

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

Vanessa Pereira Teixeira

**ESTUDO DA RESISTIVIDADE DAS VIAS  
AÉREAS EM CAMUNDONGOS OBESOS**

Alfenas/ MG

PPGB/UNIFAL

2014

Vanessa Pereira Teixeira

**ESTUDO DA RESISTIVIDADE DAS VIAS  
AÉREAS EM CAMUNDONGOS OBESOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Alfenas,  
como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de  
Mestre em Ciências. Área de Concentração: Fisiopatologia  
Orientador (a): Profª Drª Roseli Soncini  
Co-orientador (a): Prof. Dr. Angel Roberto Barchuk

Alfenas/MG

2014

Teixeira, Vanessa Pereira.

Estudo da resistividade das vias aéreas em camundongos obesos /  
Vanessa Pereira Teixeira. - Alfenas, 2014.

69 f. -

Orientador: Roseli Soncini.

Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) -  
Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.

Bibliografia.

1. Obesidade. 2. Elastina. 3. Colágeno Tipo III. 4. Resistência das  
Vias Respiratórias. I. Soncini, Roseli. II. Título.

CDD: 616.398

Vanessa Pereira Teixeira

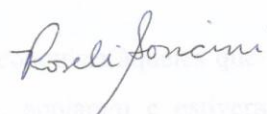
## **ESTUDO DA RESISTIVIDADE DAS VIAS AÉREAS EM CAMUNDONGOS OBESOS**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Alfenas.

Aprovada em: 07/02/14

Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup>. Roseli Soncini

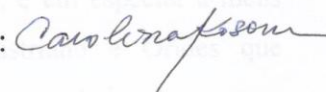
Assinatura:



Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup>. Carolina Kosour

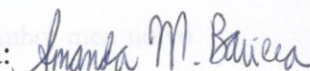
Assinatura:



Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup>. Amanda Martins Baviera

Assinatura:



Instituição: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Dedico esta conquista àqueles que sempre me incentivaram, apoiaram e estiveram ao meu lado ao longo dessa jornada:

Primeiramente a Deus, e em especial a meus abençoados pais Salustriano e Orides que sempre batalharam ao meu lado, de corpo e alma, mesmo que a distância, minha avó Donatilde pelas orações e carinho, meu noivo Rodrigo pelo seu amor, paciência e companheirismo, a minha grande amiga Daniela pelo companheirismo, amizade e ajuda nesse trabalho e aos demais amigos e familiares.

## AGRADECIMENTOS

Muitos foram os percalços, mas muitas também foram as vitórias, mas graças a eles essa vitória se tornou ainda mais prazerosa! E como as vitórias só são completas quando compartilhadas, dedico neste espaço meus profundos agradecimentos a todos aqueles que participaram diretamente ou indiretamente, na elaboração deste trabalho:

Primeiramente a Deus, principio de todo saber, pela minha vida e por sempre me ajudar mesmo quando não mereço.

À minha família, em especial à meus pais, por guiarem meus passos, incentivarem todos os meus sonhos e me acolherem nos momentos mais difíceis.

Ao meu noivo pela compreensão e apoio na realização deste trabalho.

**À minha orientadora Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Roseli Soncini que me acolheu e depositou sua confiança em mim como sua orientanda, colaborando com o meu desenvolvimento pessoal e acadêmico, obrigada pela paciência e amizade.**

**Aos membros da banca examinadora: pela disponibilidade em participar, ler e contribuir para com esta dissertação.**

**À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marisa Ionta, pela confiança, perseverança, e apoio no decorrer deste estudo, pela disposição em ajudar, compartilhando seu conhecimento, tempo e amizade!**

**Ao Prof<sup>º</sup> Luiz Cosme Cotta Malaquias pela paciência, apoio, colaboração e disponibilidade do seu tempo e das dependências de seu laboratório.**

Aos demais professores da UNIFAL, que mesmo não diretamente relacionados a esta dissertação de mestrado contribuíram para minha formação pessoal e acadêmica.

À minha grande amiga Daniela Aparecida de Brito Cervilha, minha companheira de todas as horas, meu braço direito e também o esquerdo, a qual o apoio, amizade e ajuda foram imprescindíveis neste estudo. Já éramos amigas antes mesmo de conhecer, só precisávamos

de um tempinho para descobrirmos! Agradeço sua paciência, carinho, ajuda e risadas ao longo desses anos. Sua participação foi fundamental!

Às minhas amigas Layla Dutra Marinho Cabral e Mara Pereira de Ávila, que me auxiliaram muito em todos os momentos, principalmente nos difíceis, sempre me ouvindo, me animando e com sábios conselhos. Obrigada pelos momentos maravilhosos que tivemos juntas, vocês foram grandes aliadas tanto na alegria, quanto na tristeza.

Aos meus amigos Juliana de Freitas, Franciele Santana, Érika Incerpi, Luiz Marcelo Oliveira Santos e Glaice Kelly Souza pela contribuição de diversas maneiras para esse trabalho, seja em experimentos, apoiando, aconselhando. Obrigada pela amizade!

Aos colegas do laboratório e de pós-graduação, pela afeição, incentivo e por terem compartilhado comigo tantas expectativas, angústias e conhecimentos. Obrigada por ajudarem de uma forma ou de outra no desenvolvimento do projeto, seja auxiliando nos experimentos, análises e discussões dos resultados, na troca de ideias ou mesmo pela companhia e apoio durante estes anos. Obrigada pela ajuda, simpatia, amizade e alegria.

Às minhas amigas da República, pela paciência, carinho e apoio ao longo da jornada.

Aos funcionários da fisiologia: Marina, Marília e José pela ajuda e momentos de descontração.

Ao pessoal do LABAint pela ajuda, apoio e paciência.

Ao Biotério Central da UNIFAL, em especial ao João e Fernando, pelo fornecimento dos animais que foram essenciais para a execução deste trabalho.

À CAPES, pelo grande apoio financeiro que propiciou a realização deste trabalho.

Ao Programa de Biociências aplicadas a saúde.

À UNIFAL por permitir a realização deste trabalho, me proporcionando a cada dia um novo conhecimento.

Finalmente, porém não menos significativo, aos animais que ofereceram singelamente suas vidas para a realização deste estudo.

Enfim, a todos vocês minha eterna gratidão! Vocês foram maravilhosos!!!

**“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para  
que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas  
Graças a Deus, não sou o que era antes”.**

*Marthin Luther King*



## RESUMO

A obesidade está aumentando de forma epidêmica em todo o mundo e a mesma possui efeito profundo na fisiologia da respiração, estando associada com estado de crônica inflamação sistêmica, que pode promover a hiper-reatividade das vias aéreas. Para estudar os processos que ocorrem nas vias aéreas, o presente estudo teve como objetivo avaliar a resistividade das vias aéreas de camundongos da linhagem Swiss induzidos à obesidade. Como metodologia foi realizada a análise dos efeitos da indução da obesidade pelo modelo de redução de ninhada; mecânica respiratória para analisar a resistividade do sistema respiratório pela mensuração das variáveis: elastância tecidual ( $H_{tis}$ ), das resistências dos pulmões ( $G_{tis}$ ) e das vias aéreas ( $R_{aw}$ ) e histeresividade ( $\eta$ ); análise morfométrica do tecido pulmonar para quantificar as células inflamatórias e os alvéolos normais, colapsados e hiperinsuflados; quantificação das proteínas colágeno III e elastina dos animais da ninhada normal e reduzida por meio da técnica do *Western Blot*, para verificar a presença de remodelamento. De acordo com os resultados obtidos foi possível constatar a eficácia do modelo de indução, pois houve aumento do peso corporal, do índice de Lee e da massa de gordura periepididimal e retroperitoneal. Com relação à mecânica pulmonar, não houve diferença entre os grupos para os valores basais, após a administração de salina (Sal) e metacolina (MCh), nos parâmetros  $R_{aw}$ ,  $G_{tis}$ ,  $H_{tis}$  e  $\eta$ . Frente ao desafio com salbutamol (Salb), apenas o  $\eta$ , que representa relação entre dissipação e conservação de energia nos tecidos pulmonares, apresentou diferença entre os grupos, sendo maior no grupo ninhada reduzida. Esse resultado pode ser atribuído a heterogeneidade acarretada pela broncoprovocação e a diminuição da resposta a broncodilatadores promovida pela inflamação e pela alteração da matriz extracelular. Houve diminuição de alvéolos normais e aumento do colapso alveolar, que pode acarretar aumento da viscoelasticidade pulmonar e heterogeneidade apresentada pelo mesmo o que também pode ser atribuído à presença do aumento de colágeno III e diminuição da elastina, encontrados neste estudo. Essa alteração do conteúdo de fibras colágenas e elásticas sugere um processo de remodelamento. Houve aumento de células inflamatórias mononucleares e polimorfonucleares o que indica presença de processo inflamatório, que também pode auxiliar no processo de remodelamento e desencadear hiper-responsividade. Portanto, a obesidade acarretou aumento de células inflamatórias, alterações na matriz extracelular do parênquima pulmonar e colapso alveolar nos animais da ninhada reduzida, porém não houve modificação

nos parâmetros  $R_{aw}$ ,  $G_{tis}$ ,  $H_{tis}$  da mecânica pulmonar entre os grupos e no parâmetro  $\eta$  houve diferença após a administração do salbutamol, demonstrando que não houve alteração da responsividade.

**Palavras chave:** Obesidade. Elastina. Colágeno III. Resistência das Vias Respiratórias.

## ABSTRACT

Obesity is increasing in epidemic form throughout the world and it has a profound effect on the physiology of respiration and is associated with a state of chronic systemic inflammation, which can promote the hyperreactivity of the airways. To study the processes that occur in the airways, this study aimed to evaluate the resistivity of the airways strain obesity induced Swiss mice. We analyzed the effects of induction of obesity by reducing litter model; respiratory mechanics, to analyze the resistivity of the respiratory system by: tissue elastance ( $H_{tis}$ ), the resistances of the lungs ( $G_{tis}$ ) and airway ( $R_{aw}$ ) and histeresividade ( $\eta$ ), morphometric analysis of lung tissue for quantification of inflammatory cells and normal, collapsed and hyperinflated alveoli; quantification of the proteins collagen type III and elastin in animals normal and litter reduced by the technique of Western Blot to verify the presence of remodeling. According to the obtained results it can be seen that the induction model was effective because there was an increase in body weight, Lee index and mass periepididymal and retroperitoneal fat. With respect to lung mechanics, there was no difference between groups for baseline values after administration of saline (Sal) and methacholine (MCh) in  $R_{aw}$ ,  $G_{tis}$ ,  $H_{tis}$  and  $\eta$  parameters. Upon salbutamol (Salb) challenge, only the  $\eta$ , which represents a relationship between dissipation and energy conservation in the lung tissues, differed between groups, being higher in reduced litter group. This result can be attributed to heterogeneity entailed by bronchial provocation and diminished response to bronchodilators promoted by inflammation and alterations of the extracellular matrix. There was a decrease in normal alveoli and alveolar collapse increases, which can lead to an increased heterogeneity of lung and viscoelasticity for the same which can be attributed to the presence of increased and decreased collagen III, elastin, found in this study. This change of the content of collagen and elastic fibers suggests a remodeling process. There was an increase of mononuclear and polymorphonuclear inflammatory cells indicating the presence of inflammation, which can also aid in the remodeling process and lead to hyper- responsiveness. Therefore, obesity caused increase in inflammatory cells, changes in the extracellular matrix of the lung parenchyma and alveolar collapse in animals reduced litter, but there was no change in  $R_{aw}$ ,  $G_{tis}$ ,  $H_{tis}$  parameters of pulmonary mechanics between groups and the parameter  $\eta$  was no difference after administration of salbutamol, demonstrating that there had no change in responsiveness.

**Keywords:** Obesity. Elastin. Collagen III. Airway Resistance.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ACh</b>	– Acetilcolina
<b>ANOVA</b>	– Análise de variância
<b><math>\beta</math></b>	– Beta
<b><math>\beta_1, \beta_2</math> e <math>\beta_3</math></b>	– Receptores $\beta$ adrenérgicos
<b>cmH<sub>2</sub>O</b>	– Centímetros de água
<b>CRF</b>	– Capacidade residual funcional
<b>CVF</b>	– Capacidade vital forçada
<b>COD</b>	– Coeficiente de determinação máximo
<b>DO</b>	– Densidade óptica
<b>DPOC</b>	– Doença pulmonar obstrutiva crônica
<b><i>f</i></b>	– Frequência
<b>g</b>	– Rotação
<b>Gtis</b>	– Resistência tecidual
<b>G</b>	– Gauge
<b>Htis</b>	– Elastância tecidual
<b>HE</b>	– Hematoxilina-Eosina
<b>HRB</b>	– Hiper- reatividade brônquica
<b><i>i</i></b>	– Unidade imaginária
<b><i>I<sub>aw</sub></i></b>	– Inertância das vias aéreas
<b>IgG</b>	– Imunoglobulina
<b>IL - 1<math>\beta</math></b>	– Interleucina um beta
<b>IL – 13</b>	– Interleucina treze
<b>IMC</b>	– Índice de massa corporal
<b>i.p.</b>	– Intraperitoneal
<b>kDa</b>	– Kilodalton
<b>MCh</b>	– Metacolina
<b>MSG</b>	– Glutamato Monossódico
<b>MEC</b>	– Matriz extracelular
<b>M1-M5</b>	– Receptores muscarínicos do tipo 1-5

<b><math>\eta</math></b>	– Histeresividade
<b>NaCl</b>	– Cloreto de sódio
<b>NN</b>	– Ninhada normal
<b>NO</b>	– Oxido nítrico
<b>NP-40</b>	– Nonidet solução de detergente não iônico e não denaturante
<b>NR</b>	– Ninhada reduzida
<b>OMS</b>	– Organização Mundial da Saúde
<b><math>P_{ao}</math></b>	– Pressão de abertura das vias aéreas
<b><math>P_{cyl}</math></b>	– Pressão interna do cilindro
<b>PAGE</b>	– Polyacrylamide gel electrophoresis
<b>PEEP</b>	– Pressão positiva expiratória final
<b>pH</b>	– Potencial hidrogeniônico
<b>PVDF</b>	– Fluoreto de polivinilidene
<b><math>R_{aw}</math></b>	– Resistência de via aérea
<b>RIPA</b>	– Radio Immuno Precipitation Assay Buffer
<b>Salbutamol/Salb</b>	– Salbutamol
<b>Salina/Sal</b>	– Solução fisiológica 0,9% estéril
<b>SDS</b>	– Dodecil sulfato de sódio
<b>SNC</b>	– Sistema Nervoso Central
<b>TBS</b>	– Tris-buffered saline
<b>TTBS</b>	– Tris-buffered saline e tween
<b>TEMED</b>	– N, N, N, N tetra-metiletilenodiamina
<b>TLC</b>	– Capacidade pulmonar total
<b>TNF</b>	– Fator de necrose tumoral
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	– Fator de necrose tumoral alfa
<b>Tris</b>	– Tris hidroximetil aminometano
<b><math>V'</math></b>	– Fluxo
<b><math>V_{cyl}</math></b>	– Posição do pistão
<b>x</b>	– Vezes
<b>Z (f)</b>	– Impedância em função da frequência
<b>Zrs</b>	– Impedância do sistema respiratório
<b>%</b>	– Porcento
<b>°C</b>	– Grau Celsius

- < – Menor
- ± – Mais ou menos
- $\pi$  – Pi

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Sequência do protocolo adotado no experimento .....	32
Figura 2 - Diagrama do ventilador para pequenos animais, utilizado para a coleta de dados de mecânica respiratória.....	33
Figura 3 - Ventilador para pequenos animais.....	33
Figura 4 - Sequência do protocolo adotado no ventilador mecânico .....	36
Figura 5 - Fotomicrografia do retículo com 100 pontos e 50 linhas sobre uma lâmina, aumento de 200x .....	38
Figura 6 - Diferença entre o peso corporal dos animais da ninhada reduzida em relação a animais da ninhada normal pré-desmame (Figura A) e pós-desmame (Figura B).....	41
Figura 7 - Diferença entre a massa de tecido adiposo Periepididimal da ninhada reduzida em relação a animais da ninhada normal.....	42
Figura 8 - Diferença entre a massa de tecido adiposo Retroperitoneal dos animais da ninhada reduzida em relação a animais da ninhada normal .....	42
Figura 9 - Diferença do Índice de Lee dos animais da ninhada reduzida em relação a animais da ninhada normal .....	43
Figura 10 - Parâmetros da mecânica pulmonar. (A) $R_{aw}$ , (B) $G$ , (C) $H$ e (D) $\eta$ dos animais da ninhada reduzida em relação a animais da ninhada normal, avaliada através do ventilador mecânico.....	45
Figura 11 - Diferença entre as células inflamatórias presentes no parênquima pulmonar dos grupos ninhada normal e ninhada reduzida .....	46
Figura 12 - Fotomicrografia representando o parênquima pulmonar corado com hematoxilina e eosina (HE). A) Grupo ninhada normal; B) Grupo ninhada reduzida .....	47
Figura 13 - Perfil de expressão de elastina em tecido pulmonar .....	47
Figura 14 - Representação gráfica da densidade óptica (DO) obtida a partir das bandas imunoreativas para elastina .....	48
Figura 15 - Perfil de expressão de colágeno III em tecido pulmonar.....	48
Figura 16 - Representação gráfica da densidade óptica (DO) obtida a partir das bandas imunoreativas para colágeno III.....	48



## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Dados basais da mecânica respiratória e após a nebulização com salina para os grupos estudados .....	42
Tabela 2 - Histologia Pulmonar.....	46

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>21</b>
2.1	OBESIDADE	21
2.1.1	Definição	21
2.1.2	Prevalência	21
2.1.3	Fisiopatologia	22
2.1.4	O tecido adiposo e inflamação	24
2.2	MODELOS EXPERIMENTAIS EM OBESIDADE	25
2.3	HIPER-RESPONSIVIDADE BRÔNQUICA	27
2.4	AGENTES BRONCOCONSTRITORES E BRONCODILATADORES	28
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>30</b>
3.1	GERAL	30
3.2	ESPECÍFICOS	30
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E METÓDOS</b>	<b>31</b>
4.1	ANIMAIS	31
4.2	EFEITOS DA REDUÇÃO DE NINHADA	32
4.3	MECÂNICA RESPIRATÓRIA	32
4.4	REMOÇÃO DOS ÓRGÃOS E TECIDOS	36
4.5	HISTOLOGIA	37
4.5.1	Fixação e preparo das lâminas	37
4.5.2	Análise morfométrica	37
4.6	QUANTIFICAÇÃO PROTEICA POR WESTERN BLOT	38
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>41</b>
5.1	EFEITOS DA REDUÇÃO DE NINHADA	41
5.1.1	Evolução ponderal	41
5.1.2	Parâmetros Biométricos	42
5.2	MECÂNICA RESPIRATÓRIA	43
5.3	HISTOLOGIA	45
5.4	WESTERN BLOT OU IMMUNOBLOTTING	47

<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>56</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>57</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença endócrino-metabólica crônica de origem multifatorial e de repercussão negativa na qualidade de vida, sendo considerada um importante problema de saúde pública. Em geral desenvolve-se em consequência de um desequilíbrio energético, onde o ganho é maior que o gasto de energia, podendo estar associado ao estilo de vida baseado na inatividade física, consumo excessivo de alimentos ricos em carboidratos e gordura e também nas influências biológicas e genéticas do indivíduo, que contribuem para excesso da massa de tecido adiposo em relação à massa magra, que pode ocorrer de modo regional ou generalizado (VEJA, 2002; CALLE & KAAKS, 2004; HILL, 2006).

