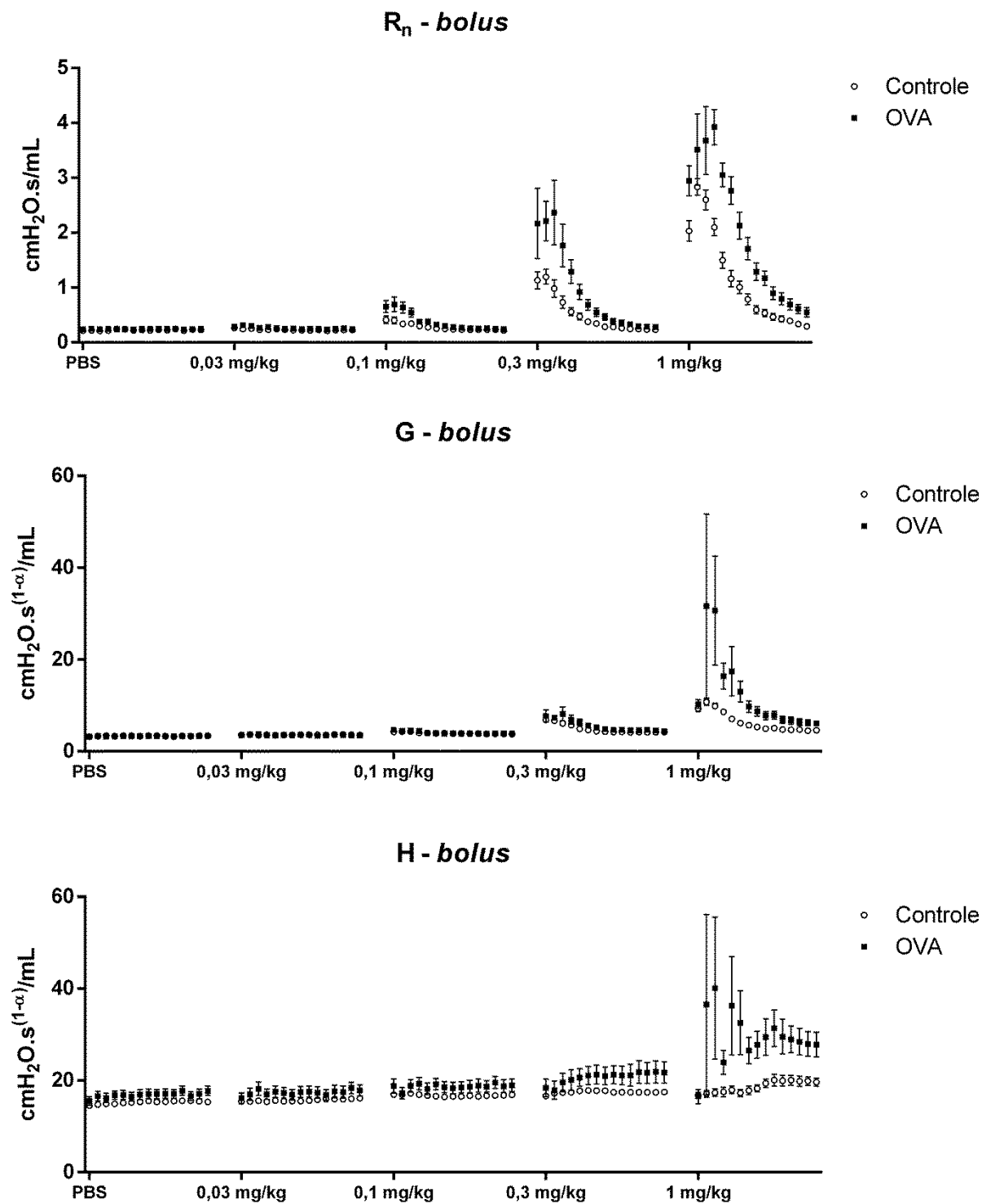
Na figura 16 são apresentados os valores de COD dos animais SAMR1. Na figura 17 são apresentados os valores de COD para os animais SAMR1 nas 3 diferentes idades. Foi traçada uma linha no valor de COD igual a 0,9 para pontuar o valor de corte.

Figura 14 - Parâmetros do MFC durante uma curva de dose-resposta para os animais SAMR1 em todas as idades no protocolo *bolus*. Média e erro-padrão.



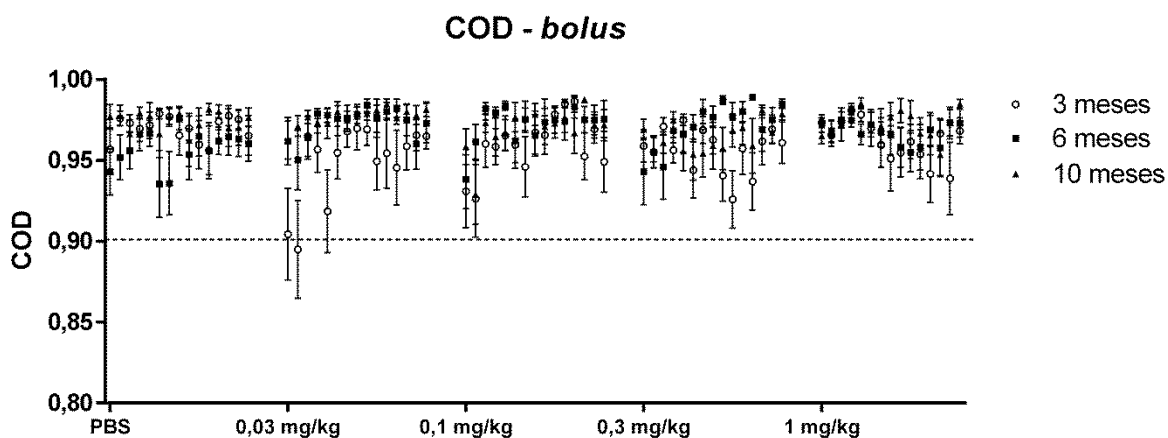
Fonte: Próprio autor.

Figura 15 - Parâmetros do MFC para os animais Balb/c controle e OVA no protocolo *bolus*. Média e erro-padrão.



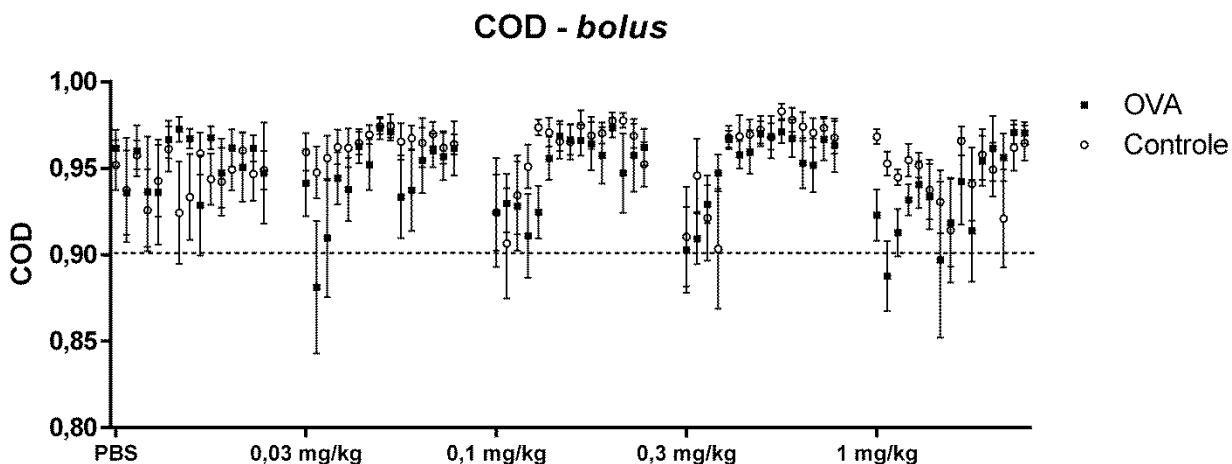
Fonte: Próprio autor.

Figura 16 - Valores de COD para os animais SAMR1 no protocolo *bolus*. Foi traçada uma linha no valor de COD igual a 0,9 para pontuar o valor de corte. Média e erro-padrão.



Fonte: Próprio autor.

Figura 17 - Valores de COD no protocolo *bolus* para os animais Balb/c. Foi traçada uma linha no valor de COD igual a 0,9 para pontuar o valor de corte. Média e erro-padrão.

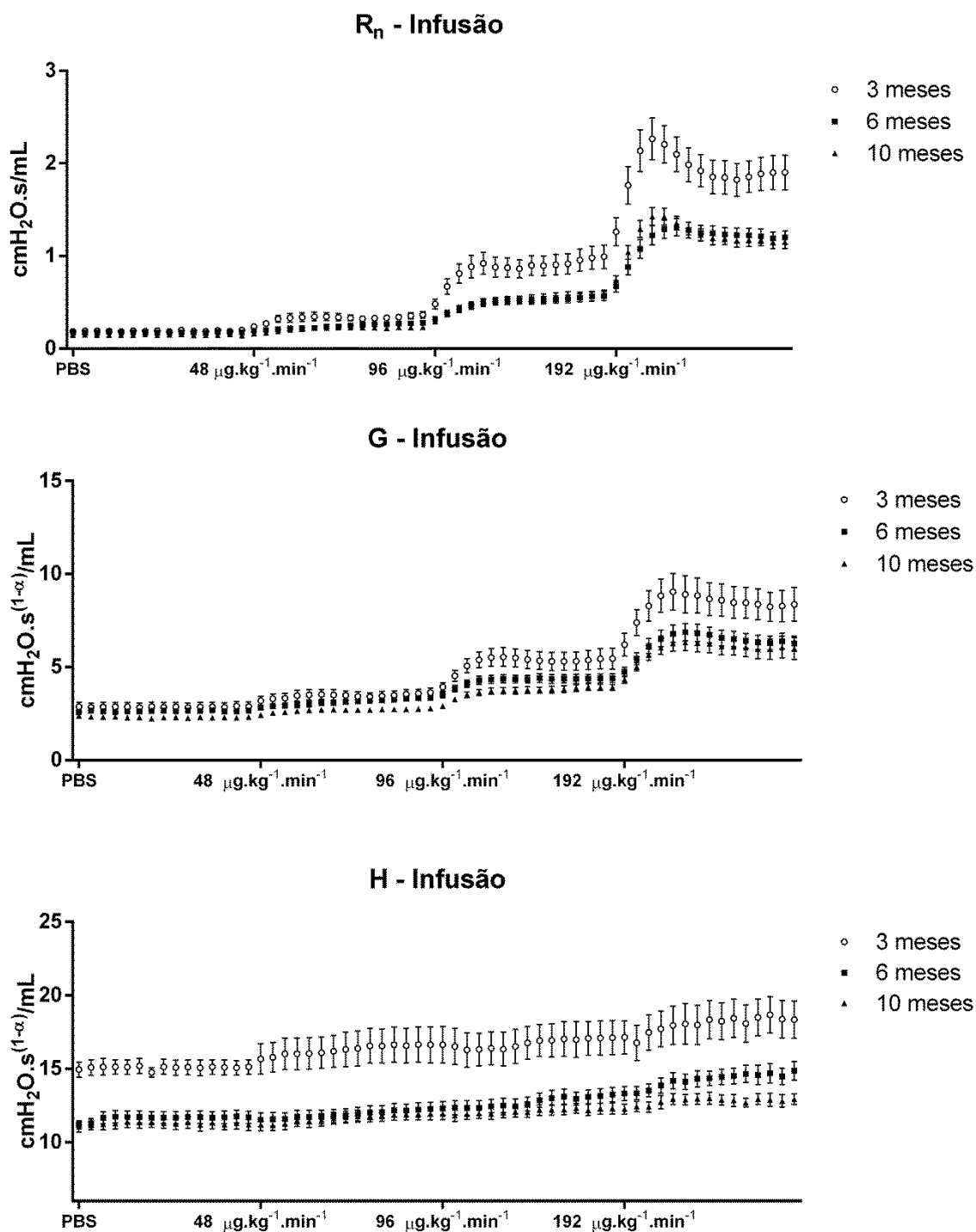


Fonte: Próprio autor.

#### 4.2.2 Curva dose-resposta - infusão contínua

Aqui são apresentadas as curvas dose-resposta do protocolo de infusão contínua em ambas as linhagens. Na figura 18 são apresentados os parâmetros do MFC para os animais SAMR1 nas 3 idades estudadas.

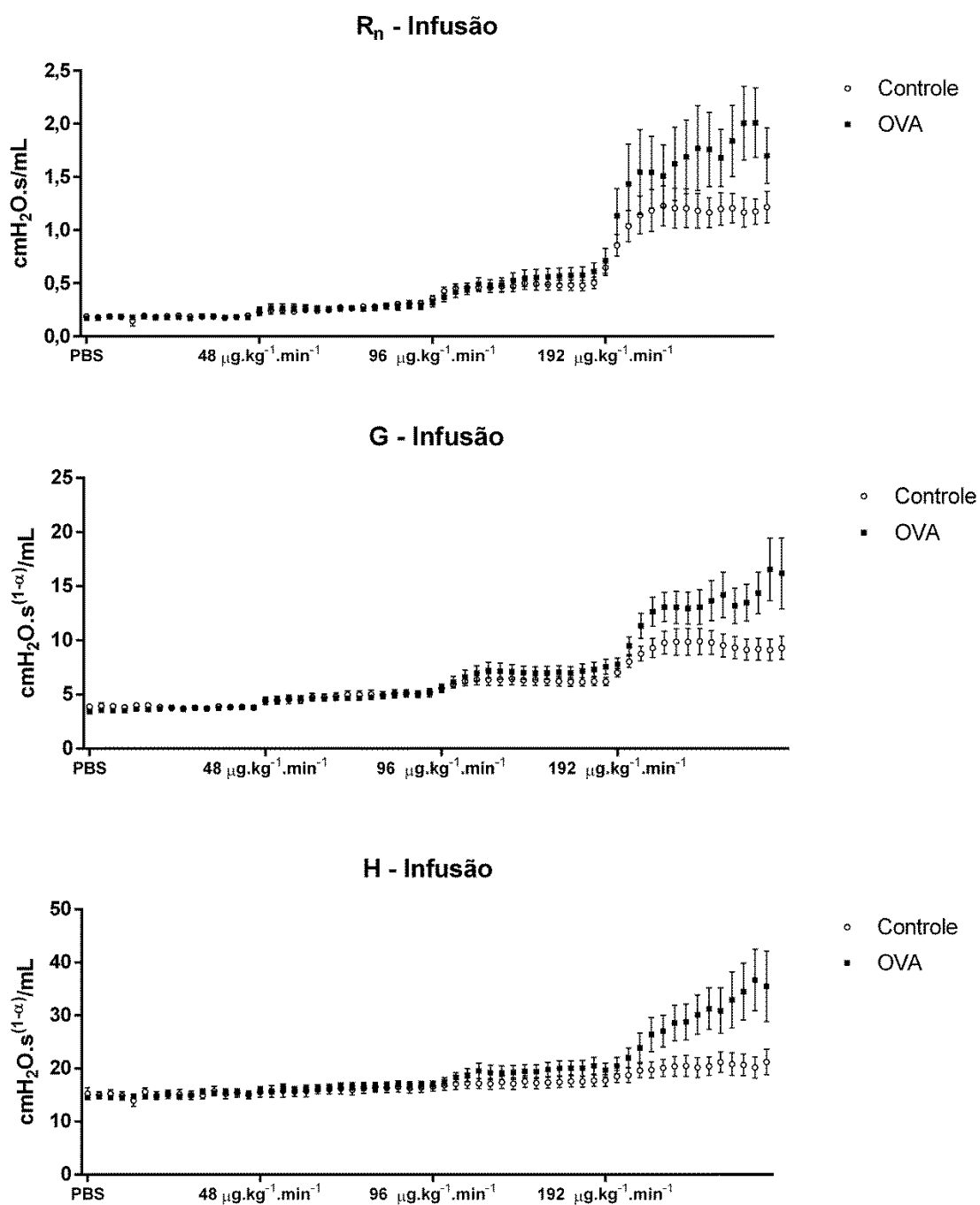
Figura 18 - Parâmetros do MFC para os animais SAMR1 em todas as idades no protocolo de infusão contínua. Média e erro-padrão.



Fonte: Próprio autor.

Na figura 19 são apresentados os parâmetros do MFC dos animais Balb/c.

Figura 19 - Parâmetros do MFC para os animais Balb/c controle e OVA no protocolo de infusão contínua. Média e erro-padrão.

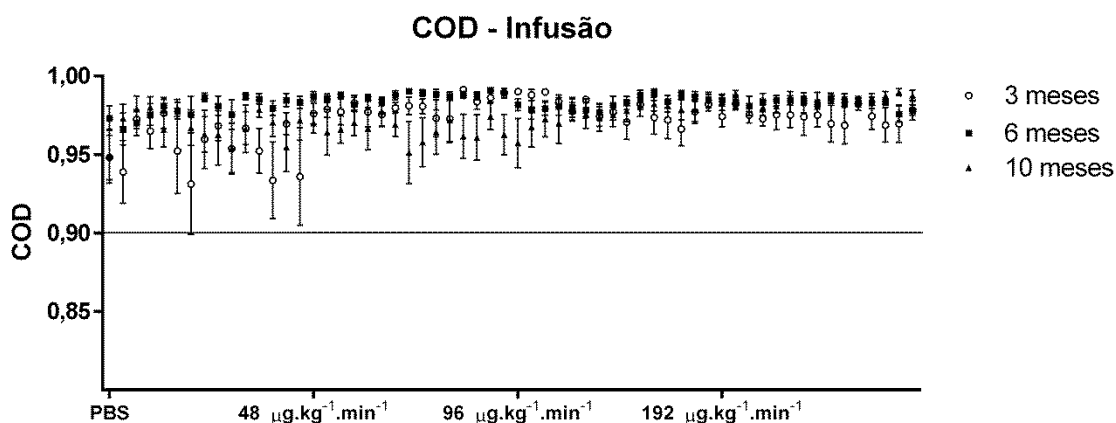


Fonte: Próprio autor.



Na figura 20 são apresentados os valores de COD no protocolo de infusão contínua para os animais SAMR1. Novamente, foi traçada uma linha no valor de COD igual a 0,9 a fim de pontuar o valor de corte.

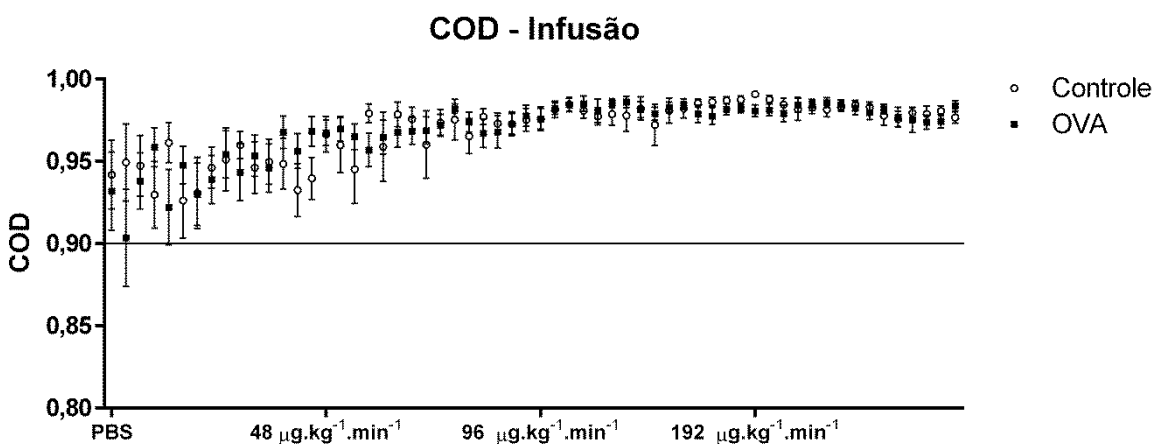
Figura 20 - Valores de COD no protocolo de infusão contínua para os animais SAMR1. Foi traçada uma linha no valor de COD igual a 0,9 para pontuar o valor de corte. Média e erro-padrão.



Fonte: Próprio autor.

Na última figura desta subseção (figura 21) são apresentados os valores de COD dos animais Balb/c.

Figura 21 - Valores de COD dos animais Balb/c no protocolo de infusão contínua. Foi traçada uma linha no valor de COD igual a 0,9 para pontuar o valor de corte. Média e erro-padrão.



Fonte: Próprio autor.