A obesidade é um conhecido fator de risco para o diabetes mellitus tipo 2, hipertensão, aterosclerose e algumas formas de câncer, tanto em seres humanos quanto em ratos, e parece predispor à hiper-responsividade das vias respiratórias, sendo considerada um fator de risco para a asma (WEISS & SHORE, 2004; LI; BOWERMAN; HEBER, 2005). A medição de hiper-responsividade das vias aéreas é executada utilizando-se testes inalatórios padronizados com agonistas constritores, comumente histamina ou metacolina (MCh), que atuarão nos receptores muscarínicos presentes nas vias aéreas. Outro estímulo possível é por meio da administração de agonistas  $\beta_2$ -adrenérgicos, com o objetivo de analisar o relaxamento da musculatura lisa e retorno da função pulmonar.

As alterações na fisiologia respiratória em decorrência da obesidade podem ser devido às modificações na função do músculo liso das vias aéreas por fatores atribuíveis à diminuição da capacidade residual funcional e diminuição do volume corrente que são observadas nos obesos. Estão relacionadas também a mudanças no desenvolvimento dos pulmões, inflamação sistêmica crônica (incluindo aumento dos níveis de citocinas inflamatórias e quimiocinas) e fatores derivados do adipócito, incluindo adiponectina e leptina (SHORE & FREDBERG, 2005).

Fatores como aumento da massa da parede abdominal e do tórax em obesos provocam menor capacidade residual funcional normal, porque o volume do pulmão é um dos principais determinantes do diâmetro das vias aéreas, portanto, é provável que as mudanças relacionadas à obesidade na capacidade residual funcional relaxem o músculo liso das vias respiratórias e, assim, permitam encurtar excessivamente quando ativado (FREDBERG, 2000). Outro fator é a ação de respiração espontânea que impõe uma força no músculo liso das vias aéreas,

podendo ser um potente agente broncodilatador (GUMP; HAUGHNEY; FREDBERG, 2001). O indivíduo obeso respira em frequências mais altas, mas em volume corrente substancialmente menor em comparação ao indivíduo magro e como resultado, este mecanismo broncodilatador causado pela respiração espontânea é comprometido e predispõe para o aumento da responsividade das vias aéreas em comparação com o indivíduo magro (SHORE & FREDBERG, 2005). Embora tais considerações mecânicas desempenhem um papel na relação entre a obesidade e a asma, outros fatores podem estar envolvidos porque a capacidade de resposta das vias aéreas está aumentada em ratos na obesidade em comparação com os magros, mesmo quando a carga mecânica é retirada pela abertura da parede do tórax e o volume corrente é fixado durante a ventilação artificial (SHORE et al., 2003).

Outra explicação para a influência da obesidade na função do músculo liso das vias respiratórias é quanto às diferenças na anatomia do pulmão e vias aéreas. Em crianças a carga mecânica de obesidade pode afetar o crescimento do pulmão, desencadeando redução na função pulmonar, um fator de risco conhecido para a asma. Obesidade também pode acarretar uma remodelação mais acelerada das vias aéreas com cada exacerbação da asma (SHORE et al., 2003).

O microambiente inflamatório juntamente com a obesidade também pode influenciar na função do músculo liso das vias aéreas. Em indivíduos obesos, mesmo na ausência de um evidente insulto inflamatório, há inflamação sistêmica de baixo grau originada do tecido adiposo e caracterizada por aumento de leucócitos circulantes e o aumento dos receptores de citocinas e das concentrações séricas de citocinas, quimiocinas e proteínas de fase aguda (RAJALA & SCHERER, 2003; NAWROCKI & SCHERER, 2004). A resposta inflamatória é caracterizada por alteração da permeabilidade endotelial e recrutamento de células inflamatórias dos sistemas fagocíticos mononuclear (macrófagos) e polimorfonuclear (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) (DALE; BOXER; LILES, 2008).

Todos estes fatores podem promover a alterações no sistema respiratório conduzindo a uma maior responsividade das vias aéreas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Após uma breve exposição sobre Obesidade, segue informações mais detalhadas existentes na literatura sobre o tema.

### 2.1 OBESIDADE

#### 2.1.1 Definição

A obesidade é uma doença metabólica crônica que tem se tornado muito comum no mundo (FORMIGUERA & CANTON, 2004). É definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como "acúmulo anormal ou excessivo de gordura que pode prejudicar a saúde", que pode afetar quase todos os órgãos e tecidos do corpo (LEAN; LARA; HILL, 2006). É classificada pelo índice de massa corporal (IMC,  $\text{kg/m}^2$ ) que é correlacionado com a gordura do corpo e é, portanto, uma medida útil na avaliação clínica e estudos epidemiológicos (MCCLEAN et al., 2008).

#### 2.1.2 Prevalência

A prevalência mundial da obesidade tem aumentado ao longo das últimas décadas, atingindo proporções epidêmicas e associando-se cada vez mais com aumento da mortalidade (OGDEN et al., 2007). Ela varia de 5% na China, Japão e alguns países africanos a 75% em algumas das ilhas da Polinésia. Na Europa, a prevalência triplicou nas últimas duas décadas. O aumento das taxas de obesidade infantil são particularmente alarmantes, pois padrões de dieta e exercício desenvolvidos na infância são difíceis de mudar, o que torna a obesidade infantil um forte fator de risco para a obesidade adulta, estando associada a maior chance de morte prematura e de incapacidade na vida adulta (MCCLEAN et al., 2008).

O Brasil tem taxas de envelhecimento mais rápida da população e com o aumento da idade pode haver profunda mudança na composição corporal, caracterizada pelo aumento da gordura e diminuição da massa livre de gordura (composta pelo tecido muscular, tecido ósseo e água) (EVANS, 1992). O aumento do comportamento sedentário e mudanças de hábitos alimentares e estilo de vida, associado ao aumento da renda, tem levado a mudança nos perfis de peso da população brasileira, resultando em aumento da obesidade em mulheres de nível socioeconômico mais baixo e decréscimo nas mulheres de nível socioeconômico mais alto nas regiões mais desenvolvidas. Nos homens, essa variação foi apenas menos intensa, sem diminuição nos estratos de maior nível socioeconômico (VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ; PIMENTA; KAC, 2004; MONTEIRO; CONDE; POPKIN, 2007; RTVELADZE et al., 2013).

### 2.1.3 Fisiopatologia

O tecido adiposo é o principal reservatório energético do organismo. É dividido em tecido adiposo marrom (especializado na produção de calor – termogênese - onde participa ativamente do controle da temperatura corporal) e tecido adiposo branco (conhecido por sua capacidade de armazenar energia na forma de triacilglicerol e como órgão endócrino) (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

Existem dois principais tipos de tecido adiposo branco: subcutâneo e visceral. O subcutâneo está localizado entre a pele e o músculo, e o visceral está localizado dentro das cavidades do corpo, primariamente na cavidade abdominal. Os adipócitos viscerais são mais metabolicamente ativos que os subcutâneos, possuem alta atividade lipolítica provocando liberação de grande quantidade de ácidos graxos livres, e são os principais responsáveis pelos problemas associados com a obesidade. Assim, com evidências aumentadas dos riscos à saúde associados com o acúmulo de gordura abdominal (visceral), duas medidas da adiposidade central, a razão cintura-quadril e, mais recentemente, a medida da circunferência da cintura, têm sido comumente usadas em estudos epidemiológicos (CALLE & KAAKS, 2004). O valor do IMC também é muito utilizado, por ser um critério aceito mundialmente para classificar sobrepeso ou obesidade.

A obesidade tem papel importante no desenvolvimento da síndrome metabólica e tem sido identificada como fator de risco importante para doenças crônicas, tais como diabetes

mellitus tipo 2 e as doenças cardiovasculares (JUBBER, 2004). No sistema respiratório, a obesidade está associada a uma grande variedade de condições, incluindo síndrome de hipoventilação da obesidade, embolia pulmonar, pneumonia de aspiração, apneia obstrutiva do sono (KOENIG, 2001). Evidências sugerem também associação entre obesidade e asma, e uma potencial ligação entre obesidade e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), embora pouco se saiba a respeito dos mecanismos desta associação (FRANSSEN et al., 2008).

Estudos longitudinais têm demonstrado que o aumento do peso corporal pode conduzir a redução da função pulmonar, estando a distribuição de gordura corporal associada com os efeitos metabólicos da obesidade. Os efeitos mecânicos da obesidade do tronco explicam, em parte, as reduções na complacência da parede torácica, na força muscular respiratória, no tamanho das vias aéreas periféricas, função e volumes pulmonares encontradas em indivíduos obesos e que podem conduzir a maior resistência das vias aéreas durante a respiração corrente (MCCLEAN et al., 2008; FARAH et al., 2011). A gordura abdominal pode alterar as características de pressão e volume do tórax e limitar a descida do diafragma, limitando assim a expansão do pulmão. Esta redução da ventilação nas bases pulmonares pode provocar o colapso de unidades pulmonares periféricas, anormalidades no volume de sangue nos pulmões e na relação de ventilação/perfusão e hipoxemia arterial, especialmente na posição supina (MCCLEAN et al., 2008). Vários motivos podem ocasionar estas alterações em indivíduos obesos, incluindo compressão por gordura e infiltração do tórax ou o aumento do volume de sangue do pulmão (SIN; JONES; MAN, 2002).

A obesidade pode promover ineficiência muscular respiratória e criar aumento da demanda para ventilação (PARAMESWARAN; TODD; SOTH, 2006). Juntamente com todas estas modificações na fisiologia pulmonar, pacientes obesos também desenvolvem respiração superficial, com redução nos volumes pulmonares, especialmente o volume de reserva expiratório, aumento do trabalho respiratório e menor capacidade vital forçada (CVF) e residual funcional (CRF) (DELGADO; BARRANCO; QUIRCE, 2008; MCCLEAN et al., 2008; FARAH et al., 2011). Esta redução nos volumes pulmonares está associada à diminuição no diâmetro das vias aéreas periféricas, que pode conduzir a alterações na função do músculo liso brônquico. Isto, por sua vez, conduz a alteração do ciclo de ponte cruzada actina-miosina, que pode potencialmente aumentar tanto a obstrução, quanto a hiperreatividade brônquica (HRB) (DELGADO; BARRANCO; QUIRCE, 2008).



#### 2.1.4 O tecido adiposo e inflamação

A resposta inflamatória que está muitas vezes presente na obesidade parece ser desencadeada e reside predominantemente no tecido adiposo (FRANSSEN et al., 2008). Deste modo, as células de gordura agem como um tipo de célula do sistema endócrino, considerando-se, portanto, o tecido adiposo como um órgão endócrino e metabólico que pode alterar a fisiologia de outros tecidos (RAJALA & SCHERER, 2003).

A obesidade central pode conduzir ao desequilíbrio na produção de vários produtos metabólicos e uma variedade de adipocinas, que exercem diferentes funções no controle fisiológico do organismo (RAJALA & SCHERER, 2003). O tecido adiposo visceral parece influenciar as concentrações circulantes de interleucina-6, fator de necrose tumoral- $\alpha$ , resistina, ácidos graxos livres, leptina e adiponectina. A adiposidade é uma condição crônica inflamatória de baixo grau e está ligada à resistência à insulina, obesidade, diabetes mellitus tipo 2, redução da função pulmonar e mortalidade cardiovascular, bem como outras causas de mortalidade (FORMIGUEIRA & CANTON, 2004; SCHERER, 2006; TILG & MOSCHEN, 2006; OCHS-BALCOM et al., 2006; BASTARD et al., 2006; SOTO GONZALEZ et al., 2007).

A produção de interleucinas associada a vários mediadores inflamatórios, como neurocininas, histamina e óxido nítrico (NO), dentre outros, pode desencadear a formação de edema perivascular e peribrônquico, além de recrutamento de células inflamatórias mononucleares (macrófago e linfócitos) e polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos). Os eosinófilos podem ser recrutados para a parede da via aérea e ativados no tecido pulmonar inflamado, liberando proteínas altamente tóxicas de seus grânulos, sendo responsáveis por graves danos no tecido pulmonar, podendo intensificar a hiper-responsividade brônquica e contribuir para o remodelamento de vias aéreas (KAY, 1991; BUSSE & LEMANSKE, 2001; HARA et al., 2006; TAGAYA & TAMAOKI, 2007; HOGAN et al., 2008). Eles contribuem para o processo de fibrose tecidual e remodelamento das vias aéreas, devido à liberação de fatores do crescimento, elastase, fibroblastos, metaloproteinases e também por estimulação dos fibroblastos (HALL & WALPORT, 1993). Além disso, produzem mediadores lipídicos que vão amplificar a resposta inflamatória pelo recrutamento e ativação de mais células (AUCHINLOS et al., 1997).

O tecido adiposo de obesos também é infiltrado por macrófagos, que podem ser uma importante fonte de citocinas pró-inflamatórias produzidas localmente (FRANSSEN et al., 2008). Os fatores de macrófagos segregados exercem efeitos sobre os adipócitos, que podem aumentar a inflamação sistêmica e a resistência à insulina associada à obesidade (PERMANA; MENGE; REAVEN, 2006). Neste contexto, parecem ampliar a expressão de fatores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios com mudança no sentido de dominância de adipocinas pró-inflamatórias em comparação com os adipócitos menores (SKURK et al., 2007).

## 2.2 MODELOS EXPERIMENTAIS EM OBESIDADE

Obesidade é uma doença complexa, envolvendo interações entre predisposição genética e fatores ambientais. Uma vez que o sobrepeso e a obesidade têm se tornado um problema de saúde pública, os adipócitos são intensamente estudados. O conhecimento da biologia e mecanismos de adipogênese dos adipócitos é necessário para compreender a patogênese da obesidade (CUMMINGS & SCHWARTZ, 2003).

Devido às limitações éticas e financeiras para estudar a obesidade em humanos, o desenvolvimento de modelos animais para a obesidade experimental tem se tornado cada vez mais importante para se estabelecer as causas, consequências e tratamento dessa doença, pois há uma maior facilidade de estudos, proporcionando grande quantidade de pesquisas e resultados. Os modelos murinos são ideais porque os roedores têm genética e desenvolvimento similares com seres humanos, além disso, os ratos e camundongos são pequenos e fáceis de manusear. Outras vantagens são: curto período de gestação, economia de espaço nos Biotérios, baixo custo de manutenção e bom conhecimento do genoma e sistema imunológico. Apesar da economia, a dificuldade encontrada quanto a mecânica pulmonar é justamente devido as suas pequenas dimensões (BATES & IRVIN, 2003). Por estas razões, a maioria das pesquisas relacionada a etiologia da obesidade humana usa modelos murinos.

Vários modelos de obesidade têm sido propostos, dentre eles, modelos genéticos, modelos de alterações endócrinas, modelos realizados por intermédio de lesão neuronal e alterações alimentares. Os mais utilizados são:

- modelo de indução da obesidade utilizando a administração de glutamato monossódico (MSG) no período neonatal em que os animais são mais sensíveis à ação do MSG, uma vez que a barreira hematoencefálica não se apresenta totalmente formada (KIZER; NEMEROFF; YOUNGBLOOD, 1977). O aminoácido neurotransmissor glutamato possui propriedades neurotóxicas que, indiretamente provocam lesões no sistema nervoso central (SNC), que afetam neurônios glutamatérgicos localizados principalmente na área pré-óptica e do núcleo arqueado do hipotálamo e nos neurônios colinérgicos do núcleo arqueado, prejudicando a sinalização de leptina e insulina nesta região (HOLZWARTH-MCBRIDE; SLADEK; KNIGGE, 1976).

- modelo de obesidade geneticamente induzida, que pode ser subdividido em: monogênico e poligênico. Modelos monogênicos incluem camundongos com deficiência em leptina (ob/ob) ou receptor de leptina (db/db) e o modelo poligênico inclui o camundongo M16 e o Kuo Kondo e pode ser mais relevante para entender a contribuição genética para a obesidade humana (KANASAKI & KOYA, 2011).

- modelo de obesidade nutricionalmente induzida em roedores, que representa um bom método para o estudo dos estágios do desenvolvimento do tecido adiposo que são análogos aos em seres humanos, pois os camundongos se tornam obesos após o consumo de dietas hipercalóricas com ajuste de calorias ao longo do tempo (WEST & YORK, 1998). No entanto, existem muitos fatores de variabilidade, incluindo espécie, idade dos animais, tipo de dieta, nível de gordura e tipo de dieta controle.

- modelo de obesidade induzida precocemente pela superalimentação pós-natal. Ele é realizado pela criação em pequenas ninhadas. A manipulação do tamanho da ninhada tem sido utilizada como modelo de superalimentação pós-natal precoce, em ratos e camundongos (SCHMIDT et al., 2001; MORRIS; VELKOSKA; COLE, 2005). O ajuste de tamanho da ninhada conduz a dois níveis de nutrição precoce com filhotes criados em ninhadas pequenas ingerindo mais do que os filhotes criados em grandes ninhadas. Superalimentação precoce conduz a animais adultos com peso corporal significativamente maior, o que está associado com o aumento da obesidade, resistência precoce à leptina, intolerância à glicose e hiperinsulinemia (LUTZ & WOODS, 2012).

A obesidade induzida em animais pode ser analisada segundo parâmetros biométricos como o índice de Lee que é a razão entre a massa corporal e o comprimento naso-anal (BERNARDIS & PATTERSON 1968, NAKAGAWA et al. 2000) e a medida de hipertrofia adipocítica que pode ser reconhecida pela medida de massa dos depósitos de gordura

periepididimal e retroperitoneal (BERNARDIS & PATTERSON 1968; NEMEROFF; LIPTON; KIZER, 1978; MACHO et al. 2000; DOLNIKOFF et al. 2001).

Nenhum modelo experimental é completamente adequado para estudar a obesidade humana com exatidão. Cada método apresenta uma variedade de características que os assemelham à obesidade humana, mas nenhum método apresenta total semelhança. Os modelos animais de experimentação colaboram grandemente no estudo da fisiologia pulmonar sendo utilizados nas pesquisas relacionadas às patologias que afetam a mecânica pulmonar, como a asma (BATES; RINCON; IRVIN, 2009).

### 2.3 HIPER-RESPONSIVIDADE BRÔNQUICA

Responsividade de via aérea se refere à capacidade das vias aéreas de se contraírem após desafios com fármacos broncoativos. Hiper-responsividade das vias aéreas denomina-se pela capacidade exacerbada de indivíduos desenvolverem esta resposta decorrente do uso de broncoconstritores. Esta resposta exagerada pode ser em razão da hiper-reatividade e/ou da hipersensibilidade do organismo (RUBIN et al., 2002; QUTAYBA; JOANNE; JAMES, 2005). Esta hiper-responsividade é identificada pela resposta pulmonar a agentes alérgenos e não específica quando ocorre em resposta a outros estímulos químicos ou físicos. A medição de hiper-responsividade de vias aéreas é executada utilizando-se testes inalatórios padronizados com agonistas constritores de vias aéreas, comumente histamina ou MCh (QUTAYBA; JOANNE; JAMES, 2005).

A hiper-responsividade brônquica pode possuir alguns mecanismos relacionados, tais como contratura excessiva da musculatura lisa das vias aéreas, espessura e integridade da camada epitelial, alterações mecânicas dos brônquios, modificações no conteúdo e no equilíbrio das proteínas da matriz extracelular (MEC) e ainda regulação autonômica exacerbada (BENTO & HERSHENSON, 1998). Todavia, a parcela de participação de cada um desses fatores ainda não está totalmente esclarecida. O processo inflamatório agudo ou crônico, com a liberação de uma vasta gama de mediadores inflamatórios e citocinas, é importante na hiper-responsividade, bem como a intensidade da fibrose subepitelial, a específica infiltração de mastócitos no músculo liso e a inflamação eosinofílica da parede das vias aéreas (BLEASE et al., 2000).

Os componentes proteicos da MEC, cujos principais são as fibras colágenas e elásticas, os proteoglicanos e as lamininas, determinam em grande parte o comportamento mecânico e viscoelástico do tecido pulmonar (RICCIARDOLO et al., 2001; JAMES, 2005). O colágeno é encontrado em vias aéreas, vasos, pleura, membrana basal e na parede alveolar (LANG et al., 1994; EBIHARA et al., 2000; ROCCO et al., 2003). Em condições normais, as fibras colágenas são as principais responsáveis por manter a estrutura do parênquima mesmo em volumes pulmonares aumentados. São fibras que não sofrem ruptura facilmente e apresentam uma rigidez cerca de 50-100 vezes maior que as elásticas, conferindo resistência ao tecido. No entanto, em condições patológicas ocorre nova síntese e deposição destas fibras, que são mais frágeis e apresentam menor estabilidade mecânica (SUKI; LUTCHEN; INGENITO, 2003). A elastina é uma proteína hidrofóbica que se agrupa a filamentos e lâminas por ligações cruzadas, é frequentemente apontada como responsável pela elasticidade pulmonar durante a respiração em volume corrente (SUKI, et al., 2005).

A integridade da matriz colágeno - elastina determina suas propriedades elásticas, de forma que a destruição do parênquima que ocorre em algumas doenças é acompanhada por alterações na composição e distribuição das fibras elásticas e de colágeno. Estas alterações estruturais interferem nas propriedades viscoelásticas do pulmão avaliadas pelas medidas da resistência tecidual ( $G_{tis}$ ) e a elastância tecidual ( $H_{tis}$ ) que são parâmetros utilizados para descrever as propriedades viscoelásticas do sistema respiratório (BATES et al., 1989; GOMES et al., 2000).

#### 2.4 AGENTES BRONCOCONSTRITORES E BRONCODILATADORES

Uma forma muito comum de estímulo ao sistema respiratório é a utilização de agentes broncoconstritores, como a histamina e agonistas colinérgicos (como a MCh, o carbacol e a acetilcolina-ACh), para analisar a responsividade da musculatura lisa das vias aéreas. Tal responsividade é muito utilizada no teste diagnóstico de pacientes suspeitos de asma, que respondem de modo exacerbado (hiper-responsivo) a estímulos broncoconstritores e no caso da obesidade pode haver aumento da carga elástica e, durante uma broncoconstrição, esta carga elástica adicional é um preditor independente de dispnéia (SALOME et al., 2008). Para a análise da fisiologia e/ou mecânica do sistema respiratório, pela hiper-responsividade a

agentes broncoconstritores, são utilizados vários modelos experimentais em animais, como ratos, camundongos e cães (BATES, 1996; JONASSON et al., 2009).

Atualmente, são utilizadas principalmente duas formas de administração do broncoconstritor MCh para o estudo de avaliação da mecânica respiratória em animais de experimentação de pequeno porte. A administração intravenosa (BATES et al., 1997) e a administração via nebulização (WAGERS et al., 2002). Acredita-se, contudo, que diferentes formas de administração do agente broncoconstritor possam causar respostas diferentes durante a avaliação da mecânica respiratória.

A MCh se liga a receptores muscarínicos colinérgicos, causando a contração da musculatura plasmática lisa. Os receptores muscarínicos são do tipo serpentiforme que transpassam a membrana sete vezes e estão acoplados à proteína G (GOSENS, et al., 2008). Existem cinco subtipos de receptores muscarínicos (M1 - M5) dos quais três exercem efeitos fisiológicos nas vias aéreas (M1, M2, e M3). A parede alveolar contém receptores M1 e a musculatura lisa das vias aéreas contém os M2 e M3, sendo que a principal função destes é atuar nos mecanismos de contração das vias aéreas e tecido (COULSON & FRYER, 2003).

Peták et al. (1997), investigaram o local de ação predominante da MCh em ratos Sprague-Dawley, sugerindo que os receptores M3, que se encontram na musculatura lisa das vias aéreas, sejam mais facilmente alcançados pela rota intravenosa do que a inalada, porque nesta última forma a droga precisa atravessar o epitélio para alcançar o tecido. No entanto, os receptores M1 seriam alcançados mais rapidamente pela forma inalada do que a intravenosa, devido à localização destes no parênquima pulmonar (PETÁK et al., 1997).

Já foi descrito a expressão de receptores muscarínicos em diversos tipos de células inflamatórias e também em células estruturais das vias aéreas. No pulmão, a ACh é um potente broncoconstritor, principalmente quando se liga a receptores muscarínicos encontrados na musculatura lisa das vias aéreas (GOSENS, et al., 2008).

No pulmão também encontram-se os receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos. Os receptores  $\beta$  adrenérgicos são divididos em 3 subtipos,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$ , sendo que o  $\beta_2$  modula o relaxamento da musculatura lisa vascular e do sistema respiratório (LYNCH & RYALL, 2008). O salbutamol que é um broncodilatador  $\beta_2$ -adrenérgico de curta duração, pode ser utilizado para relaxar a musculatura lisa e melhorar a função pulmonar, quando há hiper-responsividade brônquica demonstrada por testes de broncoprovocação (WEINBERGER, 2002; HALFHIDE; EVANS; COURIEL, 2005).

### 3 OBJETIVOS

Diante das exposições apresentadas nosso estudo apresentou como objetivos:

#### 3.1 GERAL

Avaliar a resistividade das vias aéreas de camundongos da linhagem Swiss induzidos à obesidade e correlacionar esta com os parâmetros histológicos e bioquímicos do pulmão.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

- Comprovar a indução da obesidade pelo método experimental de obesidade induzida precocemente pela superalimentação pós-natal, pela realização de medidas de parâmetros biométricos como: massa corporal, comprimento naso-anal, índice de Lee, massa dos depósitos de gordura periepididimal e retroperitoneal, nos grupos de ninhada normal e reduzida;

- Avaliar a responsividade das vias aéreas por nebulização de MCh e salbutamol em animais dos grupos da ninhada normal e reduzida, por meio da avaliação da mecânica respiratória: resistência dos pulmões e das vias aéreas, elastância e histeresividade;

- Avaliar a morfometria e a celularidade do tecido pulmonar dos grupos de ninhada normal e reduzida;

- Quantificar as proteínas presentes na matriz extracelular do tecido pulmonar: colágeno III e elastina dos grupos de ninhada normal e reduzida.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Alfenas- UNIFAL. O protocolo experimental deste estudo seguiu aos princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e os procedimentos experimentais envolvendo os animais foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alfenas–CEUA-UNIFAL-MG (Protocolo nº 422/2012).

### 4.1 ANIMAIS

Foram utilizados neste estudo 48 camundongos machos, linhagem Swiss, espécie *Mus musculus*, mantidos em caixas de polipropileno fechadas com tampa de aço inoxidável, recebendo água e ração comercial *ad libitum* sob ciclo claro-escuro de 12h (luz 07:00-19:00) no Biotério Central da UNIFAL-MG. Estes animais são provenientes de um ajuste de ninhada realizado no 1º dia pós-nascimento, sendo divididos em dois grupos: 24 animais na ninhada reduzida - NR (3 por caixa de 30x20x13cm) e 24 ninhada normal - NN (12 por caixas de 41x34x16cm), com o objetivo de maximizar o potencial lactotrófico, através da indução de supernutrição pós-natal por aumento da disponibilidade de leite (RAJIA; CHEN; MORRIS, 2010). O desmame foi realizado no 21º dia pós-natal, sendo ambos os grupos alimentados com ração comercial após esse período. Com aproximadamente 8 semanas pós-natal, os camundongos (30-50g) foram transferidos para o laboratório de Ciências Fisiológicas do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB), aclimatizados ao ambiente de experimentação, mantidos nas mesmas condições descritas acima e em gabinetes ventilados (*Alesco, São Paulo, Brasil*) com temperatura controlada (cerca de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ).



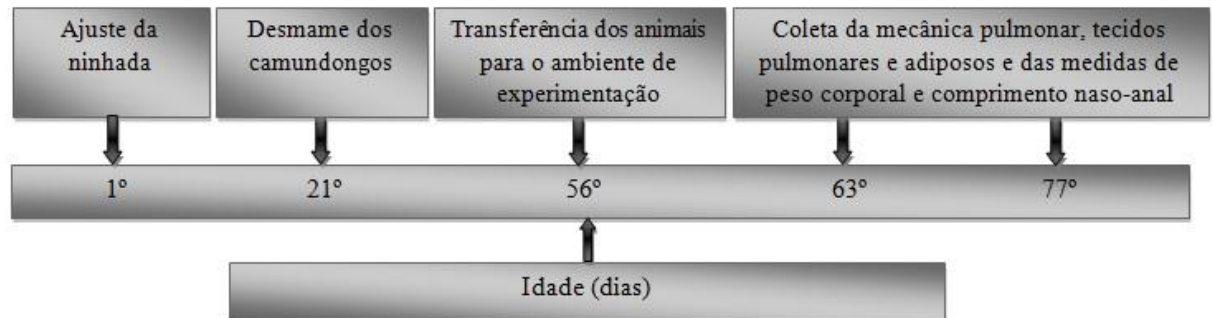


Figura 1: Sequência do protocolo adotado no experimento.  
Fonte: Da autora.

#### 4.2 EFEITOS DA REDUÇÃO DE NINHADA

A instalação da obesidade foi avaliada pela determinação do peso corporal (g) e dos parâmetros biométricos índice de Lee e medida da hipertrofia adipocítica. No pré-desmame o peso dos animais foi monitorado de 3 em 3 dias até o desmame (21 dias). No pós-desmame (3ª semana) o peso foi monitorado semanalmente até a 11ª semana de vida. Após a eutanásia os animais foram pesados, o comprimento naso-anal foi medido e os valores foram aplicados a uma fórmula para a determinação do Índice de Lee [raiz cúbica do peso corporal(g)/comprimento corporal (cm)], que avalia o grau de adiposidade corporal, sendo considerado um análogo do índice de massa corporal (BERNARDIS & PATTERSON, 1968; NAKAGAWA et al., 2000). O peso relativo (g/100g de peso corporal) das massas de tecidos adiposos periepididimal e retroperitoneal também foi determinado.

#### 4.3 MECÂNICA RESPIRATÓRIA

A partir de nove semanas de nascimento, os grupos de ninhada normal e reduzida foram novamente pesados e anestesiados com xilazina (12mg/kg) e pentobarbital sódico (68mg/kg) intraperitoneal (*i.p.*) para instalação de uma cânula traqueal. Posteriormente, os camundongos foram colocados em uma pequena mesa aquecedora (*Heat Pad – Insight*) sob foco cirúrgico em decúbito dorsal, sendo seus membros fixados por fita adesiva. Os membros

superiores foram mantidos horizontalmente abduzidos a 90 graus em relação ao corpo e os membros inferiores estendidos em diagonal. Após o posicionamento cirúrgico, foi realizada traqueostomia para introdução de uma cânula de metal com calibre de 18G, sendo a cânula fixada à traquéia por meio de fios de algodão. A fixação dos membros foi retirada e os animais foram mantidos anestesiados e conectados a um ventilador mecânico (*FlexiVent, SCIREQ, Montreal, Canadá, versão 5.00*) apropriado no módulo 1 para camundongos (FIGURAS 1 e 2). Este aparelho permite a manutenção da vida em animais sedados e curarizados e também atua na identificação da mecânica, por permitir que perturbações de volumes voluntários sejam aplicadas ao pulmão via traquéia (SHUESSLER & BATES, 1995; BATES & ALLEN, 2006).