### 4.3 Pico e platô

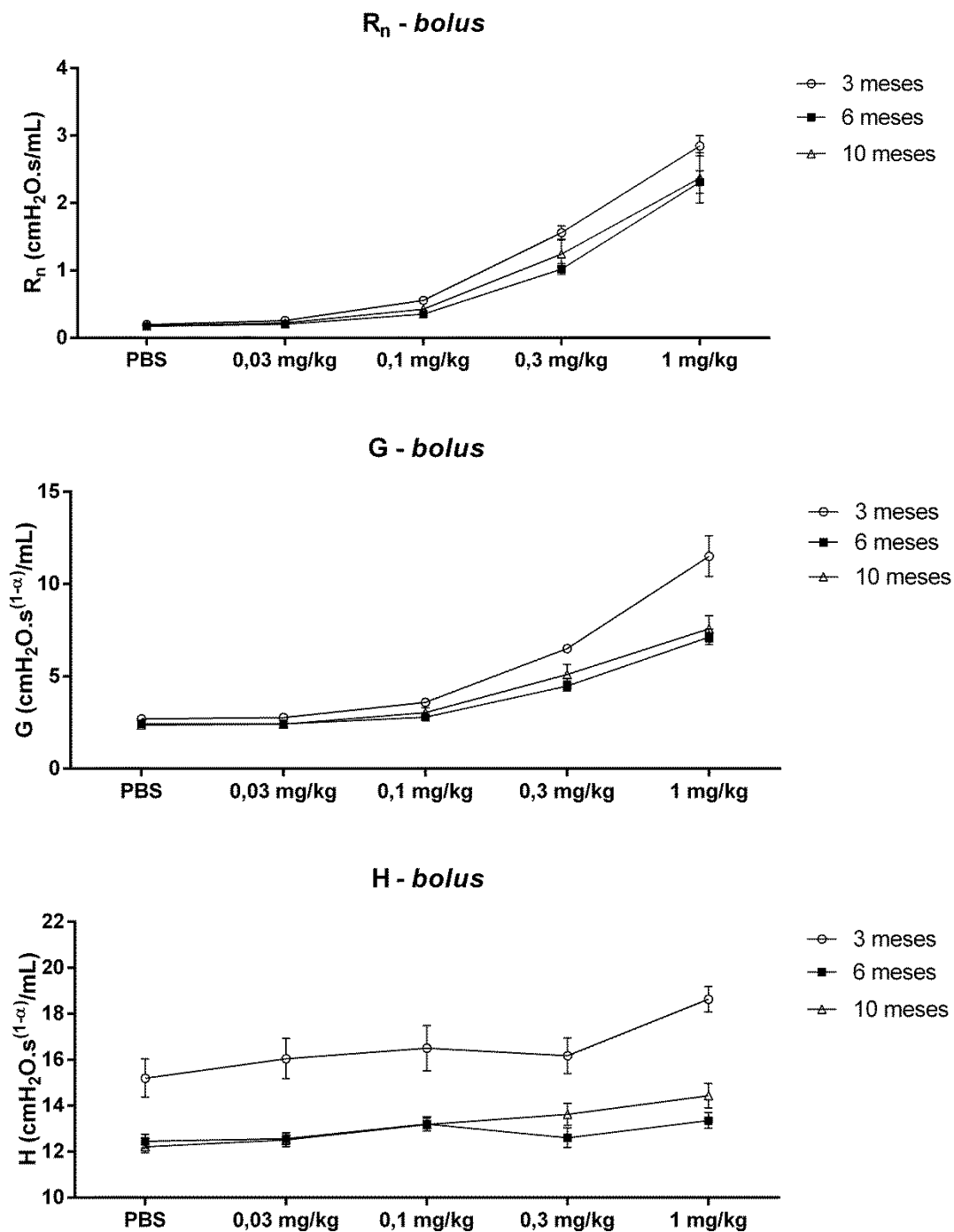
Outra maneira de se comparar os grupos em uma curva dose-resposta, principalmente em estudos de mecânica respiratória, é por meio do valor máximo encontrado em cada dose, no caso de um protocolo na qual a MCh é injetada em *bolus*. No protocolo de infusão contínua utilizam-se os valores de resposta do modelo de mecânica respiratória referentes ao platô. Portanto, são apresentadas as comparações por meio do pico para o protocolo *bolus* e do platô no protocolo de infusão contínua.

#### 4.3.1 Pico - *bolus*

Na figura 22 são apresentadas as comparações dos parâmetros  $R_n$ ,  $G$  e  $H$  referentes aos valores de pico para os animais SAMR1 no protocolo *bolus*. Os valores de  $p$  das análises de variância são apresentados nas figuras e os valores de  $p$  dos pós-testes serão apresentados em uma subseção à parte.

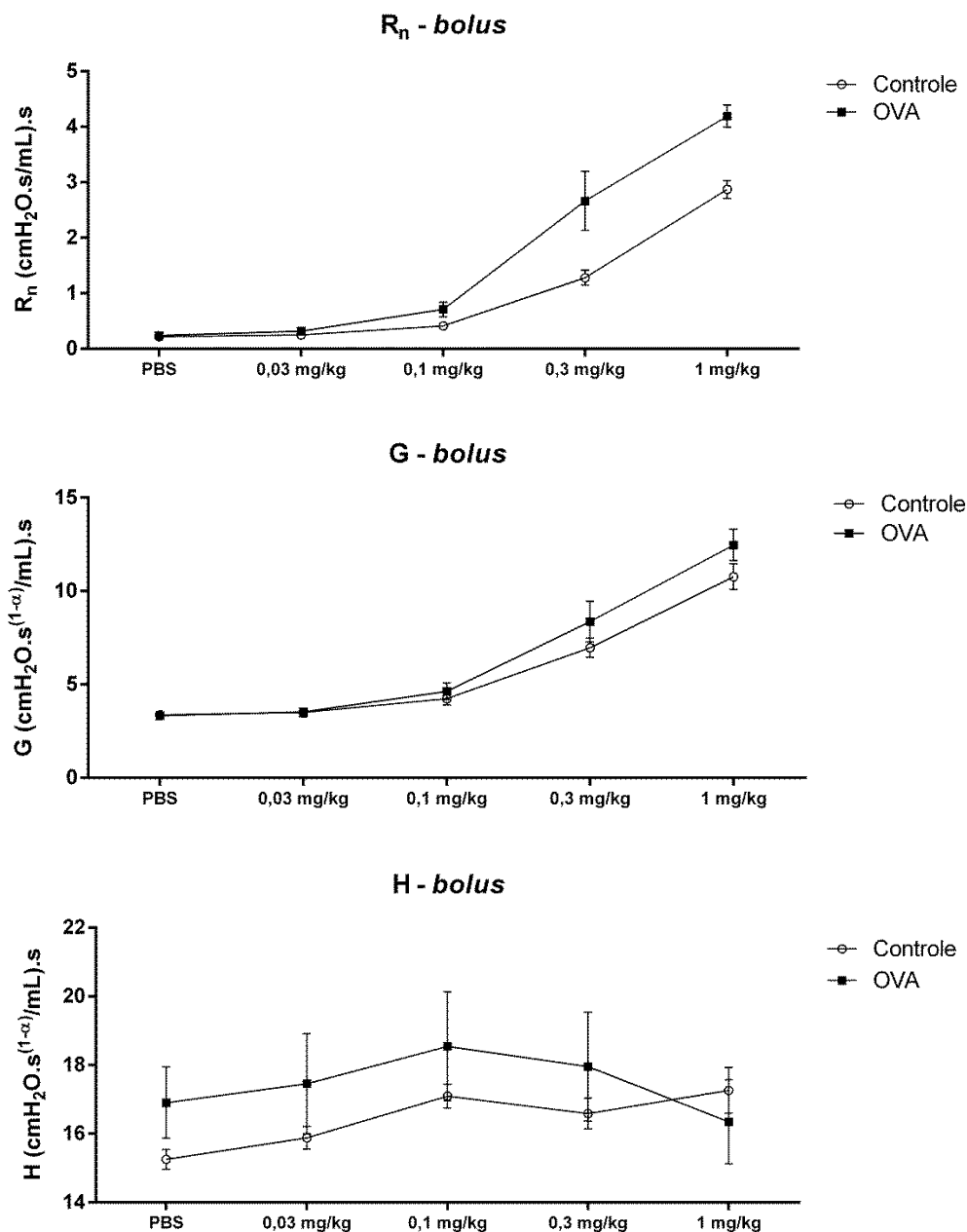
A análise apresentada acima para os animais SAMR1 é apresentada para os animais Balb/c na figura 23. Entretanto, como muitos valores de  $R_n$ ,  $G$  e  $H$  no pico de cada dose foram excluídos devido ao baixo ajuste do MFC, dois modelos de análise de variância foram utilizados. Em um deles foram consideradas medidas repetidas nas doses (o mais recomendado) e, para tal, caso o animal apresentasse um valor de COD abaixo de 0,9 em ao menos um pico de resposta este mesmo animal era excluído da análise. O segundo modelo foi análise de variância sem medidas repetidas e com isso foi possível utilizar um animal mesmo que houvesse a exclusão de um valor de pico referente a uma dose específica (COD<0,9), assim as demais doses eram utilizadas.

Figura 22 - Comparações dos valores de pico dos parâmetros  $R_n$ ,  $G$  e  $H$  dos animais SAMR1 no protocolo *bolus*. Os valores de  $p$  foram menores que 0,05 para idade e doses em todos os parâmetros, exceto para idade no  $R_n$  ( $p = 0,0597$ ). Média e erro-padrão.



Fonte: Próprio autor.

Figura 23 - Comparações dos valores de pico dos parâmetros  $R_n$ ,  $G$  e  $H$  dos animais Balb/c no protocolo *bolus*. No modelo sem medidas repetidas (gráficos abaixo) os valores de  $p$  foram menores que 0,001 para doses, grupos e interação para o  $R_n$ , menores que 0,0001 em doses para  $G$  e não significativo para  $H$ . No modelo de medidas repetidas os valores de  $p$  para doses ( $p < 0,0001$ ), interação ( $p = 0,011$ ) e grupos ( $p = 0,0062$ ) foram estatisticamente significante para o  $R_n$ , foram menores que 0,05 para doses e interação para  $G$ , o valor de  $p$  não foi significativo para grupos, doses e interação para  $H$ . Média e erro-padrão.



Fonte: Próprio autor.

### 4.3.2 Platô - infusão contínua

Nesta subseção são apresentados os gráficos referentes às comparações das duas linhagens no protocolo de infusão contínua via comparação dos valores de resposta no platô.

Na figura 24 são apresentadas as comparações dos parâmetros  $R_n$ ,  $G$  e  $H$  referentes aos valores de platô dos animais SAMR1 no protocolo infusão contínua. Os valores de  $p$  das análises de variância são apresentados nas figuras e os valores de  $p$  dos pós-testes, novamente, serão apresentados em outra subseção. Por fim, as comparações foram feitas para a última medida de cada dose e para a média de duas e três últimas medidas de cada dose.

A figura 25 mostra a comparação dos parâmetros por meio do platô para os animais Balb/c. Porém, como foram aplicados dois modelos de análise de variância no protocolo *bolus* dos animais Balb/c (devido ao número de animais excluídos), o mesmo foi realizado para o protocolo de infusão contínua nesta linhagem. Além disso, as comparações da infusão contínua, assim como no SAMR1, foram feitas para a última medida de cada dose e para a média de duas e três últimas medidas de cada dose.

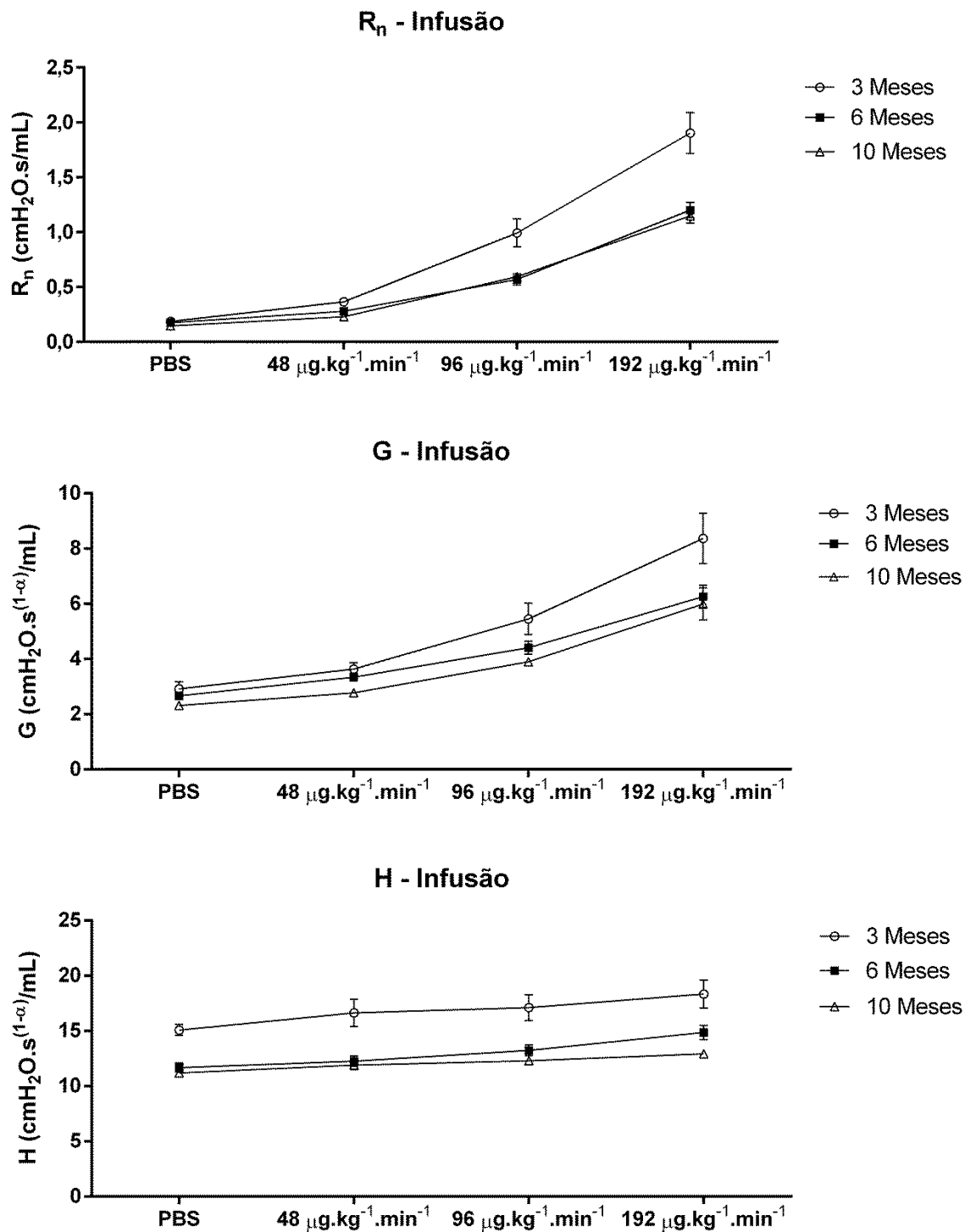
Os gráficos apresentados na figura 24 (SAMR1) e na figura 25 (Balb/c) foram realizados com o último ponto de cada dose, uma vez que mostraram um comportamento similar entre si.

## 4.4 Análise estatística - pico vs platô

Esta subseção tem por objetivo apresentar os valores tabelados dos pós-testes relativos às comparações realizadas por meio do pico ou platô dos animais SAMR1 e Balb/c. Como os resultados dos pós-teste das comparações realizadas por meio do pico/platô apresentam informações relevantes à discussão do tema, estes terão destaque nesta subseção.

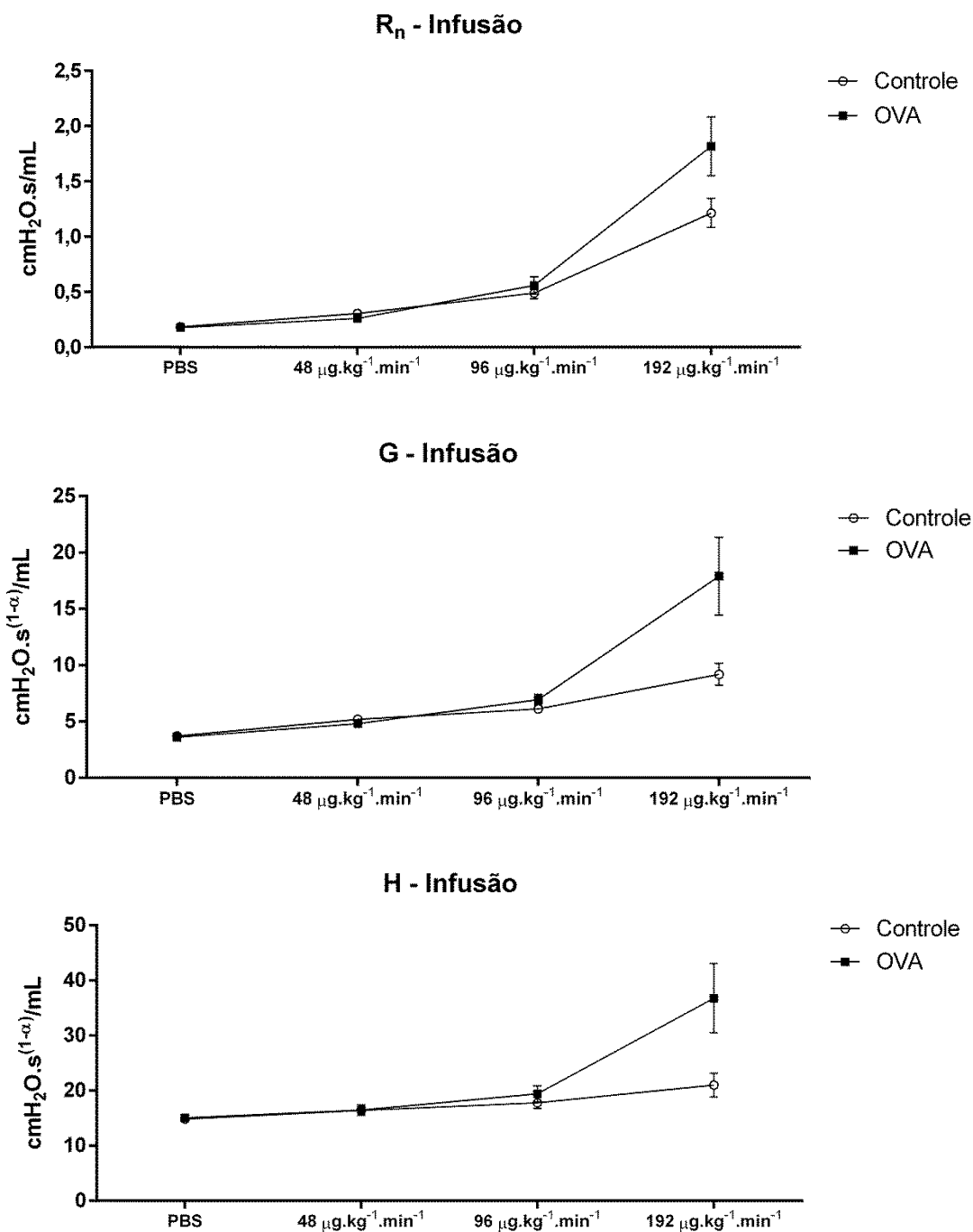
Na tabela 6 são apresentados os valores de  $p$  das comparações dos picos de resposta e do platô dos animais SAMR1 e na tabela 7 são apresentados os valores de  $p$  dos pós-testes dos animais Balb/c.

Figura 24 - Comparações dos valores de platô dos parâmetros  $R_n$ ,  $G$  e  $H$  dos animais SAMR1 em todas as idades no protocolo de infusão contínua. Os valores de  $p$  foram menores que 0,05 para idade e doses em todos os parâmetros. Média e erro-padrão.



Fonte: Próprio autor.

Figura 25 - Comparações dos valores de platô dos parâmetros  $R_n$ ,  $G$  e  $H$  dos animais Balb/c no protocolo de infusão contínua. No modelo sem medidas repetidas os valores de  $p$  foram menores que 0,05 para doses, grupos e interação na comparação do último ponto e das médias em todos os parâmetros, exceto o  $R_n$  na comparação utilizando o último ponto de cada dose ( $p = 0,065$ ). No modelo de medidas repetidas os valores de  $p$  para doses e interação e sujeitos foram menores que 0,05 em todos os cenários, entretanto para grupos os valores não foram estatísticos ( $0,086 \pm 0,039$ ). Média e erro-padrão.



Fonte: Próprio autor.

Tabela 6 - Valores de  $p$  dos pós-testes das análises via pico (a) e platô (b) dos animais SAMR1. NS - são significantivo.

a)

<i>bolus - Pico</i>				
Parâmetros	Doses	3 vs 6 meses	6 vs 10 meses	3 vs 10 meses
R <sub>n</sub>	PBS	NS	NS	NS
	0,03 mg/kg	NS	NS	NS
	0,1 mg/kg	NS	NS	NS
	0,3 mg/kg	<0,05	NS	NS
	1 mg/kg	<0,05	NS	NS
G	PBS	NS	NS	NS
	0,03 mg/kg	NS	NS	NS
	0,1 mg/kg	NS	NS	NS
	0,3 mg/kg	<0,01	NS	NS
	1 mg/kg	<0,001	NS	<0,001
H	PBS	<0,01	NS	<0,01
	0,03 mg/kg	<0,001	NS	<0,001
	0,1 mg/kg	<0,001	NS	<0,001
	0,3 mg/kg	<0,001	NS	<0,01
	1 mg/kg	<0,001	NS	<0,001

b)

Infusão contínua – Platô				
Parâmetros	Doses	3 vs 6 meses	6 vs 10 meses	3 vs 10 meses
R <sub>n</sub>	PBS	NS	NS	NS
	48 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	NS	NS	NS
	96 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	<0,001	NS	<0,001
	192 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	<0,001	NS	<0,001
G	PBS	NS	NS	NS
	48 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	NS	NS	NS
	96 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	NS	NS	<0,05
	192 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	<0,001	NS	<0,001
H	PBS	<0,01	NS	<0,001
	48 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	<0,001	NS	<0,001
	96 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	<0,001	NS	<0,001
	192 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	<0,01	NS	<0,001

Fonte: Próprio autor.