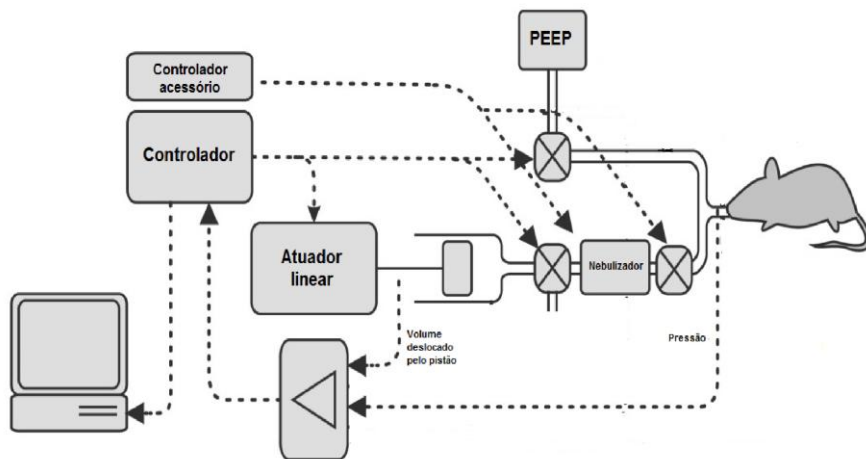


Figura 2: Diagrama do ventilador para pequenos animais (Flexivent-SCIREQ®), utilizado para a coleta de dados de mecânica respiratória. PEEP significa pressão expiratória positiva final.

Fonte: Adaptada de: SHALABY et al., 2010.



Figura 3: Ventilador para pequenos animais (FlexiVent, SCIREQ®, Canadá).

Fonte: Da autora.

Os animais foram avaliados com o tórax fechado e ventilados com parâmetros constantes: volume corrente de 10 mL/kg, frequência respiratória de 200 ciclos/minuto e pressão positiva expiratória final (PEEP) de 3cmH<sub>2</sub>O conectado a uma válvula expiratória do ventilador. Posteriormente foi induzida a paralisia muscular pela administração de brometo de pancurônio (0,5 mL/kg, *i.p*). A sequência do protocolo é apresentada na figura 3.

A mecânica respiratória foi medida pela aplicação de volumes utilizando a técnica de oscilações forçadas (HANTOS, et al., 1992). O ventilador mecânico para pequenos animais flexiVent® manteve-se controlado por um computador, intercalando a ventilação mecânica com manobras (perturbações) controladas de pressão e volume, para obter medidas precisas e reprodutíveis de mecânica respiratória (FIGURA 2) (REBER, et al., 2012). As perturbações utilizadas foram a TLC (capacidade pulmonar total) na qual consta de uma inflação profunda dos pulmões a uma determinada pressão, seguida de uma retenção da respiração normalmente de alguns segundos, utilizada antes das nebulizações com o objetivo de abrir espaços aéreos e padronizar o volume, para que a droga se difunda de maneira homogênea nos pulmões; Quick-prime-3 que é uma manobra que consiste na imposição de um fluxo de ar com amplitude correspondente à soma de senoides de frequências entre 1,00 a 20,5 Hz ao longo de 3 segundos e SnapShot que é uma onda de oscilação forçada senoidal (frequência única), que corresponde à frequência respiratória do animal e tem por objetivo proporcionar resultados precisos (CHEN, et al., 2006).

Foi calculada a impedância do sistema respiratório ( $Z_{rs}$ ) dos animais de cada grupo, e para o cálculo dos dados foram feitas correções, considerando as perdas devido à compressibilidade dos gases (BATES, et al., 1989). Foram coletados: a posição do pistão ( $V_{cyl}$ ) e a pressão interna do cilindro ( $P_{cyl}$ ) (HANTOS, et al., 1992).  $V_{cyl}$  foi corrigido para obter o volume que efetivamente chega ao animal ( $V$ ) e  $P_{cyl}$  foi corrigido, nos dando o valor de  $P_{ao}$  pressão de abertura das vias aéreas. Por intermédio da derivação no tempo de  $V$ , obtivemos o fluxo ( $V'$ ).

Para análise das impedâncias obtidas, foi utilizado o modelo de fase constante, (HANTOS, et al., 1992).

$$Z(f) = R_{aw} + i \cdot 2 \cdot \pi \cdot f \cdot I_{aw} + \frac{G - i \cdot H}{(2 \cdot \pi \cdot f)^\alpha}$$

Onde  $R_{aw}$  é a resistência de vias aéreas,  $I_{aw}$  é a inertância das vias aéreas ou inércia do ar,  $G$  caracteriza a dissipação de energia nos tecidos pulmonares,  $H$  caracteriza a energia acumulada nos tecidos do pulmão,  $i$  é a unidade imaginária,  $f$  é a frequência

$$\alpha = \frac{2}{\pi} \cdot \text{arco tangente} \left( \frac{H}{G} \right)$$

Foram obtidos com o ventilador os parâmetros:

$R_{aw}$  - resistência de via aérea nos permite a análise, isoladamente das vias aéreas, sem a interferência do tecido pulmonar;

$G_{tis}$  - resistência tecidual;

$H_{tis}$  - elastância do tecido pulmonar;

$\eta$  – histeresividade.

O animal foi ventilado por um tempo de aproximadamente sete minutos para adaptação, ajuste do sistema respiratório ao fluxo recebido e verificação de possíveis vazamentos, obstruções e correções no posicionamento. O ventilador mecânico manteve os camundongos ventilados e somente interrompeu essa ventilação em tempos determinados para aplicar perturbações e assim obter os valores acima descritos.

Todos os grupos receberam nebulização (Aeroneb Nebulizador do Flexivent - Aeroneb, Aerogen, Irlanda) com salina (Sal), o broncoconstritor MCh (*acetyl- $\beta$ -methylcholine chloride*, Sigma®- Aldrich, St. Lois, USA) na concentração de 100mg/mL para averiguar a hiper- responsividade brônquica e por último, o broncodilatador Salb (*Sigma®- Aldrich, St. Lois, USA*) na concentração de 1,5mg/mL. Primeiramente foram determinados os valores basais e posteriormente as medidas dos parâmetros respiratórios após nebulizações com Sal, MCh e Salb. O nebulizador aerosolizou o sistema respiratório durante 10 segundos e 5 segundos após, os valores da mecânica respiratória foram registrados. Os registros foram repetidos de 15 em 15 segundos até o tempo de 300 segundos para MCh e 600 segundos para Salb. O tempo de intervalo para administração da concentração de MCh foi de 5 minutos e do Salb 10 minutos.

Ao término do experimento, a traquéia foi clampeada ao final da expiração e o animal foi exsanguinado para a retirada dos pulmões.

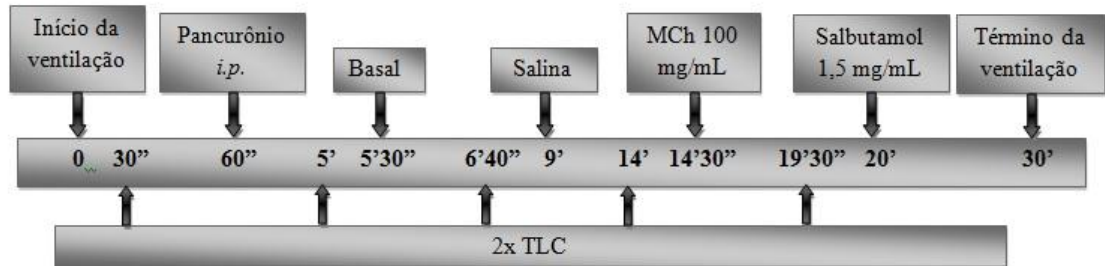


Figura 4: Sequência do protocolo adotado no flexiVent (SCIREQ, Canadá).  
Fonte: Da autora.

Após o registro dos valores, foram realizadas coletas e análises desses dados. Para as perturbações um coeficiente de determinação (COD) de 0,90 foi o limite inferior para aceitar uma medição, logo após a média de cada medição foi realizada e os valores foram plotados no Graphpad Prism.

#### 4.4 REMOÇÃO DOS ÓRGÃOS E TECIDOS

Imediatamente após a avaliação mecânica, a traquéia foi ocluída no final da expiração com linha de algodão. Os animais foram eutanasiados por exsanguinação por meio de uma secção cirúrgica da aorta e veia cava inferior em suas porções abdominais. Foram posicionados sob uma régua para a medida do comprimento naso-anal que serviu para a determinação do Índice de Lee. Procedeu-se uma laparotomia com coleta e pesagem dos tecidos adiposos brancos (periepididimal e retroperitoneal) e depois com a ressecção do esterno, sendo o diafragma aberto radialmente e a porção abdominal do esôfago identificada e isolada, sendo presa por uma pinça hemostática. As estruturas do pescoço foram dissecadas, permitindo a liberação das vias aéreas. A pinça que prendia o esôfago foi suavemente tracionada, permitindo separar o conjunto monobloco (coração-pulmão) das demais estruturas aderidas à parede torácica posterior. Com todas as estruturas visualizadas, a traquéia foi seccionada abaixo do local ocluído pelo fio de algodão e, posteriormente, separada do esôfago

e o coração. Os pulmões foram então separados individualmente. O lóbulo pulmonar direito foi destinado à análise histológica e o lóbulo pulmonar esquerdo foi coletado para análise de proteínas pelo método de *Western Blot*.

## 4.5 HISTOLOGIA

### 4.5.1 Fixação e preparo das lâminas

O pulmão foi mantido em formalina 10%, durante 7 dias (pH=7,4 e 0,1M). Após esse período, o material foi desidratado progressivamente pela imersão em soluções com concentração crescente de etanol.

Depois da fixação, o material foi embebido em parafina e cortes histológicos com 4µm de espessura foram realizados e posteriormente corados com hematoxilina-eosina.

### 4.5.2 Análise morfométrica

As lâminas contendo os cortes corados com hematoxilina e eosina foram analisadas de acordo com seus aspectos quantitativos. A análise quantitativa foi realizada através da técnica convencional de contagem de pontos (“point-counting”) (WEIBEL, 1990). Em um aumento de 200x, utilizando-se uma ocular contendo um sistema de referência de 100 pontos e 50 segmentos de reta dispostos em paralelo, acoplada ao microscópio de luz convencional (*Nikon Digital DS-U3, Japão*) (FIGURA 4). Foram avaliados dez campos aleatórios e não coincidentes por lâmina e quantificada a fração de área ocupada por alvéolos normais, colapsados e hiperinsuflados. O número de pontos que caíram em área de alvéolo normal, colapsado ou hiperinsuflado foi dividido pelo total de pontos contados em cada campo analisado (normal + colapsado + hiperinsuflado) e expresso sob a forma de percentual (DUNNILL, 1964; MARGRAF et al., 1991).

Em um aumento de 1000x foi avaliada a celularidade pulmonar, quantificando os seguintes parâmetros: tecido pulmonar, células polimorfonucleares (PMN) e células mononucleares (MN) em dez campos aleatórios e não coincidentes. O tecido pulmonar foi avaliado pelo número de pontos do campo que coincidiam com a área de tecido e não sobre o espaço aéreo. Assim, o resultado é apresentado como fração de área de tecido pulmonar.

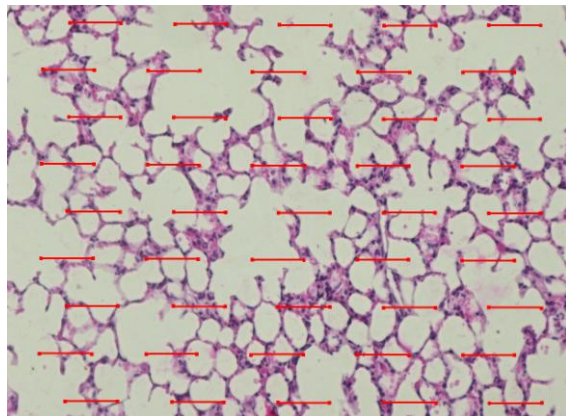


Figura 5: Fotomicrografia do retículo com 100 pontos e 50 linhas sobre uma lâmina, aumento de 200x.  
Fonte: Da autora.

#### 4.6 QUANTIFICAÇÃO PROTEICA POR WESTERN BLOTTING

O Pulmão esquerdo foi coletado e homogeneizado em 200  $\mu$ l de tampão RIPA - *Radio Immuno Precipitation Assay Buffer* (NaCl 150mM, ácido deoxicolato 1%, Tris 0,1M, pH7,5, NP-40 1%), contendo inibidores de protease (20 $\mu$ l/mL) (*Protease Inhibitor Cocktail, Sigma® - Aldrich, USA*).

O lisado foi centrifugado para remoção do material insolúvel, a 12.000g por 15 minutos a 4°C, tendo sido o sobrenadante aliqotado e estocado a -80°C até o uso.

A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo ensaio de BCA (*Pierce Biotechnology, Rockford, USA*).

As amostras foram ressuspensas em tampão de amostra (4X, Tris 0,5M, pH: 6,8, glicerol, SDS 10%, bromofenol blue 1%,  $\beta$  – mercaptoetanol), submetidas à SDS – PAGE, em gel de poliacrilamida a 7% (Tris, 1,5M, pH:8.8, acrilamida 30%, SDS 10%, persulfato de

amônio 10% e N,N,N,N tetra-metiletilenodiamina - TEMED) segundo o protocolo adaptado de Harlow e Lane (1988) e gel de empilhamento 5% (Tris, 1,0M, pH:6,8, acrilamida 30%, SDS 10%, persulfato de amônio 10% e TEMED). Como padrão foi utilizado o marcador de peso molecular Full-range Rainbow™ Recombinant Protein Molecular Weight Markers (*GE Healthcare Life Sciences, UK*).

Cada poço foi carregado com 30ug do extrato total de proteínas. A eletroforese foi realizada em tampão (1X, Tris 0,25M, glicina 1,92M, pH 8.3, SDS 1%), os parâmetros da corrida foram: 2 horas, 100V, 50mA. As proteínas foram então transferidas para membrana de PVDF - “Hydrophobic Polyvinylidene Difluoride” (*Amersham Bioscience®*), previamente ativada com metanol, em tampão (Tris 0,025M, glicina 0,192M, pH 8-8,5 e metanol 20%) e os parâmetros para a transferência foram: 2 horas, 100V e 250mA. A eficiência da transferência foi verificada corando-se a membrana por 5 minutos com corante Ponceau 0,5%.

Os sítios inespecíficos das membranas foram bloqueados com 5% de leite desnatado Molico (*Nestlé®*) em 0,05% de Tween-20 em TBS (TTBS), sob agitação em temperatura ambiente durante uma hora.

Foram utilizados os anticorpos anti-actina (1:1000) (*Sigma®- Aldrich, St. Lois, USA*), anti-elastina (1:100) (*Santa Cruz Biotechnology, California, USA*) e anti-colágeno III (1:1000) (*Abcam®- Cambridge, UK*), os quais ficaram em contato com a membrana durante a noite a 4°C. No dia seguinte, sucessivas lavagens foram realizadas em TBS e TTBS à temperatura ambiente e os anticorpos primários foram detectados por anticorpos secundários (anti-IgG de coelho, 1:2000 ou anti-IgG de camundongo, 1:500) conjugado com peroxidase. O protocolo de quimioluminescência (*ECL, Amersham Biociencia®*) foi utilizado para a detecção de bandas imunoreativas em filmes radiográficos.

Para possibilitar a marcação da mesma membrana com diferentes anticorpos, as membranas foram submetidas à *stripping* com “Restore Western Blot Stripping Buffer” (*Pierce Biotechnology*) e submetidas a novas marcações.

O programa de domínio público Image J (*NIH Image, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA*) foi utilizado para quantificar as bandas imunoreativas nos filmes radiográficos (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012).



#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as massas de tecido adiposo periepididimal e retroperitoneal e a contagem de células inflamatórias, aplicamos o teste *t*-Student para comparação dos grupos. Os dados da mecânica pulmonar foram analisados utilizando Análise de Variância “one-way analysis of variance” – ANOVA seguido do pós-teste de *Newman-Keuls* para análise da variância entre os valores basais e nebulização com Sal, MCh e Salb. Para parâmetros histológicos e Western Blot foi utilizado a Análise de Variância “one-way analysis of variance” – ANOVA seguido do pós-teste de *Tukey*. A Análise de Variância “two-way analysis of variance” (ANOVA) com posterior uso do pós-teste *Bonferroni*, foi aplicado para a comparação dos pesos pré e pós desmame. Os gráficos e as análises estatísticas foram gerados usando Graphpad Prism (*Versão 5.0, San Diego, CA, USA*). Os resultados foram apresentados com média  $\pm$  erro padrão, sendo considerado o nível de significância de 5% ( $p < 0.05$ ).

## 5 RESULTADOS

Descrição dos resultados abaixo:

### 5.1 EFEITOS DA REDUÇÃO DE NINHADA

#### 5.1.1 Evolução ponderal

No 1º dia pós-natal as ninhadas foram ajustadas e a partir do 7º dia pré desmame os animais da ninhada reduzida já se apresentavam significativamente mais pesados ( $8,313 \pm 4,793\text{g}$ ) do que a ninhada normal ( $5,679 \pm 2,629\text{g}$ ) (7º dia  $p < 0,05$  e a partir do 10º dia  $p < 0,001$ ). Após o desmame, o aumento no peso corporal como resultado do tamanho reduzido da ninhada persistiu até a 11ª semana de nascimento, de modo que os animais da ninhada reduzida ( $42,87 \pm 12,55\text{g}$ ) eram significativamente mais pesados ( $p < 0,001$ ) do que os animais da ninhada normal ( $30,28 \pm 11,97\text{g}$ ). Os animais da ninhada reduzida apresentaram aumento de 46% no peso pré desmame e 41% no pós desmame quanto ao grupo ninhada normal (FIGURA 5A e 5B).