Tabela 7 - Valores de  $p$  dos pós-testes das análises via pico (a) e platô (b) dos animais Balb/c. NS - são significantivo.

a)

Pico - Controle vs OVA			
Parâmetros	Doses	Não repetidas	Medidas repetidas
R <sub>n</sub>	PBS	NS	NS
	0,03 mg/kg	NS	NS
	0,1 mg/kg	NS	NS
	0,3 mg/kg	<0,0001	<0,01
	1 mg/kg	<0,001	<0,001
G	PBS	NS	NS
	0,03 mg/kg	NS	NS
	0,1 mg/kg	NS	NS
	0,3 mg/kg	NS	NS
	1 mg/kg	NS	<0,01
H	PBS	NS	NS
	0,03 mg/kg	NS	NS
	0,1 mg/kg	NS	NS
	0,3 mg/kg	NS	NS
	1 mg/kg	NS	NS

b)

Infusão contínua - Platô				
Parâmetros	Doses	Controle vs OVA último ponto	Controle vs OVA média 2 pontos	Controle vs OVA média 3 pontos
R <sub>n</sub>	PBS	NS	NS	NS
	48 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$	NS	NS	NS
	96 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$	NS	NS	NS
	192 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$	<0,01	<0,001	<0,001
G	PBS	NS	NS	NS
	48 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$	NS	NS	NS
	96 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$	NS	NS	NS
	192 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$	<0,001	<0,0001	<0,0001
H	PBS	NS	NS	NS
	48 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$	NS	NS	NS
	96 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$	NS	NS	NS
	192 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$	<0,001	<0,0001	<0,01

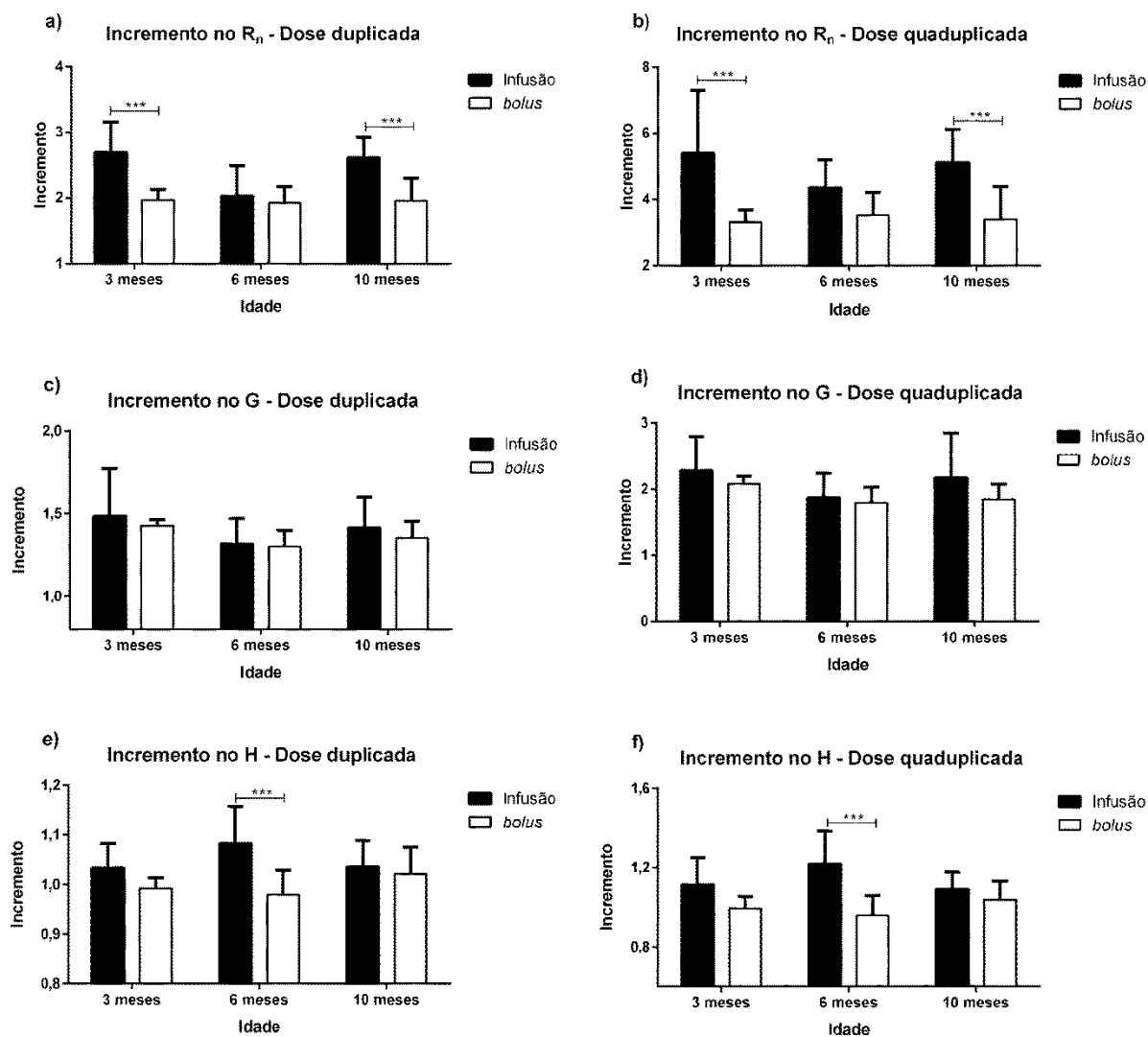
Fonte: Próprio autor.

#### 4.5 Comparação das curvas - *bolus* vs infusão contínua

Nesta seção são apresentados os dados do incremento (razão entre as respostas) dos parâmetros do MFC quando as doses foram duplicadas e quadruplicadas. No protocolo de infusão contínua foram utilizadas as doses de

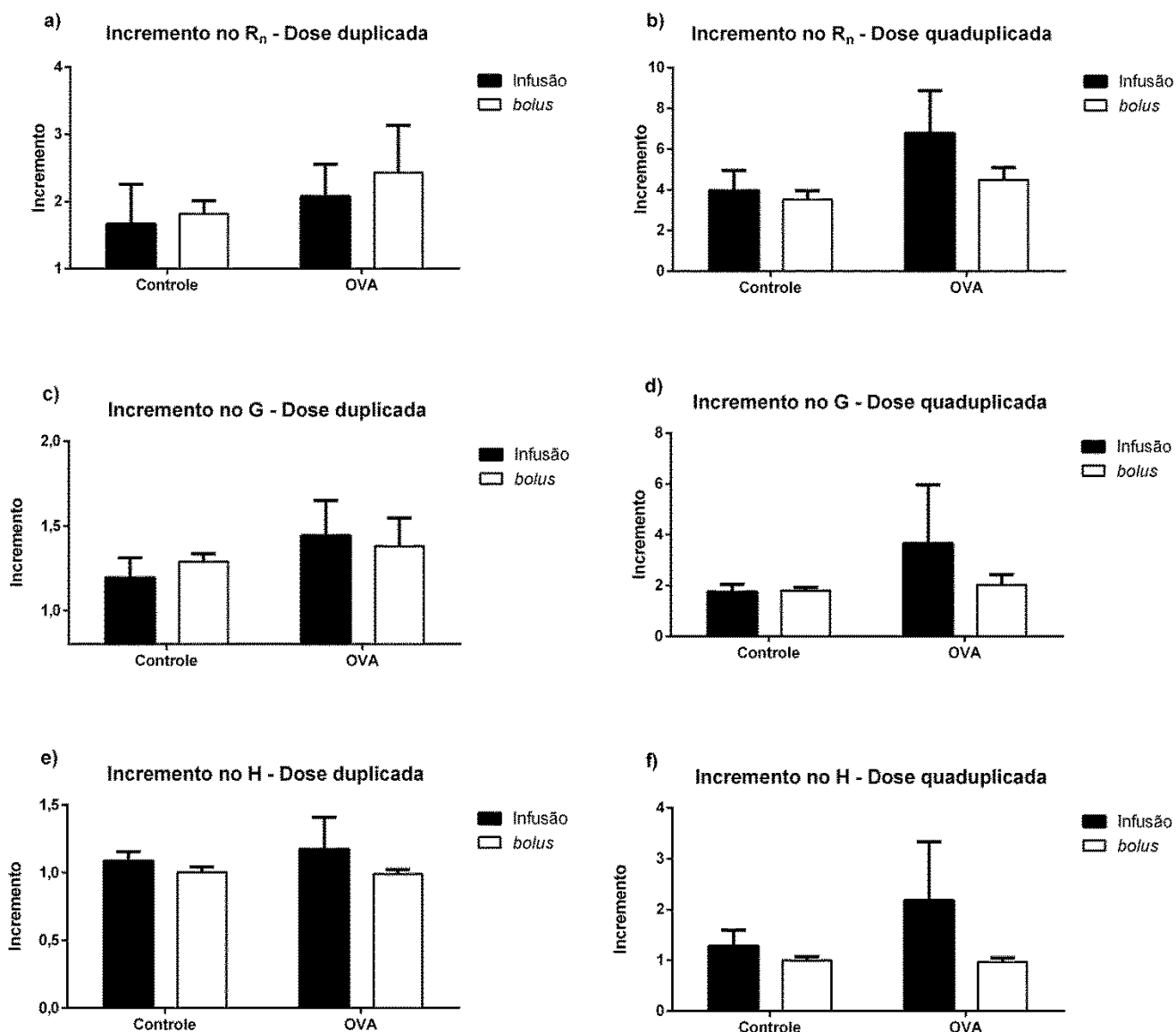
48 a 96 e 48 a 192  $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$  para verificar, respectivamente, a resposta frente ao dobro e quadruplo da dose nos animais SAMR1 (figura 26) e Balb/c (figura 27). Para o protocolo *bolus* foi realizada uma interpolação dos valores (ver descrição nos métodos) de pico para obter as doses de 100, 200 e 400  $\mu\text{g/kg}$ .

Figura 26 - O incremento de cada parâmetro quando as doses são dobradas para os animais SAMR1 ( $p < 0,03$  para idades em  $R_n$  e  $G$ ;  $p < 0,001$  para protocolos em  $R_n$  e  $H$ ) e quando são quadruplicadas ( $p < 0,05$  para idades em  $G$ ;  $p < 0,0001$  para protocolos em  $R_n$  e  $H$ ). Infusão contínua: 48 a 96 e 48 a 192  $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ . *Bolus*: 100 a 200 e 100 a 400  $\mu\text{g/kg}$ . \*\*\* corresponde a  $p < 0,001$ .



Fonte: Próprio autor

Figura 27 - O incremento de cada parâmetro quando as doses são dobradas para os animais Balb/c ( $p < 0,05$  para protocolos em  $R_n$  e  $G$ ) e quando são quadruplicadas ( $p = 0,0084$  para protocolos em  $R_n$ ; e  $p < 0,05$  para controle vs OVA em e  $H$ ) infusão contínua: 48 a 96 e 48 a 192  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ . Bolus: 100 a 200 e 100 a 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Valores não significativos no pós teste.



Fonte: Próprio autor

Por fim, a tabela 8 apresenta as doses necessárias, mediana e intervalo interquartil, para atingir 150, 200 e 300% da resposta basal do  $R_n$  nos protocolos de *bolus* e infusão contínua. Nesta tabela é possível verificar as doses em cada protocolo frente a uma resposta padronizada por animal em um

conjunto de incrementos fixos. Vale ressaltar que as doses em ambos os protocolos não são equivalentes, uma vez que a dose no protocolo *bolus* não é uma correção linear da dose no protocolo infusão contínua, isto é, não basta calcular a dose administrada ao longo do tempo de infusão.

Tabela 8 - Doses necessárias para atingir 150, 200 e 300% da resposta basal do  $R_n$  nos protocolos de *bolus* e infusão contínua dos animais a) SAMR1 e b) Balb/c. Mediana e Intervalo interquartilico (IQ).

a)

	Dose necessária para	<i>bolus</i> ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		infusão contínua ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ )	
		Mediana	(IQ)	Mediana	(IQ)
<b>3 meses</b>	150% do basal	44,8	(40,0 a 49,7)	33,0	(26,05 a 39,8)
	200% do basal	68,7	(59,15 a 77,8)	51,6	(40,5 a 56,6)
	300% do basal	111,1	(89,35 a 127,9)	69,9	(59,1 a 75,0)
<b>6 meses</b>	150% do basal	62,9	(54,9 a 83,2)	47,0	(38,0 a 53,8)
	200% do basal	95,4	(87,9 a 119,3)	66,9	(60,6 a 74,9)
	300% do basal	164,4	(140,4 a 186,1)	95,0	(79,1 a 118,5)
<b>10 meses</b>	150% do basal	59,9	(44,5 a 70,7)	40,6	(34,5 a 51,2)
	200% do basal	95,8	(72,8 a 116,7)	56,6	(53,5 a 63,8)
	300% do basal	150,1	(108,9 a 194,2)	76,1	(69,4 a 80,7)

b)

	Dose necessária para	<i>bolus</i> ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		infusão contínua ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ )	
		Mediana	(IQ)	Mediana	(IQ)
<b>Controle</b>	150% do basal	60,6	(35,9 a 83,5)	43,5	(34,3 a 52,0)
	200% do basal	113,4	(96,0 a 132,6)	68,4	(59,4 a 91,9)
	300% do basal	189,9	(153,6 a 206,3)	103,3	(82,4 a 142,9)
<b>OVA</b>	150% do basal	68,5	(48,4 a 70,6)	53,8	(36,8 a 75,9)
	200% do basal	105,2	(67,1 a 113,5)	79,4	(55,0 a 96,7)
	300% do basal	159,0	(96,3 a 170,1)	113,8	(80,0 a 125,3)

Fonte: Próprio autor

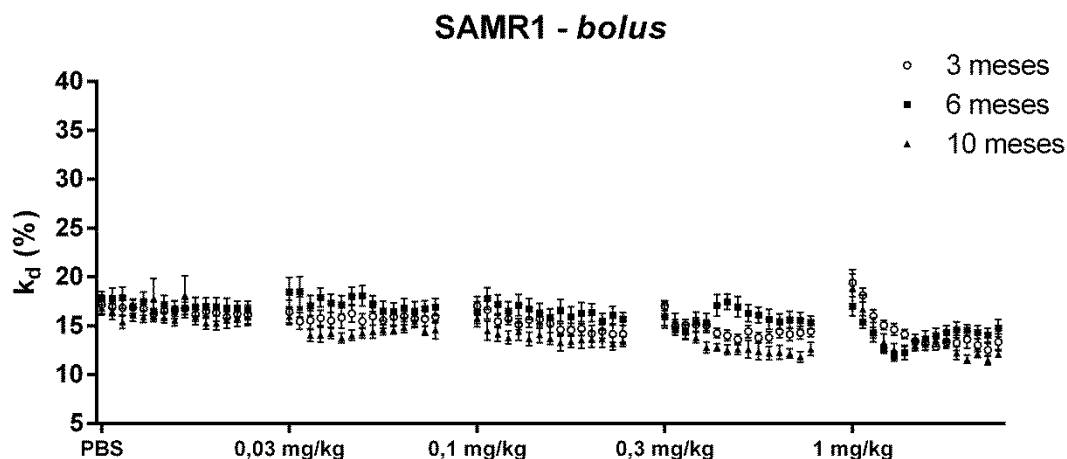
#### 4.6 Índice de distorção harmônica ( $k_d$ )

Serão apresentados os valores de  $k_d$  referentes às curvas dose-resposta das duas linhagens e dos dois protocolos.

##### 4.6.1 $k_d$ - bolus

Na figura 28 são apresentados os valores do índice de distorção harmônica ( $k_d$ ) dos animais SAMR1 no protocolo *bolus*.

Figura 28 - Valores do  $k_d$  dos animais SAMR1 no protocolo *bolus*. Média e erro-padrão.



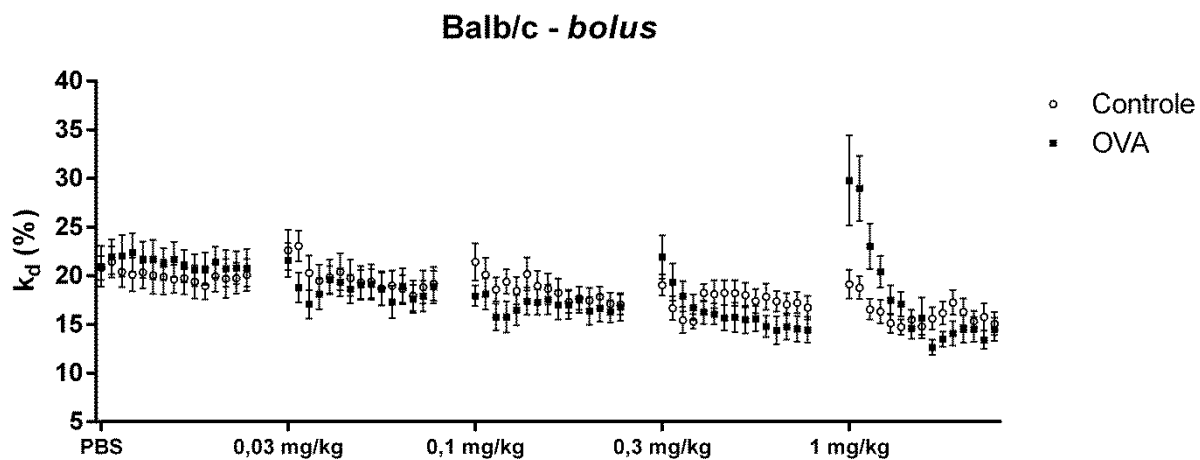
Fonte: Próprio autor.

Na figura 29 apresentam-se os valores do  $k_d$  dos animais Balb/c no protocolo *bolus*.

##### 4.6.2 $k_d$ - infusão contínua

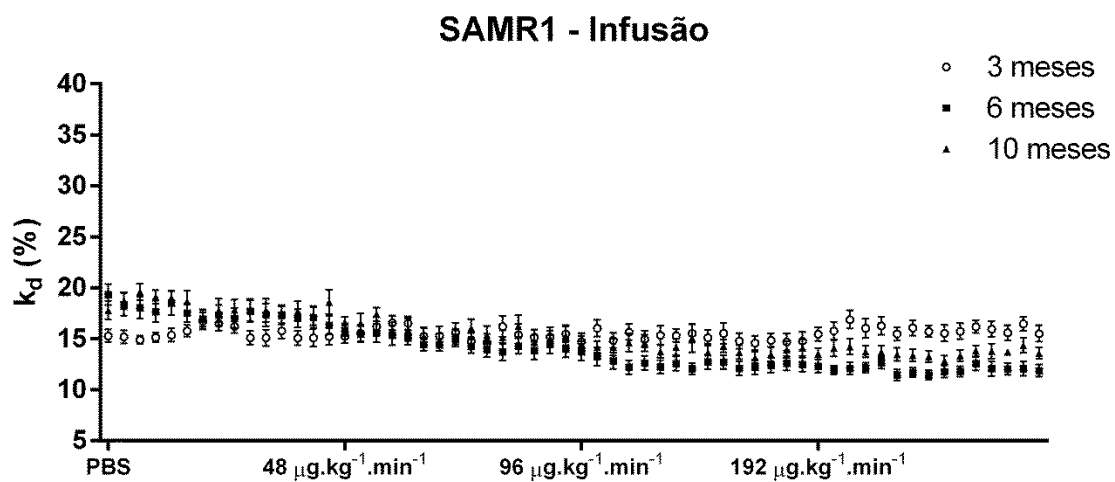
Na figura 30 são apresentados os valores do índice  $k_d$  dos animais SAMR1 no protocolo infusão contínua e na figura 31 dos camundongos Balb/c.

Figura 29 - Valores do  $k_d$  dos animais Balb/c no protocolo *bolus*. Média e erro-padrão.



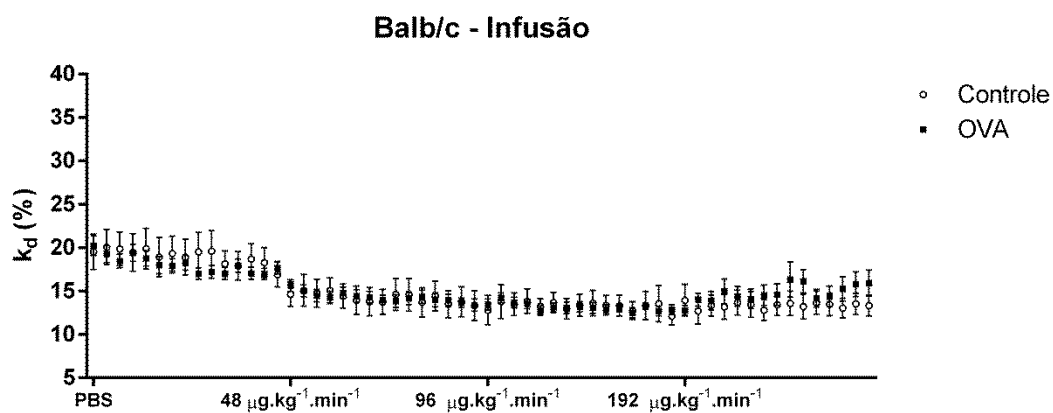
Fonte: Próprio autor.

Figura 30 - Valores do  $k_d$  dos animais SAMR1 no protocolo de infusão contínua. Média e erro-padrão.



Fonte: Próprio autor.

Figura 31 - Valores do  $k_d$  dos animais Balb/c no protocolo de infusão contínua. Média e erro-padrão.

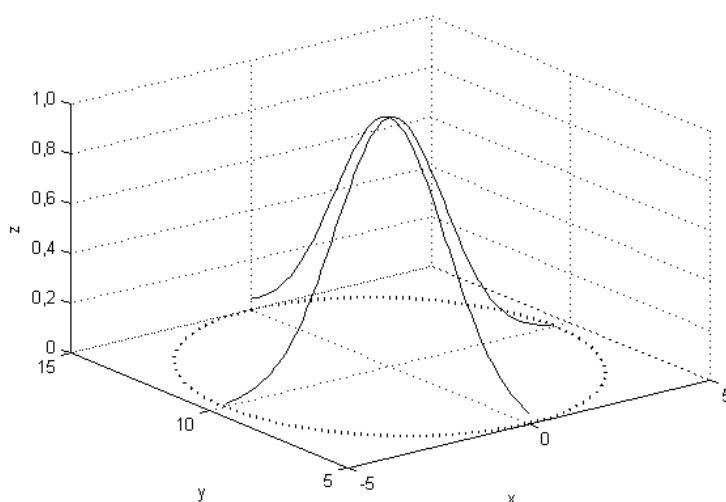


Fonte: Próprio autor.

#### 4.7 Volume do elipsoide

A figura 32 tem por objetivo representar graficamente o conceito do elipsoide descrita nos métodos. As curvas gaussianas representam, cada uma, o intervalo de confiança de um parâmetro do MFC. Caso fossem 3 parâmetros, a representação seria de um elipsoide.

Figura 32 - As curvas gaussianas representam, cada uma, o intervalo de confiança de dois parâmetros do MFC. A conjunção destes intervalos de confiança gera uma elipse tracejada.

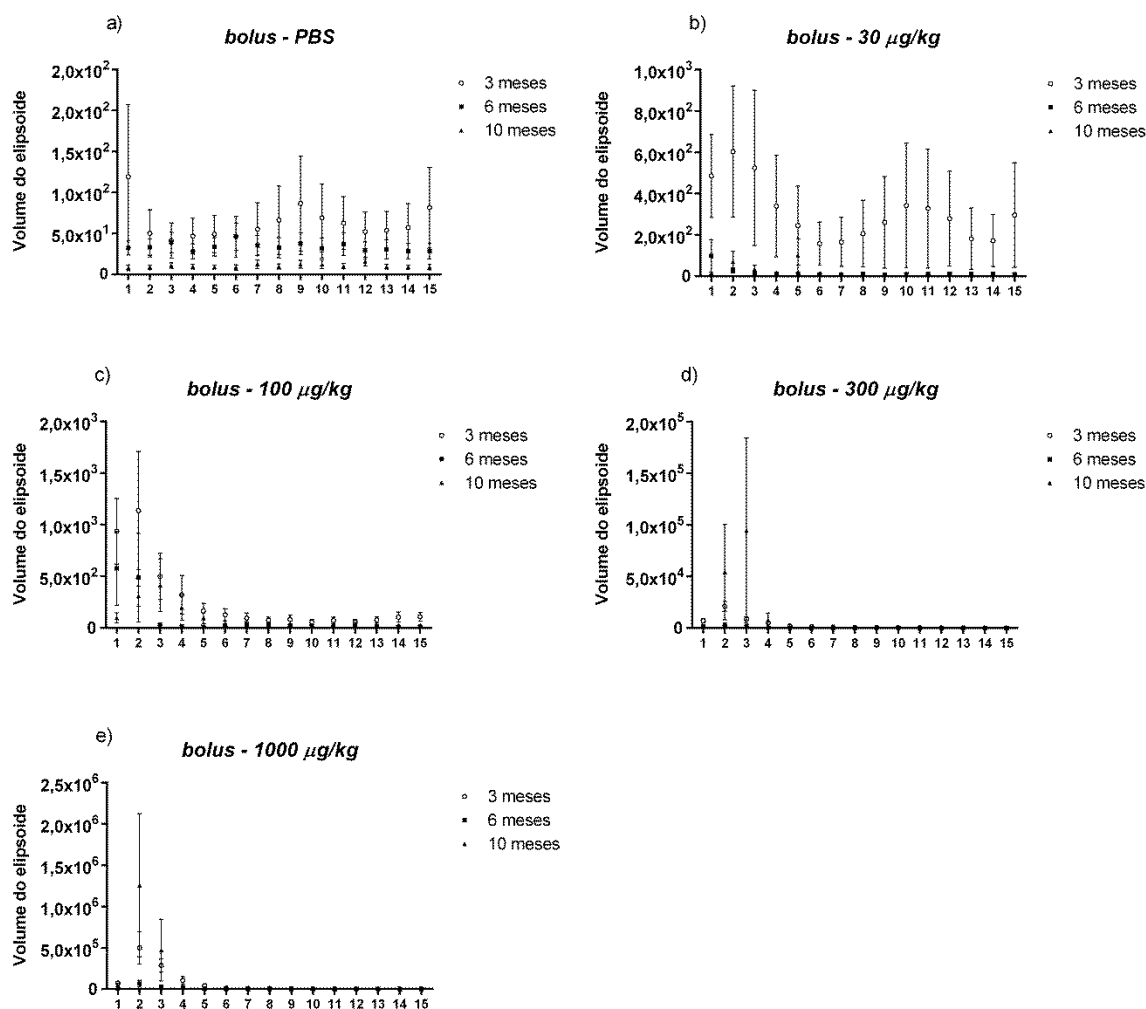


Fonte: Próprio autor.

#### 4.7.1 Volume do elipsoide – bolus

Nesta seção são apresentados os dados de volume relativos ao protocolo *bolus*. Na figura 33 são apresentados os valores de volume do elipsoide em cada dose de MCh dos animais SAMR1. Ressalta-se a importância de verificar a escala de cada gráfico.

Figura 33 - Valores dos volumes dos elipsoides dos animais SAMR1 em todas as doses do protocolo *bolus*. Média e erro-padrão.

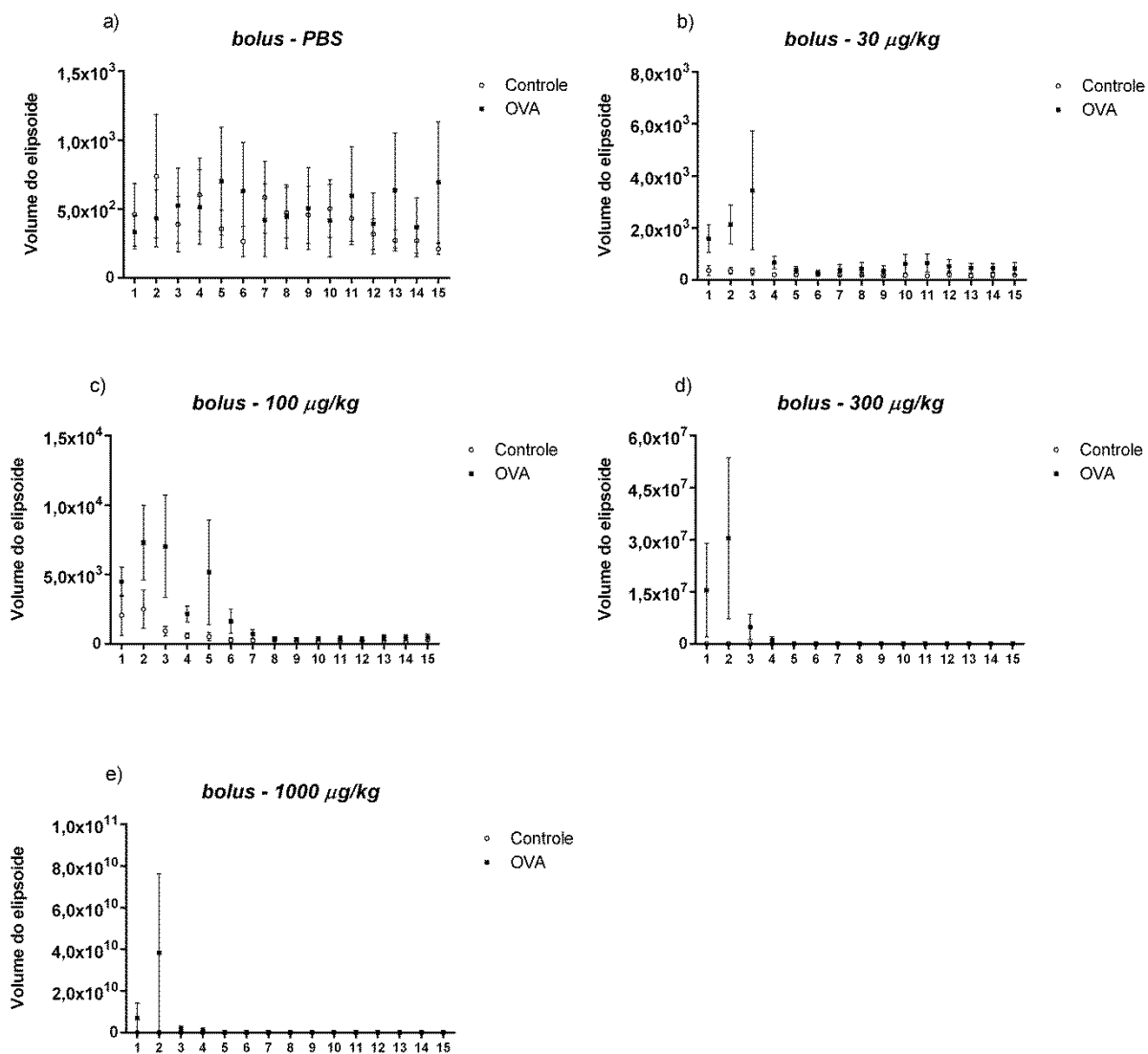


Fonte: Próprio autor.

Na figura 34 são apresentados os valores de volume do elipsoide no protocolo *bolus* dos animais Balb/c.



Figura 34 - Valores dos volumes dos elipsoides dos animais Balb/c em todas as doses do protocolo *bolus*. Média e erro-padrão.

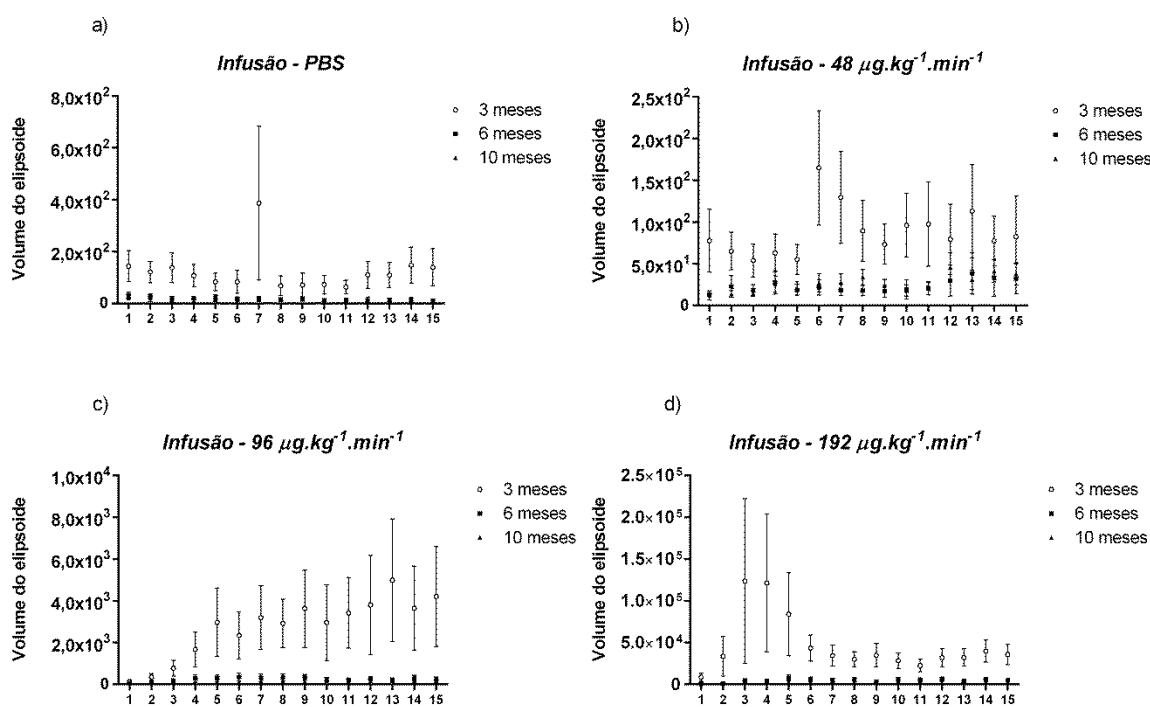


Fonte: Próprio autor.

#### 4.7.2 Volume do elipsoide - infusão contínua

Nesta subseção são apresentados os valores de volume do elipsoide referentes ao protocolo de infusão contínua. Na figura 35 são apresentados os valores de volume do elipsoide em cada dose de MCh dos animais SAMR1.

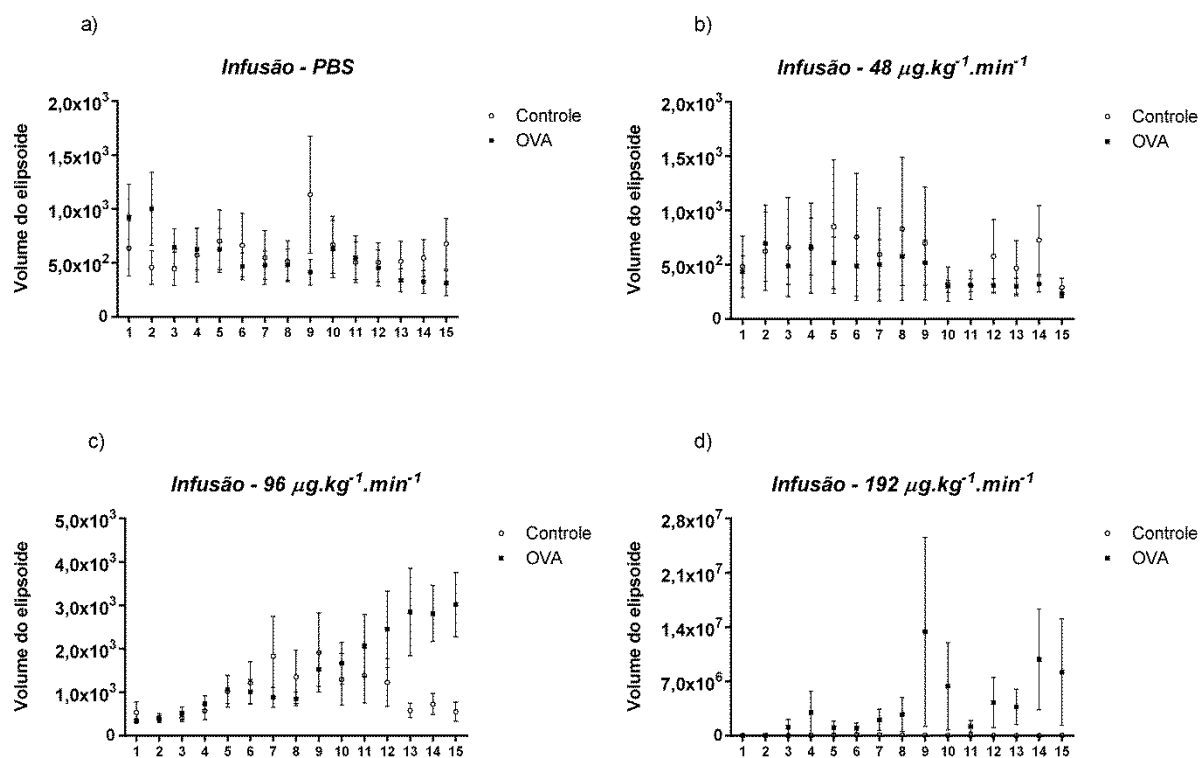
Figura 35 - Valores dos volumes dos elipsoides dos animais SAMR1 em todas as doses do protocolo de infusão contínua. Média e erro-padrão.



Fonte: Próprio autor.

Por sua vez, na figura 36 têm-se os dados de volume do elipsoide no protocolo de infusão contínua para os animais Balb/c.

Figura 36 - Valores dos volumes dos elipsoides dos animais Balb/c em todas as doses do protocolo de infusão contínua. Média e erro-padrão.



Fonte: Próprio autor.

#### 4.8 Exclusão dos animais - COD

Nesta seção são apresentadas as tabelas que sumarizam as exclusões em decorrência de valores não aceitáveis de COD, isto é, valores de COD abaixo de 0,9 (ROBICHAUD; FERREYDOONZAD; SCHUESSLER, 2015). A tabela 9 apresenta os animais excluídos no protocolo *bolus* dentre os SAMR1

Tabela 9 - Animais excluídos no protocolo *bolus* dentre os SAMR1.

	3 meses	6 Meses	10 Meses
<b>Animais excluídos</b>	7	2	2
<b>Animais não excluídos</b>	8	11	9

Fonte: próprio autor

Na tabela 10 são apresentados os animais que foram ou não excluídos no protocolo *bolus* dentre os camundongos Balb/c. Não foi realizada uma

tabela para os animais infusão contínua, uma vez que para um único animal apresentou COD<0,9 na última medida da última dose. Neste animal, foi utilizada a penúltima medida. Ademais, outro animal apresentou um valor de COD insatisfatório nas penúltimas medidas da última dose e neste a última mensuração representou os valores de média para a análise.

Tabela 10 - Animais excluídos no protocolo *bolus* - Balb/c.

	<b>Controle</b>	<b>OVA</b>
<b>Animais excluídos</b>	5	8
<b>Animais não excluídos</b>	4	3

Fonte: próprio autor.

Além disso, como um mesmo animal pode apresentar valores insatisfatórios de ajuste do modelo em quaisquer medidas da curva de dose-resposta, na tabela 11 são apresentados os valores totais de medidas excluídas no protocolo *bolus*.

Tabela 11 - Medidas excluídas no protocolo *bolus* - Balb/c.

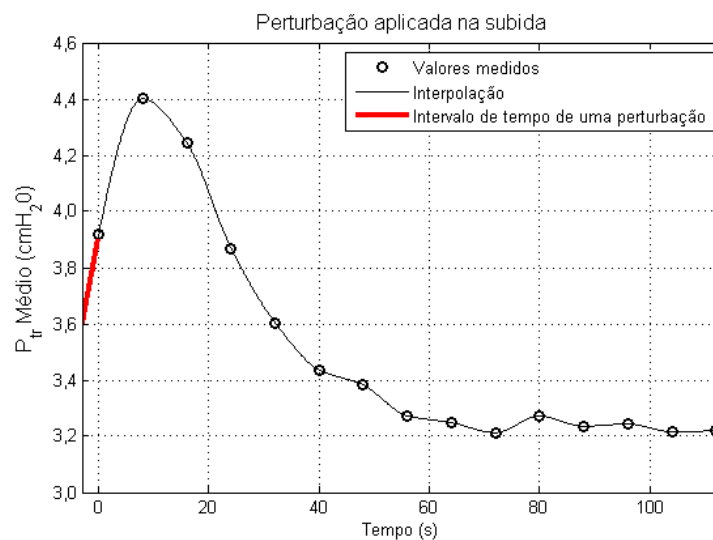
	<b>Controle</b>	<b>OVA</b>
<b>Medidas excluídas</b>	7	17
<b>Medidas não excluídas</b>	38	38

Fonte: próprio autor.

#### 4.9 Amostragem e valor de pico

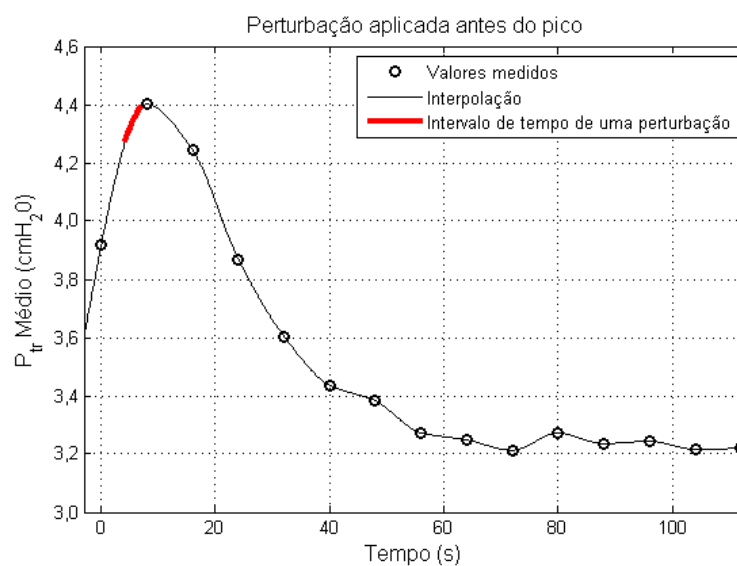
Nas figura 37-39 são apresentados os valores de pressão traqueal de um animal exemplo do protocolo *bolus* na última dose de uma curva dose-resposta e uma interpolação de seus pontos. Em vermelho é apresentado o intervalo de tempo correspondente aos 3 segundos necessários para a perturbação utilizada. Na figura 40, mostra-se um exemplo de uma possível curva (última dose de uma curva dose-resposta) e a perda do pico de resposta.