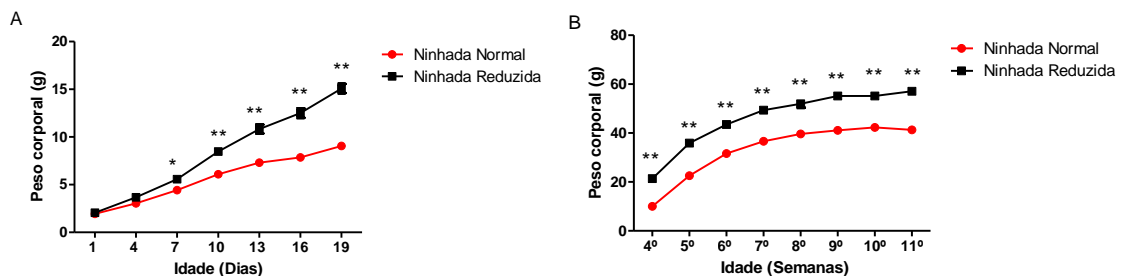


Figura 6: Diferença entre o peso corporal dos animais da ninhada reduzida em relação a animais da ninhada normal pré-desmame (Figura A) e pós-desmame (Figura B) (n=10). Valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. \*  $p < 0,05$ . \*\*  $p < 0,001$ . (Two-way ANOVA, seguido de pós- teste Bonferroni).

Fonte: Da autora.

### 2.1.1 Parâmetros biométricos

A massa dos tecidos adiposos é um indicador de obesidade e tanto a gordura retroperitoneal, quanto a periepididimal (FIGURA 6 e 7) aumentaram nos animais da ninhada reduzida ( $1,16 \pm 0,31\text{g}/100\text{g}$  e  $3,01 \pm 0,52\text{g}/100\text{g}$ , respectivamente;  $p < 0,05$ ) com relação aos da ninhada normal ( $0,68 \pm 0,47\text{g}/100\text{g}$  e  $1,70 \pm 0,75\text{g}/100\text{g}$ , respectivamente;  $p < 0,001$ ), apresentando um aumento de 70% e 75% respectivamente. Assim como o Índice de Lee apresentou-se significativamente elevado ( $p < 0,01$ ) nos animais da ninhada reduzida ( $3,26 \pm 0,04\text{g}/\text{cm}$ ), com relação aos animais de ninhada normal ( $3,11 \pm 0,10\text{g}/\text{cm}$ ), comprovando a efetividade da redução de ninhada em induzir a obesidade (FIGURA 8).

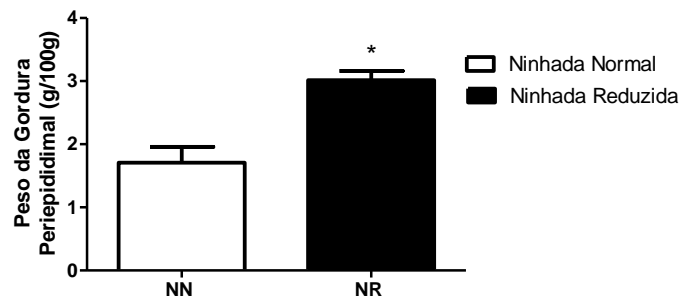


Figura 7: Diferença entre a massa de tecido adiposo Periepididimal da ninhada reduzida (NR) em relação a animais da ninhada normal (NN) (n=9). Valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. \*  $p < 0,001$  (Teste “t” de Student).

Fonte: Da autora.

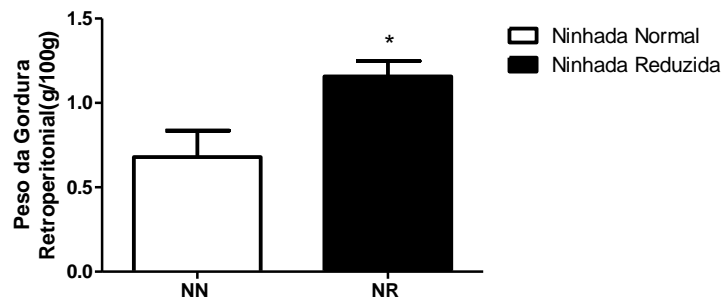


Figura 8: Diferença entre a massa de tecido adiposo Retroperitoneal dos animais da ninhada reduzida (NR) em relação a animais da ninhada normal (NN) (n=9). Valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. \*  $p < 0,05$  (Teste “t” de Student).

Fonte: Da autora.

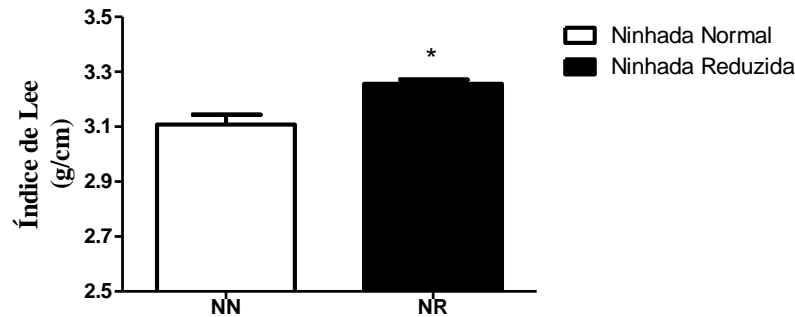


Figura 9: Diferença do Índice de Lee dos animais da ninhada reduzida (NR) em relação a animais da ninhada normal (NN) (n=8). Valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. \*  $p < 0,01$  (Teste “t” de Student).

Fonte: Da autora.

## 5.2 MECÂNICA RESPIRATÓRIA

As médias  $\pm$  desvio padrão dos valores de  $R_{aw}$ ,  $G_{tis}$ ,  $H_{tis}$  e  $\eta$  dos diferentes grupos estão apresentadas na Figura 9 A, B, C e D, respectivamente. Os grupos apresentaram valores basais de mecânica pulmonar e após a nebulização com Sal, equivalentes no início do experimento (TABELA 1).

Tabela 1 - Dados basais da mecânica respiratória e após a nebulização com Sal para os grupos estudados.

Parâmetros	Grupos experimentais			
	Basal		Salina	
	Ninhada Normal (n=15)	Ninhada Reduzida (n=15)	Ninhada Normal (n=15)	Ninhada Reduzida (n=15)
$R_{aw}$ , Resistência das Vias aéreas (cmH <sub>2</sub> O.s/mL)	0,21 $\pm$ 0,07	0,29 $\pm$ 0,19	0,29 $\pm$ 0,09	0,34 $\pm$ 0,16
$G_{tis}$ , Resistência Tecidual (cmH <sub>2</sub> O.s.s/mL)	2,84 $\pm$ 0,48	2,61 $\pm$ 0,55	3,1 $\pm$ 0,49	2,77 $\pm$ 0,42
$H_{tis}$ , Elastância Tecidual (cmH <sub>2</sub> O/mL)	18,52 $\pm$ 1,83	17 $\pm$ 2,33	18,37 $\pm$ 1,26	17,10 $\pm$ 2,17
$\eta$ , Histeresividade	0,15 $\pm$ 0,02	0,16 $\pm$ 0,03	0,17 $\pm$ 0,03	0,16 $\pm$ 0,03

Valores representam a média  $\pm$  erro padrão.

Fonte: Da autora.

O grupo Ninhada normal foi nebulizado com as doses de 100mg/mL de MCh e 1,5 mg/mL Salbutamol. O valor de  $R_{aw}$  aumentou significativamente após nebulização com MCh de  $0,29 \pm 0,09$  cmH<sub>2</sub>O.s/mL para  $0,66 \pm 0,14$  cmH<sub>2</sub>O.s/mL ( $p < 0,001$ ) e os valores alteraram-se para  $0,48 \pm 0,12$  cmH<sub>2</sub>O.s/mL quando nebulizados com Salbutamol ( $p < 0,01$ ) (FIGURA 9A). Os valores de  $G_{tis}$  também mostraram aumento significativo de  $3,1 \pm 0,49$  cmH<sub>2</sub>O.s.s/mL para  $5,98 \pm 1,38$  cmH<sub>2</sub>O.s.s/mL quando nebulizados com MCh ( $p < 0,001$ ) e quando nebulizados com Salbutamol foram  $5,64 \pm 1,47$  cmH<sub>2</sub>O.s.s/mL (FIGURA 9B).  $H_{tis}$  não apresentou diferença significativa nos animais nebulizados com MCh, mas nos animais nebulizados com Salbutamol, o valor de  $18,37 \pm 1,26$  cmH<sub>2</sub>O/mL elevou-se significativamente para  $29,29 \pm 8,65$  cmH<sub>2</sub>O/mL (FIGURA 9C). O Valor de  $\eta$  ampliou significativamente de  $0,17 \pm 0,03$  para  $0,26 \pm 0,04$  nos animais nebulizados com MCh ( $p < 0,001$ ), porém não houve significância com relação ao Salbutamol (FIGURA 9D).

O grupo Ninhada reduzida também foi nebulizado com as doses 100mg/mL de MCh e 1,5 mg/mL Salbutamol. O valor de  $R_{aw}$  alterou-se de  $0,34 \pm 0,16$  cmH<sub>2</sub>O.s/mL para  $0,65 \pm 0,11$  cmH<sub>2</sub>O.s/mL quando nebulizado com MCh ( $p < 0,001$ ), apresentando diferença estatisticamente significante e os valores alteraram-se para  $0,52 \pm 0,16$  cmH<sub>2</sub>O.s/mL quando nebulizados com Salbutamol ( $p < 0,01$ ) (FIGURA 9A).  $G_{tis}$  apresentou diferença significativa nos camundongos nebulizados com MCh, passando os valores de  $2,77 \pm 0,42$  cmH<sub>2</sub>O.s.s/mL para  $5,31 \pm 0,88$  cmH<sub>2</sub>O.s.s/mL ( $p < 0,001$ ), assim como quando nebulizados com Salbutamol elevaram-se significativamente para  $6,93 \pm 2,7$  (FIGURA 9B). Os valores de  $H_{tis}$  intensificaram significativamente em ambos os medicamentos MCh e Salbutamol, aumentaram de  $17,10 \pm 2,17$  cmH<sub>2</sub>O/mL para  $21,17 \pm 4,03$  cmH<sub>2</sub>O/mL e  $27,98 \pm 7,33$  cmH<sub>2</sub>O/mL nas respectivas doses ( $p < 0,001$ ) (FIGURA 9C). Os valores de  $\eta$  também demonstraram aumento significativo de  $0,16 \pm 0,03$  para  $0,26 \pm 0,05$  quando nebulizados com MCh e quando nebulizados com Salbutamol foram para  $0,25 \pm 0,07$  ( $p < 0,001$ ) (FIGURA 9D).

Comparando-se os medicamentos nos diferentes grupos quando nebulizado com MCh, foram observados que  $R_{aw}$ ,  $G_{tis}$ ,  $H_{tis}$ ,  $\eta$  não apresentaram diferença significativa entre os mesmos. Quanto à nebulização com Salbutamol, apenas os valores de  $\eta$  elevaram-se significativamente no grupo ninhada reduzida ( $0,25 \pm 0,07$ ), quando comparado ao grupo ninhada normal ( $0,20 \pm 0,02$ ) ( $p < 0,01$ ) (FIGURA 9D).

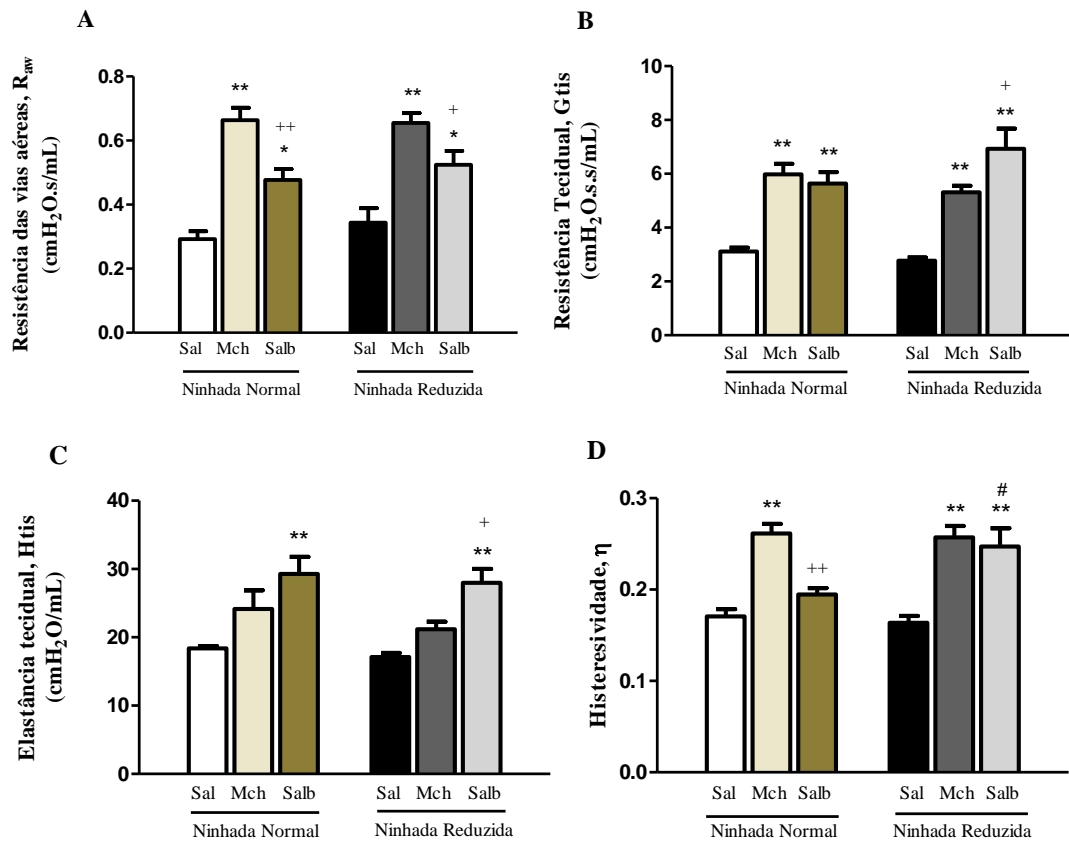


Figura 10: Parâmetros da mecânica pulmonar. (A)  $R_{aw}$ , (B)  $G_{tis}$ , (C)  $H_{tis}$  e (D)  $\eta$  dos animais da ninhada reduzida em relação a animais da ninhada normal, após nebulização com Sal (salina), MCh (metacolina), Salb (salbutamol). Valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. \*  $p < 0,01$  e \*\*  $p < 0,001$  com relação à salina. +  $p < 0,05$  e ++  $p < 0,01$  do Salb com relação à MCh dentro do mesmo grupo. #  $p < 0,01$  entre os grupos de ninhada reduzida e normal. (One-way ANOVA, seguido de pós-teste Newman-Keuls).

Fonte: Da autora.

### 5.3 HISTOLOGIA

A análise do parênquima pulmonar evidenciou no grupo de ninhada reduzida uma diminuição significativa de alvéolos normais, de  $84,2 \pm 5,9\%$  no grupo ninhada normal, para  $45,5 \pm 11,5\%$  no grupo ninhada reduzida ( $p < 0,0001$ ) e aumento de porcentagem de alvéolos colapsados de  $15,8 \pm 5,9\%$  para  $54,5 \pm 11,5\%$  no grupo ninhada reduzida ( $p < 0,0001$ ), não havendo diferenças significativas de alvéolos hiperinsuflados entre os grupos estudados (TABELA 2). Os cortes histológicos dos pulmões que caracterizam as mudanças morfológicas estão representados nas Figuras 11A, 11B.

Tabela 2 - Histologia Pulmonar

<b>Grupos</b>	<b>Ninhada Normal</b>	<b>Ninhada Reduzida</b>
Normal (%)	84,2 ± 2,41	45,5 ± 4,70*
Colapsado (%)	15,8 ± 2,40	54,5 ± 4,71*
Hiperinsuflado (%)	0	0

Valores representam a média ± erro, \*p<0,0001. Todos os valores foram computados em 10 campos não coincidentes por animal (n=6). (Teste “t” de Student).

Fonte: Da autora.

No presente estudo, foi avaliada a inflamação pulmonar através da contagem de células inflamatórias. De acordo com a Figura 10, os animais do grupo ninhada reduzida apresentaram aumento significativo da porcentagem de PMN no parênquima pulmonar em relação ao grupo ninhada normal (p<0,0001). A porcentagem de MN também aumentou significativamente nos animais do grupo ninhada reduzida em relação ao grupo ninhada normal (p<0,0001).