Figura 37 - Valores de pressão traqueal de um animal exemplo na última dose e uma interpolação de seus pontos. Protocolo *bolus*. Em vermelho é apresentado o intervalo de tempo correspondente aos 3 segundos necessários para a perturbação utilizada para o MFC. Perturbação aplicada na subida.



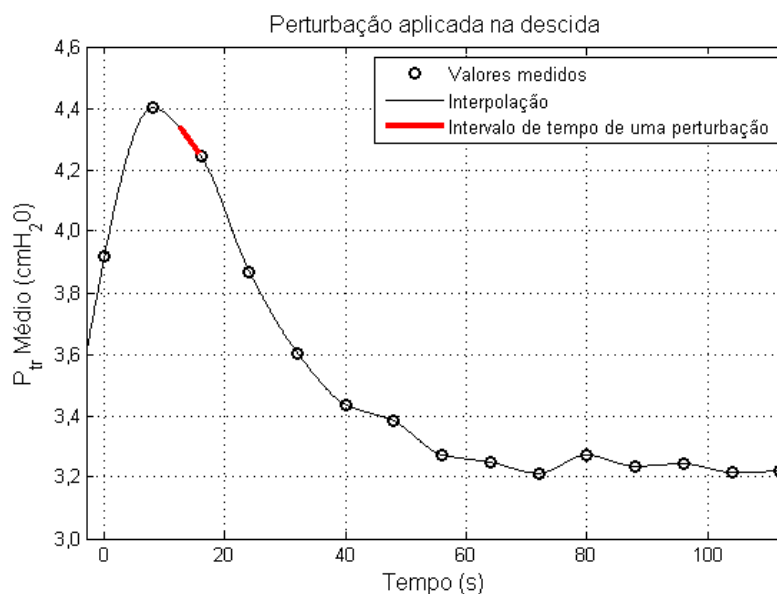
Fonte: Gráficos realizados pelo próprio autor.

Figura 38 - Valores de pressão traqueal de um animal exemplo na última dose e uma interpolação de seus pontos. Protocolo *bolus*. Em vermelho é apresentado o intervalo de tempo correspondente aos 3 segundos necessários para a perturbação utilizada para o MFC. Perturbação aplicada antes do pico.



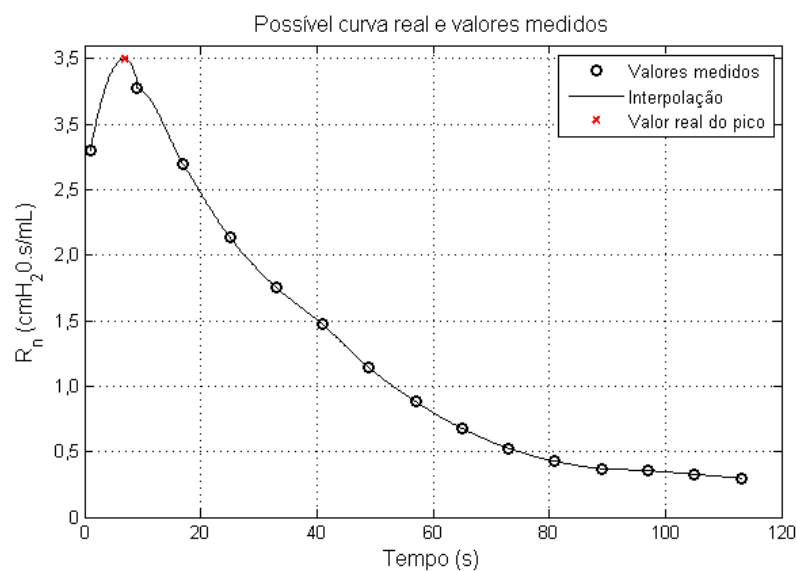
Fonte: Gráficos realizados pelo próprio autor.

Figura 39 - Valores de pressão traqueal de um animal exemplo na última dose e uma interpolação de seus pontos. Protocolo *bolus*. Em vermelho é apresentado o intervalo de tempo correspondente aos 3 segundos necessários para a perturbação utilizada para o MFC. Perturbação aplicada na descida.



Fonte: Gráficos realizados pelo próprio autor.

Figura 40 - Exemplo de uma possível curva e a perda do pico de resposta.



Fonte: Gráfico realizado pelo próprio autor.

## 5 Discussão

Neste trabalho foram utilizadas duas linhagens de camundongos: linhagem SAMR1 e Balb/c. Assim, foi possível estudar as diferenças entre o protocolo de aplicação em *bolus* e de infusão contínua em um modelo de envelhecimento e em um protocolo de inflamação pulmonar por ovalbumina. Nos animais SAMR1 esperava-se obter diferenças entre as idades principalmente na elastância, por sua vez, na linhagem Balb/c esperava-se obter diferenças entre OVA e controle principalmente na resistência de vias aéreas.

Inicialmente utilizou-se a linhagem SAMR1 (“*accelerated senescence-resistant mice*”) (KUROZUMI et al., 1994; TERAMOTO et al., 1994) para a qualificação deste doutoramento. Além disso, neste ano e com esta linhagem, foi publicado um trabalho na revista “*Experimental Biology and Medicine*”. intitulado: “*Respiratory mechanics evaluation of mice submitted to intravenous methacholine: bolus vs. continuous infusion*”. Este trabalho encontra-se na íntegra no APÊNDICE I deste manuscrito.

Os animais SAMR1 são resistentes ao envelhecimento e são utilizados em estudos coorte, em geral, como controle de uma linhagem de senescência acelerada (SAM). Os animais da linhagem SAM e SAMR apresentam algumas características do sistema respiratório descritas na literatura, tais como comportamento de curva PV e análises morfológicas do tecido pulmonar (TERAMOTO et al., 1994), o que a torna uma linhagem passível de ser elencada em estudos do sistema respiratório no envelhecimento.

O processo de envelhecimento torna-se um cenário apropriado para se comparar os protocolos de injeção de MCh uma vez que a população mundial apresenta um aumento na expectativa de vida e há um aumento da prevalência de doenças associadas ao envelhecimento (BEARD et al., 2016; TINDALE; SALEMA; BROOKS-WILSON, 2019).

No presente estudo, os animais da linhagem SAMR1 foram estudados com 3, 6 e 10 meses de vida. Sendo assim, foi possível comparar a mecânica

respiratória em animais de diferentes idades e, com isto, verificar as diferenças e similaridades nos protocolos de aplicação em *bolus* e de infusão contínua.

A segunda linhagem estudada neste trabalho foi a linhagem Balb/c. Esta linhagem é prevalente na literatura e é utilizada em modelo de inflamação pulmonar por OVA (MORI et al., 2017; VITORASSO et al., 2020a; ZOSKY et al., 2008). O modelo de OVA na inflamação pulmonar tem por objetivo mimetizar a asma humana, que por sua vez é prevalentemente eosinofílica, assim como o protocolo do presente trabalho (UMAÑA; TAVARES-DE-LIMA, 2019).

Esta predominância eosinofílica pode ser vista na tabela 5. Ainda acerca do lavado broncoalveolar (Bal), houve diferença na contagem total dos controles e OVA entre os protocolos *bolus* e infusão contínua e isto pode ter ocorrido devido aos lotes dos animais. Mais animais chegaram para completar a amostra dos animais do protocolo de infusão contínua. Entretanto, ressalta-se que as comparações foram pareadas, isto é, no mesmo dia, animais controle e OVA foram estudados. Quanto aos animais SAMR1, houve uma diminuição não estatística da contagem total nos animais do protocolo infusão contínua e uma diminuição estatística na contagem total dos animais mais velhos no protocolo *bolus*.

O cenário de estudo para o modelo OVA é propício uma vez que a asma pode afetar de 1 a 16% (ROTHER et al., 2018) da população mundial e pode apresentar casos não diagnosticados e não tratados (REHMAN; AMIN; SADEEQA, 2018). Não obstante, ela pode ser estudada tanto em humanos quanto em modelos com outros animais. O principal objetivo de se estudar a asma ou outra inflamação pulmonar é fomentar a pesquisa base com o fim último de se modelar ou entender a asma em humanos.

Ambas as linhagens foram submetidas aos mesmos protocolos de MCh (*bolus* e infusão contínua). A MCh torna-se necessária, uma vez que para a avaliação da mecânica respiratória, em muitos casos, é necessário desafiar o sistema respiratório a fim de evidenciar diferenças entre grupos. Uma das maneiras de realizar este desafio é por meio da MCh, seja em humanos (SUMINO et al., 2012) ou em animais (KIM et al., 2015).



Apesar de esta droga parassimpatomimética ter sua ação descrita na literatura, a resposta do sistema respiratório frente a esta pode ser diferente em diversas situações. Os fatores que influenciam na resposta podem ser intrínsecos ao animal (como a linhagem, idade e inflamação, no caso do presente estudo) ou externos como administração da droga em uma curva dose-resposta.

Como citado na revisão de literatura, dois estudos que comparam a administração de MCh *i.n.* e *i.v.* (JONASSON et al., 2009; PETÁK et al., 1997) apontam para a importância de se estudar a maneira em que o broncoconstritor é administrado.

O estudo do Peták et. al. (PETÁK et al., 1997) foi conduzido em ratos utilizando um dispositivo “wavetube” na avaliação da mecânica respiratória. Por sua vez, Jonasson et. al. (JONASSON et al., 2009) utilizaram um ventilador comercial para pequenos animais, o mesmo utilizado no presente estudo.

Há um estudo que compara os resultados obtidos por estas diferentes técnicas de avaliação da mecânica respiratória (MORI et al., 2017) e eles encontraram que os parâmetros do MFC obtidos por meio das diferentes técnicas não são comparáveis, isto é, não são intercambiáveis, ao menos sem alguma correção.

As diferenças entre o presente estudo e dois estudos anteriores (SALERNO; LUDWIG, 1996; THOMAS et al., 2009) que, de alguma forma, compararam *bolus* e infusão contínua são, para o presente trabalho: o uso de um ventilador comercial (em comparação com o estudo do Salerno e Ludwig); uso do MFC, as linhagens utilizadas; os modelos biológicos escolhidos; e o foco no estudo e na repercussão dos protocolos frente o modelo matemático aplicado, como, *e.g.*, perda dos valores de pico.

Os resultados aqui apresentados indicam que as diferenças na resposta dos parâmetros relacionados às vias aéreas e ao parênquima, em ambos os protocolos, foram similares nos animais SAMR1. Ademais, principal parâmetro afetado pela idade foi a elastância ( $H$ ).

Entretanto, o protocolo *bolus*, para os animais Balb/c, mostrou-se mais sensível às diferenças entre grupos nos parâmetros relacionados às vias aéreas, enquanto o protocolo de infusão contínua foi mais sensível aos

parâmetros relacionados ao parênquima pulmonar. Assim, dependendo das variáveis de interesse (relacionadas às vias aéreas ou ao parênquima), o pesquisador pode selecionar o protocolo (*bolus* ou infusão contínua) de acordo com o modelo animal e o delineamento do estudo. Além disso, essas informações devem ser levadas em consideração durante a interpretação dos resultados.

Uma explicação possível para esse fenômeno é o instante de tempo em que os parâmetros são medidos. Durante o protocolo *bolus*, as medidas observadas foram os valores de pico (até 15 s), enquanto os valores de infusão contínua foram obtidos durante o platô, ou seja, após 5 minutos (BOZANICH et al., 2007). Em uma comparação inflamação vs não inflamação, a absorção e o intervalo de tempo de degradação da MCh influenciaram nas diferenças observadas entre *bolus* e infusão contínua nos animais Balb/c. Logo, hipotetiza-se que para distinguir os parâmetros do parênquima pulmonar em uma comparação de grupo inflamado e não inflamado, o tecido pulmonar deve estar sob influência da MCh por um maior intervalo de tempo.

Outra característica de curva a ser destacada é o fato de, na última dose (figura 19), alguns animais OVA não terem apresentado um platô totalmente desenvolvido (análise qualitativa). Portanto, pode-se aumentar o intervalo de tempo da avaliação nos grupos inflamados em um novo trabalho.

Além disso, no presente trabalho, foi proposta uma comparação direta de ambos os protocolos (padrão da curva). Estudou-se o incremento dos parâmetros quando as doses são dobradas e quadruplicadas, a fim de comparar o comportamento de resposta à dose.

Por meio da figura 26 verifica-se que o protocolo de infusão contínua apresentou, em geral, nos animais SAMR1, um maior incremento na elastância ( $H$ ) e resistência ( $R_n$ ) quando comparado ao *bolus*. Quanto aos animais Balb/c, não houve diferença estatisticamente significativa entre os incrementos no protocolo *bolus* e infusão contínua. Apesar de, visualmente, apresentar um maior incremento no protocolo de infusão contínua para os parâmetros de parênquima pulmonar.

Complementarmente, a tabela 8 apresenta as doses necessárias para um mesmo conjunto de incrementos em ambos os protocolos. Esta tabela

mostra que não é possível calcular de forma direta uma dose equivalente entre *bolus* e infusão contínua. Isto ocorre em ambas as linhagens.

Esse fenômeno pode estar associado à rápida absorção e degradação da droga (KATZUNG, 2012), especialmente no protocolo de *bolus*. Como a MCh é injetada continuamente no protocolo de infusão contínua, o incremento de resposta observado com o incremento na concentração do fármaco pode ser maior neste protocolo devido a uma homeostasia na degradação e infusão contínua. Para o protocolo *bolus*, o efeito é rapidamente instaurado e a MCh é logo degradada. Contudo, essas análises não fornecem uma correspondência de dose, o que exigiria os coeficientes farmacocinéticos e sua posterior aplicação na modelagem da degradação e absorção, mas este não é o escopo do presente manuscrito.

Além da capacidade de diferenciação de grupos, a confiabilidade dos parâmetros é imperativa. Como o MFC é um modelo linear (BATES, 2009; MORIYA; MORAES; BATES, 2003), este só deve ser aplicado quando o sistema respiratório se comportar linearmente. Uma maneira prática de avaliar o ajuste do modelo se dá por meio do Coeficiente de Determinação (COD). Esse coeficiente está disponível na aplicação de controle do ventilador.

Um limiar sugerido é  $COD > 0,9$  (ROBICHAUD; FERREYDOONZAD; SCHUESSLER, 2015). Este limiar influenciou diretamente nos modelos de ANOVA elencados, uma vez que a exclusão de valores influencia no modelo selecionado. A análise relacionada ao protocolo *bolus* foi mais impactada, devido às exclusões pelo COD, que a análise relacionada ao protocolo de infusão contínua. Como o presente texto pode apresentar uma exposição dos resultados mais detalhada, foram apresentados nos resultados os desfechos da ANOVA com medidas repetidas (ideal) e sem medidas repetidas (figura 23, figura 25 e tabela 7).

Apesar de o COD ser um parâmetro facilmente encontrado em ventiladores comerciais para pequenos animais e ser um critério de ajuste do modelo, este não mensura diretamente a linearidade do sistema. No entanto, a associação entre COD e  $k_d$  foi demonstrada durante uma alta dose de MCh (a última dose aqui utilizada) na inflamação pulmonar (VITORASSO et al., 2020a). Para avaliar, especificamente, a não linearidade foram utilizados os valores de

$k_d$ , que quantificam o grau de não linearidade do sistema nas entradas do SPRN.

A figura 29 apresenta um aumento dos valores de  $k_d$  logo após a injeção de MCh. Estes são os momentos de maior interesse no protocolo *bolus* e o aumento no  $k_d$  foi maior no grupo OVA que nos SAMR1. No protocolo de infusão contínua, os valores de  $k_d$  permanecem praticamente constantes.

Em ambos os protocolos, os valores de  $k_d$  mostraram-se mais baixos na primeira dose em comparação à aplicação do PBS, marcadamente no protocolo de infusão contínua. Possivelmente, esse fenômeno está relacionado ao bloqueio muscular. Apesar de ter se esperado 7 minutos, utilizado previamente, após a injeção do paralisante muscular (brometo de pancurônio) para o início do protocolo de avaliação da mecânica respiratória, seu pico de ação pode ocorrer após um intervalo de tempo maior; e músculos respiratórios não completamente bloqueados podem aumentar a não linearidade.

Outra análise de confiabilidade, no caso uma medida de incerteza, foi a medida do volume do elipsoide da região de confiança dos parâmetros do MFC. Ao que tudo indica, esta maneira de se verificar a conjunção dos intervalos de confiança dos parâmetros do modelo ainda não foi apresentada na literatura vigente. Assim, este método ainda carece de um aporte da literatura científica.

Entretanto, uma vez que os parâmetros utilizados no cálculo deste elipsoide foram devidamente publicados (THAMRIN et al., 2004); e que os dados obtidos estão em conformidade com os valores do  $k_d$ , parece razoável que esta maneira de se exprimir os dados de confiabilidade seja confiável.

A hipótese de que estes valores estivessem em conformidade com os valores de  $k_d$  surge da expectativa de que a incerteza aumente com o incremento da heterogeneidade e da não-linearidade do sistema. Assim como o percebido, principalmente, nos animais Balb/c no grupo OVA e protocolo *bolus*.

Outrossim, além da confiabilidade dos dados medida direta ou indiretamente por meio do COD,  $k_d$  e volume do elipsoide; outros pontos tornam-se relevantes no que concerne à avaliação da mecânica respiratória por FOT. A mecânica respiratória é realizada por meio de uma perturbação

volumétrica aplicada ao sistema respiratório. A perturbação utilizada neste trabalho tem uma duração de 3 segundos.

Este fato é relevante na discussão do protocolo *bolus*, uma vez que a MCh possui um efeito muito rápido após administração (BATES et al., 2012). Com isto, o segmento da curva dose resposta referente a uma dose possui uma ascensão rápida e um decaimento característicos da figura 14. Logo, como a perturbação não possui uma duração desprezível, na avaliação de mecânica em um protocolo *bolus* podem ocorrer flutuações não modeladas no sinal de pressão.

A MCh, como citado, apresenta uma ação rápida (BATES et al., 2012; COJOCARU et al., 2008). Assim, a perturbação pode ocorrer em uma fase ascendente, descendente ou contendo o pico da dose (figuras 37-39) de cada segmento de curva (ainda que esta última seja pouco provável). Ainda que estas repercussões não tenham sido estudadas no presente estudo, conjectura-se que os parâmetros do MFC possam sofrer alterações dependendo do momento que é aplicado no segmento de curva.

Outro erro pode ocorrer devido ao fato de ser realizada uma amostragem e não uma medição contínua, ou seja, pode ocorrer a não correspondência entre o valor máximo de um parâmetro (figura 40) e o pico de resposta verdadeiro, pelo simples fato de a avaliação não ser realizada com um intervalo de tempo desprezível entre mensurações. Isto é, há um intervalo de tempo considerável entre cada perturbação. Este intervalo corresponde ao intervalo de tempo dado entre duas perturbações consecutivas e o tempo correspondente à perturbação em si.

Portanto, a comparação dos protocolos foi feita à luz das diferenças destes em duas linhagens de camundongos. Foi apresentada a comparação dos parâmetros e padrão de curva e como estes diferiam nos modelos animais apresentados. Ademais, foi estudada a confiabilidade do modelo em mais de uma maneira, nas diferentes situações apresentadas e, por fim, foram discutidas as problemáticas referentes ao protocolo *bolus*.

O protocolo *bolus* apresentou menor ajuste do modelo; maior não linearidade; e menor confiabilidade que o protocolo de infusão contínua em ambas as linhagens, mas mais especificamente nos Balb/c. Estes achados

foram encontrados nos momentos de maior interesse, isto é, no pico de resposta observados no protocolo *bolus*.

Além disso, para animais SAMR1, a capacidade de discriminar os parâmetros de vias aéreas e parênquima nas idades estudadas foi similar nos protocolos *bolus* e infusão contínua. No entanto, para os Balb/c, o protocolo *bolus* foi mais sensível para diferenciar a resistência das vias aéreas ( $R_n$ ) durante a comparação controle vs inflamação. Por sua vez, nesse cenário e linhagem, o protocolo de infusão contínua foi mais sensível à elastância ( $H$ ) e à dissipação de energia dos tecidos ( $G$ ), logo, variáveis relacionadas ao parênquima pulmonar. Portanto, essas informações devem ser levadas em consideração durante o delineamento do estudo de um modelo de inflamação pulmonar.

## 5.1 Conclusões

O objetivo da presente tese foi comparar dois protocolos de injeção de Metacolina (*bolus* e infusão contínua), por meio do MFC, em duas linhagens de camundongos. Os animais estudados foram da linhagem SAMR1 e da linhagem Balb/c. Conseqüentemente, os animais SAMR1 fizeram parte de um modelo de envelhecimento e os animais Balb/c participaram de um modelo de inflamação pulmonar. Este objetivo foi cumprido por meio dos resultados apresentados nesta tese, por meio do artigo publicado na *Experimental Biology and Medicine* (VITORASSO et al., 2020b) e por meio dos resultados apresentados no artigo com os animais Balb/c que se encontra em revisão na *Respiratory Physiology & Neurobiology*.

Teve-se como objetivo específico aplicar e detalhar as técnicas de *bolus* e infusão contínua em ambos os modelos e protocolos aqui citados. Acredita-se que este objetivo foi inteiramente alcançado por meio das experimentações em animais realizadas no Instituto de Ciência Biomédicas da USP.