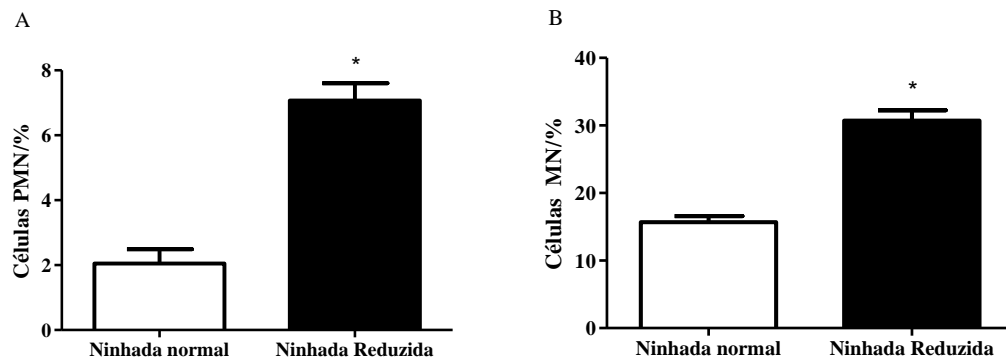


Figura 11: Diferença entre as células inflamatórias presentes no parênquima pulmonar dos grupos ninhada normal e ninhada reduzida. n=6 para cada grupo. Valores foram expressos como média ± erro padrão.

A) PMN- Polimorfonucleares; B) MN- Mononucleares. \* p<0,0001.

Fonte: Da autora.

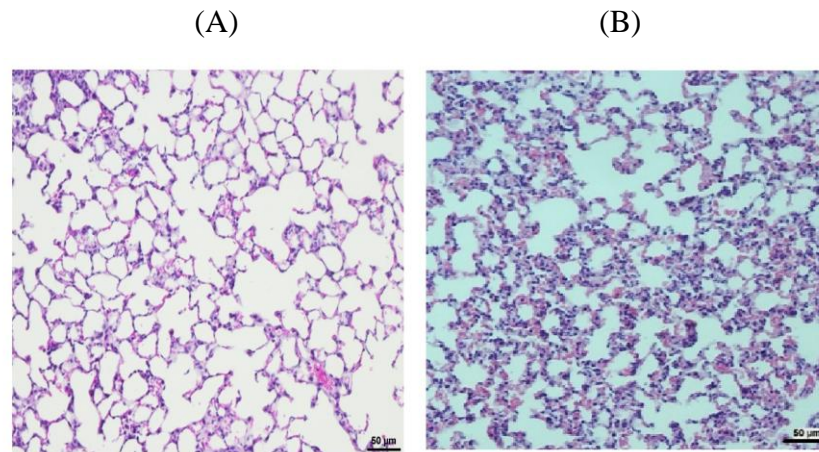


Figura 12: Fotomicrografia representando o parênquima pulmonar corado com hematoxilina e eosina (HE).  
Magnificação original:  $\times 200$ . Barras =  $50\mu\text{m}$ .

- A) Grupo ninhada normal;
- B) Grupo ninhada reduzida;

Fonte: Da autora.

#### 5.4 WESTERN BLOT

Para avaliar o remodelamento, o padrão de expressão proteica de elastina e colágeno III foi investigado em amostras derivadas de pulmão de camundongos dos grupos de ninhada normal e reduzida. A expressão da proteína actina, foi utilizada como normalizador nos ensaios de *Western Blotting* (KAWAMOTO et al., 2008). As figuras 12, 13, 14 e 15 apresentam os resultados obtidos pela expressão proteica.

De acordo com a quantificação das bandas imunorreativas houve uma tendência a diminuição de elastina nos animais da ninhada reduzida em relação aos animais que da ninhada normal, porém não significativa. (FIGURAS 12 e 13).

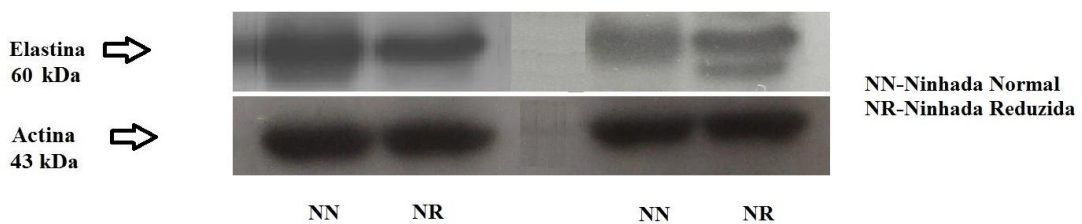


Figura 13: Perfil de expressão de elastina em tecido pulmonar. A actina foi utilizada como controle.  
Fonte: Da autora.



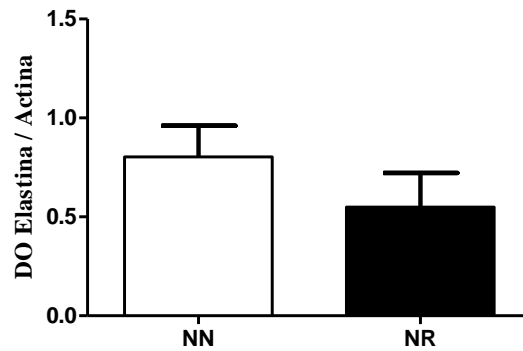


Figura 14: Representação gráfica da densidade óptica (DO) obtida a partir das bandas imunoreativas para elastina. A actina foi utilizada como controle. n=3 para cada grupo. \* p<0,05. (Teste “t” de Student).  
Fonte: Da autora.

Os dados obtidos por *western blot* também demonstraram que houve aumento significativo na expressão de colágeno III nos animais da ninhada reduzida (p<0,05) (FIGURA 14 E 15).

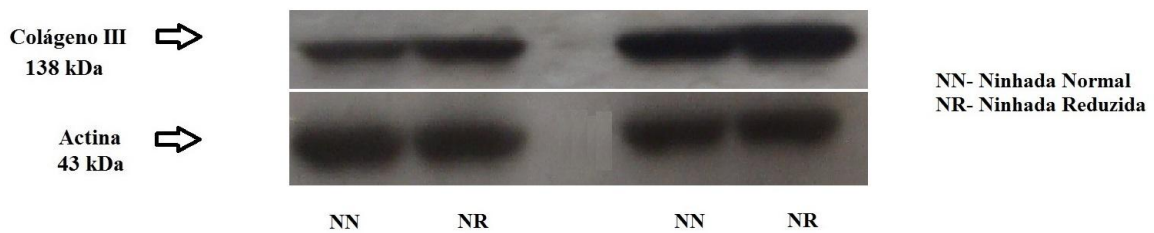


Figura 15: Perfil de expressão de colágeno III em tecido pulmonar. A actina foi utilizada como controle interno.  
Fonte: Da autora

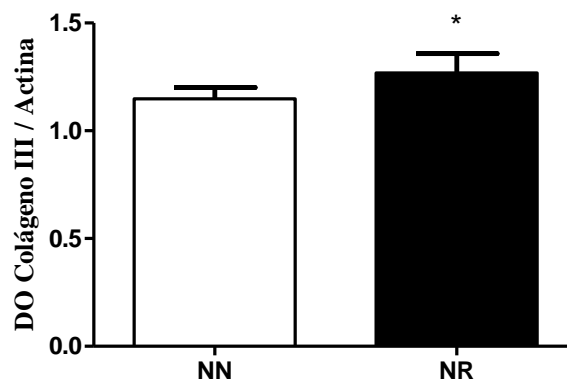


Figura 16: Representação gráfica da densidade óptica (DO) obtida a partir das bandas imunoreativas para colágeno III. A actina foi utilizada como controle. n=3 para cada grupo. \* p<0,05 (Teste “t” de Student).  
Fonte: Da autora.

## 6 DISCUSSÃO

Recentemente, alguns estudos têm sugerido uma hipótese de que a obesidade pode ter uma “origem programada” (ARMITAGE et al., 2004; MUHLHAUSLER, 2007; MORRIS, 2009; WHITE; PURPERA; MORRISON, 2009). Esta “programação” sugere, que não apenas a nutrição fetal, mas também pós-natal é capaz de desencadear a programação da adiposidade (MARTORELL; STEIN; SCHOROEDER, 2001). Pouco se sabe a respeito dos efeitos positivos e negativos das diversas variações pós-natal, tais como as diferenças nutricionais iniciais.

Em modelos animais, como nos seres humanos, a obesidade pode ser avaliada por intermédio de critérios baseados no ganho de peso corporal, índice de Lee e/ou aumento do teor de gordura corporal, apesar dessas características não serem tão definidas como os limites do IMC em seres humanos (ICHIHARA & YAMADA, 2008; HARIRI & THIBAUT, 2010). Geralmente, o grau de obesidade é avaliado pela comparação do peso corporal (ou gordura) do grupo experimental com os animais controle. Os primeiros, alimentados com dieta rica em gordura ou alta densidade energética, e os últimos, alimentados com ração ou dietas com baixo teor de gordura (HARROLD; WILLIAMS; WIDDOWSON, 2000; GHIBAUDI et al., 2002; LEVIN & DUNN-MEYNELL, 2002; WOODS et al., 2003). O índice de Lee, para avaliar a obesidade em ratos e camundongos, é semelhante ao IMC em seres humanos e foi definido por Lee em 1929 (LEE, 1929). Desde então, alguns pesquisadores têm utilizado o índice de Lee para avaliar os níveis de obesidade em ratos (LI et al., 2004; SUN; ZHANG; LIU, 2002). Porém no estudo de Woods et al. (2003) observou-se que a medida da gordura corporal é um critério bastante sensível para avaliar a obesidade em animais, uma vez que os ratos alimentados com dieta rica em gorduras durante 10 semanas apresentaram aumento de 10% no peso total do corpo e aumento de 35-40% da gordura corporal total em comparação com os animais alimentados com uma dieta de baixa gordura.

Neste estudo, os animais da ninhada reduzida apresentaram aumento de 46% no peso pré desmame e mantiveram o aumento no pós desmame (41%) quanto ao grupo ninhada normal. Com relação a gordura periepididimal e retroperitoneal o grupo ninhada reduzida apresentou aumento de 76% e 70% respectivamente, em referência ao grupo ninhada normal. Observou-se, também, que a supernutrição pós-natal induzida por redução do tamanho das ninhadas acarretou alterações precoces no peso corporal, o que pode estar relacionado com o

aumento da disponibilidade de leite (RAJIA; CHEN; MORRIS, 2010). O efeito da redução de ninhada no peso corporal foi mantido durante o período da idade adulta (11 semanas) de acordo com estudos anteriores (PLAGEMANN et al., 1999; VELKOSKA; COLE; MORRIS, 2005). Além do peso, utilizou-se a massa dos depósitos de gordura periepididimal e retroperitoneal e o índice de Lee como parâmetros comparativos entre animais de ninhada reduzida e normal. Os parâmetros avaliados refletem a adiposidade nos animais de ninhada reduzida e demonstra que este modelo foi capaz de induzir a obesidade. Esses resultados sugerem que a nutrição precoce é importante para as características do indivíduo na vida adulta (VELKOSKA; COLE; MORRIS, 2005).

Há diversas classificações para os depósitos de tecido adiposo, sendo uma delas de acordo com a sua localização topográfica, que se subdivide em: depósitos subcutâneos e depósitos internos, cada um deles apresentando outras subdivisões. Os dois depósitos de gordura avaliados no presente estudo (periepididimal e retroperitoneal) são classificados como internos e viscerais, sendo o retroperitoneal denominado extraperitoneal intra-abdominal, e o periepididimal designado extraperitoneal intrapélvico (WAJCHENBERG, 2000; YANG, 2008). A distribuição regional da gordura corporal, principalmente o excesso de gordura visceral, pode ser considerada como sendo o principal problema relacionado à obesidade e é conhecida como importante indicador de alterações metabólicas e cardiovasculares em alguns indivíduos (WAJCHENBERG, 2000; WAJCHENBERG et al., 2002; CHAN et al., 2004; DESPRÉS & LEMIEUX, 2006; YANG, 2008; GIL et al., 2011). Os depósitos de gordura possuem características diferentes, não somente relacionadas ao metabolismo celular, mas também quanto à sua capacidade de formar novos adipócitos (CINTI, 2005; GIL et al., 2011; CINTI, 2012). Estes dados, juntamente com a análise do índice de Lee, evidenciam claramente outra característica desse modelo, que é a hipertrofia adipocítica, onde há aumento no conteúdo das células de gordura (BERNARDIS & PATTERSON, 1968; MACHO et al., 2000).

Para indivíduos saudáveis, os músculos da respiração permitem que ar pulmonar seja constantemente renovado, superando as forças de recolhimento elástico dos tecidos pulmonares e parede torácica e o impedimento à passagem de ar ao longo das vias aéreas. Sabendo que as propriedades fisiológicas e a mecânica pulmonar mudam em determinadas patologias humanas, essas têm sido reproduzidas em animais experimentais (BATES, 2009).

Obesidade induz a inúmeras mudanças na função e mecânica pulmonar. O principal efeito da obesidade na função pulmonar é a redução da capacidade residual funcional (CRF),

o que promove alterações ventilatórias com baixos volumes e conseqüentemente a uma diminuição do calibre das vias aéreas e aumento da resistência destas durante a respiração (FARAH et al., 2011). A medição do aumento da resistência de vias aéreas é executada utilizando-se testes inalatórios padronizados com agonistas constritores de vias aéreas, comumente histamina ou MCh e o relaxamento das vias aéreas após o desafio constritor pode ser avaliado através da administração de fármacos broncodilatadores. No presente estudo, os experimentos foram realizados com nebulização de Sal, MCh e Salb. Os resultados da mecânica pulmonar demonstraram que não houve diferença estatística entre as medidas basais e após a nebulização com salina, nos parâmetros  $R_{aw}$ ,  $G_{tis}$ ,  $H_{tis}$  e  $\eta$ , demonstrando que o veículo da droga (a solução salina) não causa broncoconstrição e broncodilatação. A nebulização da MCh ao invés da administração via intravenosa, aproxima-se mais da situação utilizada, por exemplo, em um teste de espirometria (WAGERS et al., 2002; JONASSON et al., 2009). Porém, segundo Jonasson et al. (2009), a administração de forma inalada talvez cause má distribuição do fármaco na árvore traqueobrônquica, levando a resposta heterogênea das vias aéreas periféricas.

Peták e colaboradores (1997) estudaram os efeitos da administração de MCh inalatória e intravenosa em ratos, e a análise da responsividade pulmonar destes animais revelou que o padrão de alteração mecânica nas vias aéreas e no parênquima dependia do local de ação da MCh, que por sua vez estava intimamente relacionado à sua forma de administração. Enquanto a infusão intravenosa induzia somente broncoconstrição, a versão aerossol foi capaz de evocar constrição tanto de tecido como de via aérea, o que pode decorrer da presença e atividade diferencial de receptores muscarínicos (colinérgicos) do tipo M3 no músculo liso das vias aéreas e M1, localizados nas paredes alveolares. Os receptores M3, responsáveis por respostas constritoras de vias aéreas, parecem ser mais facilmente ativados pela infusão venosa de MCh, enquanto o agonista aerossol necessita ser difundido através do epitélio respiratório antes de atingir o músculo. Já os receptores M1, localizados nas paredes dos alvéolos e envolvidos nas respostas do parênquima, são alcançados sem obstáculos pela via inalatória (PETÁK et al., 1997).

A mecânica do sistema respiratório é marcadamente alterada quando a musculatura brônquica é desafiada com agentes broncoativos e como ela se transforma nas diversas doenças pulmonares, o desafio com agonistas da musculatura lisa, portanto, serve como método adequado para auxiliar na compreensão de determinadas patologias respiratórias.

Com a utilização do ventilador pressupõe-se que os pulmões sejam ventilados homogeneamente (BATES, 2005). Contudo, a administração de broncoconstritores causa heterogeneidade regional na pressão alveolar (BATES & SUKI, 2008). Com base nisso, a perturbação em volume denominada pelo ventilador de TLC foi realizada para o recrutamento dos alvéolos e diminuição da heterogeneidade pulmonar.

A análise dos parâmetros da mecânica respiratória como, por exemplo:  $R_{aw}$ ,  $G_{tis}$  e  $H_{tis}$ , têm sido utilizadas em muitos estudos para a caracterização do sistema respiratório, pois permite separar os componentes centrais e vias aéreas dos componentes de tecido periférico (PINTO, 2008). A resistência e a elastância observadas neste modelo têm significado fisiológico direto, ou seja, a resistência significa o impedimento à passagem de ar pelas vias aéreas (ou o atrito da passagem do ar pelos ductos aéreos) (CARVALHO & ZIN, 2011) e a elastância assume principalmente a dificuldade em se expandir os compartimentos alveolares (BATES, 2009).

Na obesidade a resistência do sistema respiratório humano, tanto das vias aéreas quanto pulmonar total, se mostra aumentada de acordo com o aumento do IMC, porém neste estudo nenhuma das resistências se mostrou aumentada (MCCALLISTER; ADKINS; O'BRIEN JR, 2009). No presente estudo, houve aumento do parâmetro  $G_{tis}$  após a administração do agente broncoativo MCh em ambos os grupos, o que pode ser esclarecido pela contração da musculatura lisa dos brônquios e bronquíolos. Já para o aumento na  $R_{aw}$  uma possível explicação fisiológica se deve à contração da musculatura lisa, causando a diminuição do calibre das vias aéreas. Esta diminuição no diâmetro aumenta a dificuldade da passagem do ar pelos ductos aéreos, exigindo maior gradiente de pressão para se alcançar o mesmo fluxo de quando a musculatura estava relaxada (BATES, 2009).

A  $H_{tis}$  não apresentou diferença entre o grupo de ninhada reduzida e o de ninhada normal. É possível que a obesidade não tenha impacto na elastância tecidual até que uma quantidade mais importante de tecido adiposo tenha se acumulado (JOHNSTON et al., 2008). A tendência a aumento de  $H$  após a aplicação da MCh, por sua vez, pode ser elucidado pela distribuição dos alvéolos nos pulmões. Os alvéolos estão distribuídos de tal forma que são interdependentes, ou seja, se um grupo de alvéolos é estirado, esta força de estiramento irá se espalhar para os alvéolos que estiverem ao seu redor. Assim, a broncoconstrição originada pela MCh causa o estiramento dos alvéolos próximos aos brônquios e bronquíolos, aumentando a rigidez do parênquima pulmonar. O parênquima mais rígido dificulta a insuflação dos compartimentos alveolares, ou seja, aumentando a elastância pulmonar. Na

obesidade pode haver aumento da elastância, assim como no caso da fibrose cística que causa o enrijecimento do parênquima pulmonar, já o enfisema, causado pela destruição da estrutura do parênquima pulmonar, causa a diminuição deste parâmetro (COHEN, et al., 2004). Nos parâmetros  $R_{aw}$ ,  $G_{tis}$  e  $H_{tis}$  não houve relaxamento significativo após a administração de Salb, o que pode ser atribuído ao tempo de ação de 10 minutos utilizado, que pode variar de 10 a 20 minutos (RIESENFELD et al., 2010; HORIBA et al., 2011). Porém, devido a dificuldades técnicas, como manter o animal vivo durante o extenso procedimento (devido à inclusão dos parâmetros basal, Sal, MCh, Salb e as perturbações de TLC), optou-se por realizar um tempo menor de aplicação da droga. Outra explicação seria com relação à presença de citocinas, como por exemplo, a IL-13 que pode diminuir os efeitos broncoprotetores de Salb e estar associada com o aumento da hiper-responsividade a MCh (HORIBA et al., 2011).

A hiper-responsividade observada nos camundongos de ambos os grupos foi atribuída não somente às vias respiratórias, mas também ao parênquima pulmonar, pois resistência tecidual e elastância tecidual, os parâmetros que refletem a mecânica do tecido pulmonar, apresentaram diferenças com a administração da MCh (JOHNSTON et al., 2008).

A  $\eta$  representa relação entre dissipação e conservação de energia nos tecidos pulmonares, sendo representada pela razão  $\eta = G/H$  (FEITOSA, 2012). É possível observar, no presente estudo, aumento deste parâmetro nos animais da ninhada reduzida desafiados com Salb quando comparados aos animais da ninhada normal submetidos ao mesmo tratamento. A diferença observada nesse parâmetro após a administração do Salb pode ser devido à heterogeneidade pulmonar causada pela broncoconstrição, ou também por uma grande variação na resposta a drogas  $\beta_2$  agonistas, que pode ocorrer por aumento na inflamação das vias respiratórias, causando regulação negativa da função de receptor  $\beta$  (SHORE et al., 1997; SHORE, 2002). Outra explicação seria devido à modificação da rede das fibras de colágeno e de elastina que pode ser um determinante para o aumento da  $\eta$  (ROCCO et al., 2003).

Além das medidas funcionais, as avaliações morfométricas são utilizadas para quantificar o grau de destruição das paredes alveolares (JOHANSON & PIERCE, 1972; FUSCO, et al., 2002). Neste estudo houve redução da porcentagem de alvéolos normais, aumento do colapso alveolar no grupo de redução de ninhada, o que pode conduzir à presença de heterogeneidades e ao aumento da viscoelasticidade do pulmão e/ou pressão heterogênea, juntamente com mudanças no conteúdo de fibras colágenas e elásticas (ROCCO et al., 2003).

A resposta inflamatória é caracterizada por alteração da permeabilidade endotelial e recrutamento de células inflamatórias. Neste contexto, os animais da ninhada reduzida apresentaram aumento do infiltrado de células MN e PMN quando comparado aos animais ninhada normal. Esse aumento, principalmente de macrófagos, neutrófilos e linfócitos pode conduzir ao desenvolvimento de hiper-responsividade brônquica, assim como liberação de mediadores inflamatórios e citocinas que amplificam a inflamação (WENZEL, 2003; HARA et al., 2006). O aumento do número de células inflamatórias correlaciona-se com o comprometimento do parênquima pulmonar e a persistência da inflamação crônica pode induzir a um reparo do tecido, conhecido como remodelamento, que envolve alterações estruturais da parede das vias aéreas com uma deposição muitas vezes desarranjada das fibras da MEC (SAETTA; TURATO; LUPPI, 2002; PHIPPS et al., 2004). Entretanto, este processo de reparo não restaura a estrutura e função normal do tecido levando a alterações fisiológicas e patológicas (LAURENT, 1991).

Lucey et al., (2002) descrevem a participação do processo inflamatório no comprometimento dos componentes da matriz extracelular (MEC), demonstrando que macrófagos ativados liberam mediadores como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  que podem ativar diretamente as vias de transdução de sinais, afetando a produção de matriz do tecido conjuntivo, síntese de enzimas proteolíticas e a apoptose.

O processo de remodelamento pulmonar envolve um constante processo de reparo e regeneração das estruturas da parede das vias aéreas e parece contribuir significativamente para a perda de função pulmonar, principalmente em pacientes com asma grave (IN'T VEEN et al., 2000; MAUAD et al., 2004). Qualquer alteração na parede alveolar é provavelmente consequência da mudança na composição de colágeno do tecido (LANG et al., 1994). No presente estudo, foi observado pelo *Western Blot* um aumento da deposição de fibras colágenas pulmonares, sugerindo maior remodelamento pulmonar periférico nos animais da ninhada reduzida, provavelmente decorrente de inflamação, pois as citocinas liberadas podem estimular a produção de fibras elásticas e de colágeno I e III por miofibroblastos e por outros mecanismos como desequilíbrio na síntese e degradação na matriz extracelular.

Yuan e colaboradores, demonstraram em seu estudo que as fibras de colágeno e elásticas contribuem para a elasticidade do tecido durante a respiração normal (YUAN et al., 2000). No presente estudo, não observou-se relação entre elastância tecidual, alterações na resistência do tecido e o resultado do *Western Blot* de colágeno III e de elastina. Provavelmente as alterações na MEC contribuíram para os resultados negativos de H o que

corroborar com os resultados do estudo de Phipps et al. (2004). Acredita-se também que a realização da mecânica pulmonar com tórax fechado pode ocultar as alterações pulmonares, pois um tórax intacto é necessário para regular a resistência e as conexões parenquimatosas do sistema respiratório.

A organização e a interação entre colágeno e elastina e não só o número absoluto destas constituem importantes fatores que influenciam no comportamento mecânico pulmonar (MIJAILOVICH et al., 1994; YUAN; INGENITO; SUKI, 1997). Estudos prévios sugerem que os conteúdos destas fibras influenciam diretamente a rigidez e viscosidade do parênquima pulmonar (FAFFE et al., 2002; FAFTE et al., 2006).

Tais alterações podem ser ao menos em parte responsáveis pelo efeito do Salb nos animais do grupo de ninhada reduzida, conduzindo a perda do efeito broncodilatador, e aumento do fechamento de vias aéreas em episódios de broncoconstrição (MAUAD et al., 2004). Rocco e colaboradores (2003) apresentaram a hipótese de que o aumento na quantidade de fibras elásticas, principalmente fibras oxitalânicas, poderia ser responsável pela perturbação da organização tridimensional da matriz extracelular, o que levaria a um impacto maior sobre a mecânica dos tecidos do que a quantidade efetiva de cada componente da fibra. Estes resultados são suportados pela observação de que a  $\eta$  do tecido não é determinada somente por fibras colágenas e elásticas, mas provavelmente por um efeito de rede (YUAN et al., 2000).



## 7 CONCLUSÃO

No presente estudo foi possível concluir que:

- A indução da obesidade através do modelo de redução de ninhada foi eficaz, pois observou-se aumento do peso corporal dos animais da ninhada reduzida em relação à ninhada normal, assim como da gordura retroperitoneal e periepídimal e Índice de Lee.

- A medida da mecânica respiratória em camundongos induzidos a obesidade não foi capaz de detectar alterações fisiológicas nos parâmetros  $R_{aw}$ , G, H e  $\eta$  entre os grupos, nos valores basais, após a administração de salina e MCh. Com relação ao salbutamol apenas  $\eta$  apresentou diferença significativa entre os grupos, o que pode estar relacionado à heterogeneidade pulmonar causada pela MCh, assim como ao remodelamento observado através do *Western Blot*. Demonstrando que o modelo de obesidade utilizado, não se mostrou eficaz em produzir alterações mecânicas pulmonares, não apresentando alterações na resistividade das vias aéreas.

- O modelo de obesidade em questão apresentou aumento do número de alvéolos colapsados e diminuição dos alvéolos normais e aumento de células inflamatórias.

- O conteúdo proteico de elastina no grupo ninhada reduzida apresentou uma tendência a redução, porém não significativa e, inversamente, a quantidade de colágeno tipo III aumentou no parênquima pulmonar dos animais da ninhada reduzida, indicando o processo de destruição e remodelamento do parênquima pulmonar.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARMITAGE, J.A. et al. Developmental programming of the metabolic syndrome by maternal nutritional imbalance: how strong is the evidence from experimental models in mammals? **J Physiol**, v. 561, n. 355–377, 2004.

AUCHINLOS, H. J., et al. Allergy and hypersensitivity. **Immunobiology**, v. 11, n. 1, p. 11-25, 1997.

BASTARD, J.P. et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. **Eur Cytokine Netw**, v. 17, p. 4–12, 2006.

BATES, J. H. T. et al. Measurements of alveolar pressure in closed-chest dogs during flow interruption. **J Appl Physiol**, v. 67, p. 488-492, 1989.

BATES, J. H. T. The temporal dynamics of acute induced bronchoconstriction. In: KHOO, M. C. K. (Ed.) *Bioengineering Approaches to Pulmonary Physiology and Medicine*. New York: Plenum Press, Ch. 14, p. 213-226, 1996.

BATES, J. H. T. et al. Temporal dynamics of acute isovolume bronchoconstriction in the rat. **J Appl Physiol**, v. 82, p. 55-62, 1997.

BATES, J. H. T.; IRVIN, C. G. Measuring lung function in mice: the phenotyping uncertainty principle. **J Appl Physiol**, v. 94, p. 1297-1306, 2003.

BATES, J. H. T. Measurement techniques in respiratory mechanics. In: HAMID, Q.; SHANNON, J.; MARTIN, J. (Eds.) *Physiologic Basis of Respiratory Disease*. Hamilton: BC Decker, Ch. 54, p. 623-637, 2005.

BATES, J.H.T.; ALLEN, G.B. The estimation of lung mechanics parameters in the presence of pathology: a theoretical analysis. **Ann of Biom Eng**, v. 34, n. 3, p.384-392, 2006.

BATES, J. H. T.; SUKI, B. Assessment of peripheral lung mechanics. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 163, p. 54-63, 2008.

BATES, J. T. **Lung mechanics: An inverse modeling approach**. Cambridge: Cambridge, University Press, cap. 1, p. 1-14, 2009.

BATES, J. H. T.; RINCON, M.; IRVIN, C. G. Animal models of asthma. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 297, p. L401-L410, 2009.

BENTO, A. M.; HERSHENSON, M. B. Airway remodeling: potential contributions of subepithelial fibrosis and airway smooth muscle hypertrophy/hyperplasia to airway narrowing in asthma. **Allergy Asthma Proc**, v. 19, p. 353-358, 1998.

BERNARDIS, L. L, PATTERSON, B. D. Correlation between “Lee index” and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **J Endocrinol**, v. 40, p. 527-528, 1968.

BLEASE, K. et al. Chemokines and their role in airway hyper-reactivity. **Respir Res**, v. 1, p. 54-61, 2000.

BUSSE, W. W.; LEMANSKE, R. F. Asthma. **N Engl J Med**, v.344, n.5, p.350-362, 2001.

CALLE, E. E.; KAAKS, R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. **Nat. Rev. Cancer**, v. 4, p. 579-591, 2004.

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

CHAN, D. C. et al. Adipose tissue compartments and insulin resistance in overweight-obese Caucasian men. **Diab Res Clin Prat**, v. 63, p. 77-85, 2004.

CHEN, B. et al. Tidal breathing pattern differentially antagonizes bronchoconstriction in C57BL/6J vs. A/J mice. **J Appl Physiol**, v. 101, p. 249-255, 2006.

CINTI, S. The adipose organ. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 73, n. 1, p. 9-15, 2005.

\_\_\_\_\_. The adipose organ at a glance. **Dis Model Mech**, v. 5, n. 5, p. 588-594, 2012.

COHEN, J. C. et al. The “Goldilocks Effect” in Cystic Fibrosis: identification of a lung phenotype in the cftr knockout and heterozygous mouse. **BMC Genetics**, v. 5, 2004.

COULSON, F.R.; FRYER, A.D. Muscarinic acetylcholine receptors and airway diseases. **Pharmacol Ther**, v. 98, n.1, p. 59-69, 2003.

CUMMINGS, D. E.; SCHWARTZ, M. W. Genetics and pathophysiology of human obesity. **Annu Rev Med**, v. 54, p. 453-471, 2003.

DALE, D. C.; BOXER, L.; LILES, W. C. "The phagocytes: neutrophils and monocytes". **Blood** v.112, p.935-945, 2008.

DELGADO, J.; BARRANCO, P.; QUIRCE, S. Obesity and asthma. **J Investig Allergol Clin Immunol**, v. 18, n. 6, p. 420-425, 2008.

DESPRÉS, J. P.; LEMIEUX, I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. **Nature**, v. 44, p. 881-887, Dec. 2006.

DOLNIKOFF, M. et al. Decreased lipolysis and enhanced glycerol and glucose utilization by adipose tissue prior to development of obesity in monosodium glutamate (MSG) treated-rats. **Int J Obes and Rel Metab Dis**, v. 25, p. 426-433, 2001.

DUNNILL, M.S. Evaluation of a Simple Method of Sampling the Lung for Quantitative Histological Analysis. **Thorax**, v. 19, p. 443-448, 1964.

EBIHARA, T. et al. Changes in extracellular matrix and tissue viscoelasticity in bleomycin-induced lung fibrosis: temporal aspects. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 162, p. 1569-1576, 2000.

EVANS, W. J. Exercise, nutrition and aging. **Journal of nutrition**, v. 122, p. 796-801, 1992.

FAFFE, D. S. et al. Comparison of rat and mouse pulmonary tissue mechanical properties and histology. **J Appl Physiol**, v. 92, p. 230-234, 2002.

\_\_\_\_\_. Mouse strain dependence of lung tissue mechanics: role of specific extracellular matrix composition. **Respir Physiol Neurobiol**, v. 152, p. 186-196, 2006.

FARAH, C. S. et al. Obesity Is a Determinant of Asthma Control Independent of Inflammation and Lung Mechanics. **Chest**, v. 140, n. 3, p. 659-666, 2011.

FEITOSA, E. K. **Efeito do 1,8 – cineol nos parâmetros de contratilidade do músculo liso traqueal e de mecânica do sistema respiratório de ratos expostos a fumaça do cigarro.** 2012, 130f. Tese (Mestrado em Ciências Fisiológicas). Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2012.

FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 50, p. 216-229, 2006.

FORMIGUERA, X.; CANTON, A. Obesity: epidemiology and clinical aspects. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 18, p. 1125–1146, 2004.

FRANSSEN, F. M. E. et al. Obesity and the lung: 5 Obesity and COPD. **Thorax** v. 63, p. 1110–1117, 2008.

FREDBERG, J. J. Frozen objects: small airways, big breaths, and asthma. **J Allergy Clin Immunol**, v. 106, p. 615-624, 2000.

FUSCO, L.B. et al. Papain-induced experimental pulmonary emphysema model in rats. **J Pneumol**, v. 28, n. 1, p. 107, 2002.

GHIBAUDI, L. et al. Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of Sprague–Dawley rats. **Obes Res**, v.10, p. 956–963, 2002.

GIL, A. et al. Is adipose tissue metabolically different at different sites? **Int J Pediatr Obes**, v. 6, n. 1, p. 13-20, 2011.

GOMES, R. F. M. et al. Comparative respiratory system mechanics in rodents. **J Appl Physiol**, v. 89, p. 908-916, 2000.

GOSENS, R. et al. Pharmacology of airway smooth muscle proliferation. **European Journal of Pharmacology**, v. 585, p. 385-397, 2008.

GUMP, A.; HAUGHNEY, L.; FREDBERG, J. Relaxation of activated airway smooth muscle: relative potency of isoproterenol vs. tidal stretch. **J Appl Physiol**, v. 90, p. 2306-2310, 2001.

HALFHIDE, C.; EVANS, H. J.; COURIEL, J. Inhaled bronchodilators for cystic fibrosis. **Cochrane Database Syst Rev**. n. 4, 2005.