O objetivo de se instaurar um modelo de inflamação pulmonar eosinofílica foi cumprido neste trabalho uma vez que o lavado broncoalveolar demonstrou uma predominância eosinofílica no grupo inflamado.

Um dos objetivos específicos do presente manuscrito foi avaliar as respostas dos parâmetros do MFC em cada protocolo nas duas linhagens. Associado a este, teve-se por objetivo comparar as curvas e o padrão de resposta de cada protocolo, bem como avaliar se há equivalência de doses entre protocolos.

Estes objetivos foram atingidos nas comparações dos parâmetros do MFC, na comparação dos padrões de curvas e nas respostas frente aos incrementos de dose. Por meio destas análises percebeu-se que para animais SAMR1 não houve distinção dos protocolos entre capacidade discriminatória dos parâmetros de vias aéreas e parênquima. Todavia, para o modelo de inflamação pulmonar, o protocolo *bolus* foi mais sensível para diferenciar a resistência das vias aéreas ( $R_n$ ) durante a comparação controle vs inflamação. Por sua vez, o protocolo de infusão contínua foi mais sensível aos parâmetros relacionados ao parênquima pulmonar. Adicionalmente, mostrou-se a não equivalência de doses entre os protocolos, ao menos na ausência dos coeficientes farmacocinéticos.

Finalmente, tiveram-se como objetivos específicos: avaliar a influência dos protocolos no MFC; e avaliar não linearidade e critérios de aceitação do MFC em ambas as linhagens e protocolos. Assim, percebeu-se que o protocolo *bolus* apresentou um maior número de medidas excluídas devido a um baixo ajuste do modelo quando comparado ao protocolo de infusão contínua. Adicionalmente, além de estas exclusões terem ocorrido predominantemente no pico de resposta observado, foram associadas a um maior grau de não linearidade e uma maior incerteza do MFC comparado ao protocolo de infusão contínua.

Portanto, os objetivos propostos para esta tese de doutoramento foram cumpridos ainda no escopo deste texto, bem como nos artigos científicos. Espera-se que os achados desta tese possam fomentar a literatura científica relacionada à mecânica respiratória e à modelagem matemática em modelo animal.

## Referências

ALCIATORE, D. G.; HISTAND, M. B. **Introdução à Mecatrônica e aos Sistemas de Medições**. 4. ed. [s.l.] AMGH Editora, 2014.

ALTES, T. A. et al. Hyperpolarized  $^3\text{He}$  MR lung ventilation imaging in asthmatics: preliminary findings. **Journal of magnetic resonance imaging: JMRI**, v. 13, n. 3, p. 378–84, mar. 2001.

AOKI, F. G. **Modelos matemáticos aplicados na avaliação da mecânica respiratória em camundongos com desafios de agonista da musculatura lisa**. São Paulo: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, 14 fev. 2013.

BATES, J. H. et al. Lung tissue rheology and  $1/f$  noise. **Annals of biomedical engineering**, v. 22, n. 6, p. 674–81, 1994.

BATES, J. H. et al. Temporal dynamics of acute isovolume bronchoconstriction in the rat. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 82, p. 55–62, 1997.

BATES, J. H. T. **Lung Mechanics: An Inverse Modeling Approach**. [s.l.] Cambridge University Press, 2009.

BATES, J. H. T. et al. Airway responsiveness depends on the diffusion rate of methacholine across the airway wall. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 112, n. 10, p. 1670–7, maio 2012.

BATES, J. H. T. CORP: Measurement of Lung Function in Small Animals. **Journal of Applied Physiology**, p. jap.00243.2017, 10 ago. 2017.

BATES, J. H. T.; IRVIN, C. G. Measuring lung function in mice: the phenotyping uncertainty principle. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 94, n. 4, p. 1297–306, 1 abr. 2003.

BATES, J. H. T.; LAUZON, A.-M. Parenchymal tethering, airway wall stiffness, and the dynamics of bronchoconstriction. **Journal of Applied Physiology**, v. 102, n. 5, p. 1912–1920, 25 jan. 2007.

BEARD, J. R. et al. The World report on ageing and health: a policy framework for healthy ageing. **The Lancet**, v. 387, n. 10033, p. 2145–2154, 21 maio 2016.



BOZANICH, E. M. et al. Methacholine responsiveness in mice from 2 to 8 wk of age. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 103, n. 2, p. 542–6, ago. 2007.

BURBURAN, S. M. et al. Effects of inhalational anaesthetics in experimental allergic asthma. **Anaesthesia**, v. 69, n. 6, p. 573–82, jun. 2014.

CARVALHO, C. R. R. DE; TOUFEN JUNIOR, C.; FRANCA, S. A. Ventilação mecânica: princípios, análise gráfica e modalidades ventilatórias. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 33, p. 54–70, 2007.

COJOCARU, A. et al. Computational assessment of airway wall stiffness in vivo in allergically inflamed mouse models of asthma. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 104, n. 6, p. 1601–10, jun. 2008.

COLLINS, R. A. et al. Lack of long-term effects of respiratory syncytial virus infection on airway function in mice. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 156, n. 3, p. 345–52, 15 jun. 2007.

DAVEY, B. L.; BATES, J. H. Regional lung impedance from forced oscillations through alveolar capsules. **Respiration physiology**, v. 91, n. 2–3, p. 165–82, mar. 1993.

HANIFI, A. et al. A linear parametric approach for analysis of mouse respiratory impedance. **IEEE transactions on biomedical circuits and systems**, v. 6, n. 3, p. 287–94, jun. 2012.

HANTOS, Z. et al. Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 72, n. 1, p. 168–78, 1 jan. 1992.

HANTOS, Z.; SUKI, B.; DARÓCZY, B. Constant-phase modelling of pulmonary impedance. **Bull Eur Physiopathol Respir**, v. 12, p. 326s, 1987.

HARDMAN, J.; LIMBIRD, L.; GILMAN, A. **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 10. ed. New York: McGraw-Hill, 2000.

HILDEBRANDT, J. Dynamic properties of air-filled excised cat lung determined by liquid plethysmograph. **J Appl Physiol**, v. 27, n. 2, p. 246–250, 1969.

JONASSON, S. et al. Comparisons of effects of intravenous and inhaled methacholine on airway physiology in a murine asthma model. **Respiratory**

**Physiology and Neurobiology**, v. 165, p. 229–236, 2009.

KACZKA, D. W.; DELLACÁ, R. L. Oscillation mechanics of the respiratory system: applications to lung disease. **Critical reviews in biomedical engineering**, v. 39, n. 4, p. 337–59, 2011.

KATZUNG, B. Basic and Clinical Pharmacology. **Pharmacology Britain**, v. 9, p. 911–973, 2012.

KIM, H. J. et al. Airway Smooth Muscle Sensitivity to Methacholine in Precision-Cut Lung Slices (PCLS) from Ovalbumin-induced Asthmatic Mice. **The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology**, v. 19, n. 1, p. 65–71, jan. 2015.

KUROZUMI, M. et al. Age-related changes in lung structure and function in the senescence-accelerated mouse (SAM): SAM-P/1 as a new murine model of senile hyperinflation of lung. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 149, n. 3, p. 776–782, mar. 1994.

LARCOMBE, A. N. et al. Absence of cholinergic airway tone in normal BALB/c mice. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 161, n. 3, p. 223–9, 31 maio 2008.

LUTCHEN, K. R.; JACKSON, A. C. Reliability of parameter estimates from models applied to respiratory impedance data. **Journal of Applied Physiology**, v. 62, n. 2, p. 403–413, fev. 1987.

MORI, V. et al. Input respiratory impedance in mice: comparison between the flow-based and the wavetube method to perform the forced oscillation technique. **Physiological Measurement**, v. 38, n. 6, p. 992–1005, 1 jun. 2017.

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.

OPPENHEIM, A.; SCHAFER, R.; BUCK, J. **Discrete-Time Signal Processing**. 2nd. ed. Upper saddle rive, New Jersey: Prentice-Hall, 1998.

PEREIRA, J. CÉSAR R. **Bioestatística em outras palavras**. São Paulo: Edusp, 2010.

PESLIN, R. Resistance measurements. Forced oscillations and plethysmography. In: **Basics of Respiratory Mechanics and Artificial**

**Ventilation.** Milano: Springer Milan, 1999. p. 37–57.

PETÁK, F. et al. Methacholine-induced bronchoconstriction in rats: effects of intravenous vs. aerosol delivery. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 82, n. 5, p. 1479–1487, 1997.

RATTI, E. et al. Comparison of Medical and Consumer Wireless EEG Systems for Use in Clinical Trials. **Frontiers in Human Neuroscience**, v. 11, p. 398, 3 ago. 2017.

REHMAN, A.; AMIN, F.; SADEEQQA, S. Prevalence of asthma and its management: A review. **JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association**, v. 68, n. 12, p. 1823–1827, dez. 2018.

ROBICHAUD, A. et al. Comparative study of three flexiVent system configurations using mechanical test loads. **Experimental lung research**, v. 41, n. 2, p. 84–92, 7 mar. 2015.

ROBICHAUD, A.; FEREDDOONZAD, L.; SCHUESSLER, T. F. Delivered dose estimate to standardize airway hyperresponsiveness assessment in mice. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, p. ajplung.00343.2014, 30 jan. 2015.

ROTHER, T. et al. Diagnosis and Management of Asthma - The Swiss Guidelines. **Respiration; international review of thoracic diseases**, v. 95, n. 5, p. 364–380, 2018.

SALERNO, F. G.; LUDWIG, M. S. Effect of the route and mode of agonist delivery on functional behaviour of the airways. **Respiration Physiology**, v. 106, n. 1, p. 71–80, out. 1996.

SCHWARTZ, B. L. et al. Effects of central airway shunting on the mechanical impedance of the mouse lung. **Annals of biomedical engineering**, v. 39, n. 1, p. 497–507, jan. 2011.

SCIREQ. **FX w computer\_shading.jpg**.2015. Largura: 320 pixels. Altura: 174 pixels. 12 Kb. Imagem JPEG., [s.d.]. Disponível em: <<http://blog.scireq.com/2015/10/lets-talk-about-impedance.html>>

SOSNOWSKI, M.; CZYZ, Z.; TENDERA, M. Time and frequency analysis of beat-to-beat R-T interval variability in patients with ischaemic left ventricular dysfunction providing evidence for non-neural control of ventricular repolarisation. **European journal of heart failure**, v. 4, n. 6, p. 737–43, dez.

2002.

SUKI, B. et al. Airway and tissue constrictions are greater in closed than in open-chest conditions. **Respiration physiology**, v. 108, n. 2, p. 129–41, maio 1997.

SUMINO, K. et al. Methacholine challenge test: diagnostic characteristics in asthmatic patients receiving controller medications. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 130, n. 1, p. 69- 75.e6, 7 jul. 2012.

TERAMOTO, S. et al. A novel model of senile lung: senescence-accelerated mouse (SAM). **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 150, n. 1, p. 238–244, jul. 1994.

THAMRIN, C. et al. Sensitivity analysis of respiratory parameter estimates in the constant-phase model. **Annals of biomedical engineering**, v. 32, n. 6, p. 815–22, jun. 2004.

THOMAS, A. C. et al. A robust protocol for regional evaluation of methacholine challenge in mouse models of allergic asthma using hyperpolarized <sup>3</sup>He MRI. **NMR in biomedicine**, v. 22, n. 5, p. 502–15, jun. 2009.

TINDALE, L. C.; SALEMA, D.; BROOKS-WILSON, A. R. 10-year follow-up of the Super-Seniors Study: compression of morbidity and genetic factors. **BMC Geriatrics**, v. 19, n. 1, p. 58, 28 dez. 2019.

TOMIOKA, S.; BATES, J. H. T.; IRVIN, C. G. Airway and tissue mechanics in a murine model of asthma: alveolar capsule vs. forced oscillations. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 93, n. 1, p. 263–70, jul. 2002.

UMAÑA, E. R. P.; TAVARES-DE-LIMA, W. **A relação da obesidade e de hormônios sexuais femininos em modelo de inflamação pulmonar alérgica**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2019.

VITORASSO, R. et al. Methacholine dose response curve and acceptability criteria of respiratory mechanics modeling. **Experimental lung research**, v. 46, n. 1–2, p. 23–31, 7 fev. 2020a.

VITORASSO, R. et al. Highlight article: Respiratory mechanics evaluation of mice submitted to intravenous methacholine: Bolus vs. continuous infusion. **Experimental Biology and Medicine**, v. 245, n. 8, p. 680–689, 17

abr. 2020b.

VITORASSO, R. DE L. **Análise da aplicação do modelo de fase constante na avaliação da mecânica respiratória em animais durante broncoconstrição.** São Paulo: Universidade de São Paulo, 30 ago. 2016.

WALKER, J. K. L.; KRAFT, M.; FISHER, J. T. Assessment of murine lung mechanics outcome measures: alignment with those made in asthmatics. **Frontiers in physiology**, v. 3, p. 491, 2012.

ZHANG, Q.; SUKI, B.; LUTCHEN, K. R. Harmonic Distortion from Nonlinear Systems with Broadband Inputs: Applications to Lung Mechanics. **Ann Biomed Eng**, v. 23, n. i, p. 672–681, 1995.

ZOSKY, G. R. et al. Ovalbumin-sensitized mice are good models for airway hyperresponsiveness but not acute physiological responses to allergen inhalation. **Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology**, v. 38, n. 5, p. 829–38, maio 2008.

## APÊNDICE I

### ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA EXPERIMENTAL BIOLOGY AND MEDICINE – Última versão antes do “final proof”

#### Respiratory mechanics evaluation of mice submitted to intravenous methacholine: *bolus* vs. continuous infusion

**Short title:** Bolus and continuous infusion of methacholine in mice

Renato de L. Vitorasso<sup>1</sup>, Maria A. de Oliveira<sup>2</sup>, Wothan Tavares-de-Lima<sup>2</sup> and  
Henrique T. Moriya<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Biomedical Engineering Laboratory – University of Sao Paulo (USP). Av. Professor  
Luciano Gualberto, travessa 3, 158. 05508-010, Sao Paulo, SP, Brazil.

<sup>2</sup> Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Science USP Av. Prof. Lineu  
Prestes, 2415. Butantã, CEP 05508-000, Sao Paulo, SP, Brazil

Corresponding author: Renato de Lima Vitorasso

Address: Av. Professor Luciano Gualberto, travessa 3, 158. 05508-010, Sao Paulo,  
SP, Brazil

renatovitorasso@usp.br

## **Respiratory mechanics evaluation of mice submitted to intravenous methacholine: bolus vs. continuous infusion**

**Abstract:** *The application of a bronchoconstrictor, usually Methacholine (MCh), in respiratory mechanics studies is usually accompanied by the assessment of respiratory mechanics in a dose-response curve. The MCh used in the dose-response curve can be applied intravenously (i.v.) or inhalational (i.h.) and there are studies comparing i.v. bolus and i.h. MCh in both mice and rats. However, MCh i.v. can be injected at short time interval (bolus) or in continuous infusion. This comparison is relevant since the way MCh is applied influences the mathematical model. We chose an aging process scenario to compare both protocols. This study aims to compare respiratory mechanics of 3, 6 and 10-month SAMR1 mice and how both administration methods (continuous infusion and bolus) impact respiratory mechanics evaluation. Both protocols were capable of assessing the difference among ages and doses in: peak or plateau; and area under the curve analysis. The respiratory mechanics parameters were  $R_n$ ,  $G$  and  $H$  (two-way ANOVA: groups and doses with a  $p < 0.05$  for all). Also, the infusion protocol presented a higher sensitivity to dose increment. In conclusion, both protocols were able to discriminate intra and inter group differences. In the bolus protocol, the highest value of each curve dose may not correspond to the highest real value, and the loss of this point may be a problematic factor in the sample size. These factors are not present in the infusion protocol. Additionally, at this lineage and age screening, the infusion protocol appeared to be more sensitive to differences among ages when compared to the bolus protocol.*

**Keywords:** Pulmonary; Age; Engineering; Lung; Pharmacology; Respiratory Mechanics

**Impact Statement:** *Respiratory mechanics studies are associated with fundamental research and translational studies; the present work thus investigates this particular matter. Our current research describes differences and similarities between two different ways of administering a very prevalent Bronchoconstrictor (Methacholine) in an aging process scenario. The core issue of our work is related with troubles we find with the bolus protocol and the application of the mathematical model used to assess the respiratory mechanics. Our findings reveal the continuous infusion as an alternative to these problems and we hope to provide the proper foundations to a more reliable assessment in the respiratory field.*

## Introduction

In the current literature, there are a large number of studies that assess respiratory mechanics in small animals mechanically ventilated.<sup>1-5</sup> These studies aim to describe the physiological mechanisms associated with the changes of lung function as, for example, observed in the aging process.<sup>6</sup>

The Constant Phase Model (CPM) is the mathematical model, a frequency domain one, used herein and is widely applied in the literature.<sup>7</sup> Respiratory mechanics studies may be carried out with a mathematical model as the response of a dose-response curve, which is plotting the drug effects as a function of its concentration. These curves present important parameters, such as maximum effect; the modeling of



drug response;<sup>8</sup> assessment of responsiveness;<sup>9</sup> reactivity and sensitivity<sup>10</sup> and many others.

Nevertheless, parameters of respiratory mechanics, such as elastance and airway resistance, obtained through mathematical modeling may vary during the dose-response curve according to different factors. Among these factors are: the selection of the animal lineage; the pathophysiological model and, as expected, the concentration of the delivered drug reaching the target organ.

The cholinergic agent methacholine (MCh) is a bronchoconstrictor usually applied in respiratory mechanics studies or in order to assess the reactivity in asthma<sup>11</sup> both in *in vitro* and *in vivo* experiments. The route of administration *in vivo* affects how the drug reaches the target organ and the respiratory mechanics evaluation. Indeed, there are studies that compare inhaled (i.h.) and intravenous (i.v.) routes in mice<sup>12</sup> and in rats.<sup>13</sup>

Most of the studies of respiratory mechanics employing i.v. MCh use it through a bolus protocol, i.e. a rapid injection of the drug. Yet there are some works that apply a continuous infusion protocol.<sup>14-17</sup> The way the MCh is injected intravenously, bolus or infusion, may alter the dose-response curve (presence of a peak or plateau) and may influence the respiratory mechanics evaluation.

As the world longevity increases<sup>18</sup> and the lung diseases are associated with the aging process,<sup>19</sup> this particular subject becomes more prevalent in the literature. Hence, a description of the respiratory mechanics aging process should provide a proper scenario to study the two protocols of i.v. MCh. Moreover, it is relevant to describe how each protocol is able to describe respiratory mechanics in the aging process.

In order to compare the protocols, we chose a screening of age with a health-aging resistant strain (SAMR1)<sup>20,21</sup> generally used in cohort studies as a control over Senescence-Accelerated Mouse (SAM), once the SAMR strain presents a normal aging process.

Therefore, this study aims to compare respiratory mechanics of 3, 6 and 10-month SAMR1 mice submitted to MCh administration and to compare continuous infusion and bolus protocols. Additionally, this work aims to determine how both protocols impact the respiratory mechanics evaluation.

## **Methods**

### **Animals**

All the experiments involving laboratory animals were evaluated and approved by the 'Ethics Committee for Animal Use' (protocol number 59/2016) from the Institute of Biomedical Sciences - University of São Paulo. The procedures abide by Brazilian National Law number 11794 from 08/10/2008, which regulates all the research activities involving animal use in the country.

### **Insert Table 1**

The mice (Infusion animals: 3 months: 10; 6 months: 13; 10 months: 7. Bolus animals: 3 months: 15; 6 months: 13; 10 months: 11) were anesthetized with an intraperitoneal (i.p.) injection of ketamine (120 mg/kg) and xylazine (12 mg/kg). After the proper anesthesia, tracheostomy and cannulation were performed with a metal cannula 18G (BD Company, USA), and the animal was ventilated (flexiVent, SCIREQ, Canada) with a tidal volume of 10 mL/kg, PEEP of 3 cmH<sub>2</sub>O and 150 breaths per minute. Then, a needle attached to a flexible PVC tube (Critchley Electrical Products PTY, Australia) was inserted through the right jugular vein.

The respiratory muscles were blocked with pancuronium bromide (1 mg/kg i.p.). After 7 minutes, two alveolar recruitment (volume ramp up to the value of 30 cmH<sub>2</sub>O) maneuvers were performed.

### **Bolus protocol**

After the recruitments, PBS (Phosphate Buffered Saline) was injected through the right jugular vein. Then, 15 perturbations of 3 seconds each were performed, in apnea, with a 5-s programmed interval between each assessment. The CPM parameters peak values were the measurements associated with the highest values of airway resistance after the bolus injection. Usually, the maximum value occurred at the second measurement (second perturbation).

The perturbation consisted in a sum of 13 sinusoids (Hz): 1, 1.5, 2.5, 3.5, 5.5, 6.5, 8.5, 9.5, 11.5, 14.5, 15.5, 18.5 and 20.5. After the measurements, the animals were ventilated for two minutes until the next injection (Fig 1).

The same perturbations were performed for all doses of MCh: 0.03, 0.1, 0.3, 1 mg/kg. Automation routines of the ventilator control program were used to perform the perturbations.

### **Insert Figure 1**

### **Continuous infusion protocol**

The animals of the infusion protocol were anesthetized, tracheostomized, blocked with pancuronium bromide and recruited in the same way as those in the bolus protocol. After the recruitments, PBS was injected, also through the right jugular vein, for 5 minutes with a continuous infusion pump (11 Plus, Harvard Apparatus, USA). Then, the MCh solution was injected for 2 minutes ("wash out") before the measurement set-up.