HALL, F. C.; WALPORT, M. J. Hypereosinophilic syndromes: association with vasculitis, fibrosis and autoimmunity. **Clin Exp Allergy**, v. 23, p. 542-547, 1993.

HANTOS, Z., et al. Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs. **J Appl Physiol**, v. 72, p. 168–178, 1992.

HARA, J., et al. Eosinophilic inflammation, remodeling of lower airway, bronchial responsiveness and cough reflex sensitivity in non-asthmatic subjects with nasal allergy. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 140, n. 4, p. 327-333, 2006.

HARIRI, N.; THIBAUT, L. High-fat diet-induced obesity in animal models. **Nutrition Research Reviews**, v. 23, p. 270–299, 2010.

HARROLD, J. A.; WILLIAMS, G.; WIDDOWSON, P. S. Early leptin response to a palatable diet predicts dietary obesity in rats: key role of melanocortin-4 receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus. **J Neurochem**, v. 74, p. 1224–1228, 2000.

HILL, J. O. Understanding and addressing the epidemic of obesity: an energy balance perspective. **Endocr. Rev.**, v. 27, n. 7, p. 750-761, 2006.

HOGAN, S. P., et al. Eosinophils: Biological properties and role in health and disease. **Clin experimental allergy**, v. 38, n. 5, p. 709-750, 2008.

HOLZWARTH-MCBRIDE, M. A.; SLADEK, K. M.; KNIGGE, J. R. Monosodium glutamate induced lesions of the arcuate nucleus. II. Fluorescence histochemistry of catecholamines. **Anat. Rec.**, v. 186, p. 197-206, 1976.

HORIBA, M. et al. Effect of IL-1b and TNF-a vs IL-13 on bronchial hyperresponsiveness, b2-adrenergic responses and cellularity of bronchial alveolar lavage fluid. **Autonomic & Autacoid Pharmacology**, v. 31, p. 37–49, 2011.

ICHIHARA, S.; YAMADA, Y. Genetic factors for human obesity. **Cell Mol Life Sci**, v. 65, p. 1086–1098, 2008.

IN'T VEEN, J. C. et al. Recurrent exacerbations in severe asthma are associated with enhanced airway closure during stable episodes. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 161, p. 1902–1906, 2000.

JAMES, A. Airway remodeling in asthma. **Curr Opin Pulm Med**, v. 11, p. 1-6, 2005.

JONASSON, S. et al. Comparisons of effects of intravenous and inhaled methacholine on airway physiology in a murine asthma model. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 165, p. 229-236, 2009.

JOHANSON, Jr. W.G.; PIERCE, A.K. Effects of elastase, collagenase, and papain on structure and function of rat lungs in vitro. **J Clin Invest**, v. 51, p. 288-293, 1972.

JOHNSTON, R. A. et al. Diet-induced obesity causes innate airway hyperresponsiveness to methacholine and enhances ozone-induced pulmonary inflammation. **J Appl Physiol**, v. 104, p. 1727-1735, 2008.

JUBBER, A. S. Respiratory complications of obesity. **Int J Clin Pract**, v. 58, p. 573–580, 2004.

KANASAKI, K.; KOYA, D. Biology of obesity: lessons from animal models of obesity. **J Biomed Biotechnol**, v. 2011, p. 1-11, 2011.

KAWAMOTO, E. M. et al. Amyloid beta-peptide activates nuclear factor-kappa B through an N-methyl-D-aspartate signaling pathway in cultured cerebellar cells. **J Neurosci Res**, v. 86, n. 4, p. 845-860, 2008.

KAY, A. B. Asthma and Inflammation. **J Allergy Clin Immunol**, v. 87, n. 5, p. 893-910, 1991.

KIZER, J. S.; NEMEROFF, C. B.; YOUNGBLOOD, W. W. Neurotoxic amino acids and structurally related analogs. **Pharmacol. Rev**, v. 29, n. 4, p. 301-318, 1977.

KOENIG, S. M. Pulmonary complications of obesity. **Am J Med Sci**, v. 321, p. 249–279, 2001.

LANG, M.R. et al. Collagen content of alveolar wall tissue in emphysematous and non-emphysematous lungs. **Thorax**, v. 49, p. 319-326, 1994.

LAURENT, G. J. Regulation of lung collagen production during wound healing. **Chest**, v. 99, p. 67S–69S, 1991.

LEAN, M.; LARA, J.; HILL, J. O. ABC of obesity. Strategies for preventing obesity. **BMJ**, v. 333, p. 959–962, 2006.

LEE, M. O. Determination of the surface area of the white rat with its application to the expression of metabolic results. **Am J Physiol**, v. 89, p. 24–33, 1929.

LEVIN, B. E.; DUNN-MEYNELL, A. A. Defense of body weight depends on dietary composition and palatability in rats with diet-induced obesity. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 282, p. R46–R54, 2002.

LI, X. L., et al. Experimental study on the obesity rat model induced by vitamin D. **Chin J Clin Rehab**, v. 8, p. 1786–1787, 2004.

LI, Z.; BOWERMAN, S.; HEBER, D. Health Ramifications of the Obesity Epidemic. **Surg. Clin. N. Am.**, v. 85, n. 4, p. 681-701, 2005.

LUCEY, E. C. et al. Severity of Elastase-Induced Emphysema Is Decreased in Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Interleukin-1 $\beta$  Receptor-Deficient Mice. **Laboratory Investigation**, v. 82, n. 1, p. 79-85, 2002.

LUTZ, T. A.; WOODS, S. C. Overview of Animal Models of Obesity. **Curr Protoc Pharmacol**, v. 58, p. 1–22, 2012.

LYNCH, G. S.; RYALL, J. G. Role of beta-adrenoceptor signaling in skeletal muscle: implications for muscle wasting and disease. **Physiological reviews**, v. 88, n. 2, p. 729-767, 2008.

MACHO, L. et al. Effects of new hypoglycemic agent A-4166 on lipolysis and lipogenesis in rat adipocytes. **Endocr Regul**, v. 34, p. 119-126, 2000.

MARGRAF, L. R. et al. Morphometric analysis of the lung in bronchopulmonary dysplasia. **Am Rev Respir Dis**, v. 143, n. 2, p. 391-400, 1991.

MARTORELL, R.; STEIN, A. D.; SCHROEDER, D. G. Early nutrition and later adiposity. **J Nutr**, v. 131, p. 874S–880S, 2001.



MAUAD, T. et al. Abnormal Alveolar Attachments with Decreased Elastic Fiber Content in Distal Lung in Fatal Asthma. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 170, p. 857- 862, 2004.

MCCALLISTER, J. W.; ADKINS, E. J.; O'BRIEN JR. J. M. Obesity and Acute Lung Injury. **Clin Chest Med**, v. 30, n. 3, p. 495–viii, 2009.

MCCLEAN, K. M. et al. Obesity and the lung: 1 Epidemiology. **Thorax**, v. 63, p. 649–654, 2008.

MIJAILOVICH, S. M. et al. Dynamic moduli of rabbit lung tissue and pigeon ligamentum propatagiale undergoing uniaxial cyclic loading. **J Appl Physiol**, v. 76, p. 773-782, 1994.

MONTEIRO, C. A.; CONDE, W. L.; POPKIN, B. M. Income-Specific Trends in Obesity in Brazil: 1975–2003. **Am J Public Health**, v. 97, p. 1808– 1812, 2007.

MORRIS, M. J.; VELKOSKA, E.; COLE, T. J. Central and peripheral contributions to obesity-associated hypertension: impact of early overnourishment. **Exp Physiol**, v. 90, p. 697–702, 2005.

MORRIS, M. J. Early life influences on obesity risk: maternal overnutrition and programming of obesity. **Expert Rev Endocrinol Metab**, v. 4: p. 625–637, 2009.

MUHLHAUSLER, B. S. Programming of the appetite-regulating neural network: a link between maternal overnutrition and the programming of obesity? **J Neuroendocrinol**, v. 19, p. 67–72, 2007.

NAKAGAWA, T.; et al. Effects of chronic administration of sibutramine on body weight, food intake and motor activity in neonatally monosodium glutamate-treated obese female rats: relationship of antiobesity effect with monoamines. **Exp Anim**, v. 49: p. 239-249, 2000.

NAWROCKI, A. R.; SCHERER, P. E. The delicate balance between fat and muscle: adipokines in metabolic disease and musculoskeletal inflammation. **Curr Opin Pharmacol**, v. 4, p. 281-289, 2004.

NEMEROFF, C. B.; LIPTON, M. A.; KIZER, J. S. Models of neuroendocrine regulation: use of monosodium glutamate as an investigational tool. **Dev Neurosci**, v. 1, p. 102-109, 1978.

OCHS-BALCOM, H. M. et al. Pulmonary function and abdominal adiposity in the general population. **Chest**, v. 129, n. 4, p. 853-862, Apr. 2006.

OGDEN, C. L. et al. The epidemiology of obesity. **Gastroenterology**, v. 132, p. 2087–2102, 2007.

PARAMESWARAN, K.; TODD, D. C.; SOTH, M. Altered respiratory physiology in obesity. **Can Respir J**, v. 13, p. 203–210, 2006.

PERMANA, P. A.; MENGE, C.; REAVEN, P. D. Macrophage-secreted factors induce adipocyte inflammation and insulin resistance. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 341, p. 507–514, 2006.

PETÁK, F. et al. Methacholine-induced bronchoconstriction in rats: effects of intravenous vs. aerosol delivery. **J Appl Physiol**, v. 82, p. 1479-1487, 1997.

PHIPPS, S. et al. Acute allergen-induced airway remodeling in atopic asthma. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 31, p. 626–632, 2004.

PINTO, T. S. **Avaliação de diferentes métodos para o estudo da mecânica respiratória em um modelo murino de enfisema pulmonar**. 2008, 86f. Tese (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

PLAGEMANN, A. et al. Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galaninergic neurons, and syndrome x-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats. **Brain Res**, v. 836, p. 146–155, 1999.

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

RAJALA, M. W.; SCHERER, P. E. Minireview: the adipocyte—at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. **Endocrinology**, v. 144, p. 3765-3773, 2003.

RAJIA, S.; CHEN, H.; MORRIS, M. J. Maternal Overnutrition Impacts Offspring Adiposity and Brain Appetite Markers-Modulation By Postweaning iet. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 22, p. 905-914, 2010.

REBER, L. L. et al. A Dissociated Glucocorticoid Receptor Modulator Reduces Airway Hyperresponsiveness and Inflammation in a Mouse Model of Asthma. **J Immunol**, v. 188, n. 7, p. 3478-3487, 2012.

RICCIARDOLO, F. L.; et al. Allergen-induced impairment of bronchoprotective nitric oxide synthesis in asthma. **J Allergy Clin Immunol**, v. 108, p. 198–204, 2001.

RIESENFELD, E. P. et al. Inhaled salmeterol and/or fluticasone alters structure/function in a murine model of allergic airways disease. **Respiratory Research**, v. 11, p. 22, 2010.

ROCCO, P.R. et al. Effect of corticosteroid on lung parenchyma remodeling at an early phase of acute lung injury. **Am. J. Respir. Crit. Care Med**, v. 168, p. 677–684, 2003.

RTVELADZE, K. et al. Health and Economic Burden of Obesity in Brazil. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. 1-10, July. 2013.

RUBIN, A.S. et al. Hiper- responsividade brônquica. **J Pneumol**. v. 28, p. S101-S121, 2002.

SAETTA, M.; TURATO, G.; LUPPI, F. Inflammation in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. **Chronic Obstructive lung disease. BC Decker**, p. 114-126, 2002.

SALOME, C. M. et al. Effect of obesity on breathlessness and airway responsiveness to methacholine in non-asthmatic subjects. **Int J Obes, Lond**, v. 32, n. 3, p. 502–509, 2008.

SCHERER, P. E. Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. **Diabetes**, v. 55, n. 6, p. 1537-1545, 2006.

SCHMIDT, I. et al. The effect of leptin treatment on the development of obesity in overfed suckling Wistar rats. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 25, p. 1168–1174, 2001.

SCHNEIDER, C.A.; RASBAND, W.S.; ELICEIRI, K.W. "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis". **Nature Methods**, v. 9, p. 671-675, 2012.

SHALABY, K. H. et al. Combined forced oscillation and forced expiration measurements in mice for the assessment of airway hyperresponsiveness. **Respiratory Research**, v. 11, p. 82, 2010.

SHORE, S. A. et al. Effect of IL-1 beta on responses of cultured human airway smooth muscle cells to bronchodilator agonists. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol**, v. 16, p. 702–712, 1997.

SHORE, S. A. Cytokine regulation of betaadrenergic responses in airway smooth muscle. **J. Allergy Clin. Immunol.** v. 110, p. S255–S260, 2002.

SHORE, S. A.; et al. Responses to ozone are increased in obese mice. **J Appl Physiol**, v. 95, p. 938-945, 2003.

SHORE, S. A.; FREDBERG, J. J. Obesity, smooth muscle and airway hyperresponsiveness. **J Allergy Clin Immunol**, v. 115, p. 925-927, 2005.

SHUESSLER, T.F.; BATES, J.H.T. A computer-controlled research ventilator for a small animals: design and evaluation. **IEE Trans Biomed Eng**, v. 42, p. 860-866, 1995.

SIN, D.D.; JONES, R.L.; MAN, S.F. Obesity is a risk factor for dyspnea but not for airflow obstruction. **Arch Intern Med**, v. 162, p. 1477-1481, 2002.

SKURK, T. et al. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 92, p. 1023–1033, 2007.

SOTO GONZALEZ, A. et al. Predictors of the metabolic syndrome and correlation with computed axial tomography. **Nutrition**, v. 23, p. 36–45, 2007.

SUKI, B.; LUTCHEN, K. R.; INGENITO, E. P. On the progressive nature of emphysema roles of proteases, inflammation, and mechanical forces. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 168, p. 516-521, 2003.

SUKI, B. et al. Biomechanics of the lung parenchyma: critical roles of collagen and mechanical forces. **J Appl Physiol**, v. 98, p. 1892–1899, 2005.

SUN, Z.; ZHANG, Z. C.; LIU, Z. C. Experimental study of diet-induced obesity animal model. **Chin Pharmacol Bull**, v. 18, p. 466–467, 2002.

TAGAYA, E.; TAMAOKI, J. Mechanisms of airway remodeling in asthma. **Allergology International**, v. 56, p. 331-340, 2007.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 6, p. 772-783, 2006.

VEJA, G. L. Cardiovascular Outcomes for Obesity and Metabolic Syndrome. **Obes. Res**, v. 10, n. 1, p. S27-S32, 2002.

VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, G.; PIMENTA, A. M.; E KAC, G. Epidemiologia do sobrepeso e da obesidade e seus fatores determinantes em Belo Horizonte (MG), Brasil: estudo transversal de base populacional. **Rev Panam Salud Publica**, v. 16, n. 5, p. 308–314, 2004.

VELKOSKA, E.; COLE, T. J.; MORRIS, M. J. Early dietary intervention: long-term effects on blood pressure, brain neuropeptide Y, and adiposity markers. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 288, p. E1236–E1243, 2005.

WAGERS, S. et al. Nonlinearity of respiratory mechanics during bronchoconstriction in mice with airway inflammation. **J Appl Physiol**, v. 92, p. 1802-1807, 2002.

WAJCHENBERG, B. L. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. **Endocr Ver**, v. 21, n. 6, p. 697-738, 2000.

WAJCHENBERG, B. L. et al. Depot-specific hormonal characteristics of subcutaneous and visceral adipose tissue and their relation to the metabolic syndrome. **Horm Metab Res**, v. 34, p. 616-621, 2002.

WEIBEL, E. R. “Morphometry: stereological theory and practical methods”, In: Gil J. (Ed.), **Models of lung disease-microscopy and structural methods**, New York, p. 199–247, 1990.

WEINBERGER, M. Airways reactivity in patients with CF. **Clin Rev Allerg Immunol**, v. 23, n. 1, p. 77-85, 2002.

WEISS, S. T.; SHORE, S. Obesity and asthma: directions for research. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 169, p. 963-968, 2004.

WENZEL, S. Mechanisms of severe asthma. **Clin Exp Allergy**, v. 33, n. 12, p. 1622-1628, 2003.

WEST, D. B.; YORK, B. Dietary fat, genetic predisposition, and obesity: lessons from animal models. **Am J Clin Nutr**, v. 67, p. 505S-512S, 1998.

WHITE, C. L.; PURPERA, M. N.; MORRISON, C. D. Maternal obesity is necessary for programming effect of high-fat diet on offspring. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 296: p. R1464–R1472, 2009.

WOODS, S.C. et al. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. **J Nutr**, v. 133, p. 1081–1087, 2003.

YANG, K. Adipose tissue protocols. **Human Press**, v. 2 ed, 2008.

YUAN, H.; INGENITO, E. P.; SUKI, B. Dynamic properties of lung parenchyma: mechanical contributions of fiber network and interstitial cells. **J Appl Physiol**, v. 83, p. 1420-1431, 1997.

YUAN, H. et al. Effects of collagenase and elastase on the mechanical properties of lung tissue strips. **J Appl Physiol**, v. 89, p. 3–14, 2000.