In the continuous infusion protocol, the dose was increased by incrementing the volume, rather than the solution concentration. The concentration of the MCh solution was 320 µg/mL and the injected MCh doses were: 48, 96 and 192 µg.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> and the infusion time was 5 minutes and CPM parameters used as plateaus were assessed at the final of the each dose infusion (5 min). Thus, at each dose increment, the flow rate was doubled and the flow calculation was performed based on the weight of each animal.

The same 15 perturbations performed in the bolus protocol were executed in the continuous infusion protocol. However, the inter-perturbation time was increased to 17 s. As in the bolus protocol, automation routines were used in the ventilator control program (Fig 2).

### Insert Figure 2

**The constant phase model** – is a frequency domain model with parameters endowed with physiological meaning. This model has been widely applied to studies on the assessment of respiratory mechanics Eq 1-2.

$$Z_{sr}(f) = R_n + j \cdot 2 \cdot \pi \cdot f \cdot I + \frac{G - j \cdot H}{(2 \cdot \pi \cdot f)^\alpha} \quad (1)$$

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

where  $Z_{rs}$  is the respiratory system input impedance,  $R_n$  is the Newtonian Resistance,  $I$  is the airway inertance,  $j$  is the imaginary unity and  $f$  the frequency. Parameter  $G$  is associated with tissue energy dissipation and  $H$  is associated with the potential elastic energy storage in lung tissue.<sup>1</sup>

This model is adjusted to the estimated impedance values.<sup>22</sup> The model fit was accepted when the coefficient of determination (COD) was higher than 0.9.<sup>23</sup> Therefore, this threshold was used as an exclusion criterion and, particularly for the bolus group, in case of low COD value at the highest value of a particular dose, this dose could not be used as it would jeopardize the experiment. This exclusion process is less adverse in the infusion protocol, since the analysis was performed using 3 scenarios: using the last value of each dose; the mean of the last 2 values and the mean of the last 3 values.

**Statistical analysis** – The main variables of this study were the constant phase model (CPM) parameters. The peak and plateau values were selected from the bolus and infusion protocols, respectively. In addition, for both protocols, the Area Under the Curve (AUC) was calculated for all the doses using trapezoidal integration (Matlab, The MathWorks, USA).

In order to assess the capacity of discriminating doses of MCh and the different ages of both protocols (bolus and infusion), the two-way Analysis of Variance (two-way ANOVA) was used as a statistical test. Additionally, the Bonferroni was selected as posttest.

In the case of increment response, when the doses were doubled or quadrupled, we used two-way ANOVA and Sidak's multiple comparisons test. Since the doses of the bolus protocol were not in a scale of 2, we used a Piecewise Cubic Hermite Interpolating Polynomial to find the corresponding response to the interpolated doses of 100, 200 and 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . The same interpolation was applied to find the doses required to achieve 150, 200 and 300% of  $R_n$  baseline response in bolus and infusion protocols. The statistical significance was  $p < 0.05$ .

## Results

**Dose-response curves** – Figures 3 shows the characteristics of  $R_n$ ,  $G$  and  $H$  from bolus and infusion protocols, respectively. As expected, in the bolus protocol, a rapid increase of  $R_n$  and  $G$  is perceptible, followed by a sharp decrease. In turn, in the infusion protocol, an increase of the same parameters was observed with a plateau instead of the bolus characteristic decrease.  $H$  remains practically constant in both protocols responding to MCh only at the last dose.

### Insert Figure 3

**Area under the curve** – The graphs of Figures 4 presents the behavior of the AUC of  $R_n$ ,  $G$  and  $H$  from the bolus and infusion protocols, respectively. Visually, there is congruence between the peak or plateau and the AUC behavior.

### Insert Figure 4

**Bolus vs infusion** – In order to compare both protocols behaviors, we assessed the increment (ratio between the responses) of the CPM model parameters ( $R_n$ ,  $G$  and  $H$ ) when the doses where doubled and quadrupled. This analysis should provide a proper understanding of sensitivity to drug variation in each protocol. Infusion (last measure of each dose): 48 to 96 and 48 to 192  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ . Bolus: interpolation of the peak values of each bolus protocol dose. Figure 5 presents the interpolation of one animal per group (each age) in the bolus protocol in order to obtain the doses of 100, 200 and 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Finally, the Figure 6 presents the graphs of the increment of each parameter along with the statistical analysis.

### Insert Figure 5

### Insert Figure 6

Additionally, the table 2 presents the doses required, median and interquartile range, to achieve 150, 200 and 300% of  $R_n$  baseline response in bolus and infusion protocols.

### **Insert Table 2**

**Statistical Analysis** – The p value relative to doses and age in the two-way ANOVA was lower than 0.05 to all parameters and protocols, except for p, value relative to age in peak comparison of  $R_n$  in the bolus protocol. Therefore, tables 3 and 4 show all the statistical analyses relative to posttest.

Table 3 presents the statistics of the comparison relative to the bolus protocol. The first part summarizes the comparison associated to peak values, whereas the second depicts the comparison relative to AUC. The post-test values presented in table 3 were only presented when the source of variation, for example age, was statistically significant. There was one p value ( $R_n$  in the peak comparison,  $p=0.0597$ ) that was considerate in table 3. However, since this value is not strictly below 0.05, it needs to be mentioned.

### **Insert Table 3**

Table 4 describes the statistics of the comparison regarding the infusion protocol. The first part summarizes the comparison associated to plateau values, whereas the second depicts the comparison concerning the AUC of the same protocol.

### **Insert Table 4**

**Data exclusion** – Animal exclusion from the bolus protocol is presented in Table 5. The exclusion criterion was, mainly, the  $COD < 0.9$  at the peak response in any dose of MCh.

### **Insert Table 5**

No animal needed to be excluded from the analysis of the continuous infusion protocol, even with a few low COD values.

## **Discussion**

In order to compare bolus and infusion protocols in an aging process scenario, we used the SAMR1 strain (“accelerated senescence-resistant”).<sup>20,21</sup> This lineage is an aging-resistant strain and presents a few respiratory system characteristics described by the literature, such as PV curve behavior and morphological analyses.<sup>20</sup> The aging process is an appropriate scenario since the world’s population is presenting a higher life expectation and, with that, the age-associated diseases become more prevalent.<sup>18,19</sup>

We used a dose-response curve to MCh and this drug is usually applied to challenge the respiratory system in respiratory mechanics. There are two studies that compare i.h. and i.v. MCh.<sup>12,13</sup> Essentially, in mice,<sup>12</sup> the i.v. MCh leads to a more homogeneous bronchoconstriction and, in rats,<sup>13</sup> the i.v. MCh is responsible for the predominance of airway contraction rather than parenchyma.

Peták et. al.<sup>13</sup> compared i.h with i.v. in rats using an infusion protocol with a wavetube device to assess the respiratory mechanics. Jonasson et. al.<sup>12</sup> compared the i.h. in mice with a bolus protocol and they used the same small animal ventilator we used in this work.

One study compared wavetube and flexiVent<sup>24</sup>; its authors found that the CPM parameters obtained through wavetube and flexiVent are not comparable in an experimental protocol or without correction. Therefore, we used the modeled parameters obtained via flexiVent for both protocols.



There is one study previous to Peták's et. al. and Jonasson's et. al. works that compares the route (inhaled, i.v. - bolus and i.v. - infusion) of MCh in sham rats.<sup>25</sup> In this work, Salerno and Ludwig modeled the Resistance and Elastance with the equation of motion and without a commercial ventilator.

They found that the overall incidence of highly constricted airways was higher in the aerosol group compared with the continuous infusion group. In addition, the overall incidence of local dynamic hyperinflation was higher in the i.v. groups vs the aerosol group.

Finally, in an imaging protocol study<sup>26</sup>, it was found that the degree of bronchoconstriction and number of ventilation defects were consistently less in infusion of MCh than for similar doses delivered as a bolus. Moreover, ventilation defects recovered more quickly following infusion than after bolus injection.

The characteristics of the dose-response curves are described in figure 3. In the bolus protocol, the rapid increase<sup>27</sup> and decrease of  $R_n$  and  $G$  was present. In the infusion protocol, an increase of these parameters with a plateau was observed.

$H$  remains practically constant in both protocols responding to MCh only at the last dose, meaning that the tissue elastance only increases with a high dose of MCh.

There was a notable difference in CPM parameters among ages in both protocols. The tissue elastance must be highlighted since there is a decrease of the elastic recoil associated with the aging process.<sup>20</sup> The airways enlargement associated with aging process should be related with lower resistance. Thus, both protocols should be able to discriminate the parameters of CPM.

Indeed, both protocols managed to assess the difference among doses and ages. The infusion protocol appeared to be more sensitive to differences between ages

and doses, as seen in the statistical analysis of Table 4 as compared with Table 3. However, further analyses with different scenarios, e.g. with a lung inflammation, should be carried out.

So far, we can realize that in an aging process screening, both protocols performed according to expectations. However, once the pharmacokinetics of MCh is different between bolus and infusion, due to absorption and degradation, it may not be feasible to directly compare the doses in both protocols. In future work, it may be relevant to assess the required concentration of MCh in each protocol for a given response.

In the current literature, we may perceive that comparisons of intermittent vs infusion of, for example, an antibiotic delivery to humans has been published.<sup>28,29</sup> Additionally, in these studies the comparisons were carried out in a parallel analysis, thus comparing the outcomes of one protocol vs the other.

In our present work, we proposed a direct comparison of both methods (not of doses but the pattern of the curve). We studied the increment of the parameters when the doses are doubled and quadrupled, so that we could compare the behavior of the dose response itself. Figure 6 allows verifying that the infusion protocol presented, overall, a higher increment in the elastance and airway resistance when compared with bolus. Complementarily, table 2 presents the doses required to a same set of increments in both protocol. This table shows that one could not simply calculate the amount of MCh delivered in each protocol in order to find a dose correspondence.

This phenomenon can be associated with the fast absorption and degradation of the drug,<sup>8</sup> especially in the bolus protocol. Since the MCh is continuously injected in the infusion protocol, the response increment observed with the increment of the drug may be higher in this protocol due to the balance between degradation and infusion.

For the bolus protocol, the effect is rapidly observed and the MCh is soon degraded. Unfortunately, these analyses do not provide a dose correspondence, which would require the pharmacokinetics coefficients to fully model the degradation, but this is not the scope of this work.

Hence, there was difference in the increments of the dose response curves of both protocols and the protocols were capable of discriminating groups. However, those findings are not the only relevant issues regarding respiratory mechanics. For example, the perturbation used herein lasted 3 seconds; however, the constant phase model can be applied to longer perturbations<sup>1</sup> and this is important to the bolus protocol discussion.

A major error would be the non-matching of the maximum value of a parameter to the true response peak simply because the evaluation is not performed with a negligible time interval between measurements. Furthermore, if the maximum measurement presents a COD<0.9 or low signal to noise ratio, the entire experiment may be compromised, as can be seen from the number of animals excluded (Table 5).

The continuous infusion protocol does not present these errors, since the values used are associated to the “steady state” condition after 5 minutes.<sup>17</sup> For example, in case the last measurement presents an exclusion criterion, it is possible to use the penultimate or to standardize the use of the average of the last points, since the statistical analysis was not different using the last point or the mean of the 2 or 3 last points as we can see in legend of Table 4.a.

Consequently, the exclusion of one measurement would not jeopardize the analysis. However, the implementation of continuous infusion presents some milestones that should be taken into consideration when designing the study.

In conclusion, both protocols were capable of evaluating intra and inter group differences. Nonetheless, in the bolus protocol, the highest value of each curve dose may not correspond to the highest real value, and the loss of this point may be a problematic factor in the sample size. These factors are not present in the infusion protocol. Additionally, at this lineage and age screening, the infusion protocol presented a higher sensitivity to dose increment and it appeared to be more sensitive to differences among ages when compared to the bolus protocol.

#### **Authors' Contributions:**

All the authors participated in the design, interpretation of the studies and analysis of the data and review of the manuscript; MAO and RLV conducted the experiments; RLV conducted the analysis and wrote the manuscript; WTL and HTM contributed with infrastructure and study design.

#### **Declaration of Conflicting Interests**

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

#### **Funding**

This study was financed in part by the Coordenacao de Aperfeicoamento de Pessoal de Nivel Superior - Brazil (CAPES-Brazilian Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel) - Finance Code 001 (88882.333348/2019-01) and the Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Brazilian National Council of Scientific and Technological Development) - Brazil (308298/2016-0 and 408006/2016-1) .

#### **Figure Legends**

Figure 1 – Diagram of bolus protocol.

Figure 2 – Diagram of infusion protocol.

Figure 3 – The bolus (left) and infusion (right) dose response curves of all ages and doses. Mean and error.

Figure 4 – Comparison of the Area Under the Curve (AUC) of the bolus (left) and infusion (right) protocols. Mean and error.

Figure 5 - Interpolation of one animal per group (each age) in the bolus protocol in order to obtain the doses of 100, 200 and 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Along with the interpolation it is shown the measured and the interpolated values.

Figure 6 –The increment of each parameter when the doses are doubled ( $p < 0.03$  for ages in  $R_n$  and  $G$ ;  $p < 0.001$  for protocols in  $R_n$  and  $H$ ) and quadrupled ( $p < 0.05$  for ages in  $G$ ;  $p < 0.0001$  for protocols in  $R_n$  and  $H$ ). Infusion: 48 to 96 and 48 to 192  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ . Bolus: 100 to 200 and 100 to 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . \*\*\* corresponds to  $p < 0.001$ .

## References

1. Moriya HT, Moraes JCTB, Bates JHT. Nonlinear and Frequency-Dependent Mechanical Behavior of the Mouse Respiratory System. *Ann Biomed Eng* 2003; 31: 318–326.
2. Schwartz BL, Anafi RC, Aliyeva M, Thompson-Figueroa JA, Allen GB, Lundblad LKA, Bates JHT. Effects of central airway shunting on the mechanical impedance of the mouse lung. *Ann Biomed Eng* 2011; 39: 497–507.
3. Hanifi A, Goplen N, Matin M, Salters RE, Alam R. A linear parametric approach for analysis of mouse respiratory impedance. *IEEE Trans Biomed Circuits Syst* 2012; 6: 287–94.

4. Walker JKL, Kraft M, Fisher JT. Assessment of murine lung mechanics outcome measures: alignment with those made in asthmatics. *Front Physiol* 2012; 3: 491.
5. Burburan SM, Silva JD, Abreu SC, Samary CS, Guimarães IHL, Xisto DG, Morales MM, Rocco PRM. Effects of inhalational anaesthetics in experimental allergic asthma. *Anaesthesia* 2014; 69: 573–82.
6. Takeda T. Senescence-accelerated mouse (SAM): with special reference to age-associated pathologies and their modulation. *Nihon Eiseigaku Zasshi* 1996; 51: 569–78.
7. Hantos Z, Suki B, Daroczy B. Constant-phase modelling of pulmonary impedance. *Bull Eur Physiopathol Respir* 1987; 12: 326s
8. Katzung B. Basic and Clinical Pharmacology. *Pharmacol Britain* 2012; 9: 911–973.
9. Lotvall J, Inman M, O'Byrne P. Measurement of airway hyperresponsiveness: new considerations. *Thorax* 1998; 53: 419–424.
10. Hulbert WM, McLean T, Hogg JC. The effect of acute airway inflammation on bronchial reactivity in guinea pigs. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132: 7–11.
11. Kim HJ, Kim Y, Park SJ, Bae B, Kang HR, Cho SH, Yoo HY, Nam JH, Kim WK, Kim SJ. Airway Smooth Muscle Sensitivity to Methacholine in Precision-Cut Lung Slices (PCLS) from Ovalbumin-induced Asthmatic Mice. *Korean J Physiol Pharmacol* 2015; 19: 65–71.
12. Jonasson S, Hedenstierna G, Hedenström H, Hjöberg J. Comparisons of effects of intravenous and inhaled methacholine on airway physiology in a murine asthma model. *Respir Physiol Neurobiol* 2009; 165: 229–236.

13. Peták F, Hantos Z, Adamicza A, Asztalos T, Sly PD. Methacholine-induced bronchoconstriction in rats: effects of intravenous vs. aerosol delivery. *J Appl Physiol* 1997; 82: 1479–1487.
14. Larcombe AN, Zosky GR, Bozanich EM, Turner DJ, Hantos Z, Sly PD. Absence of cholinergic airway tone in normal BALB/c mice. *Respir Physiol Neurobiol* 2008; 161: 223–9.
15. Collins RA, Gualano RC, Zosky GR, Chiappetta CL, Turner DJ, Colasurdo GN, Hantos Z, Sly PD. Lack of long-term effects of respiratory syncytial virus infection on airway function in mice. *Respir Physiol Neurobiol* 2007; 156: 345–52.
16. Suki B, Peták F, Adamicza A, Daróczy B, Lutchen KR, Hantos Z. Airway and tissue constrictions are greater in closed than in open-chest conditions. *Respir Physiol* 1997; 108: 129–41.
17. Bozanich EM, Jánosi TZ, Collins RA, Thamrin C, Turner DJ, Hantos Z, Sly PD. Methacholine responsiveness in mice from 2 to 8 wk of age. *J Appl Physiol* 2007; 103: 542–6.
18. Beard JR, Officer A, de Carvalho IA, Sadana R, Pot AM, Michel JP, Lloyd-Sherlock P, Epping-Jordan JE, Peeters GMEE, Mahanani WR, Thiyagarajan JA, Chatterji S. The World report on ageing and health: a policy framework for healthy ageing. *Lancet* 2016; 387: 2145–2154.
19. Tindale LC, Salema D, Brooks-Wilson AR. 10-year follow-up of the Super-Seniors Study: compression of morbidity and genetic factors. *BMC Geriatr* 2019; 19: 58.
20. Teramoto S, Fukuchi Y, Uejima Y, Teramoto K, Oka T, Orimo H. A novel model of senile lung: senescence-accelerated mouse (SAM). *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150: 238–244.
21. Kurozumi M, Matsushita T, Hosokawa M, Takeda T. Age-related changes in lung structure and function in the senescence-accelerated mouse

(SAM): SAM-P/1 as a new murine model of senile hyperinflation of lung. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: 776–782.

22. Bates JHT. *Lung Mechanics: An Inverse Modeling Approach*. Cambridge University Press, [https://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=CNgQ0B7\\_Fo0C&pgis=1](https://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=CNgQ0B7_Fo0C&pgis=1) (2009, accessed 21 July 2015).

23. Robichaud A, Fereydoonzad L, Schuessler TF. Delivered dose estimate to standardize airway hyperresponsiveness assessment in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2015; 308: 837-46 .

24. Mori V, Oliveira MA, Vargas MHM, da Cunha AA, de Souza RG, Pitrez PM, Moriya HT. Input respiratory impedance in mice: comparison between the flow-based and the wavetube method to perform the forced oscillation technique. *Physiol Meas* 2017; 38: 992–1005.

25. Salerno FG, Ludwig MS. Effect of the route and mode of agonist delivery on functional behaviour of the airways. *Respir. Physiol.* 1996;106: 71–80.

26. Thomas AC, Potts EN, Chen BT, Slipetz DM, Foster WM, Driehuys B. A robust protocol for regional evaluation of methacholine challenge in mouse models of allergic asthma using hyperpolarized <sup>3</sup>He MRI. *NMR Biomed.* 2009;22: 502–515.

27. Bates JHT, Stevenson C a, Aliyeva M, Lundblad LKA. Airway responsiveness depends on the diffusion rate of methacholine across the airway wall. *J Appl Physiol* 2012; 112: 1670–7.

28. van Maarseveen EM, Gipmans S, Vasbinder E, Petjak M, van Zanten ARH. Switching From Intermittent to Continuous Infusion of Vancomycin in Critically Ill Patients. *Ther Drug Monit* 2016; 38: 398–401.

29. Stok D, Wieringa JW. Continuous infusion versus intermittent flushing: maintaining peripheral intravenous access in newborn infants. *J Perinatol* 2016; 36: 870–873.





## Tables

Table 1 – Characteristics of groups.

Age	Infusion			<i>Bolus</i>		
	n	Weight (g)	Bal (x 10 <sup>5</sup> cel/cm <sup>3</sup> )	n	Weight (g)	Bal (x 10 <sup>5</sup> cel/cm <sup>3</sup> )
<b>3 Months</b>	10	38.6 ± 4.0	1.1 ± 0.7	15	44.1 ± 3.6	2.3 ± 0.6
<b>6 Months</b>	13	40.5 ± 2.8	1.0 ± 0.7	13	44.8 ± 5.0	2.8 ± 1.1
<b>10 Months</b>	7	43.1 ± 4.6	0.9 ± 0.6	11	45.7 ± 4.7	1.2 ± 0.6

Weight in grams and bronchoalveolar lavage (Bal). Mean and Standard deviation

Table 2 - Doses required to achieve 150, 200 and 300% of  $R_n$  baseline response in *bolus* and infusion protocols.

$R_n$	Dose required to achieve	bolus ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		Infusion ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ )	
		Median	(IQ)	Median	(IQ)
<b>3 months</b>	150% of baseline response	44.8	(40.0 to 49.7)	33.0	(26.0 to 39.8)
	200% of baseline response	68.7	(59.1 to 77.8)	51.6	(40.5 to 56.6)
	300% of baseline response	111.1	(89.3 to 127.9)	69.9	(59.1 to 75.0)
<b>6 months</b>	150% of baseline response	62.9	(54.9 to 83.2)	47.0	(38.0 to 53.8)
	200% of baseline response	95.4	(87.9 to 119.3)	66.9	(60.6 to 74.9)
	300% of baseline response	164.4	(140.4 to 186.1)	95.0	(79.1 to 118.5)
<b>10 months</b>	150% of baseline response	59.9	(44.5 to 70.7)	40.6	(34.5 to 51.2)
	200% of baseline response	95.8	(72.8 to 116.7)	56.6	(53.5 to 63.8)
	300% of baseline response	150.1	(108.9 to 194.2)	76.1	(69.4 to 80.7)

IQ - Interquartile Range.

Table 3 – Posttest statistical values of CPM parameters in the *bolus* protocol.

**a)**

Bolus - Peak				
		3 vs 6 months	6 vs 10 months	3 vs 10 months
R <sub>n</sub>	PBS	NS	NS	NS
	0.03 mg/kg	NS	NS	NS
	0.1 mg/kg	NS	NS	NS
	0.3 mg/kg	<0.05	NS	NS
	1 mg/kg	<0.05	NS	NS
G	PBS	NS	NS	NS
	0.03 mg/kg	NS	NS	NS
	0.1 mg/kg	NS	NS	NS
	0.3 mg/kg	<0.01	NS	NS
	1 mg/kg	<0.001	NS	<0.001
H	PBS	<0.01	NS	<0.01
	0.03 mg/kg	<0.001	NS	<0.001
	0.1 mg/kg	<0.001	NS	<0.001
	0.3 mg/kg	<0.001	NS	<0.01
	1 mg/kg	<0.001	NS	<0.001

**b)**

Bolus - AUC				
		3 vs 6 months	6 vs 10 months	3 vs 10 months
R <sub>n</sub>	PBS	NS	NS	NS
	0.03 mg/kg	NS	NS	NS
	0.1 mg/kg	NS	NS	NS
	0.3 mg/kg	<0.01	NS	NS
	1 mg/kg	<0.001	NS	<0.05
G	PBS	NS	NS	NS
	0.03 mg/kg	NS	NS	NS
	0.1 mg/kg	NS	NS	NS
	0.3 mg/kg	<0.05	NS	NS
	1 mg/kg	<0.001	NS	<0.01
H	PBS	<0.01	NS	<0.01
	0.03 mg/kg	<0.001	NS	<0.001
	0.1 mg/kg	<0.001	NS	<0.001
	0.3 mg/kg	<0.001	NS	<0.001
	1 mg/kg	<0.001	NS	<0.001

a) Comparison of peak values. b) Comparison of AUC.

Table 4 - Posttest statistical values of CPM parameters in the infusion protocol.

**a)**

Infusion - Plateau				
		3 vs 6 months	6 vs 10 months	3 vs 10 months
R <sub>n</sub>	PBS	NS	NS	NS
	48 mg.kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup>	NS	NS	NS
	96 mg.kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup>	<0.001	NS	<0.001
	192 mg.kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup>	<0.001	NS	<0.001
G	PBS	NS	NS	NS
	48 mg.kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup>	NS	NS	NS
	96 mg.kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup>	NS	NS	<0.05
	192 mg.kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup>	<0.001	NS	<0.001
H	PBS	<0.01	NS	<0.001
	48 mg.kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup>	<0.001	NS	<0.001
	96 mg.kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup>	<0.001	NS	<0.001
	192 mg.kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup>	<0.01	NS	<0.001

**b)**

Infusion - AUC				
		3 vs 6 months	6 vs 10 months	3 vs 10 months
R <sub>n</sub>	PBS	NS	NS	NS
	48 mg.kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup>	NS	NS	NS
	96 mg.kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup>	<0.001	NS	<0.01
	192 mg.kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup>	<0.001	NS	<0.001
G	PBS	NS	NS	NS
	48 mg.kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup>	NS	NS	NS
	96 mg.kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup>	NS	NS	<0.05
	192 mg.kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup>	<0.001	NS	<0.001
H	PBS	<0.01	NS	<0.001
	48 mg.kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup>	<0.001	NS	<0.001
	96 mg.kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup>	<0.001	NS	<0.001
	192 mg.kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup>	<0.001	NS	<0.001

a) Comparison of plateau values - last value; mean of two last values and mean of three fast values of each dose. The statistics was the same for the three scenarios. b) Comparison of AUC.

Table 5 - Excluded and non-excluded animals from bolus protocol.  
The exclusion criterion was  $COD < 0.9$  in a peak response.

	<b>3 Months</b>	<b>6 Months</b>	<b>10 Months</b>
<b>Excluded animals</b>	7	2	2
<b>Non-Excluded animals</b>	8	11	9

Number of animals excluded due low noise signal ratio or  $COD < 0.9$

## Figures

### Figure 1

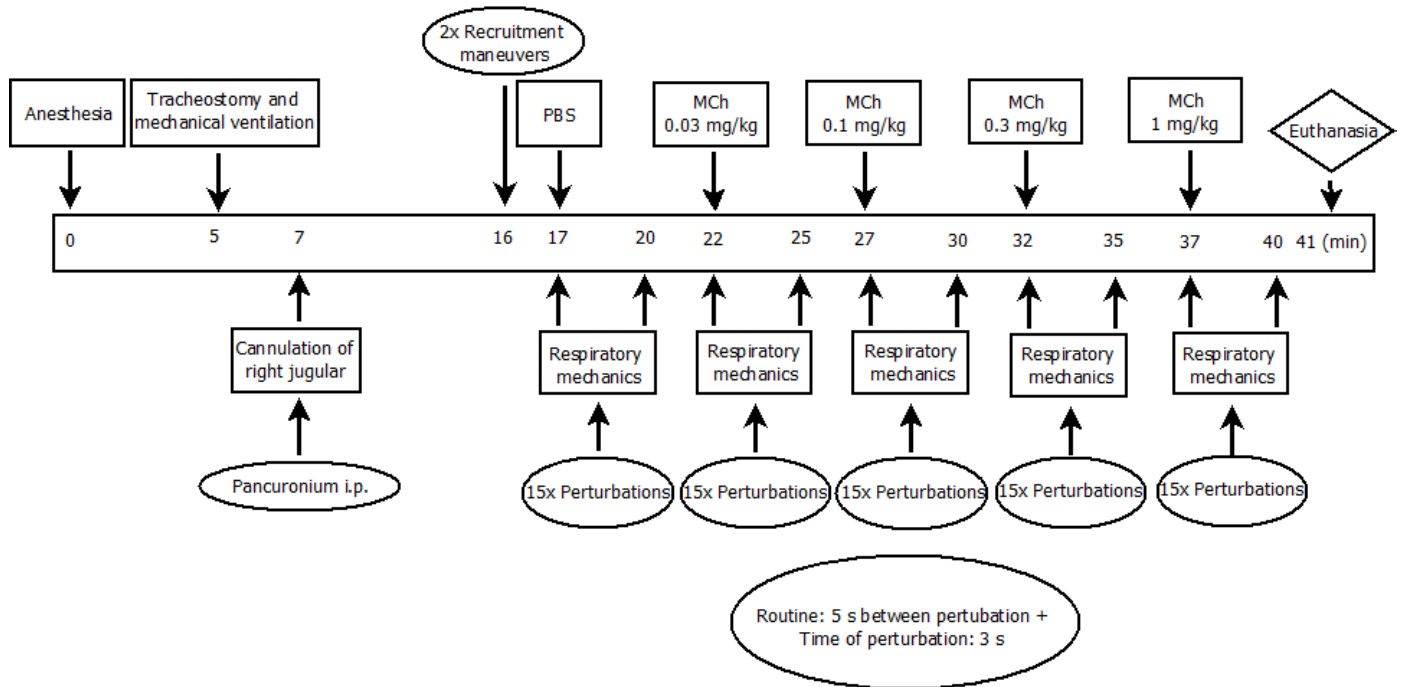


Figure 2

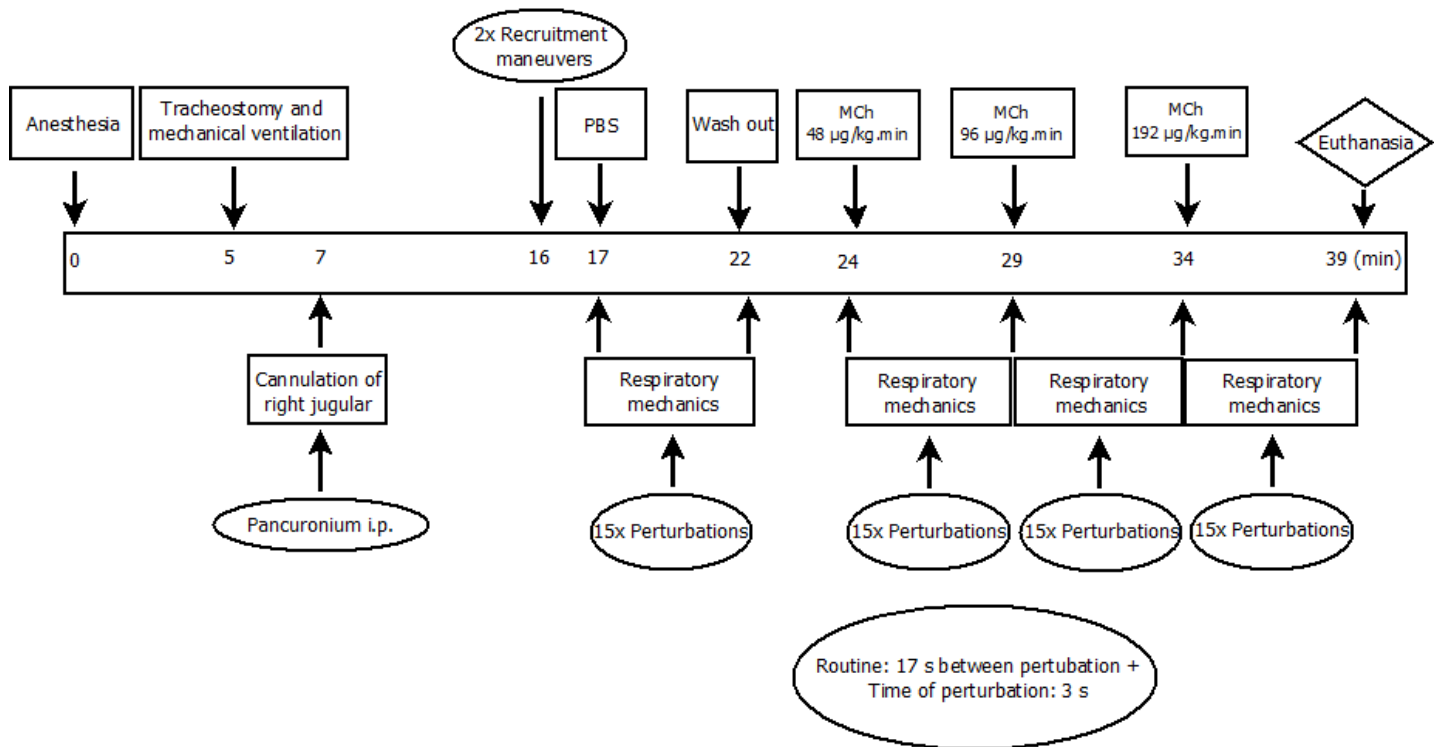




Figure 3

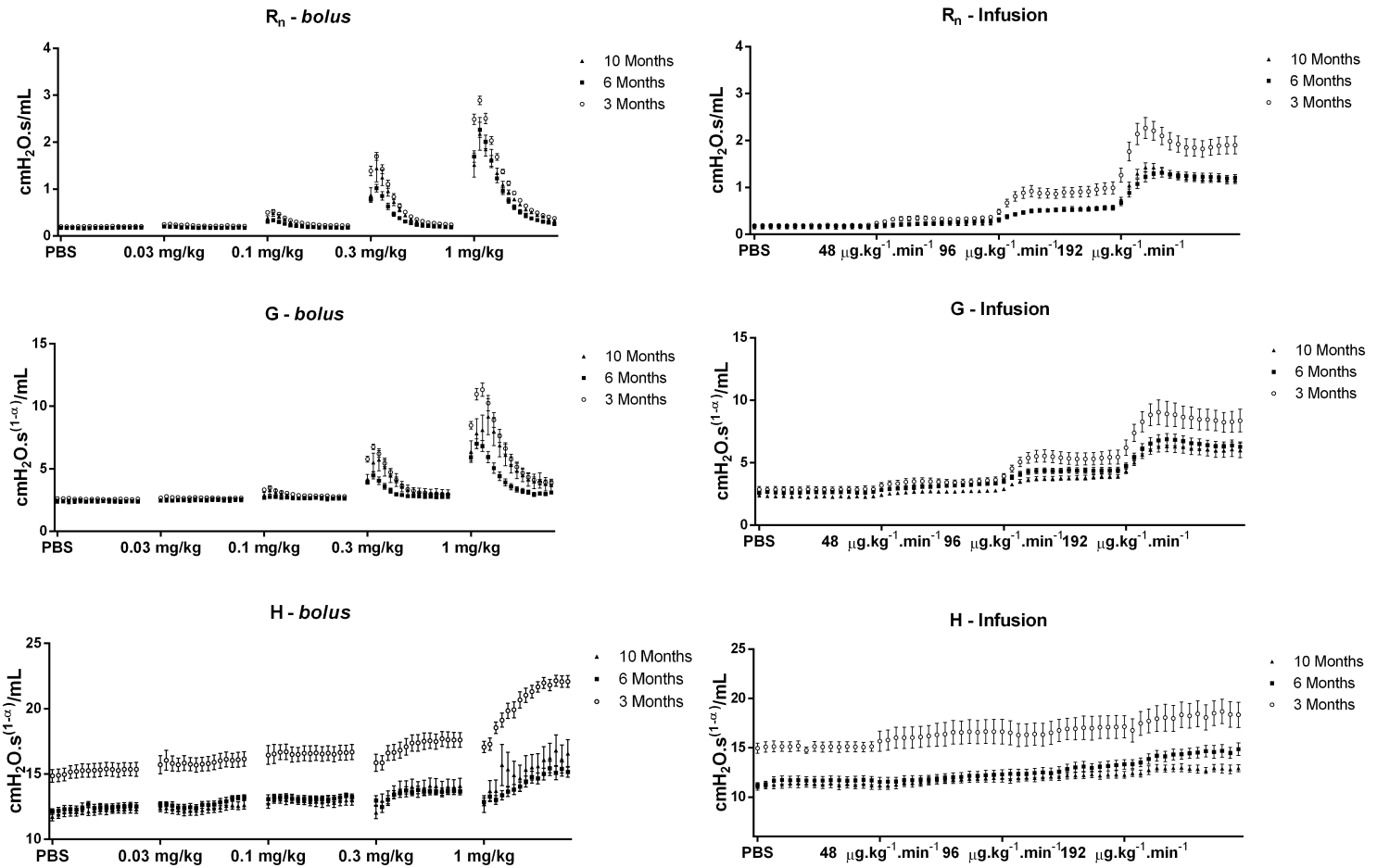


Figure 4

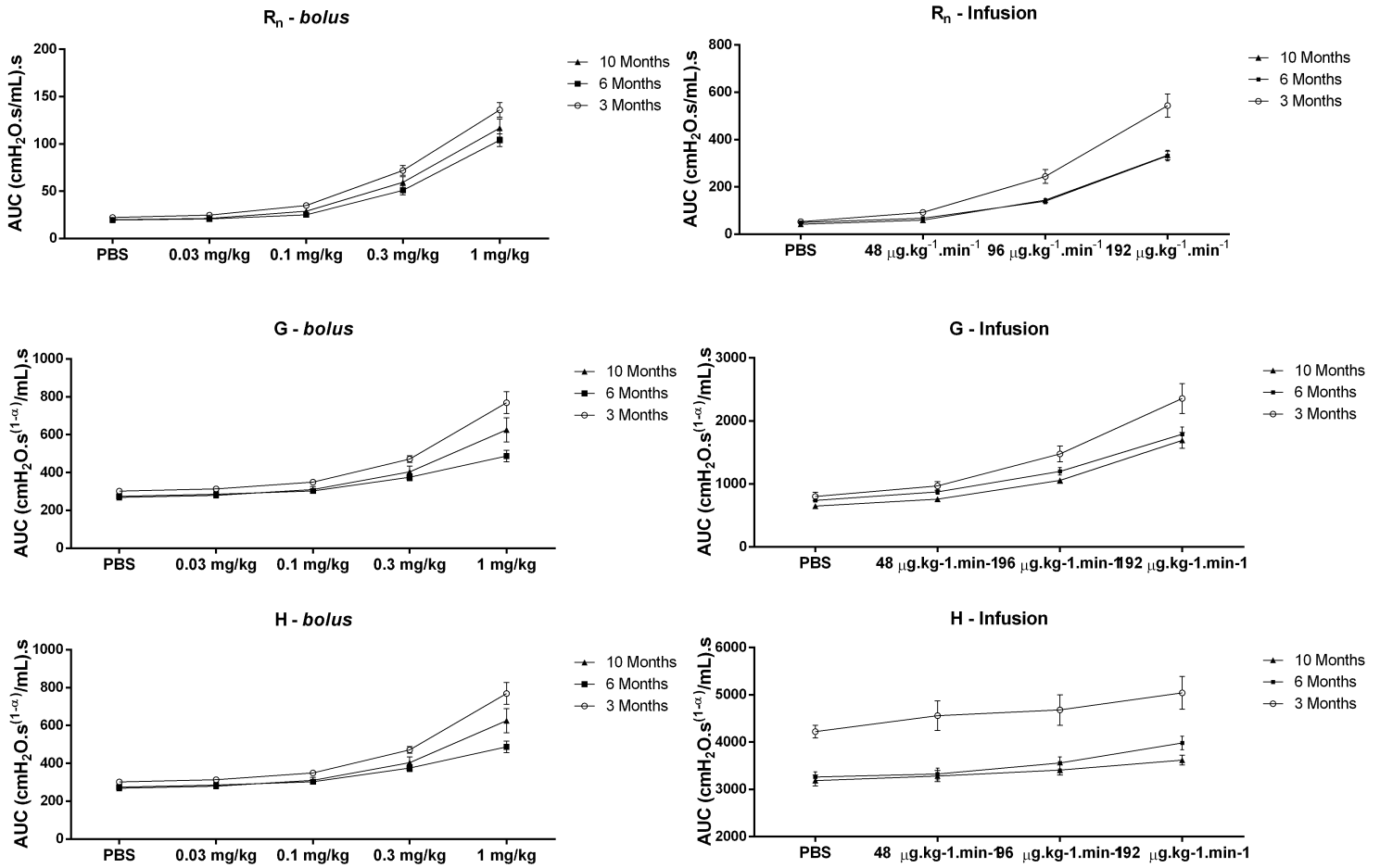


Figure 5

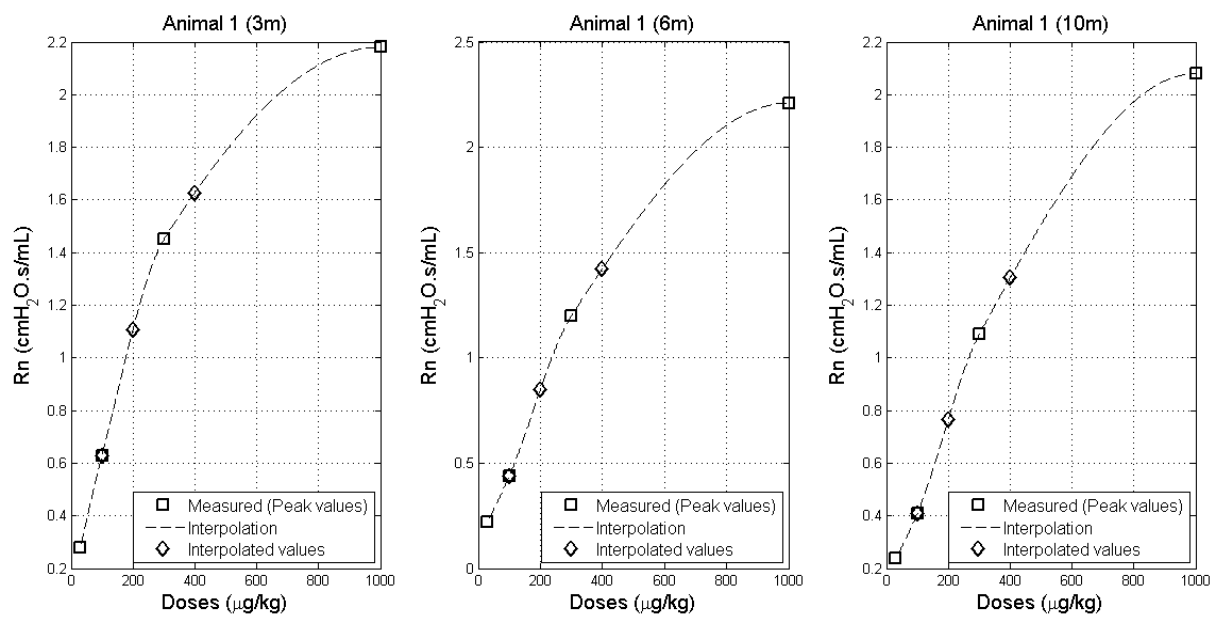


Figure 6

